

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 768 229**

51 Int. Cl.:

A61K 9/16	(2006.01) A61P 25/00	(2006.01)
A61K 9/51	(2006.01) A61P 21/00	(2006.01)
A61K 31/53	(2006.01) A61K 31/00	(2006.01)
A61K 35/30	(2015.01)	
A61K 35/545	(2015.01)	
A61K 35/54	(2015.01)	
A61K 38/17	(2006.01)	
A61K 38/18	(2006.01)	
A61K 38/30	(2006.01)	
A61K 31/203	(2006.01)	

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **06.07.2011 PCT/EP2011/061377**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **12.01.2012 WO12004291**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.07.2011 E 11745497 (5)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.11.2019 EP 2590661**

54 Título: **Método mejorado para diferenciación de células madre in vivo mediante la administración de morfógenos con sílice mesoporosa y principios activos farmacéuticos correspondientes**

30 Prioridad:

06.07.2010 US 361741 P

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

22.06.2020

73 Titular/es:

**NANOLOGICA AB (100.0%)
P.O Box 8182
104 20 Stockholm, SE**

72 Inventor/es:

**GARCIA-BENNETT, ALFONSO, E. y
KOZLOVA, ELENA NICKOLAEVNA**

74 Agente/Representante:

DEL VALLE VALIENTE, Sonia

ES 2 768 229 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

Método mejorado para diferenciación de células madre *in vivo* mediante la administración de morfógenos con sílice mesoporosa y principios activos farmacéuticos correspondientes

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a un sistema de administración para la administración de un principio activo farmacéutico que comprende conjuntos compuestos por células madre y sílice porosa, preferiblemente sílice mesoporosa, que contienen un conjunto definido de factores de diferenciación para la diferenciación deseada de diferentes tipos de células, para su uso en la administración controlada del agente liberable para controlar la diferenciación de células madre después del trasplante de células madre coimplantadas con la sílice mesoporosa, para el tratamiento de la enfermedad de Parkinson o esclerosis lateral amiotrófica o atrofia muscular espinal o accidente cerebrovascular o traumatismo craneoencefálico o de médula espinal.

15 **Antecedentes de la invención**

La investigación experimental con células madre ha logrado un enorme progreso durante los últimos años en la generación de tipos deseados de células *in vitro*, que pueden usarse en medicina regenerativa. Estos protocolos *in vitro* han confirmado que factores extrínsecos/morfógenos pueden inducir la expresión de factores de transcripción (TF) específicos, que establecen códigos moleculares para la identidad de la diferenciación de células madre. La identificación de factores extrínsecos que transducen sus efectos a través de códigos de TF en la diferenciación de células madre y la exploración de esta información para el desarrollo de sistemas de administración para estos factores a células madre trasplantadas puede dar como resultado la traducción de protocolos *in vitro* a aplicaciones *in vivo*. En la solicitud de patente WO2008/002250 que tiene el título "Improved Stem Cells For Transplantation And Métodos For Production Thereof" se describe un método para controlar la diferenciación de células madre después del trasplante mediante la expresión controlada de TF en las células trasplantadas usando sistemas de regulación inducibles por fármacos.

El trasplante de células madre es una estrategia atractiva para la sustitución de células específicas que se pierden permanentemente o no son funcionales como resultado de una lesión o enfermedad. Las células madre trasplantadas también pueden promover la reparación tisular a través de efectos protectores tróficos y celulares, es decir, sin sustituir las células específicas que se han perdido por lesión o enfermedad. Aunque tales efectos "inespecíficos" pueden ser beneficiosos e importantes, el objetivo final del trasplante de células madre sigue siendo sustituir las células dañadas o enfermas por células completamente funcionales del mismo tipo. El entorno en el que se encontrarán las células madre/progenitoras trasplantadas es predominantemente adulto y marcado por respuestas patológicas. Para que la terapia de sustitución celular sea satisfactoria, es importante entender estas respuestas y o bien cómo pueden modificarse para proporcionar un entorno del huésped que sea compatible con la supervivencia a largo plazo y la diferenciación deseada o bien cómo puede cambiarse este entorno, de modo que las células trasplantadas no se vean afectadas por estímulos externos negativos.

Los resultados de numerosos experimentos *in vitro* e *in vivo* han demostrado de manera convincente que la expresión oportuna de determinados factores intrínsecos para las células, los factores de transcripción, durante el desarrollo normal o durante la diferenciación de células madre *in vitro* puede ser suficiente para inducir y, en algunos casos guiar, la diferenciación de células madre. Usando el sistema de regulación génica de tetraciclina para inducir la expresión del factor de transcripción clave Runx1 en células madre de la cresta neural que expresan Sox10, se logró una diferenciación específica de neuronas nociceptivas *in vitro* y *en vivo* después del trasplante (Aldskogius H, Berens C, Kanaykina N, *et al.* Regulation of boundary cap neural crest stem cell differentiation after transplantation. Stem Cells 2009;27:1592-603). Por tanto, con el fin de lograr una expresión tan oportuna de factores intrínsecos y de transcripción celular, se desea lograr la liberación cinética de moléculas reguladoras de genes a través del uso de un vehículo de administración.

Otra posibilidad para promover la protección tisular y/o la diferenciación de células madre tras del trasplante es crear un entorno adecuado para las células trasplantadas. Esto puede lograrse mediante el cotrasplante de células de soporte o el uso de minibombas osmóticas que proporcionan sustancias para mejorar la supervivencia, la diferenciación y la función de las células trasplantadas. El cotrasplante de células madre de la cresta neural con islotes pancreáticos mostró efectos beneficiosos tanto para los islotes como para las células madre con secreción de insulina mejorada, proliferación de células beta mejorada y diferenciación avanzada de las células madre de la cresta neural en las proximidades de los islotes (Olerud J, Kanaykina N, Vasylovska S, *et al.* Neural crest stem cells increase beta cell proliferation and improve islet function in co-transplanted murine pancreatic islets. Diabetologia 2009;52:2594-601. Fe de erratas en: Diabetologia. 2010;53:396. Vasilovska, S [corregido a Vasylovska, S]).

En cuanto a la administración, se han desarrollado partículas porosas para la administración de fármacos debido a su potencial para controlar (retrasar) la liberación del fármaco, potenciar la disolución del fármaco, promover la penetración del fármaco a través de la pared celular intestinal (biodisponibilidad) y mejorar la estabilidad del fármaco en el entorno extremo del tracto gastrointestinal cuando se administra por vía oral (Vallhov H, Gabrielsson S,

Strømme M, *et al.* Mesoporous silica particles induce size dependent effects on human dendritic cells. *Nano Lett* 2007; 7: 3576-82; Fadeel B, García-Bennett AE. Better safe than sorry: Understanding the toxicological properties of inorganic nanoparticles manufactured for biomedical applications. *Adv Drug Deliv Rev* 2010;62:362-74).

5 El documento WO2009/100128 da a conocer el uso del factor de crecimiento para el tratamiento de enfermedades cardiovasculares, por lo que los factores están comprendidos en partículas. Las partículas se administran localmente dentro de las células antes del trasplante de dichas células.

10 El documento US2010/0055167, da a conocer el uso de un agente anticanceroso y un resto de direccionamiento comprendidos en un vehículo que está presente dentro de una célula madre modificada para seleccionar como diana células de glioma. El vehículo comprende al menos un agente neoplásico.

El documento US2007/160639 da a conocer sistemas de administración para diferentes fármacos.

15 El documento US2005/0019801 da a conocer métodos de identificación y/o caracterización de agentes que promueven la diferenciación de células madre en un tipo de célula diferenciada particular.

Factores externos para la diferenciación celular

20 Casi todas las decisiones de desarrollo durante la embriogénesis están reguladas por un número relativamente pequeño de familias de morfógenos y factores de crecimiento secretados, incluyendo factores de crecimiento de fibroblastos (FGF) (Böttcher RT, Niehrs C. Fibroblast growth factor signaling during early vertebrate development. *Endocr Rev* 2005;26:63-77), Wnt (Logan CY, Nusse R. The Wnt signaling pathway in development and disease. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2004;20:781-810), miembros de la familia de factores de crecimiento transformantes (TGF)-
 25 beta (Massagué J. TGF-beta signal transduction. *Annu Rev Biochem* 1998;67:753-91) y proteínas Hedgehog (hh) (McMahon AP, Ingham PW, Tabin CJ. Developmental roles and clinical significance of hedgehog signaling. *Curr Top Dev Biol* 2003;53:1-114). Las primeras pistas sobre la naturaleza molecular de la influencia inductiva del organizador (señales de una región del mesodermo dorsal) proceden de estudios de un receptor para miembros de la superfamilia TGF-beta y Nogina, un factor secretado expresado por el organizador (Hemmati-Brivanlou A, Melton
 30 DA, A truncated activin receptor inhibits mesoderm induction and formation of axial structures in *Xenopus* embryos. *Nature* 1992;359:609-14; Smith WC, Harland RM. Expression cloning of noggin, a new dorsalizing factor localized to the Spemann organizer in *Xenopus* embryos. *Cell* 1992;70:829-40; Lamb TM, Knecht AK, Smith WC, *et al.* Neural induction by the secreted polypeptide noggin. *Science* 1993;262:713-8). Las células madre embrionarias (ES) se diferencian en las células madre neurales basándose en el tratamiento con FGF4/Notch seguido por el tratamiento
 35 con FGF/factor de crecimiento epidérmico (EGF) descrito en [http:// www.cscr.cam.ac.uk/asmith.html](http://www.cscr.cam.ac.uk/asmith.html). La red de señalización de células madre, y específicamente las cascadas de señalización de Wnt, Notch, FGF y BMP, están implicadas en la regulación del equilibrio para células madre neurales, células progenitoras y células neurales diferenciadas (Israsena N, Hu M, Fu W, *et al.* The presence of FGF2 signaling determines whether beta-catenin exerts effects on proliferation or neuronal differentiation of neural stem cells. *Dev Biol* 2004;268:220-31; Akai J, Halley PA, Storey KG. FGF-dependent Notch signaling maintains the spinal cord stem zone. *Genes Dev* 2005;19:2877-87).

Sonic Hedgehog (Shh)

45 Shh desempeña un papel destacado en el diseño del tubo neural en desarrollo (Lee KJ, Jessell TM. The specification of dorsal cell fates in the vertebrate central nervous system. *Annu Rev Neurosci* 1999;22:261-94; Tanabe Y, Jessell TM. Diversity and pattern in the developing spinal cord. *Science* 1996;274:1115-23. Review. Fe de erratas en: *Science* 1997;276:21). La aplicación ectópica de Shh es suficiente para inducir la formación de neuronas motoras en el tubo neural dorsal (Ericson J, Morton S, Kawakami A, *et al.* Two critical periods of Sonic Hedgehog signaling required for the specification of motor neuron identity. *Cell* 1996;87:661-73; Ericson J, Muhr J, Placzek M, *et al.* Sonic hedgehog induces the differentiation of ventral forebrain neurons: a common signal for ventral patterning within the neural tube. *Cell* 1995;81:747-56. Fe de erratas en: *Cell* 1995;82:tras 165) y en cultivo (Hu BY, Zhang SC. Differentiation of spinal motor neurons from pluripotent human stem cells. *Nat Protoc* 2009;4:1295-304). Shh tanto
 50 diseña destinos celulares a lo largo del eje dorso-ventral de la médula espinal como regula el número de células a través de sus efectos sobre la proliferación y la muerte celular programada (Ericson J, Morton S, Kawakami A, *et al.* Two critical periods of Sonic Hedgehog signaling required for the specification of motor neuron identity. *Cell* 1996; 87: 661-73; Oppenheim RW, Homma S, Marti E, *et al.* Modulation of early but not later stages of programmed cell death in embryonic avian spinal cord by sonic hedgehog. *Mol Cell Neurosci* 1999;13:348-61).

60 Shh promueve la proliferación de la cresta neural (Fu M, Lui VC, Sham MH, Pachnis V, *et al.* Sonic hedgehog regulates the proliferation, differentiation, y migration of enteric neural crest cells in gut. *J Cell Biol* 2004;166:673-84) y la supervivencia (Ahlgren SC, Bronner-Fraser M. Inhibition of sonic hedgehog signaling *in vivo* results in craniofacial neural crest cell death. *Curr Biol* 1999;9:1304-14; Ahlgren SC, Thakur V, Bronner-Fraser M. Sonic hedgehog rescues cranial neural crest from cell death induced by ethanol exposure. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99:10476-81) además de regular la movilidad de la cresta neural (Testaz S, Jarov A, Williams KP, *et al.* Sonic hedgehog restricts adhesion and migration of neural crest cells independently of the Patched- Smoothed-Gli signaling pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98:12521-6). Además, Shh promueve tanto la proliferación celular

como la muerte celular programada (PCD) de las células tempranas del ganglio de la raíz dorsal (DRG) regulando así el número de células DRG, la distribución de fenotipos sensoriales y el hallazgo de la ruta sensorial (Guan W, Wang G, Scott SA, *et al.* Shh influences cell number and the distribution of neuronal subtypes in dorsal root ganglia. *Dev Biol* 2008;314:317-28).

5

Ácido retinoico (RA)

El ácido retinoico es otra molécula de señalización con un efecto pronunciado sobre la diferenciación y la supervivencia de neuronas del SNC en vertebrados en desarrollo (Maden, M. Retinoid signalling in the development of the central nervous system. *Nat Rev Neurosci* 2002;3:843-53; Appel B, Eisen JS. Retinoids run rampant: multiple roles durante spinal cord and motor neuron development. *Neuron* 2003;40:461-4). El ácido retinoico puede estimular tanto el número de neuritas como la longitud de las neuritas (Maden, M. Role and distribution of retinoic acid during CNS development. *Int Rev Cytol* 2001;209:1-77); y está implicado en la regeneración del nervio periférico lesionado (Zhelyaznik N, Schrage K, McCaffery P, *et al.* Activation of retinoic acid signaling after sciatic nerve injury: up-regulation of cellular retinoid binding proteins. *Eur J Neurosci* 2003;18:1033-40). En las neuronas DRG embrionarias, RARb2 media la excrecencia de neuritas inducida por ácido retinoico (Corcoran J, Shroot B, Pizzey J, *et al.* The role of retinoic acid receptors in neurite outgrowth from different populations of embryonic mouse dorsal root ganglia. *J. Cell Sci* 2000;113:2567-74). Recientemente se demostró que la expresión inducida de RAR-beta2 en neuronas DRG adultas es suficiente para impulsar el crecimiento de sus axones a través de la superficie de contacto no permisiva entre la raíz dorsal y la médula espinal, la zona de transición de la raíz dorsal (DRTZ) y hacia la médula espinal (Wong LF, Yip PK, Battaglia A, *et al.* Retinoic acid receptor beta2 promotes functional regeneration of sensory axons in the spinal cord. *Nat Neurosci* 2006;9:243-50).

Wnt

Otro grupo de moléculas implicadas en la organización de la embriogénesis son los miembros de la familia Wnt. FZD1, FZD2, FZD3, FZD4, FZD5, FZD6, FZD7, FZD8, FZD9, FZD10, LRP5, LRP6 y ROR2 son receptores transmembrana que transducen señales de Wnt basándose en la preferencia dependiente de ligando para la endocitosis mediada por caveolina o clacitrina. Las señales de Wnt se transducen a la ruta canónica para la determinación del destino celular y a rutas no canónicas para la regulación de la polaridad celular plana, la adhesión celular y la movilidad. Por tanto, para la cascada de señalización de Wnt canónica, MYC, CCND1, AXIN2, FGF20, WISP1, JAG1, DKK1 y glucagón son genes diana, mientras que CD44, vimentina y STX5 son genes diana de cascadas de señalización de Wnt no canónicas.

Los genes diana de las cascadas de señalización de Wnt dependen del perfil de expresión de los factores de transcripción y del estado epigenético. Las cascadas de señalización de Wnt asociadas con las cascadas de señalización de Notch, FGF, BMP y Hedgehog regulan el equilibrio de las células madre mesenquimatosas, las células madre hematopoyéticas y las células madre intestinales y sus células progenitoras. Wnt3, Wnt5A y Wnt10B se expresan en células madre embrionarias humanas indiferenciadas, mientras que Wnt6, Wnt8B y Wnt10B se expresan en células precursoras de endodermo. Wnt6 se expresa en la región de la cripta intestinal para células madre o progenitoras. La señalización de TNF/alfa-Wnt10B mantiene la homeostasis del tejido adiposo y la mucosa gastrointestinal con inflamación crónica.

La proteína Wnt recombinante o mimético de Wnt (péptido circular, compuesto de molécula pequeña o aptámero de ARN) en combinación con mimético de Notch, FGF y BMP (Kato M. WNT signaling in stem cell biology and regenerative medicine. *Curr Drug Targets* 2008;9:565-70) abren una nueva ventana a la aplicación de sílice mesoporosa en la regulación de la diferenciación de células madre.

La ruta de señalización de Wnt es de importancia crítica para la organogénesis y el desarrollo de la planificación corporal. La señalización de Wnt dependiente de beta-catenina/TCF7L2 (la vía canónica) está implicada en el desarrollo del páncreas, la función de los islotes y la producción y secreción de insulina. La hormona glucocretina, péptido 1 similar al glucagón, y el factor 1 derivado de las células estromales, quimiocina, modulan la señalización de Wnt canónica en células beta, que es obligatoria para sus acciones mitogénicas y citoprotectoras. El factor de transcripción TCF7L2 está asociado de manera particularmente fuerte con un riesgo de diabetes y parece ser fundamentalmente importante tanto en la señalización de Wnt canónica como en la función de las células beta.

Se muestra un papel inhibitorio para Wnt en una función de represión para la señalización de Wnt en la inducción neural de ratón. Los mutantes de ratón que carecen de efectores de la señalización de Wnt dependiente de beta-catenina, tales como Wnt3a, muestran un aumento del tejido neural e incluso de los tubos neurales ectópicos (Yoshikawa Y, Fujimori T, McMahon AP, *et al.* Evidence that absence of Wnt-3a signaling promotes neutralization instead of paraxial mesoderm development in the mouse. *Dev Biol* 1997;183:234-42). De manera similar, la mutación de los correceptores de Wnt, Lrp5 y Lrp6, da como resultado una expansión del neuroectodermo anterior (Kelly OG, Pinson KI, Skarnes WC. The Wnt co-receptors Lrp5 and Lrp6 are essential for gastrulation in mice. *Development* 2004; 131:2803-15). De acuerdo con este papel regulador negativo, la pérdida de Dickkopf (Dkk), un inhibidor de Wnt, impide el desarrollo del prosencéfalo (Mukhopadhyay M, Shtrom S, Rodriguez-Esteban C, *et al.* Dickkopf1 is required for embryonic head induction and limb morphogenesis in the mouse. *Dev Cell* 2001;1: 423-34).

Proteína morfogenética ósea (BMP)

La figura 1 muestra esquemáticamente la inducción neural *in vitro*. Muchos inductores neurales *in vivo* que actúan como inhibidores de las BMP, la señalización nodal y de Wnt también promueven la diferenciación de células ES en células neurales comprometidas. En cambio, no se sabe que la RA, que promueve la inducción neural en ESC, sea importante para la inducción neural *in vivo* (Gaulden J, Reiter JF. Neur-ons y neur-offs: regulators of neural induction in vertebrate embryos and embryonic stem cells. Hum Mol Genet 2008; 17:R60-6).

Factores de crecimiento de fibroblastos (FGF)

En apoyo de la participación de los FGF en la inducción neural, los FGF pueden actuar de manera cooperativa con inhibición de BMP para promover la inducción neural de *Xenopus* (Reversade B, Kuroda H, Lee H, *et al.* Depletion of Bmp2, Bmp4, Bmp7 y Spemann organizer signals induces massive brain formation in *Xenopus* embryos. Development 2005;132:3381-92). Un posible mecanismo molecular para esta cooperación funcional es a través de la convergencia de la ruta MAPK en la señalización de BMP a través de la fosforilación diferencial de Smad1, un importante efector de BMP (Pera EM, Ikeda A, Eivers E, *et al.* Integration of IGF, FGF, and anti-BMP signals via Smad1 fosforilation in neural induction. Genes Dev 2003;17:3023-8). GSK3, un componente e inhibidor de la ruta de Wnt, promueve la fosforilación y degradación adicionales de Smad1 después de una fosforilación de cebado por MAPK, lo que puede explicar de manera similar las propiedades antineuralizantes de Wnt (Fuentealba LC, Eivers E, Ikeda A, *et al.* Integrating patterning signals: Wnt/GSK3 regulates the duration of the BMP/Smad1 signal. Cell 2007;131:980-93).

Sin embargo, la mutación del sitio de fosforilación de MAPK de Smad1 no anula abiertamente la inducción neural en ratones, lo que sugiere que esta interacción no es esencial para los efectos de los FGF sobre la inducción neural (Aubin J, Davy A, Soriano P. In vivo convergence of BMP and MAPK signaling pathways: impact of differential Smad1 phosphorylation on development and homeostasis. Genes Dev 2004;18:1482-94). Otra posibilidad es que las señales tempranas de FGF regulan por disminución la expresión de BMP en el dominio neural prospectivo, permitiendo que continúe la diferenciación neural (Wilson SI, Graziano E, Harland R. An early requirement for FGF signalling in the acquisition of neural cell fate in the chick embryo. Curr Biol 2000;10:421-9; Furthauer M, Van Celst J, Thisse C, *et al.* Fgf signalling controls the dorsoventral patterning of the zebrafish embryo. Development 2004; 131:2853-64). Una tercera posibilidad es que la señalización temprana de FGF promueve el destino neural a través de un mecanismo paralelo, independiente de BMP (Delaune, E., Lemaire, P. y Kodjabachian, L. Neural induction in *Xenopus* requires early FGF signalling in addition to BMP inhibition. Development 2005;132: 299-310; Linker C, Stern CD. Neural induction requires BMP inhibition only as a late step, and involves signals other than FGF and Wnt antagonists. Development 2004;131:5671-81). Un mecanismo independiente de BMP puede implicar Wnt que, tal como se describió anteriormente, puede inhibir la inducción neural durante las etapas de gastrulación (Wilson SI, Rydstrom A, Trimborn T, *et al.* (2001) The status of Wnt signaling regulates neural and epidermal fates in the chick embryo. Nature 2001;411:325-30). Sin embargo, la adición de múltiples FGF, antagonistas de BMP y antagonistas de Wnt al epiblasto embrionario de pollo no es suficiente para inducir la expresión del marcador neural Sox2, lo que sugiere que todavía hay otras vías que regulan la inducción neural (Linker C, Stern CD. Neural induction requires BMP inhibition only as a late step, and involves signals other than FGF and Wnt antagonists. Development 2004;131:5671-81).

Mantenimiento y potenciación de la excrecencia axonal de células madre diferenciadas *in vivo*

Diferentes conjuntos de señales están implicados en la guía del crecimiento axonal: las señales de guía "canónicas": netrinas, slits, semaforinas y efrinas (O'Donnell M, Chance RK, Bashaw GJ. Axon growth and guidance: receptor regulation and signal transduction. Annu Rev Neurosci. 2009;32:383-412), los morfógenos de las familias Hedgehog, BMP y Wnt, y las moléculas de adhesión celular tales como N-cadherina, NCAM y LI-CAM (Skaper SD, Moore SE, Walsh FS. Cell signalling cascades regulating neuronal growth-promoting and inhibitory cues. Prog Neurobiol. diciembre de 2001;65(6):593-608). Una combinación de estas señales que trabajan en diferentes rangos ejerce un control direccional fino para el axón.

Mientras que la diferenciación neuronal inicial de las células madre implantadas puede lograrse *in vivo* exponiéndolas a los factores apropiados descritos anteriormente, la supervivencia óptima y la excrecencia axonal eficaz de estas células también depende de la presencia temprana de factores tróficos específicos en su entorno (Lindsay RM, Wiegand SJ, Altar CA, DiStefano PS. Neurotrophic factors: from molecule to man. Trends Neurosci. mayo de 1994;17(5):182-90). Estos factores señalan a través de receptores específicos expresados por las neuronas diana y regulan su expresión de genes que promueven la excrecencia de axones y la supervivencia. Por tanto, la administración de factores tróficos a células madre implantadas *in vivo* mejorará significativamente su supervivencia a largo plazo y su integración funcional. Los factores tróficos relevantes incluyen la familia de neurotrofinas (factor de crecimiento nervioso (NGF), factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), neurotrofina (NT)3 y NT4/5), la familia de factores de crecimiento relacionados con TGF-beta (factor neurotrófico derivado de línea celular de la glía (GDNF), artermina y persefina) (Airaksinen MS, Saarma M. The GDNF family: signalling, biological functions and therapeutic value. Nat Rev Neurosci. mayo de 2002;3(5):383-94), las citocinas, factor

neurotrófico ciliar (CNTF), factor inhibidor de leucemia (LIF), cardiotrofina 1 y oncostatina M (Murphy M, Dutton R, Koblar S, Cheema S, Bartlett P. Cytokines which signal through the LIF receptor and their actions in the nervous system. *Prog Neurobiol.* 1997 Ago;52(5):355-78), y la familia del factor neurotrófico cerebral de dopamina y factor neurotrófico derivado de astrocitos (CDNF/MANF) (Lindholm P, Saarma M. Novel CDNF/MANF family of neurotrophic factors. *Dev Neurobiol.* abril 2010;70(5):360-71).

Breve descripción de la invención

Las moléculas pequeñas que funcionan como agonistas o antagonistas de receptores celulares comprenden algunos de los agentes terapéuticos y sondas moleculares más valiosos. Su administración controlada a largo plazo a tejidos lesionados, enfermos o trasplantados puede tener efectos críticos sobre la diferenciación celular y la reparación tisular en las zonas diana. Según la presente invención, se han preparado sílices mesoporosas con tamaño de partícula controlado usando una variedad de métodos, por ejemplo, usando agentes anfífilos derivados de aminoácidos aniónicos y agentes de dirección de la coestructura de alcóxido silano (CSDA), denominadas sílices mesoporosas AMS-n (Shunai Che, Alfonso E. Garcia-Bennett, Toshiyuki Yokoi, Kazutami Sakamoto, Hironobu Kunieda, Osamu Terasaki, Takashi Tatsumi. A novel anionic surfactant templating route for synthesizing mesoporous silica with unique structure; *Nature Materials*, 2003, 2, 801). Los materiales mesoporosos se usan según la presente invención para controlar la diferenciación de células madre después del trasplante. Se evaluó cómo las partículas mesoporosas, incluyendo nanopartículas con porosidad bien definida, controlan la liberación del agonista de Sonic Hedgehog (Shh), purmorfamina (Pur), y el ácido retinoico (RA) durante periodos de tiempo prolongados que afectan a la supervivencia, la migración y la diferenciación de las células madre. Se demostró que la administración de RA y Pur a partir de AMS-n es eficaz para promover la diferenciación neuronal a partir de células madre embrionarias y células madre de la cresta neural regional *in vitro* e *in vivo*. Estos hallazgos indican que la administración mediada por sílice porosa de factores de diferenciación celular es un enfoque útil y ventajoso en las estrategias de trasplante y reparación de tejidos.

Por tanto, se ha usado un nuevo enfoque, el sistema de administración de sílice mesoporosa para la diferenciación inducida de células madre *in vitro* e *in vivo* después del trasplante con factores extrínsecos

La combinación de ambos métodos, factores intrínsecos y extrínsecos, facilitará el desarrollo de protocolos *in vivo* para la diferenciación de células madre controlada y reproducible que pueden traducirse en aplicación clínica.

Tal como se muestra mejor a continuación en el presente documento, según la presente invención, pueden emplearse partículas porosas para la administración controlada de factores de diferenciación para obtener el tipo deseado de células a partir de trasplantes de células madre. En la siguiente descripción, también se observará el efecto del material mesoporoso sobre la supervivencia de las células madre, la formación de cicatrices gliales y la migración de las células madre.

Para explorar la utilidad de esta tecnología de administración para la diferenciación de células madre, se ha preparado sílice mesoporosa con tamaño de poro y partículas controlado usando una variedad de moldes de formación de poros que incluyen tensioactivos y moléculas no tensioactivas, para la liberación controlada de purmorfamina, un agonista de Sonic Hedgehog (Shh) y ácido retinoico (RA) durante periodos de tiempo prolongados tras el cotrasplante con bNCSC, células madre embrionarias de ratón y ser humano.

La creación de tal sistema, que proporcionará un entorno *in vitro* y/o *in vivo* favorable para la supervivencia y la diferenciación de células madre, tiene un gran potencial para su uso en biología del desarrollo y estrategias de trasplante de células madre.

Se prevé que la administración oportuna de sustancias extracelulares, tales como factores de crecimiento de fibroblastos (FGF), Wnt, miembros de la familia de factores de crecimiento transformantes (TGF)-beta y proteínas Hedgehog (hh) a células madre/progenitoras trasplantadas, que están diferenciadas previamente *in vitro* antes del trasplante, puede conducir al desarrollo de protocolos *in vivo* para la diferenciación controlada de células madre.

Sumario de la invención

La presente invención se refiere a un sistema de administración que puede usarse en un método para estimular la supervivencia y la diferenciación de células madre trasplantadas mediante la administración de factores externos definidos a partir de sílice mesoporosa. El sistema de administración es, entre otras cosas, adecuado para el trasplante de ESC e iPSC humanas, células madre específicas de tejido humano y células madre mesenquimatosas en una clínica, así como para sistemas experimentales con células madre correspondientes de otras especies.

Los presentes inventores han encontrado que las ESC humanas pueden forzarse a diferenciarse en neuronas mediante la administración local del agonista de Sonic Hedgehog, purmorfamina (Pur), y ácido retinoico (RA) a partir de nanopartículas mesoporosas. Por tanto, este enfoque puede ser útil para mejorar la supervivencia inicial de células madre trasplantadas, así como para lograr la diferenciación deseada de estas células y mantener su viabilidad a largo plazo.

El sistema de administración puede usarse para potenciar la supervivencia celular durante la implantación de células madre.

5 El sistema de administración puede usarse para potenciación de la supervivencia de células madre implantadas durante y después de su diferenciación a partir de células madre en células completamente funcionales para sustituir la pérdida de células huésped no funcionales. Dicha potenciación puede lograrse mediante uno de los siguientes modos:

10 a) administración a partir de sílice mesoporosa de factores de supervivencia y diferenciación específicos para células madre implantadas y los derivados deseados,

15 b) administración a partir de sílice mesoporosa de factores de supervivencia y diferenciación específicos para células madre de la cresta neural coimplantadas y sus derivados deseados que tienen como objetivo proporcionar soporte trófico y reinervación funcional de las células madre usadas para la terapia de sustitución celular.

20 El sistema de administración, que puede usarse para potenciar la supervivencia celular de las células madre durante la implantación, también puede usarse como método terapéutico para tratar pacientes con trastornos para los cuales se requiere una terapia de sustitución celular. Dicho tratamiento puede lograrse mediante uno de los siguientes modos:

c) trasplantando ESC/iPSC u otras células madre, lo que produce células progenitoras deseadas antes o después del trasplante a pacientes con trastornos en los que las células se pierden permanentemente o son no funcionales.

25 d) trasplantando ECS/iPSC, lo que produce células deseadas o bien antes o bien después del trasplante a pacientes con trastornos en los que las células se pierden permanentemente o son no funcionales junto con células madre de la cresta neural. Dicho método terapéutico tiene el potencial de producir soporte neurotrófico e inervación específica a partir de bNCSC diferenciadas de células sustituidas recientemente diferenciadas.

30 El sistema de administración puede usarse para un método terapéutico dirigido a pacientes que requieren la reinervación de órganos y tejidos después del trasplante (trasplantes cardíacos, trasplantes de islotes pancreáticos, trasplantes de hígado, etc.) u órganos/tejidos recién creados a partir de células madre/progenitoras de diferentes fuentes, incluyendo transferencia nuclear de células somáticas, biopsia de embriones de células individuales, embriones detenidos, transferencia nuclear alterada y reprogramación de células somáticas. Dicho método
35 comprende usar sílice mesoporosa para la administración de factores de supervivencia y diferenciación para:

e) células madre trasplantadas,

40 f) células madre/progenitoras diferenciadas previamente *in vitro* para subtipos de neuronas sensoriales o subtipos de neuronas autónomas, o subtipos de células gliales,

g) para células madre de la cresta neural cotrasplantadas.

45 El sistema de administración puede usar kits para su uso con los métodos terapéuticos mencionados anteriormente.

El kit está ideado para la coimplantación de células madre con sílice mesoporosa que contiene la administración controlada de factores de supervivencia y diferenciación para la generación del tipo de células deseado para la terapia de sustitución celular. Estas células incluyen:

50 i) cardiomiocitos,

ii) células del músculo esquelético,

55 iii) células beta productoras de insulina,

iv) fotorreceptores retinianos,

v) neuronas dopaminérgicas del mesencéfalo,

60 vi) motoneuronas espinales,

vii) neuronas glutaminérgicas,

viii) neuronas gabaérgicas

65 ix) oligodendrocitos

x) astrocitos

5 El kit está ideado, por ejemplo, para un método de reinervación y soporte trófico de órganos después del trasplante u órganos/tejidos o bien creados a partir de células madre/progenitoras de diferentes fuentes, o bien trasplantados de donantes de órganos/tejidos.

Dicho kit comprende, además de las células madre, uno o más de los siguientes tipos de células en combinación con sílice mesoporosa que contiene factores de supervivencia y diferenciación para:

10 xi) células madre de la cresta neural cotrasplantadas,

xii) células madre/progenitoras diferenciadas previamente *in vitro* para subtipos de neuronas sensoriales o subtipos de neuronas autónomas, o subtipos de células gliales.

15 Los métodos y kits anteriores pueden comprender alternativamente células derivadas de animales, ya que estos métodos y kits pueden usarse para los fines veterinarios correspondientes.

20 La presente invención se refiere a un sistema de administración para la administración de un principio activo farmacéutico para la diferenciación celular para paliar deficiencias celulares y relacionadas con células en mamíferos que comprende sílice porosa que contiene agentes liberables que pueden contribuir a un entorno celular propicio para la diferenciación de células madre en células madre coimplantadas y/o en células madre endógenas.

25 Dicha sílice porosa se caracteriza por un área superficial mayor de 200 m²/g y un tamaño de poro de entre 1,5-50 nm.

La partícula de sílice porosa tienen una forma de partícula que comprende esferas, o partículas en forma de varilla.

30 La sílice porosa tiene preferiblemente un tamaño y/o tamaños medio(s) de partícula en el intervalo de entre 50-5000 nm y más preferiblemente está en forma de partículas sustancialmente esféricas que tienen un intervalo de tamaño de 200-500 nm.

35 En el principio activo de la invención, el agente liberable que puede contribuir a un entorno celular propicio para la diferenciación de células madre en células madre coimplantadas y/o en células madre endógenas es del 1-60% del peso total del principio farmacéutico activo que contiene sílice, y más preferiblemente entre el 10-45% en peso.

40 El sistema de administración para la administración de un principio activo farmacéutico para su uso en la eliminación de células madre coimplantadas indiferenciadas con potencial para la formación de tumores en un mamífero, comprende sílice porosa producida *in vitro* que contiene agentes liberables que pueden forzar a las células coimplantadas a convertirse en posmitóticas.

La sílice porosa producida *in vitro* tiene las características mencionadas anteriormente en lo que se refiere al área superficial y la porosidad.

45 Según una realización preferida, las células madre coimplantadas que se combinan con sílice mesoporosa se eligen del grupo que consiste en células madre regionales, células madre embrionarias (ES), células madre de la cresta neural, células madre neurales de cerebro y médula espinal, células madre mesenquimatosas, células madre endoteliales, células madre endodérmicas, células madre pluripotentes inducidas (iPS).

50 Preferiblemente, el/los agente(s) liberable(s) se selecciona(n) del grupo que consiste en morfógenos y factores de crecimiento secretados, incluyendo factores de crecimiento de fibroblastos (FGF), Wnt, miembros de la familia de factores de crecimiento transformantes (TGF)-beta, proteínas Hedgehog (hh), ácido retinoico, factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), Dickkopf (Dkk)-1, insulina, activina, SDF-1/CXCL12, pleiotrofina (PTN), factor de crecimiento similar a la insulina 2 (IGF2), efrina B1 (EFNB1) y AMPc.

55 La presente invención se refiere a un sistema de administración para la administración de un principio activo farmacéutico en mamíferos, que comprende un principio activo farmacéutico para diferenciación celular para paliar deficiencias celulares y relacionadas con células en mamíferos, comprendiendo dicho principio activo farmacéutico sílice porosa que contiene un agente liberable que puede contribuir a un entorno celular propicio para la diferenciación de células madre en células madre coimplantadas y/o en células madre endógenas, y células madre.

60 La invención se refiere a un sistema de administración para la administración de un principio activo farmacéutico en mamíferos, comprendiendo el principio activo farmacéutico un conjunto compuesto por células madre y sílice mesoporosa que contiene un agente liberable,

65 en el que dicha sílice porosa tiene un área superficial mayor de 200 m²/g y un tamaño de poro de entre 1,5-50 nm, y,

en el que las partículas de sílice porosa tienen una forma de partícula que comprende esferas o partículas en forma de varilla,

en el que el agente liberable se selecciona del grupo que consiste en factores de crecimiento de fibroblastos (FGF), Wnt, miembros de la familia de factores de crecimiento transformantes (TGF)-beta, proteínas Hedgehog (hh), ácido retinoico, factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), Dickkopf (Dkk)-1, insulina, activina, SDF-1/CXCL12, pleiotrofina (PTN), factor de crecimiento similar a la insulina 2 (IGF2), efrina B1 (EFNB1), AMPc, semaforinas, slits, netrinas, NCAM, L1-CAM, NGF, BDNF, NT3, NT4/5, GDNF, artemina, persefina, CNTF, LIF, oncostatina M, cardiotrofina 1, CDNF/MANF,

en el que dicho agente liberable es el 1-60% del peso total del principio activo farmacéutico,

para su uso en la administración controlada del agente liberable para controlar la diferenciación de células madre después del trasplante de células madre coimplantadas con la sílice mesoporosa,

para el tratamiento de la enfermedad de Parkinson o esclerosis lateral amiotrófica o atrofia muscular espinal o accidente cerebrovascular o traumatismo craneoencefálico o lesión medular.

Preferiblemente, dichas células se seleccionan del grupo que consiste en células madre regionales, células madre embrionarias (ES), células madre de la cresta neural, células madre neurales de cerebro y médula espinal, células madre mesenquimatosas, células madre endoteliales, células madre endodérmicas, células iPS.

Los ejemplos de agentes liberables incluyen morfógenos y factores de crecimiento secretados, incluyendo factores de crecimiento de fibroblastos (FGF), Wnt, miembros de la familia de factores de crecimiento transformantes (TGF)-beta, y proteínas Hedgehog (hh), ácido retinoico, VEGF, Dkk1, insulina, activina, SDF-1/CXCL12, pleiotrofina (PTN), factor de crecimiento similar a la insulina 2 (IGF2), y efrina B1 (EFNB1), AMPc.

Descripción detallada de la invención

Métodos para cargar factores de supervivencia y diferenciación en sílice mesoporosa

La presente invención incluye un método para cargar factores de diferenciación y potenciación de la supervivencia en partículas mesoporosas mediante las cuales el material de sílice porosa, ya sea un material calcinado o extraído con disolvente (véase Rambabu Atluri, Niklas Hedin, Alfonso E. García-Bennett. *Hydrothermal Phase transformations of cubic mesoporous solid AMS-6. Chemistry of Materials*, 2008, 20 (12), 3857-3866) se mezcla con la cantidad deseada de factores de diferenciación y potenciación de la supervivencia en un disolvente que disolverá o disolverá parcialmente los factores mencionados anteriormente. La mezcla puede agitarse, centrifugarse, secarse por pulverización o filtrarse después de periodos de entre 0,5 horas y 2 días a temperaturas de entre 0 y 80 grados centígrados. El sólido recuperado si la muestra se agita normalmente contiene entre el 20-49% en peso de factores dentro de los poros de la partícula de sílice, pero puede contener cantidades más altas si el proceso de carga se repite varias veces.

Fuentes de células donantes para trasplante de células madre

Se muestra la prueba de principio en el ejemplo de ESC y células madre neurales para diferenciar hacia el fenotipo neuronal bajo el efecto de factores extrínsecos administrados con AMS. Sin embargo, se prevé que con este método puede generarse diferenciación de diferentes tipos de células a partir de diferentes fuentes de células madre. Por tanto, en la siguiente sección se describen brevemente diferentes fuentes de células madre que se consideran para la terapia de sustitución celular.

Las células madre embrionarias (ES) pueden generar todos los tipos de células en el organismo y son muy prometedoras para la terapia de sustitución celular en aplicaciones clínicas. Las ESC se han aislado como líneas celulares homogéneas, pueden expandirse y modificarse para satisfacer las necesidades del paciente utilizando protocolos normalizados y optimizados.

El reciente descubrimiento de células madre pluripotentes inducidas (iPS) ofrece la posibilidad de generar células específicas de paciente, que pueden implantarse sin complicaciones éticas o inmunológicas. Varios laboratorios han demostrado que un conjunto limitado de menos de cuatro factores de transcripción es suficiente para la dediferenciación de la mayoría de los tipos de células somáticas al estado de iPS indiferenciado (Takahashi K, Yamanaka S. *Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. Cell* 2006;126:663-76; Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, *et al.* Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 2007;131:861-72; Huangfu D, Osafune K, Maehr R, *et al.* Induction of pluripotent stem cells from primary human fibroblasts with only Oct4 and Sox2. *Nat Biotechnol* 2008;26:1269-75; Carey BW, Markoulaki S, Hanna J, *et al.* Reprogramming of murine and human somatic cells using a single polycistronic vector. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009;106:157-62. Fe de erratas en: *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009;106:5449. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009;106:11818; Carey BW, Markoulaki S, Beard C, *et al.* Single-gene

transgenic mouse strains for reprogramming adult somatic cells. *Nat Methods* 2010;7:56-9; Silva J, Nichols J, Theunissen TW, *et al.* Nanog is the gateway to the pluripotent ground state. *Cell* 2009;138:722-37). El protocolo inicial de reprogramación de células adultas para obtener iPSC cultivadas planteó preocupaciones sobre su aplicabilidad terapéutica debido a la expresión del protooncogén c-myc, pero los protocolos mejorados más nuevos para la producción de células iPSC muestran que puede lograrse pluripotencia sin ninguna alteración genética de la célula adulta (Zhou H, Wu S, Joo JY, *et al.* Generation of induced pluripotent stem cells using recombinant proteins. *Cell Stem Cell* 2009;4:381-4. Fe de erratas en: *Cell Stem Cell* 2009;4:581). Estudios recientes han demostrado que la generación de células diferenciadas a partir de iPSC se produce a un ritmo más lento que para las ESC (Hu BY, Zhang SC. Directed differentiation of neural-stem cells and subtype-specific neurons from hESCs. *Methods Mol Biol* 2010;636:123-37), posiblemente debido a una diferencia genética en una región de desarrollo importante del cromosoma 12qF1 en el ratón (Stadtfeld M, Apostolou E, Akutsu H, *et al.* Aberrant silencing of imprinted genes on chromosome 12qF1 in mouse induced pluripotent stem cells. *Nature* 2010;465:175-8).

Las células madre/progenitoras específicas de tejido son una fuente atractiva para el trasplante, puesto que ya están comprometidas en cierta medida a la diferenciación hacia el/los tipo(s) de células deseado(s). Estas células se encontraron en la tiroides humana, con una capacidad intrínseca para generar células tiroideas y el potencial de producir células no tiroideas (Fierabracci A, Puglisi MA, Giuliani L, *et al.* Identification of an adult stem/progenitor cell-like population in the human thyroid. *J Endocrinol* 2008;198:471-87); en el páncreas humano adulto (Puglisi MA, Guilani L, Fierabracci A 2008 Identification and characterization of a novel expandable adult stem/progenitor cell population in the human exocrine pancreas. *J Endocrinol Invest* 2008;31:563-72), en el músculo esquelético humano (Alessandri G, Pagano S, Bez A, *et al.* Isolation and culture of human muscle-derived stem cells able to differentiate into myogenic and neurogenic cell lineages. *Lancet* 2004;364:1872-83), en corazón humano y murino (Messina E, De Angelis L, Frati G, *et al.* Isolation and expansion of adult cardiac stem cells from human and murine heart. *Circulation Res* 2004;95:911-21) y en vejiga humana (Fierabracci A, Caione P, Di Giovine M, *et al.* Identification and characterisation of adult stem/progenitor cells in the human bladder (Bladder spheroids): perspectives of application in pediatric surgery. *Ped Surg Int* 2007;23 837-9). Sin embargo, su potencial para la medicina regenerativa es cuestionable ya que estas células no siempre son de fácil acceso y a menudo son poco viables cuando se obtienen a partir de tejido adulto.

Las células madre mesenquimatosas (MSC) pueden recogerse fácilmente de, por ejemplo, médula ósea, tejido adiposo, sangre de cordón umbilical o amnios pueden diferenciarse en una variedad de tipos de células mesodérmicas y no mesodérmicas *in vitro* (Franco Lambert AP, Fraga Zandonai A, Bonatto D, *et al.* Differentiation of human adipose-derived adult stem cells into neuronal tissue: does it work? *Differentiation* 2009;77:221-8; Meirelles Lda S, Nardi NB. Methodology, biology and clinical applications of mesenchymal stem cells. *Front Biosci* 2009;14:4281-98 09) y pueden usarse para el trasplante autólogo. Las MSC tienen la capacidad de modificar procesos inmunitarios (Uccelli A, Moretta L, Pistola V. Mesenchymal stem cells in health and disease. *Nat Rev Immunol* 2008;8:726-36; Sadan O, Melamed E, Offen D. Bone-marrow-derived mesenchymal stem cell therapy for neurodegenerative diseases. *Expert Opin Biol Ther* 2009;9:1487-97) y se utilizaron para el trasplante en un estado indiferenciado con la intención de promover la reparación tisular en lugar de con el propósito de la sustitución celular (Kim SU, de Vellis J. Stem cell-based cell therapy in neurological diseases: a review. *J Neurosci Res* 2009;87:2183-200; Abdallah BM, Kassem M. The use of mesenchymal (skeletal) stem cells for treatment of degenerative diseases: current status and future perspectives. *J Cell Physiol* 2009;218:9-12). El trasplante de MSC ha recibido considerable atención en el tratamiento de la enfermedad de injerto contra huésped y mostró resultados prometedores en ensayos clínicos (Kebriaei P, Isola L, Bahceci E, *et al.* Adult human mesenchymal stem cells added to corticosteroid therapy for the treatment of acute graft-versus-host disease. *Biol Blood Marrow Transplant* 2009;15:804-11; Picinich SC, Mishra PJ, Mishra PJ, *et al.* The therapeutic potential of mesenchymal stem cells. *Cell- & tissue-based therapy. Expert Opin Biol Ther* 2007;7:965-73).

Estado actual del trasplante de células madre como terapia de sustitución celular para trastornos mayores

Hay una larga lista de estados médicos que son objetivos terapéuticos potenciales para el trasplante de células madre. Para algunos de estos trastornos, ningún tratamiento puede cambiar aun significativamente el curso de la enfermedad; para otros existe tratamiento, pero no cura la enfermedad o es insuficiente. En el presente documento se describen trastornos con un enorme impacto en los individuos afectados y en la sociedad, y en los que generalmente se cree que el tratamiento se beneficiará en gran medida a largo plazo de la terapia de sustitución celular mediante trasplantes de células madre. El trasplante de células madre en modelos animales de estos trastornos ha sido y sigue siendo objeto de una intensa investigación que proporciona evidencia, hasta cierto punto, de reparación estructural y mejora funcional. Además, los ensayos clínicos con trasplante de células madre ya se han llevado a cabo o están en preparación y los primeros iniciales muestran que este enfoque es factible y seguro, pero los beneficios terapéuticos son hasta ahora inconsistentes (revisado en Trounson A. New perspectives in human stem cell therapeutic research. *BMC Medicine* 2009;7:2).

1. Enfermedad miocárdica

La cardiopatía isquémica es la causa más común de muerte en el mundo occidental. Los cardiomiocitos son los elementos de contracción del corazón y la capacidad intrínseca del corazón para sustituir estas células es muy

limitada. Por tanto, el trasplante de células madre que pueden sustituir cardiomiocitos perdidos es una opción atractiva para tratar este estado. Se han generado cardiomiocitos *in vitro* a partir de una amplia variedad de células madre/progenitoras, incluyendo iPSC (Gai H, Leung EL, Costantino PD, *et al.* Generation and characterization of functional cardiomyocytes using induced pluripotent stem cells derived from human fibroblasts. *Cell Biol Int* 2009;33:1184-93; Kuzmenkin A, Liang H, Xu G, *et al.* Functional characterization of cardiomyocytes derived from murine induced pluripotent stem cells *in vitro*. *FASEB J* 2009;23:4168-80 Pfannkuche K, Liang H, Hannes T, *et al.* Cardiac myocytes derived from murine reprogrammed fibroblasts: intact hormonal regulation, cardiac ion channel expression and development of contractility. *Cell Physiol Biochem* 2009;24:73-86), ESC (Beqqali A, van Eldika W, Mummery C, *et al.* Human stem cells as a model for cardiac differentiation and disease *Cell Mol Life Sci* 2009;66:800-13; Steel D, Hyllner J, Sartipy P. Cardiomyocytes derived from human embryonic stem cells - characteristics and utility for drug discovery. *Curr Opin Drug Discov Dev* 2009;12:133-40), células progenitoras/madre hematopoyéticas, MSC (Choi SC, Shim WJ, Lim DS. Specific monitoring of cardiomyogenic and endothelial differentiation by dual promoter-driven reporter systems in bone marrow mesenchymal stem cells. *Biotechnol Lett* 2008;30:835-43; Antonitsis P, Ioannidou-Papagiannaki E, Kaidoglou A, *et al.* Cardiomyogenic potential of human adult bone marrow mesenchymal stem cells *in vitro*. *Thorac Cardiovasc Surg* 2008;56:77-82; Ge D, Liu X, Li L, *et al.* Chemical and physical stimuli induce cardiomyocyte differentiation from stem cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2009;381:317-21; Gwak SJ, Bhang SH, Yang HS, *et al.* In vitro cardiomyogenic differentiation of adipose-derived stromal cells using transforming growth factor-beta 1. *Cell Biochem Funct* 2009;27:148-54) y células progenitoras de cardiomiocitos (Smits AM, van Vliet P, Metz CH, *et al.* Human cardiomyocyte progenitor cells differentiate into functional mature cardiomyocytes: an *in vitro* model for studying human cardiac physiology and pathophysiology. *Nat Protoc* 2009;4:232-43).

Una fuente adicional para la reparación de la contractilidad miocárdica son los mioblastos esqueléticos (Nomura T, Ueyama T, Ashihara E, *et al.* Skeletal muscle-derived progenitors capable of differentiating into cardiomyocytes proliferate through myostatin-independent TGF-beta family signaling. *Biochem Biophys Res Commun* 2008;365:863-9), aunque no parecen poder diferenciarse en cardiomiocitos (Reinecke H, Poppa V, Murry CE. Skeletal muscle stem cells do not transdifferentiate into cardiomyocytes after cardiac grafting. *J Mol Cell Cardiol* 2002;34:241-9; Leobon B, Garcin I, Menasche P, *et al.* Myoblasts transplanted into rat infarcted myocardium are functionally isolated from their host. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100:7808-11). Se ha demostrado que la administración intravascular o los trasplantes cardíacos de células cardiogénicas multipotentes o diferenciadas previamente de estas fuentes de células madre promueven la reparación estructural cardíaca y el restablecimiento funcional en modelos animales de lesión miocárdica (Fukushima S, Coppens SR, Lee J, *et al.* Choice of cell-delivery route for skeletal myoblast transplantation for treating post-infarction chronic heart failure in rat. *PLoS One* 2008;3:e3071; Hendry SL 2nd, van der Bogt KE, Sheikh AY, *et al.* Multimodal evaluation of *in vivo* magnetic resonance imaging of myocardial restoration by mouse embryonic stem cells. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2008;136:1028-37; Matsuura K, Honda A, Nagai T, *et al.* Transplantation of cardiac progenitor cells ameliorates cardiac dysfunction after myocardial infarction in mice. *J Clin Invest* 2009;119:2204-17; Jin J, Jeong SI, Shin YM, *et al.* Transplantation of mesenchymal stem cells within a poly(lactide-co-epsilon-caprolactone) scaffold improves cardiac function in a rat myocardial infarction model. *Eur J Heart Fail* 2009;11:147-53; Okura H, Matsuyama A, Lee CM, *et al.* Cardiomyoblast-like cells differentiated from human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells improve left ventricular dysfunction and survival in a rat myocardial infarction model. *Tissue Eng Part C Methods* 2010;16:417-25).

Los alentadores resultados de esta investigación experimental han llevado a varios ensayos clínicos en pacientes con enfermedad miocárdica, usando diferentes tipos de células progenitoras/madre (Segers VF, Lee RT. Stem-cell therapy for cardiac disease. *Nature* 2008;451:937-42; Joggerst SJ, Hatzopoulos AK. Stem cell therapy for cardiac repair: benefits and barriers. *Exp Rev Molec Med Epub* 2009 Jul 8;11:e20; Piepoli MF. Transplantation of progenitor cells and regeneration of damaged myocardium: more facts or doubts? Insights from experimental and clinical studies. *J Cardiovasc Med* 2009;10:624-34).

50 Protocolo para cardiomiocitos

Se generaron progenitores de cardiomiocitos a partir de cuerpos embrioides de hESC tratados con activina A, BMP4 o con estos 2 + Wnt3 y bFGF. Los progenitores expresan Nkx2.5, Tbx5/20, Gata-4, Mef2c y Hand1/2. Su diferenciación en cardiomiocitos funcionales *in vitro* puede promoverse con VEGF y Dkk1 (Vidarsson H, Hyllner J, Sartipy P. Differentiation of human embryonic stem cells to cardiomyocytes for *in vitro* and *in vivo* applications. *Stem Cell Rev* 2010;6:108-20).

2. Trastornos del músculo esquelético

60 Las distrofias musculares incluyen un gran número de trastornos hereditarios caracterizados por degeneración grave y progresiva de fibras del músculo esquelético, lo que da como resultado incapacidad grave y, a menudo, muerte prematura. En vista de la base genética de este trastorno, el trasplante de células madre que pueden formar fibras musculares funcionales es un enfoque atractivo para curar estos trastornos.

65 Puede lograrse formación de miotubos a partir de células madre regionales (células satélite musculares) mediante la activación del factor de transcripción Pax7 bajo la influencia de FGF y HGF, seguido por los factores de transcripción

MyoD y MyoG (Yablonka-Reuveni Z, Day K, Vine A, *et al.* Defining the transcriptional signature of skeletal muscle stem cells. *J Anim Sci* 2008;86(14 Supl):E207-16). El ácido retinoico parece desempeñar un papel crítico en la generación de la fase progenitora muscular al activar la beta-catenina e inhibir BMP (Kennedy KA, Porter T, Mehta V *et al.* Retinoic acid enhances skeletal muscle progenitor formation and bypasses inhibition by bone morphogenetic protein 4 but not dominant negative beta-catenin. *BMC Biol* 2009;7:67).

Se han administrado células madre embrionarias (ser humano, ratón), células madre asociadas a la médula ósea (ser humano, ratón), células madre del sistema hematopoyético o vascular (ser humano, ratón), células madre derivadas de tejido adiposo (ser humano) y células precursoras asociadas al músculo esquelético (ser humano, ratón) por vía intramuscular (principalmente) o intravascular a modelos de distrofias musculares de ratón (Darabi R, Perlingeiro RC. Lineage-specific reprogramming as a strategy for cell therapy. *Cell Cycle* 2008;7:1732-7; Quattrocchi M, Cassano M, Crippa S *et al.* Cell therapy strategies and improvements for muscular dystrophy. *Cell Death Differ.* 30 de octubre de 2009 [Epub antes de la impresión]). Se han obtenido resultados prometedores con varios, pero no con todos estos enfoques. Los factores limitativos importantes incluyen la muerte temprana generalizada de las células injertadas, la incapacidad de las células injertadas para diferenciarse adecuadamente e integrarse funcionalmente con el tejido muscular del huésped. Se han realizado varios ensayos clínicos con trasplante de células madre miogénicas, pero con éxito limitado (Tedesco FS, Dellavalle A, Diaz-Manera J *et al.* Repairing skeletal muscle: regenerative potential of skeletal muscle stem cells. *J Clin Invest* 2010;120:11-9). Los resultados de estudios experimentales recientes que utilizan ESC son prometedores en lo que se refiere a la supervivencia y potencial de mejora funcional en modelos de distrofia muscular de ratón (Darabi R, Gehlbach K, Bachoo RM, *et al.* Functional skeletal muscle regeneration from differentiating embryonic stem cells. *Nat Med* 2008;14:134-43; Darabi R, Baik J, Clee M, *et al.* Engraftment of embryonic stem cell-derived myogenic progenitors in a dominant model of muscular dystrophy. *Exp Neurol* 2009;220:212-6).

El trasplante de células madre para la reparación del músculo disfuncional se ha sometido a prueba con cierto éxito en pacientes con incontinencia urinaria de esfuerzo, un trastorno común caracterizado por un tono reducido en el vaciado de la vejiga por regulación del músculo pélvico (Nikolavsky D, Chancellor MB. Stem cell therapy for stress urinary incontinence. *Neurourol Urodyn* 2010;29 Supl 1:S36-41).

Protocolo para las fibras del músculo esquelético

Los progenitores mesodérmicos que pueden generar fibras musculares expresan Pax3 y Pax 7. Pax3 actúa como regulador maestro para determinar un linaje miogénico (Darabi R, Gehlbach K, Bachoo RM, *et al.* Functional skeletal muscle regeneration from differentiating embryonic stem cells. *Nat Med* 2008;14:134-43; Darabi R, Santos FN, Perlingeiro RC. The therapeutic potential of embryonic and adult stem cells for skeletal muscle regeneration. *Stem Cell Rev* 2008;4:217-25). Un objetivo esencial para Pax3 parece ser la señalización FGF a través de FRGR4 (Lagha M, Kormish JD, Rocancourt D, *et al.* Pax3 regulation of FGF signaling affects the progression of embryonic progenitor cells into the myogenic program. *Genes Dev* 2008;22:1828-37; Lagha M, Sato T, Bajard L, *et al.* Regulation of skeletal muscle stem cell behavior by Pax3 and Pax7. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 2008;73:307-15) por FGF8, que en combinación con Shh promueven la expresión de los factores reguladores miogénicos (MRF) myf5 y myoD (Hammond CL, Hinits Y, Osborn DP *et al.* Signals and myogenic regulatory factors restrict pax3 and pax7 expression to dermomyotome-like tissue in zebrafish. *Dev Biol* 2007;302:504-21). Las fibras musculares esqueléticas también se generaron a partir de hESC a través de la generación de células madre mesenquimatosas multipotentes (Stavropoulos ME, Mengarelli I, Barberi T. Differentiation of multipotent mesenchymal precursors and skeletal myoblasts from human embryonic stem cells. *Curr Protoc Stem Cell Biol* 2009; Capítulo 1: Unidad 1F.8). Las células del músculo esquelético embrionario expresan NCAM y se clasifican por FACS después de la incubación con anti-NCAM. Las células clasificadas se diferencian en células musculares que se contraen espontáneamente *in vitro* y en la supervivencia a largo plazo después del trasplante a ratones con daño muscular inducido por toxinas. No se presentan datos funcionales. El ácido retinoico parece desempeñar un papel crítico en la generación de progenitores musculares mediante la activación de beta-catenina y la inhibición de BMP (Kennedy KA, Porter T, Mehta V *et al.* Retinoic acid enhances skeletal muscle progenitor formation and bypasses inhibition by bone morphogenetic protein 4 but not dominant negative beta-catenin. *BMC Biol* 2009;7:67).

3. Células beta productoras de insulina.

La diabetes tipo 1 se caracteriza por una pérdida mediada por el sistema inmunitario de células β productoras de insulina en los islotes pancreáticos de Langerhans. Hoy en día, el trasplante de páncreas en su totalidad o de islotes aislados se ha convertido en un tratamiento de elección para pacientes seleccionados con *diabetes mellitus* (Frank AM, Barker CF, Markmann JF Comparison of whole organ pancreas and isolated islet transplantation for type 1 diabetes. *Adv Surg* 2005;39:137-63; Ryan EA, Bigam D, Shapiro AM. Current indications for pancreas or islet transplant. *Diabetes Obes Metab* 2006;8:1-7). Sin embargo, los resultados a largo plazo después del trasplante de islotes son decepcionantes, observándose una función adecuada del injerto en menos del 10% de los pacientes después de cinco años (Ryan EA, Paty BW, Senior PA, *et al.* Five-year follow-up after clinical islet transplantation. *Diabetes* 2005;54:2060-9).

Además, el número de pacientes que necesitan nuevas células β supera con creces el acceso limitado al tejido de

los islotes para el trasplante. Por tanto, el trasplante de células madre para sustituir las células β perdidas es una terapia atractiva para el tratamiento a largo plazo de la diabetes tipo 1 y también para algunos casos de diabetes tipo 2. Las células β productoras de insulina se han generado a partir de varias fuentes, incluyendo ESC (Baharvand H, Jafary H, Massumi M, *et al.* Generation of insulin-secreting cells from human embryonic stem cells. *Dev Growth Differ* 2006;48:323-32; Schroeder IS, Rolletschek A, Blyszczuk P, *et al.* Differentiation of mouse embryonic stem cells to insulin-producing cells. *Nat Protoc* 2006;1:495-507; Marchand M, Schroeder IS, Markossian S, *et al.* Mouse ES cells over-expressing the transcription factor NeuroD1 show increased differentiation towards endocrine lineages and insulin-expressing cells. *Int J Dev Biol* 2009;53:569-78; Evans-Molina C, Vestermark GL, Mirmira RG. Development of insulin-producing cells from primitive biologic precursors. *Curr Opin Organ Transplant* 2009;14:56-63; Van Hoof D, D'Amour KA, German MS. Derivation of insulin-producing cells from human embryonic stem cells. *Stem Cell Res* 2009;3:73-87), células madre/progenitoras del páncreas exocrino (Demeterco C, Hao E, Lee SH, *et al.* Adult human beta-cell neogenesis? *Diabetes Obes Metab* 2009;11 Supl 4:46-53; Noguchi H, Oishi K, Ueda M, *et al.* Establishment of mouse pancreatic stem cell line. *Cell Transplant* 2009;18:563-71; Mato E, Lucas M, Petriz J, *et al.* Identification of a pancreatic stellate cell population with properties of progenitor cells: new role for stellate cells in the pancreas. *Biochem J* 2009;421:181-91), conductos biliares (Nagaya M, Kubota S, Isogai A, *et al.* Ductular cell proliferation in islet cell neogenesis induced by incomplete ligation of the pancreatic duct in dogs. *Surg Today* 2004;34:586-92), MSC de diversas fuentes (Parekh VS, Joglekar MV, Hardikar AA. Differentiation of human umbilical cord blood-derived mononuclear cells to endocrine pancreatic lineage. *Differentiation* 2009;78:232-40; Xie QP, Huang H, Xu B, *et al.* Human bone marrow mesenchymal stem cells differentiate into insulin-producing cells upon microenvironmental manipulation in vitro. *Differentiation* 2009;77:483-91; Kajiyama H, Hamazaki TS, Tokuhara M, *et al.* Pdx1-transfected adipose tissue-derived stem cells differentiate into insulin-producing cells in vivo and reduce hyperglycemia in diabetic mice. *Int J Dev Biol* 2009;54:699-705), de iPSC derivadas de fibroblastos de pacientes con diabetes tipo 1 (Maehr R, Chen S, Snitow M, *et al.* Generation of pluripotent stem cells from patients with type 1 diabetes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009;106:15768-73). Las ESC humanas se han convertido en células beta que pueden sintetizar insulina a través de un procedimiento gradual de regulación transcripcional que imita el desarrollo normal de las células beta (D'Amour KA, Agulnick AD, Eliazer S, *et al.* Efficient differentiation of human embryonic stem cells to definitive endoderm. *Nat Biotechnol.* 2005;23:1534-41; D'Amour KA, Bang AG, Eliazer S, *et al.* Production of pancreatic hormone-expressing endocrine cells from human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol* 2006;24:1392-401). También se demostró que las células pancreáticas exocrinas dan lugar a células β productoras de insulina mediante la reprogramación transcripcional con una combinación específica de los tres factores de transcripción Ngn3 (también conocido como Neurog3), Pdx1 y Mafa (Zhou Q, Brown J, Kanarek A, *et al.* In vivo reprogramming of adult pancreatic exocrine cells to beta-cells. *Nature* 2008;455:627-32).

El trasplante de ESC a ratones diabéticos también mejoró la homeostasis de la glucosa indirectamente al promover la neogénesis endógena de células β (Kodama M, Takeshita F, Kanegasaki S, *et al.* Pancreatic endocrine and exocrine cell ontogeny from renal capsule transplanted embryonic stem cells in streptozocin-injured mice. *J Histochem Cytochem* 2008;56:33-44). Las ESC humanas se diferenciaron previamente en endodermo pancreático comprometido desarrollado en células beta funcionales después del trasplante a ratones inmunocomprometidos (Kroon E, Martinson LA, Kadoya K, *et al.* Pancreatic endoderm derived from human embryonic stem cells generates glucose-responsive insulin-secreting cells in vivo. *Nat Biotechnol* 2008;26:443-52). Resulta interesante que el tratamiento de los receptores con la toxina de células beta estreptozotocina destruyó su población endógena de células beta, pero las células injertadas quedaron protegidas y proporcionaron una fuente funcional de insulina. Por tanto, aunque todavía no se ha logrado completamente la sustitución eficaz y reproducible de células β perdidas en la diabetes tipo 1 con trasplantes de células madre (revisado en Trounson A. New perspectives in human stem cell therapeutic research. *BMC Medicine* 2009;7:2), se han dado pasos prometedores en esta dirección.

Protocolo para células beta

El protocolo para generar células beta productoras de insulina a partir de hESC implica la restricción de linaje gradual que genera en secuencia: células endodérmicas definitivas (activina + Wnt3), endodermo del intestino proximal primitivo (FGF10 + KAAD-ciclopamina), endodermo del intestino proximal posterior (RA + FGF10 + KAAD-ciclopamina), endodermo pancreático y precursores endocrinos (extendina-4) y células productoras de hormonas (IGF1 + HGF). Los perfiles de los factores de transcripción son: Sox17, CER, FoxA2 y el receptor de citocinas CXCR4 (células endodérmicas definitivas), Hnf1B, Hnf4A (endodermo del intestino proximal primitivo), Pdx1, Hnf6, HlxB9 (endodermo del intestino proximal posterior), Nkx6.1, Nkx2.2, Ngn3, Pax4 (endodermo pancreático y precursores endocrinos). (D'Amour KA, Bang AG, Eliazer S, *et al.* Production of pancreatic hormone-expressing endocrine cells from human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol* 2006;24:1392-401; Kroon E, Martinson LA, Kadoya K, *et al.* Pancreatic endoderm derived from human embryonic stem cells generates glucose-responsive insulin-secreting cells in vivo. *Nat Biotechnol* 2008;26:443-52).

Se ha sugerido un protocolo mejorado que se centra en la regulación de las rutas de señalización clave de ESC a las células beta productoras de insulina (Champeris Tsaniras S, Jones PM. Generating pancreatic beta-cells from embryonic stem cells by manipulating signaling pathways. *J Endocrinol.* 12 de abril de 2010. [Epub antes de la impresión]). Según este protocolo, los principios son: mesendodermo (estimulando las rutas Wnt y ganglionares, regulando por disminución la ruta de la fosfatidilinositol 3-cinasa (PI3K)), endodermo definitivo (eliminación de Wnt), intestino proximal posterior (regulación por disminución de Wnt), endodermo pancreático (bloqueo de Shh),

precursores de células beta (bloqueo de Notch), células beta (bloqueo de PI3K, estimulación de Shh).

4. Enfermedad retiniana

5 La degeneración macular relacionada con la edad se asocia con la pérdida de fotorreceptores y es una causa común de ceguera o deficiencia visual grave en la población anciana occidental. Actualmente no existe ningún tratamiento eficaz para este trastorno. Se han identificado y caracterizado células madre en varias ubicaciones del ojo de mamíferos adultos, así como en las rutas moleculares que conducen a su diferenciación en diferentes tipos de células (Locker M, Borday C, Perron M. Stemness or not stemness? Current status and perspectives of adult retinal stem cells. *Curr Stem Cell Res Ther* 2009;4:118-30). Sin embargo, la captación de estas células *in vivo* para sustituir fotorreceptores perdidos hasta ahora ha resultado insatisfactoria. Por otro lado, se han generado fotorreceptores o células ganglionares de la retina a partir de iPSC, ESC y células madre/progenitoras de la retina *in vitro* (Mayer EJ, Carter DA, Ren Y *et al.* Neural progenitor cells from postmortem adult human retina. *Br J Ophthalmol* 2005;89:102-6; Zhao B, Allinson SL, Ma A *et al.* Targeted corneal limbal stem/progenitor cell transfection in an organ culture model. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2008;49:3395-40; Hiram Y, Osakada F, Takahashi K *et al.* Generation of retinal cells from mouse and human induced pluripotent stem cells. *Neurosci Lett* 2009;458:126-31; Osakada F, Jin ZB, Hiram Y *et al.* In vitro differentiation of retinal cells from human pluripotent stem cells by small-molecule induction. *J Cell Sci* 2009;122(Pt 17):3169-79). Después del trasplante, estas células pueden integrarse en la red retiniana, diferenciarse para dar fotorreceptores funcionales y ayudar a preservar o restablecer la función visual en el modelo experimental de degeneración retiniana (Klassen H. Transplantation of cultured progenitor cells to the mammalian retina. *Expert Opin Biol Ther* 2006;6:443-51; Klassen H, Schwartz PH, Ziaeiian B *et al.* Neural precursors isolated from the developing cat brain show retinal integration following transplantation to the retina of the dystrophic cat. *Vet Ophthalmol* 2007;10:245-53; Gias C, Jones M, Keegan D *et al.* Preservation of visual cortical function following retinal pigment epithelium transplantation in the RCS rat using optical imaging techniques. *Eur J Neurosci* 2007;25:1940-8 Pinilla I, Cuenca N, Sauvé Y *et al.* Preservation of outer retina and its synaptic connectivity following subretinal injections of human RPE cells in the Royal College of Surgeons rat. *Exp Eye Res* 2007;85:381-92; Wang S, Girman S, Lu B *et al.* Long-term vision rescue by human neural progenitors in a rat model of photoreceptor degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2008;49:3201-6; Chen FK, Uppal GS, MacLaren RE *et al.* Long-term visual and microperimetry outcomes following autologous retinal pigment epithelium choroid graft for neovascular age-related macular degeneration. *Clin Exp Ophthalmol* 2009;37:275-85). Los resultados de estudios preclínicos han verificado la seguridad de estos protocolos (Francis PJ, Wang S, Zhang Y *et al.* Subretinal transplantation of forebrain progenitor cells in nonhuman primates: survival and intact retinal function. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2009;50:3425-31; Lu B, Malcuit C, Wang S *et al.* Long-term safety and function of RPE from human embryonic stem cells in preclinical models of macular degeneration. *Stem Cells* 2009;27:2126-35) y están preparándose ensayos clínicos en pacientes con degeneración macular relacionada con la edad (Coffey P. Interview: stemming vision loss with stem cells: seeing is believing. *Regen Med* 2009;4:505-7). Por tanto, la base experimental para ensayos clínicos satisfactorios es prometedora. Sin embargo, aún podrían ser necesarias herramientas para optimizar la supervivencia y la diferenciación de trasplantes de células madre/progenitoras cuando se alojan en tejido retiniano que se someten a un proceso degenerativo crónico.

Protocolo para células retinianas

Se generaron diversos tipos de células retinianas a partir de hESC (Lamba DA, Karl MO, Ware CB, *et al.* Efficient generation of retinal progenitor cells from human embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103:12769-74; Reh TA, Lamba D, Gust J. Directing human embryonic stem cells to a retinal fate. *Methods Mol Biol* 2010;636:139-53). Se produjeron cuerpos embrioides y luego se trataron con IGF1, nogina (inhibidor de BMP) y Dkk1 (inhibidor de Wnt). Esto obliga a las hESC a adoptar un fenotipo progenitor retiniano, que expresa Pax6 y Chx10. Al exponer estos progenitores a éster t-butílico de N-(N-(3,5-difluorofenacetil)-1-alanil)-S-fenilglicina (DAPT), un bloqueante de la señalización de Notch, las células progenitoras experimentarán diferenciación neuronal). Se usó un protocolo similar para generar células de la retina a partir de iPSC humanas (Lamba DA, McUsic A, Hirata RK, *et al.* Generation, purification and transplantation of photoreceptors derived from human induced pluripotent stem cells. *PLoS One* 2010;5:e8763). La decisión de someterse a la diferenciación de fotorreceptores está bajo el control del factor de transcripción Blimp1 (Brzezinski JA 4th, Lamba DA, Reh TA. Blimp1 controls photoreceptor versus bipolar cell fate choice during retinal development. *Development* 2010;137:619-29).

5. Enfermedad de Parkinson

En la enfermedad de Parkinson (PD), se pierden gradualmente las neuronas liberadoras de dopamina en la *sustancia negra*, lo que da como resultado la disfunción motora progresiva y gravemente incapacitante que es el sello distintivo de esta enfermedad. Estudios previos en modelos animales experimentales de PD han demostrado que puede restablecerse la liberación de dopamina y puede revertirse la disfunción motora mediante el trasplante de neuronas embrionarias en el *cuerpo estriado* (Lindvall O, Kokaia Z. Prospects of stem cell therapy for replacing dopamine neurons in Parkinson's disease. *Trends Pharmacol Sci* 2009;30:260-8; Lindvall O, Kokaia Z. Stem cells in human neurodegenerative disorders-time for clinical translation? *J Clin Invest* 2010;120:29-40). Los ensayos clínicos con neuronas dopaminérgicas embrionarias humanas (DA) inicialmente proporcionaron resultados alentadores, pero las evaluaciones de seguimiento posteriores indican sólo un éxito limitado (Schwarz J. Developmental perspectives

on human midbrain-derived neural stem cells. *Parkinsonism Relat Disord* 2007;13 Supl 3:S466-8).

Se han generado neuronas DA *in vitro* a partir de iPSC, ESC, MSC y células madre/progenitoras regionales. Posteriormente se injertaron células diferencias previamente *in vitro* en el *cuero estriado* y se encontró que se reversionen parcialmente los síntomas similares a la PD en modelos animales (Rodríguez-Gómez JA, Lu JQ, Velasco I, *et al.* Persistent dopamine functions of neurons derived from embryonic stem cells in a rodent model of Parkinson disease. *Stem Cells* 2007;25:918-28; Cho MS, Lee YE, Kim JY, *et al.* Highly efficient and large-scale generation of functional dopamine neurons from human embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;105:3392-7; Parish CL, Castelo-Branco G, Rawal N, *et al.* Wnt5a-treated midbrain neural stem cells improve dopamine cell replacement therapy in parkinsonian mice. *J Clin Invest* 2008;118:149-60; Sanchez-Pernaute R, Lee H, Patterson M, *et al.* Parthenogenetic dopamine neurons from primate embryonic stem cells restore function in experimental Parkinson's disease. *Brain* 2008;131(Pt 8):2127-39). Sin embargo, el/los mecanismo(s) responsable(s) de la reversión de los síntomas no se comprenden completamente, ya que se demostró que la mejora funcional en un modelo animal de PD se produce a partir de trasplantes de células progenitoras neurales humanas sin diferenciación en neuronas DA (Hovakimyan M, Haas SJ, Schmitt O, *et al.* Mesencephalic human neural progenitor cells transplanted into the adult hemiparkinsonian rat striatum lack dopaminergic differentiation but improve motor behaviour. *Cells Tissues Organs* 2008;188:373-83). Recientemente se notificaron resultados alentadores en un modelo animal de PK con trasplantes de ESC en el *cuero estriado*, que dieron lugar a una abundancia de neuronas DA funcionales tras la expresión forzada de TF Lmx1a (Friling S, Andersson E, Thompson LH, *et al.* Efficient production of mesencephalic dopamine neurons by Lmx1a expression in embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009;106:7613-8).

Protocolo para neuronas dopaminérgicas

El protocolo para la diferenciación de ESC en neuronas DA incluye la sobreexpresión del factor de transcripción *Nurr1* seguido de su exposición a Shh, FGF-8 y ácido ascórbico (Lee SH, Lumelsky N, Studer L, Auerbach JM, McKay RD. Efficient generation of midbrain and hindbrain neurons from mouse embryonic stem cells. *Nat Biotechnol.* junio de 2000;18(6):675-9; Kriks S, Studer L. Protocols for generating ES cell-derived dopamine neurons. *Adv Exp Med Biol.* 2009;651:101-11; Lindvall O, Kokaia Z. Prospects of stem cell therapy for replacing dopamine neurons in Parkinson's disease. *Trends Pharmacol Sci.* mayo de 2009;30(5):260-7). Alternativamente a la combinación del factor 1 derivado de células estromales (SDF-1/CXCL12), pleiotrofina (PTN), factor de crecimiento similar a la insulina 2 (IGF2) y efrina B1 (EFNB1). Esta combinación aplicada a hESC induce su diferenciación en neuronas positivas para TH *in vitro*, que expresan marcadores específicos del mesencéfalo, incluyendo *Engrailed 1*, *Nurr1*, *Pitx3* y el transportador de dopamina (DAT), y que pueden generar potenciales de acción y formar conexiones sinápticas funcionales (Vazin T, Becker KG, Chen J, *et al.* A novel combination of factors, termed SPIE, which promotes dopaminergic neuron differentiation from human embryonic stem cells. *PLoS One* 2009;4:e6606).

6. Enfermedad de neuronas motoras

La esclerosis lateral amiotrófica (ELA), la atrofia muscular espinal bulbar (o enfermedad de Kennedy), la atrofia muscular espinal (SMA) y la atrofia muscular espinal con dificultad respiratoria 1 son trastornos neurodegenerativos que conducen a la pérdida de neuronas motoras y a la muerte del paciente. Actualmente no existe ningún tratamiento que pueda detener o retrasar significativamente la progresión de la enfermedad. La patogenia de estos trastornos se conoce de manera incompleta, pero se ha implicado una función comprometida en astrocitos y/o microglia circundantes. Por tanto, se considera la terapia basada en células madre con sustitución de neuronas motoras perdidas, así como la sustitución de astrocitos disfuncionales (Mazzini L, Vercelli A, Ferrero I, Mareschi K, Boido M, Servo S, Oggioni GD, Testa L, Monaco F, Fagioli F. Stem cells in amyotrophic lateral sclerosis: state of the art. *Expert Opin Biol Ther.* oct de 2009; 9(10): 1245-58; Papadeas ST, Maragakis NJ. Advances in stem cell research for Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Curr Opin Biotechnol.* oct de 2009; 20(5):545-51. Epub 12 de Oct de 2009. Review. PubMed PMID: 19819686.). Para trastornos tales como la ELA que sólo afecta a adultos, la posibilidad de restablecer las conexiones neuromusculares perdidas mediante la sustitución de neuronas motoras resulta problemática debido a las largas distancias desde la médula espinal hasta los músculos diana. Por tanto, el uso de células madre para generar astrocitos para neuroprotección puede ser el enfoque más racional en este trastorno. Sin embargo, para la SMA, que afecta a bebés o niños, sustituir las neuronas motoras perdidas es una estrategia atractiva.

Protocolo para neuronas motoras

Se generaron neuronas motoras a partir de ESC humanas usando medio de diferenciación neural, tratamiento con RA (células neuroepiteliales primitivas que expresan Pax6), RA + Shh (células neuroepiteliales que expresan Pax6/Sox1, que gradualmente comienzan a expresar el marcador progenitor de neuronas motoras Olig2). La reducción de la concentración de RA + Shh promueve la aparición de neuronas motoras que expresan HB9 e *Islet1*. La adición del factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), el factor neurotrófico derivado de la glía (GDNF), el factor de crecimiento similar a la insulina-1 (IGF1) y el AMPc promueven la excrecencia del proceso (Hu BY, Du ZW, Zhang SC. Differentiation of human oligodendrocytes from pluripotent stem cells. *Nat Protoc* 2009;4:1614-22; Hu BY, Weick JP, Yu J, *et al.* Neural differentiation of human induced pluripotent stem cells follows developmental principles but with variable potency. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010;107:4335-40).

7. Accidente cerebrovascular, lesión cerebral y lesión medular

El accidente cerebrovascular es una causa principal de incapacidad de por vida y muerte en el mundo occidental. El traumatismo craneoencefálico es una causa principal de muerte e incapacidad a largo plazo en adultos jóvenes en el mundo occidental. La lesión de la médula espinal es menos frecuente que el traumatismo craneoencefálico, pero habitualmente afecta a individuos jóvenes y da como resultado una discapacidad grave y una calidad de vida reducida para los pacientes. El trasplante de células madre es una estrategia atractiva en todos estos estados, tanto en lo que se refiere a lograr la neuroprotección temprana como en el restablecimiento de funciones perdidas durante la fase de rehabilitación (Bliss TM, Andres RH, Steinberg GK. Optimizing the success of cell transplantation therapy for stroke. *Neurobiol Dis* 2010;37:275-83; Lindvall O, Kokaia Z. Stem cells in human neurodegenerative disorders-time for clinical translation? *J Clin Invest* 2010;120:29-40; Orlacchio A, Bernardi G, Orlacchio A, *et al.* Stem cells: an overview of the current status of therapies for central and peripheral nervous system diseases. *Curr Med Chem* 2010;17:595-608; Ronaghi M, Erceg S, Moreno-Manzano V, *et al.* Challenges of stem cell therapy for spinal cord injury: human embryonic stem cells, endogenous neural stem cells, or induced pluripotent stem cells? *Stem Cells* 2010;28:93-9). Por tanto, la elección de las células madre y los derivados deseados puede ser diferente dependiendo de la fase del trastorno. El hecho de que estos estados den como resultado la pérdida de diferentes tipos de células gliales y neuronales presenta desafíos adicionales.

Para el accidente cerebrovascular y el traumatismo craneoencefálico, la función de restablecimiento en el conjunto de circuitos neurales locales puede ser la más relevante. Los componentes básicos de estos conjuntos de circuitos son las neuronas glutamatérgicas y gabaérgicas, así como las neuronas colinérgicas para conjuntos de circuitos seleccionados que median funciones cognitivas. Las neuronas glutamatérgicas también forman partes importantes de las rutas de proyección motoras descendentes desde la corteza cerebral hasta el tronco encefálico y la médula espinal. La implantación de neuronas gabaérgicas ha mostrado resultados terapéuticos prometedores en modelos experimentales de epilepsia, que es una secuela común del traumatismo craneoencefálico.

Las lesiones de la médula espinal a menudo son lesiones de contusión que conducen a la pérdida de oligodendrocitos y mielina de la sustancia blanca y, por tanto, a fallo de conducción en las rutas ascendentes y descendentes afectadas. Por tanto, restablecer oligodendrocitos competentes de mielina es un objetivo principal tras una lesión de la médula espinal. Dianas adicionales para la sustitución celular en este estado son las neuronas glutamatérgicas, que pueden formar conexiones descendentes a través del sitio de la lesión y de este modo restablecer las funciones motoras y autónomas perdidas bajo el sitio de lesión.

Protocolo para neuronas glutamatérgicas

Las neuronas glutamatérgicas pueden generarse a partir de ESC de ratón *in vitro* mediante la producción de agregados celulares que luego se tratan durante 8 días con RA. Esto da como resultado células gliales radiales que expresan Pax6, que después de un cultivo adicional en N2 seguido por medio "completo" da como resultado aproximadamente el 95% de neuronas de glutamato (Bibel M, Richter J, Lacroix E, *et al.* Generation of a defined and uniform population of CNS progenitors and neurons from mouse embryonic stem cells. *Nat Protoc* 2007;2:1034-43).

Protocolo para neuronas gabaérgicas

Se generaron neuronas gabaérgicas a partir de ESC de ratón mediante la exposición de cuerpos embrioides (EB) durante 3 días a *todo trans*-RA. Tras el cultivo posterior en medio de inducción neuronal libre de suero, que comprende medio neurobasal complementado con B27, bFGF y EGF, se desarrollaron aproximadamente un 95% de neuronas GABA (Chatzi C, Scott RH, Pu J, *et al.* Derivation of homogeneous GABAergic neurons from mouse embryonic stem cells. *Exp Neurol* 2009;217:407-16).

Protocolo para oligodendrocitos

Se generaron precursores de oligodendrocitos (OPC) que pueden desarrollarse hasta oligodendrocitos mielinizantes maduros a partir de ESC (h) humanos (Hu BY, Du ZW, Zhang SC. Differentiation of human oligodendrocytes from pluripotent stem cells. *Nat Protoc* 2009;4:1614-22). Las hESC se dirigen primero hacia el destino de neuroectodermo bajo en un estado definido químicamente en ausencia de factores de crecimiento durante 2 semanas y expresan factores de transcripción del neuroectodermo, incluyendo Pax6 y Sox1. A continuación, las hESC se exponen al factor de caudalización ácido retinoico (RA) y al morfógeno ventralizante Shh durante 10 días para comenzar la expresión de Olig2. Para evitar la diferenciación en motoneuronas y promover la generación de OPC, las células se cultivan con FGF2 durante 10 días. Para el día 35, los progenitores de Olig2 coexpresan Nkx2.2 y ya no dan lugar a motoneuronas. La coexpresión de Olig2 y Nkx2.2 refleja una fase previa a los OPC humanos ("pre-OPC"). Finalmente, se cultivan en un medio de glía que contiene triyodotironina (T3), neurotrofina 3 (NT3), PDGF, AMPc, IGF-1 y biotina, que de forma individual o sinérgica pueden promover la supervivencia y la proliferación de los OPC derivados de hESC, durante otras 8 semanas para generar OPC. Estos OPC son bipolares o multipolares, expresan Olig2, Nkx2.2, Sox10 y PDGFR α , llegan a ser móviles y pueden diferenciarse en oligodendrocitos competentes.

También hay un protocolo más sencillo para generar OPC a partir de ESC de ratón (Jiang P, Selvaraj V, Deng W. Differentiation of embryonic stem cells into oligodendrocyte precursors. J Vis Exp. 2010;pii:1960).

Ejemplos

5 *Ejemplo 1: Diferenciación inducida de células madre embrionarias humanas trasplantadas con Shh y ácido retinoico administradas con sílice mesoporosa*

10 Antecedentes: Las células madre embrionarias (ESC) se diferencian en neuronas motoras, establecen sinapsis funcionales con fibras musculares y adquieren propiedades fisiológicas características de las neuronas motoras embrionarias cuando se cultivan con agonista de Sonic Hedgehog (Shh) y ácido retinoico (RA) (Wichterle H, Lieberam I, Porter JA, *et al.* Directed differentiation of embryonic stem cells into motor neurons. Cell 2002;110:385-97; Miles GB, Yohn DC, Wichterle H, *et al.* Functional properties of motoneurons derived from mouse embryonic stem cells. J Neurosci 2004;24:7848-58). Motoneuronas derivadas de ESC trasplantadas en tubo neural de pollo en desarrollo proyectaron axones hacia los músculos, recibieron entrada sináptica y desarrollaron propiedades electrofisiológicas similares a las neuronas motoras endógenas (Soundararajan P, Miles GB, Rubin LL, *et al.* Motoneurons derived from embryonic stem cells express transcription factors and develop phenotypes characteristic of medial motor column neurons. J Neurosci 2006;26:3256-68; De Marco Garcia and Jessel, 2008). Estos resultados muestran que las ESC después del tratamiento con Shh y RA se diferencian fácilmente en neuronas motoras funcionales *in vitro* y pueden someterse a trasplante.

25 También se generaron neuronas motoras *in vitro* mediante la activación de los factores de transcripción (TF) Olig2 y HB9 en presencia de Shh y RA (Zhang X, Cai J, Klueber KM, Guo Z, *et al.* Role of transcription factors in motoneuron differentiation of adult human olfactory neuroepithelial-derived progenitors. Stem Cells 2006;24:434-42). En estudios de desarrollo se demostró que los TF Nkx6.1 e Isl1 rigen la diferenciación de células madre en neuronas motoras de la columna motora lateral (neuronas motoras de LMC) (De Marco Garcia NV, Jessell TM. Early motor neuron pool identity and muscle nerve trajectory defined by postmitotic restrictions in Nkx6.1 activity. Neuron 2008;57:217-31), que inervan los músculos de las extremidades.

30 Material y métodos: En este caso se usaron ESC humanas (h) y se guio su diferenciación en neuronas motoras en la cavidad del ganglio de la raíz dorsal (DRG) de ratas receptoras adultas mediante la administración de factores extrínsecos (agonista de Shh y RA administrados con nanopartículas mesoporosas). Las hESC en el experimento expresaron proteína fluorescente verde (GFP).

35 Sílice AMS

La sílice mesoporosa se preparó tal como se describió anteriormente (Garcia-Bennett *et al.*, 2008). La carga con RA se realizó añadiendo 250 mg de RA a 500 mg de sílice AMS-6 en 20 ml de etanol y se dejó a temperatura ambiente durante 30 minutos antes de filtrar y secar como un polvo.

40 La carga con PUR se realizó mediante la adición de 5 mg de PUR a 500 mg de sílice AMS-6.

45 La carga se realizó en una mezcla de DMSO/etanol, y a temperatura ambiente. Después de cargar la muestra, se filtró y se lavó con H₂O, y se secó durante un período corto.

A cada trasplante se añadió sílice mesoporosa que contenía 25 µg de RA y 150 µg de purmorfamina. Las neuroesferas se mezclaron en el tubo Eppendorf con las nanopartículas y luego se trasplantaron a la cavidad de DRG.

50 Material: Después de 2 meses, los ratones se perfundieron a través del ventrículo izquierdo con formaldehído al 4% (p/v) frío y ácido pícrico saturado al 14% (v/v) en tampón fosfato 0,15 M, se fijaron posteriormente durante 4 horas y se almacenaron durante la noche en tampón fosfato frío que contenía sacarosa al 15% para crioprotección. Se cortaron criosecciones de 14 µm y se analizaron en un microscopio de fluorescencia Nikon. Las hESC no tratadas mostraron una morfología mixta con formación de teratoma típica, mientras que los trasplantes tratados demostraron una morfología desarrollada de células neuronales con procesos extendidos. La figura 2 muestra trasplantes de hESC 2 meses después del trasplante a la cavidad de DRG de ratones nu/nu adultos. La figura 2A muestra trasplantes no tratados, la figura 2B muestra trasplantes con AMS + RA + purmorfamina.

60 La inmunotinción confirmó la presencia de células positivas para beta-tubulina (bTUB) (marcador neuronal) en los trasplantes tratados y algunas de las células expresaron el factor de transcripción HB9, el marcador para la diferenciación neuronal motora (véase la figura 3).

65 La figura 3A muestra cómo se expresa bTUB (indicado con la flecha) en algunas hESC que expresan GFP. La figura 3B muestra cómo se expresa HB9 (indicado con estrellas) en algunas células que expresan GFP.

Por tanto, se pudo inducir diferenciación de ESC indiferenciadas hacia neuronas motoras *in vivo* mediante RA y Shh

administrados con sílice mesoporosa.

Ejemplo 2: Diferenciación de células madre de la cresta neural hacia fenotipo neuronal in vitro mediante RA administrado con sílice mesoporosa.

5 *Antecedentes:* El receptor RA, RAR-beta2, se expresa en subtipos de neuronas del ganglio de la raíz dorsal (DRG). Se demostró que la señalización de retinoides desempeña un papel en la excrecencia de neuritas *in vivo* (Corcoran J, Shroot B, Pizzey J, *et al.* The role of retinoic acid receptors in neurite outgrowth from different populations of embryonic mouse dorsal root ganglia. *J. Cell Sci* 2000;113:2567-74; Dmetrichuk JM, Spencer GE, Carlone RL. Retinoic acid-dependent attraction of adult spinal cord axons towards regenerating newt limb blastemas *in vitro*. *Dev Biol* 2005;281:112-20) al demostrar que en un modelo de aplastamiento de nervio periférico hay menos excrecencia de neuritas sensoriales en los ratones sin RAR-beta en comparación con los ratones de tipo natural. Los experimentos *in vitro* identificaron Sonic Hedgehog (Shh) como una diana posterior de la ruta de señalización de RAR-beta2, ya que se expresa en el DRG lesionado de ratones de tipo natural pero no en los que carecen de RAR-beta y que Shh por sí solo no puede inducir la excrecencia de neuritas, pero potencia la señalización de RAR-beta2 en este proceso (So PL, Yip PK, Bunting S, *et al.* Interactions between retinoic acid, nerve growth factor and sonic hedgehog signalling pathways in neurite outgrowth. *Dev Biol.* 2006; 298:167-75).

20 Se cultivaron células madre de la cresta neural de barrera (*boundary cap*) (bNCSC) como neuroesferas. Estas células tienen el potencial de producir neuronas y células de la glía *in vitro* y pueden inducirse a producir un tipo específico de neuronas *in vivo* mediante la activación condicional de factores de transcripción claves para la diferenciación de neuronas nociceptivas (Aldskogius H, Berens C, Kanaykina N, *et al.* Regulation of boundary cap neural crest stem cell differentiation after transplantation. *Stem Cells* 2009;27:1592-603).

25 *Material y métodos:*

30 Se aislaron bNCSC de forma semiclona de embriones con EGFP en el día embrionario (E) 11, tal como se describió anteriormente (Hjerling-Leffler J, Marmigère F, Heglind M, *et al.* The boundary cap: a source of neural crest stem cells that generate multiple sensory neuron subtypes. *Development* 2005;132:2623-32). Brevemente, los DRG junto con las *boundary caps* se separaron mecánicamente de la médula espinal aislada y se disociaron de manera mecano-enzimática usando colagenasa/dispa (1 mg/ml) y DNasa (0,5 mg/ml) durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se sembraron las células en placa a $0,5-1 \times 10^5$ células/cm² en medio N2 que contenía B27 (Gibco, Grand Island, NY, <http://www.invitrogen.com>), así como EGF y factor de crecimiento básico de fibroblastos (R&D Systems, Mineápolis, <http://www.rndsystems.com>; 20 ng/ml, respectivamente). Después de 12 horas, se retiraron las células no adherentes junto con la mitad del medio antes de añadir medio nuevo. Se cambió el medio cada dos días (se substituyó el 50% del medio por medio nuevo) hasta que pudieron observarse neuroesferas tras aproximadamente 2 semanas de cultivo.

40 En este caso se realizó un ensayo de diferenciación de bNCSC *in vitro* en tres condiciones: bNCSC solas, bNCSC + RA y bNCSC + AMS-RA.

45 Se sembraron las células en placa a una densidad de $1,2 \times 10^3$ células en un cubreobjetos recubierto de poli-D-lisina (50 µg/ml)/laminina (20 ng/ml) y se mantuvieron en medio F12-Eagle modificado de Dulbecco/medio neurobasal complementado con N2, B27, aminoácidos no esenciales 0,1 mM y piruvato de sodio 2 mM. A cada pocillo se le añadió AMS con 24 ng de RA durante 3 días.

50 Después de 3 días, se fijaron los cultivos y se realizó el inmunomarcaje tal como se describió anteriormente (Kozlova EN. Differentiation and migration of astrocytes in the spinal cord following dorsal root injury in the adult rat. *Eur J Neurosci* 2003;17:782-90). Los anticuerpos primarios fueron anti-bIII-tubulina (bTUB; anticuerpo monoclonal de ratón; Covance, Princeton, NJ, <http://www.covance.com>, 1:500; proteína ácida fibrilar anti-glial (GFAP; anticuerpo policlonal de conejo; DAKO, Glostrup, Dinamarca, <http://www.dako.com>; 1:1.000) Los anticuerpos secundarios (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA, <http://www.jacksonimmuno.com>) se diluyeron en PBS con Triton X-100 al 0,3% y azida sódica al 0,1%: anticuerpo de burro conjugado con AMCA anti-conejo y anti-ratón, anticuerpo de burro conjugado con Cy3 anti-ratón).

55 Se añadió la AMS a los cultivos y se estableció el intervalo de tiempo para determinar su presencia antes de disolverse en el medio de cultivo. También se analizó su contacto con las células madre. Después de 3 y 7 días, los cultivos se fijaron y se procesaron para inmunohistoquímica. Después de la tinción, se tomaron 10 fotografías de cada portaobjetos y se calcularon las razones de neuronas y células de la glía en todo tipo de experimentos. También se calculó la longitud de las neuritas por célula como medida del nivel de diferenciación neuronal (Kozlova EN. Differentiation and migration of astrocytes in the spinal cord following dorsal root injury in the adult rat. *Eur J Neurosci* 2003;17:782-90).

60 *Resultados:*

65 Se encontró que la AMS tiene una fuerte afinidad con las células madre y se une fuertemente a las neuroesferas

durante los primeros minutos/horas después de colocarlas en la placa de cultivo. La diferenciación de las neuroesferas no se vio obstaculizada y las células, a pesar de su estrecho contacto con las partículas, se extendieron con éxito sobre la superficie y se diferenciaron (véase la figura 4).

5 En la figura 4, las columnas de la izquierda muestran las neuroesferas de NCSC que expresan eGFP cultivadas con las partículas de AMS (las esferas de eGFP se ven perforadas. En las imágenes de contraste de fase, las partículas se observan como tres ángulos oscuros - segunda columna). En las columnas de la derecha, las NCSC son cultivos sin partículas. En ambos casos, las esferas se diferenciaron y se extendieron sobre la superficie. La cantidad de partículas se redujo durante la primera semana.

10 Entonces se comparó si el RA administrado a las NCSC tendrá un efecto similar sobre su diferenciación en comparación con el RA administrado con AMS (AMS-RA). RA y AMS-RA indujeron ambos diferenciación neuronal (figura 5A). Basándose en el cálculo de longitudes de las neuritas, la diferenciación de las neuronas en los cultivos tratados con RA aumentó hasta el 37% y en los cultivos tratados con AMS-RA hasta el 18% en comparación con las neuroesferas no tratadas, y la razón neurona/glia en los cultivos tratados con RA aumentó 3,4 veces y en AMS-RA 3,9 veces en comparación con las neuroesferas solas (figura 5B).

20 La figura 5A muestra el ensayo de diferenciación *in vitro* de bNCSC cultivadas sin tratamiento especial (panel superior), con RA (panel central) y con AMS-RA (panel inferior). El nivel de diferenciación neuronal en los paneles medio e inferior es mayor en comparación con el panel superior (células no tratadas), mientras que la diferenciación de las células de la glía se reduce fuertemente en los cultivos tratados con RA y AMS-RA. Primera columna: eGFP (bNCSC), segunda columna GFAP (marcador de la glía), tercera columna bTUB (marcador neuronal). El gráfico de la figura 5B muestra un aumento de la razón neuro/glia en los cultivos tratados con RA.

25 Además, se realizó un análisis de RT-PCR de bNCSC cultivadas solas (BC), cultivos de NCSC con AMS, con AMS-RA y con AMS-Purm (purmorfomina, el agonista de Shh) y se encontró una expresión específica de factores de transcripción en respuesta a la activación de RA y Shh (figuras 6A y 6B) (Guan W, Wang G, Scott SA, *et al.* Shh influences cell number and the distribution of neuronal subtypes in dorsal root ganglia. *Dev Biol* 2008;314:317-28).

30 Tal como se muestra en las figuras, el análisis de RT-PCR mostró la expresión específica de Ngn2 en los cultivos tratados con AMS-RA (A) y Patch1 en respuesta a los cultivos tratados con AMS-Purm.

Por tanto, se muestra que RA administrado con sílice mesoporosa tiene un efecto similar al de la administración directa de RA sobre la diferenciación neuronal y la excrecencia de neuritas *in vitro* de bNCSC.

35 *Ejemplo comparativo. Ejemplo 3: Diferenciación y migración de NCSC en presencia de AMS bajo la cápsula renal.*

Antecedentes: Anteriormente se demostró que las NCSC trasplantadas bajo la cápsula renal de un polo del riñón migran ampliamente hacia islotes pancreáticos cotrasplantados colocados en el polo opuesto del mismo riñón (Olerud J, Kanaykina N, Vasylovska S, *et al.* Neural crest stem cells increase beta cell proliferation and improve islet function in co-transplanted murine pancreatic islets. *Diabetologia* 2009;52:2594-601. Fe de erratas: *Diabetologia*. 2010;53:396. Vasilovska, S [corregido a Vasylovska, S]; Kozlova EN, Jansson L. Differentiation and migration of neural crest stem cells are stimulated by pancreatic islets. *Neuroreport* 2009;20:833-8). El propósito de estos estudios anteriores fue desarrollar un nuevo protocolo para obtener un resultado mejorado tras el trasplante de islotes pancreáticos. El trasplante de islotes pancreáticos es una terapia establecida en pacientes seleccionados con diabetes tipo 1. Sin embargo, la supervivencia de los islotes trasplantados es insuficiente y es necesario desarrollar formas de mejorar su supervivencia. Las NCSC cotrasplantadas, que pueden secretar factores tróficos y tienen potencial para reinervar islotes trasplantados, pueden ser un enfoque útil para mejorar el resultado clínico del trasplante de islotes. Los resultados mostraron que las bNCSC migran hacia los islotes, promueven fuertemente su función y aumentan la proliferación de células beta. Sin embargo, las bNCSC trasplantadas no se diferenciaron en neuronas funcionales y no reinervaron islotes trasplantados. Por tanto, el desarrollo de protocolos para la diferenciación de NCSC *in vivo* es un objetivo importante. El uso de morfogenos que contienen AMS puede facilitar la diferenciación de bNCSC *in vivo* después del trasplante. Antes de realizar experimentos a largo plazo, se investigó si la AMS puede tener un efecto negativo sobre la supervivencia de bNCSC injertadas bajo la cápsula renal y su migración hacia islotes pancreáticos injertados en el polo opuesto del mismo riñón.

Material y métodos:

60 Se trasplantó AMS-RA en un polo del riñón junto con bNCSC e islotes pancreáticos en el polo opuesto del riñón (véase la figura 7).

La figura 7 es una visión general del riñón con tres combinaciones diferentes de trasplantes:

65 - izquierda: trasplantes de NCSC (círculos blancos) ubicados en el polo inferior del riñón. Las NCSC no migran desde su ubicación;

- centro: las NCSC migran hacia los islotes (óvalos) que se trasplantan en otro lado del riñón;

- derecha: migración reducida de NCSC (círculos pequeños) hacia los islotes y diferenciación aumentada de NCSC en la ubicación inicial cuando se cotrasplantaron con AMS (triángulo negro).

5 Los islotes se recogieron de ratones transgénicos que contenían proteína fluorescente roja (RFP) y se prepararon bNCSC a partir de ratones transgénicos con eGFP. El trasplante se realizó tal como se describió anteriormente (Olerud J, Kanaykina N, Vasylovska S, *et al.* Neural crest stem cells increase beta cell proliferation and improve islet function in co-transplanted murine pancreatic islets. *Diabetologia* 2009;52:2594-601. Fe de erratas: *Diabetologia*. 2010;53:396. Vasilovska, S [corregido to Vasylovska, S]; Kozlova EN, Jansson L. Differentiation and migration of neural crest stem cells are stimulated by pancreatic islets. *Neuroreport* 2009;20:833-8) y después de un mes, los ratones se perfundieron con fijador, se recogieron sus riñones, se fijaron posteriormente durante 4 horas, se almacenaron durante la noche en tampón de fosfato frío que contenía sacarosa al 15%. Al día siguiente, se prepararon cortes con criostato en serie de 14 µm a través de todo el órgano.

15 *Resultados:*

El AMS no afectó negativamente a la supervivencia de las bNCSC ni a su migración hacia los islotes pancreáticos (figura 7, figura 8).

20 La figura 8 muestra bNCSC que expresan eGFP bajo la cápsula renal:

- A: bNCSC migradas (columna izquierda) hacia islotes pancreáticos que expresan RFP (columna central) en el otro polo del riñón.

25 - B: izquierda - bNCSC trasplantadas sin AMS,

derecha - bNCSC cotrasplantadas con AMS.

30 Basándose en la morfología de las NCSC, parece que las NCSC cotrasplantadas con partículas están más diferenciadas en comparación con las NCSC trasplantadas solas (figura 8).

Ejemplo comparativo. Ejemplo 4: Investigación de si AMS influye en la formación de cicatrices gliales después de lesión cerebral.

35 *Antecedentes:* La formación de cicatrices gliales después de lesión en el cerebro o la médula espinal representa una causa importante de incapacidad de los axones dañados para regenerarse en el SNC. Por tanto, las consecuencias de estas lesiones son la pérdida permanente de funciones atendidas por los sistemas neuronales dañados. Reducir la formación de cicatrices gliales es importante para promover la regeneración axonal y restablecer las funciones perdidas.

40 Anteriormente se demostró que la formación de cicatrices gliales en el cerebro está relacionada con la expresión de la proteína de unión a calcio Mts1/S100A4 que se produce específicamente en los astrocitos de la sustancia blanca. La regulación por disminución de Mts1/S100A4 en los astrocitos redujo la formación de cicatrices gliales y aumentó su movilidad, mientras que la regulación por incremento de la expresión de Mts1/S100A4 dio como resultado una formación aumentada de cicatrices gliales (Fang Z, Duthoit N, Wicher G, *et al.* Intracellular calcium-binding protein S100A4 influences injury-induced migration of white matter astrocytes. *Acta Neuropathol* 2006;111:213-9).

50 En este caso se investiga si AMS y AMS + RA afectan al grado de formación de cicatrices gliales una semana después de la lesión en la corteza cerebral.

55 *Material y métodos:* Se realizó una lesión de un diámetro y profundidad definidos con una aguja de calibre xx en la corteza cerebral frontal de ratas adultas. En algunos de estos casos se implantó AMS o AMS-RA en la cavidad. Una semana después de la lesión, se perfundieron las ratas (véase el ejemplo 1), se extrajeron los cerebros, se fijaron posteriormente, se crioprotegieron y se crioseccionaron en el plano coronal. La tinción se realizó para bTUB - marcador neuronal (igual que anteriormente), proteína ácida fibrilar glial (GFAP) - marcador glial (véase el ejemplo 2) y marcador de astrocitos de materia blanca Mts1/S100A4 (obsequio de Lukanidin, 1:700, anticuerpo policlonal de conejo), ED1 - marcador microglial (anticuerpo monoclonal, 1:500).

60 *Resultados:* Los datos *in vitro* mostraron que AMS y AMS-RA reducen la diferenciación glial (figura 5). Por tanto, se sintió curiosidad por saber si la AMS afecta a la formación de cicatrices gliales tras lesión cortical. El experimento piloto muestra que la respuesta glial en el cerebro a la lesión tratada o no tratada con AMS y AMS-RA difiere de la respuesta en animales no tratados (véase la figura 9).

65 La figura 9 muestra secciones coronales a través de la corteza cerebral de la rata una semana después de una lesión focal.

Panel superior: la lesión sin tratamiento;

panel central - la lesión + AMS;

panel inferior - la lesión + AMS-RA.

GFAP (marcador glial) en primera columna, OX42 (marcador microglial) en segunda columna, tinción nuclear de Hoechst en tercera columna. Debe observarse la reacción microglial aumentada (segunda columna) y la reacción astroglial reducida (primera columna) en los sitios de lesión tratados (paneles medio e inferior).

Los experimentos piloto muestran que AMS disminuye la formación de cicatrices gliales e induce una reacción microglial en las zonas lesionadas. Experimentos adicionales mostrarán si la formación reducida de cicatrices gliales es un efecto directo de AMS o es una consecuencia de una reacción microglial aumentada.

Ejemplo 5:

Se estimó la longitud de los axones en los trasplantes tratados con partículas mesoporosas de tipo NLAB-Silica (200) con distribución de tamaño de poro centrada en 200 Å y estructura de poro desordenada, cargadas con miméticos en comparación con los trasplantes no tratados. La longitud de los axones se calculó con el método descrito anteriormente (Rønn LC, Raets I, Hartz BP, Bech M, Berezin A, Berezin V, Møller A, Bock E. A simple procedure for quantification of neurite outgrowth based on stereological principles. *J Neurosci Methods*. 31 de julio de 2000;100(1-2):25-32). La longitud de los axones en los trasplantes tratados con miméticos fue 5 veces mayor que en los trasplantes no tratados (datos no mostrados).

Para la evaluación del tamaño del trasplante y la supervivencia de las células madre/progenitoras neurales, se analizaron las células que expresaban HB9-EGFP en cada quinta sección.

Se usó el software NIH ImageJ (Rasband, 1997, disponible en <http://rsb.info.nih.gov/ij>) para medir las áreas de trasplante. La estimación del volumen de trasplante se calculó según la fórmula $A = TK [\sum (S1 \text{ a } Sn)]$, donde T es el grosor de la sección ($T = 12 \mu\text{m}$), K es el número de secciones entre las áreas medidas ($K = 50$) y S es el área del trasplante en las secciones desde 1 hasta N. La evaluación demostró que el volumen de trasplantes tratados con miméticos aumentó significativamente ($3X$, $p < 0,5$).

Las propiedades de liberación de los factores cargados en el material mesoporoso NLAB-Silica (200) fueron las siguientes:

La liberación de GDNF *in vivo*: (Kirik D, Georgievska B, Rusenblad C, Bjorklund A. Delayed infusion of GDNF promotes recovery of motor function in the partial lesion model of Parkinson's disease. *EJN*, 2001, v13, págs.1589-99) $0,25 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ durante 2 semanas, velocidad de infusión $0,5 \mu\text{l}$ por hora, es decir, $6 \mu\text{g}/\text{día}$ de GDNF. Esta velocidad de liberación se logró durante 14 días.

Liberación de CNTF *in vivo*: (Kelleher MO, Myles LM, Al-Abri RK, Glasby MA The use of Ciliary neurotrophic factor to promote recovery after peripheral nerve injury by delivering it at the site of the cell body. *Acta Neurochir (Wien)* 2006, v146, págs. 55-61) $100 \mu\text{g}/\text{ml}$ durante 4 semanas, $2,5 \mu\text{l}$ por hora, es decir, $6 \mu\text{g}/\text{día}$ de CNTF. Esta velocidad de liberación se logró durante 14 días. Las figuras 10 y 11 muestran las propiedades estructurales y de textura de NLAB-Silica (200), incluyendo la imagen de SEM (figura 10) de la estructura de poros desordenada, y la isoterma de adsorción de nitrógeno y la distribución del tamaño de poro (figura 11). El volumen de trasplantes tratados con NLAB-Silica (200) cargada con miméticos de péptidos (véase la figura 12 B) fue aproximadamente 4 veces mayor que los no tratados (véase la figura 12 A), y las células HB9-EGFP en trasplantes tratados fueron un promedio de 8 veces más grandes en comparación con las células en trasplantes no tratados.

REIVINDICACIONES

1. Sistema de administración para la administración de un principio activo farmacéutico en mamíferos, comprendiendo el principio activo farmacéutico un conjunto compuesto por células madre y sílice mesoporosa que contiene un agente liberable, en el que dicha sílice porosa tiene un área superficial mayor de 200 m²/g y un tamaño de poro de entre 1,5-50 nm, y, en el que las partículas de sílice porosa tienen una forma de partícula que comprende esferas o partículas en forma de varilla, en el que el agente liberable se selecciona del grupo que consiste en factores de crecimiento de fibroblastos (FGF), Wnt, miembros de la familia de factores de crecimiento transformantes (TGF)-beta, proteínas Hedgehog (hh), ácido retinoico, factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), Dickkopf (Dkk)-1, insulina, activina, SDF-1/CXCL12, pleiotrofina (PTN), factor de crecimiento similar a la insulina 2 (IGF2), efrina B1 (EFNB1), AMPc, semaforinas, slits, netrinas, NCAM, L1-CAM, NGF, BDNF, NT3, NT4/5, GDNF, artemina, persefina, CNTF, LIF, oncostatina M, cardiotrofina 1, CDNF/MANF, en el que dicho agente liberable es el 1-60% del peso total del principio activo farmacéutico, para su uso en la administración controlada del agente liberable para controlar la diferenciación de células madre después del trasplante de células madre coimplantadas con la sílice mesoporosa, para el tratamiento de la enfermedad de Parkinson o esclerosis lateral amiotrófica o atrofia muscular espinal o accidente cerebrovascular o traumatismo craneoencefálico o lesión medular.
2. Sistema de administración para su uso según la reivindicación 1, en el que las partículas de sílice porosa están en forma de partículas esféricas que tienen un intervalo de tamaño de 200-500 nm.
3. Sistema de administración para su uso según la reivindicación 1 o 2, en el que dicho agente liberable es el 1-45% en peso del peso total del principio activo farmacéutico.
4. Sistema de administración para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que dichas células madre se seleccionan del grupo que consiste en células madre regionales, células madre embrionarias (ES), células madre de la cresta neural, células madre neurales de cerebro y médula espinal, células madre mesenquimatosas, células madre endoteliales, células madre endodérmicas, células madre pluripotentes inducidas (iPS).

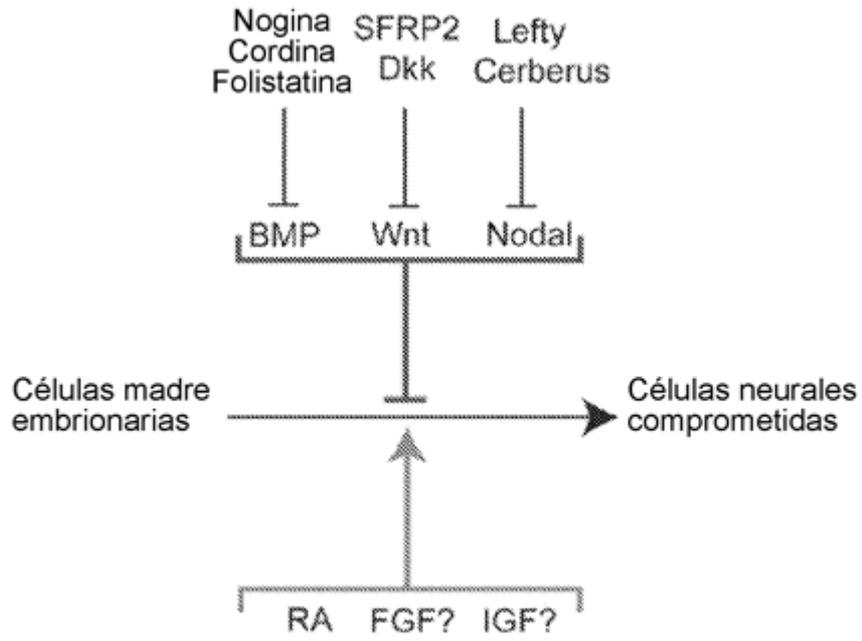


Fig. 1

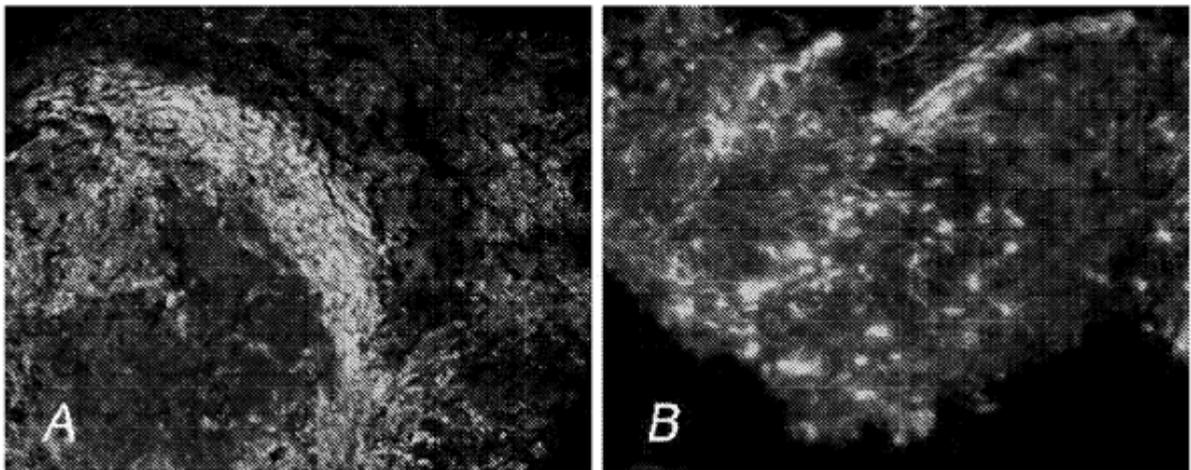


Fig. 2

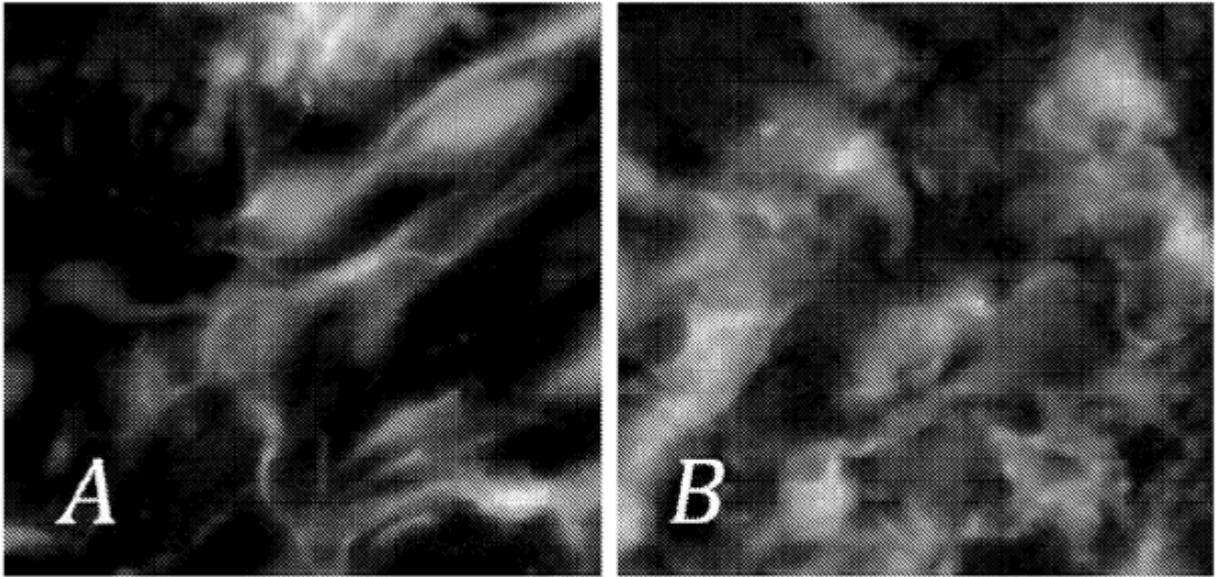


Fig. 3

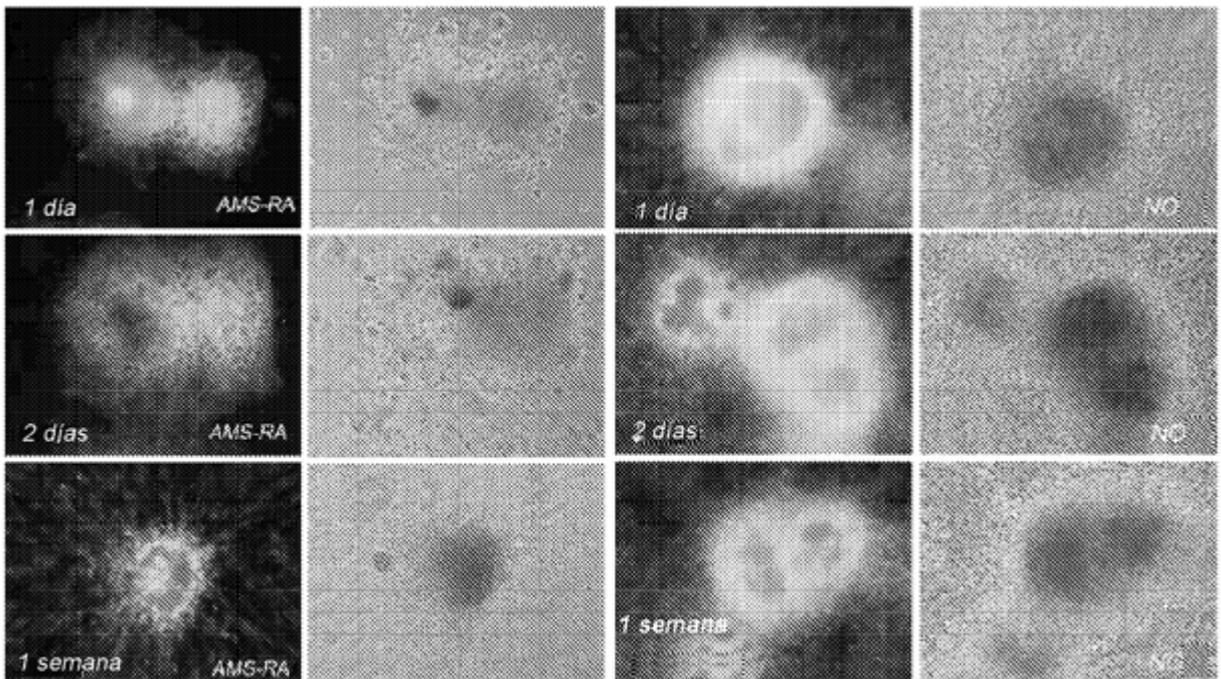


Fig. 4

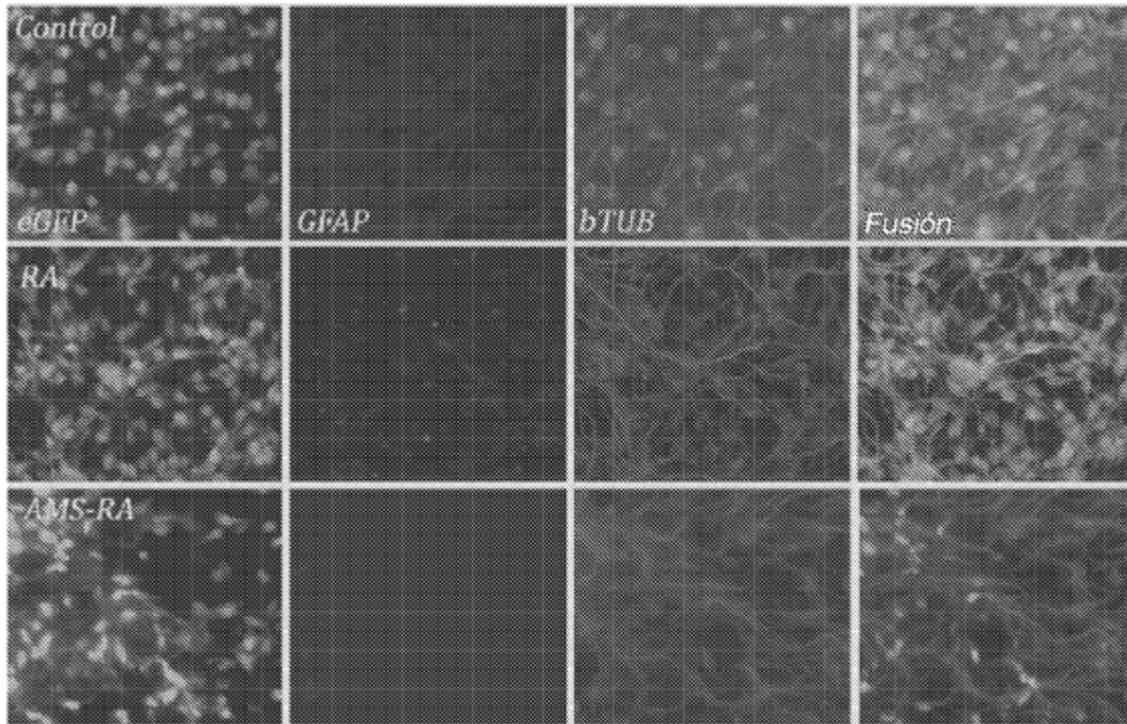


Fig. 5A

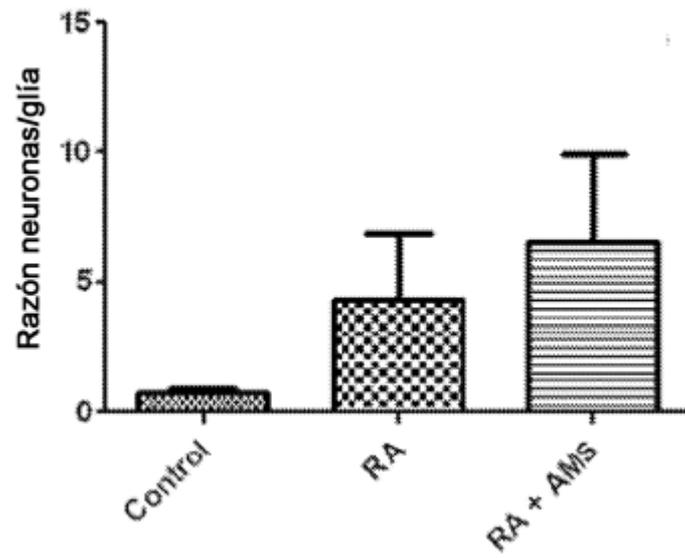


Fig. 5B

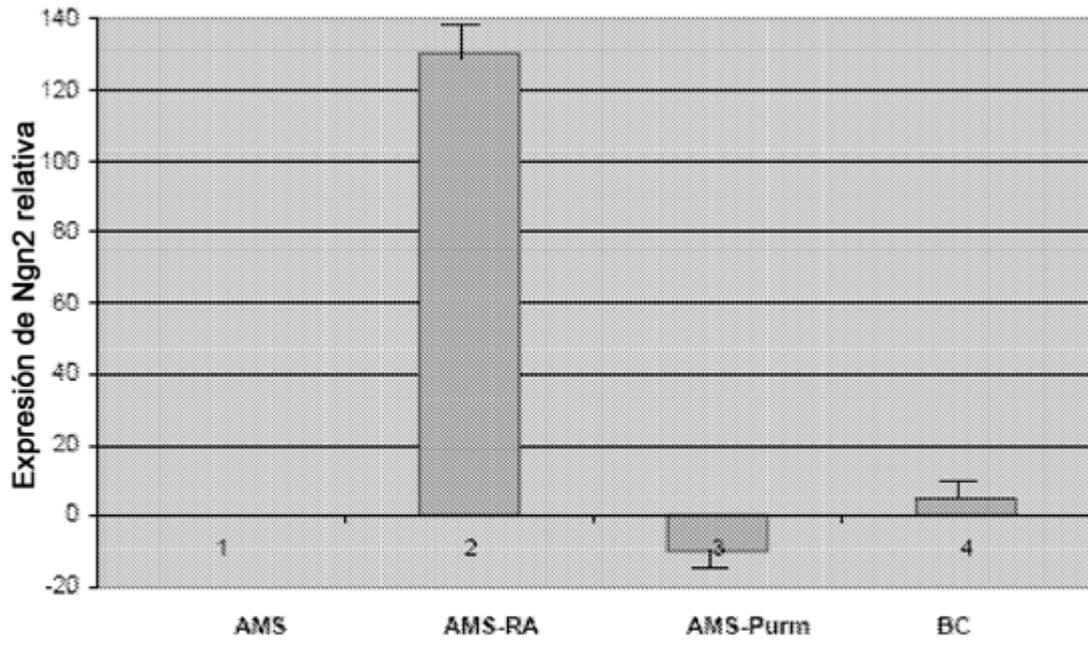


Fig. 6A

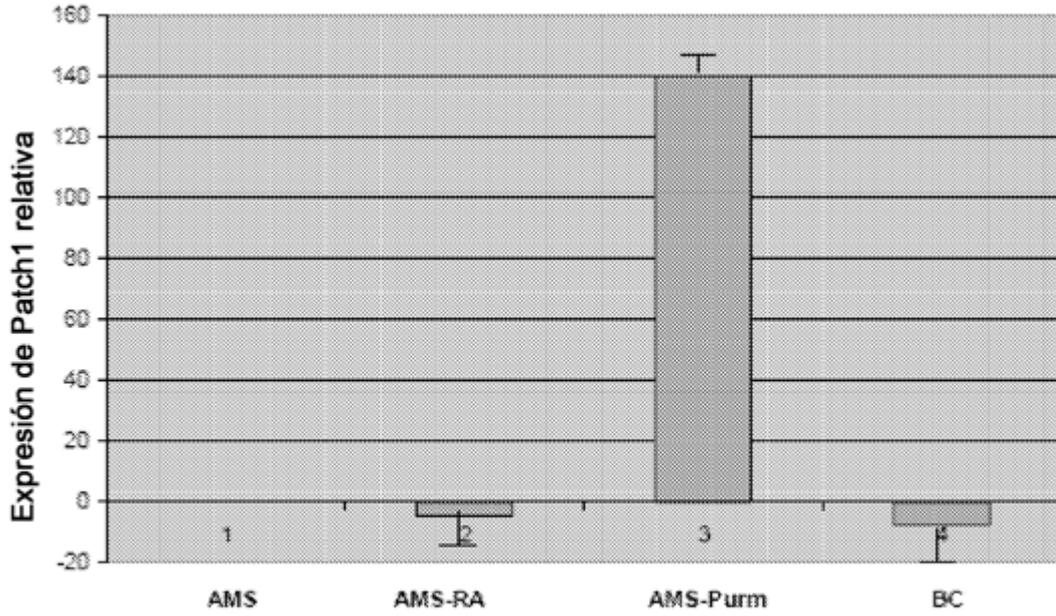


Fig. 6B

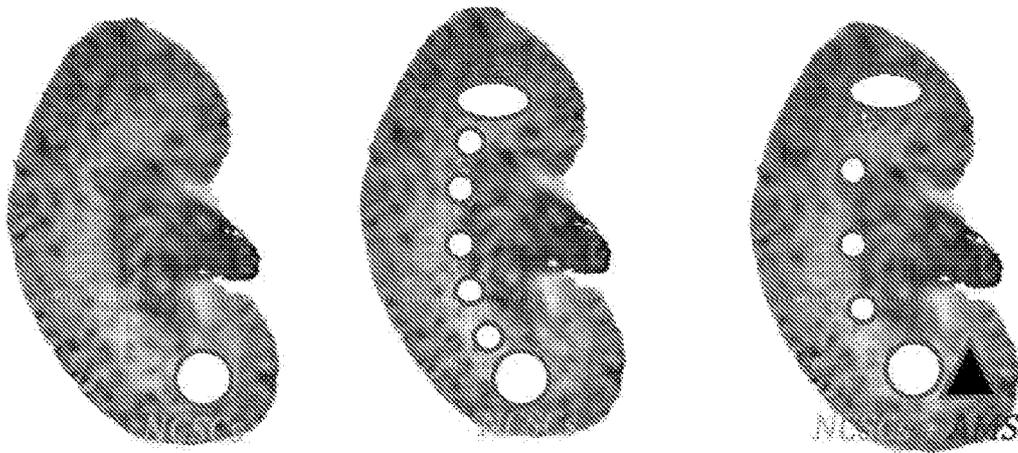


Fig. 7

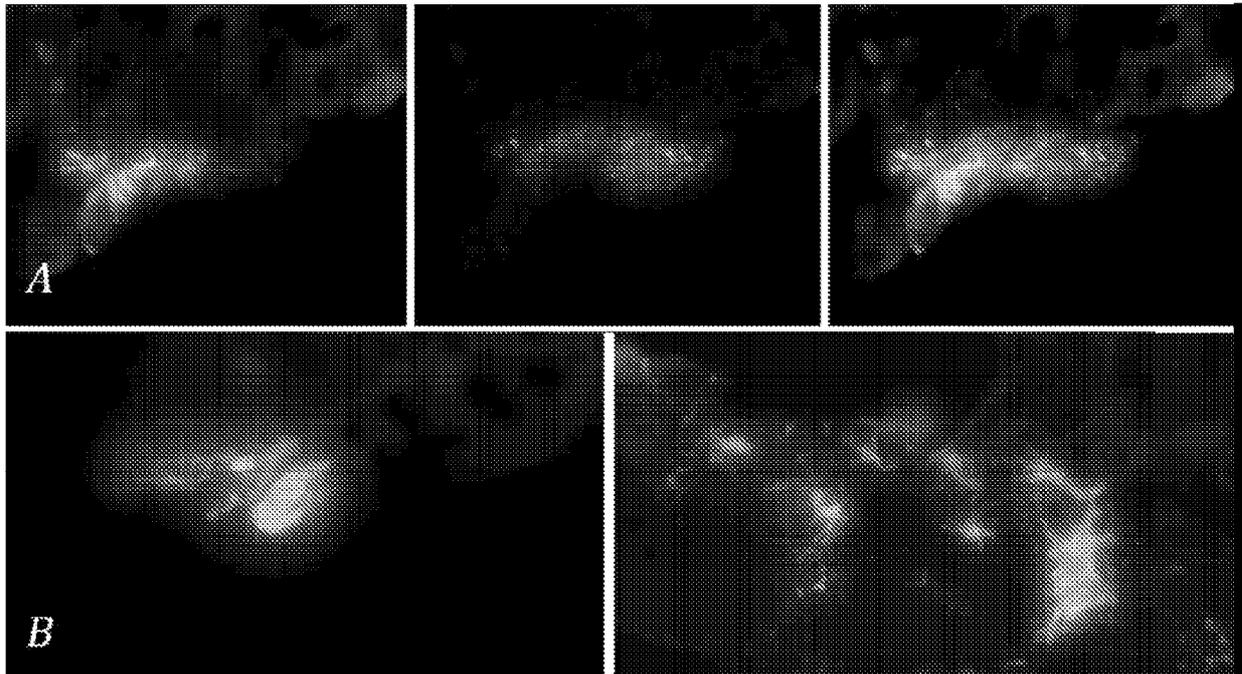


Fig. 8

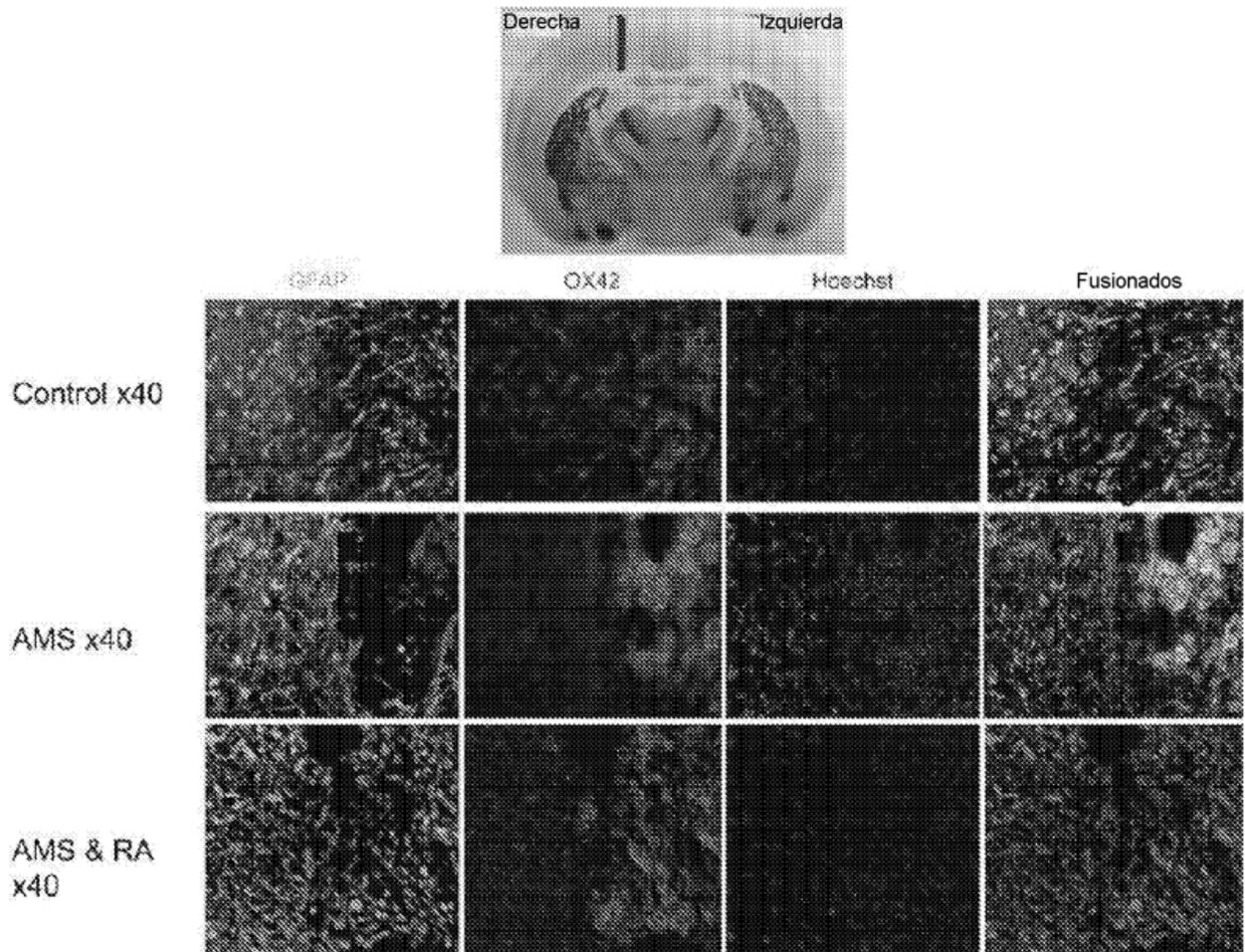


Fig. 9



Fig. 10

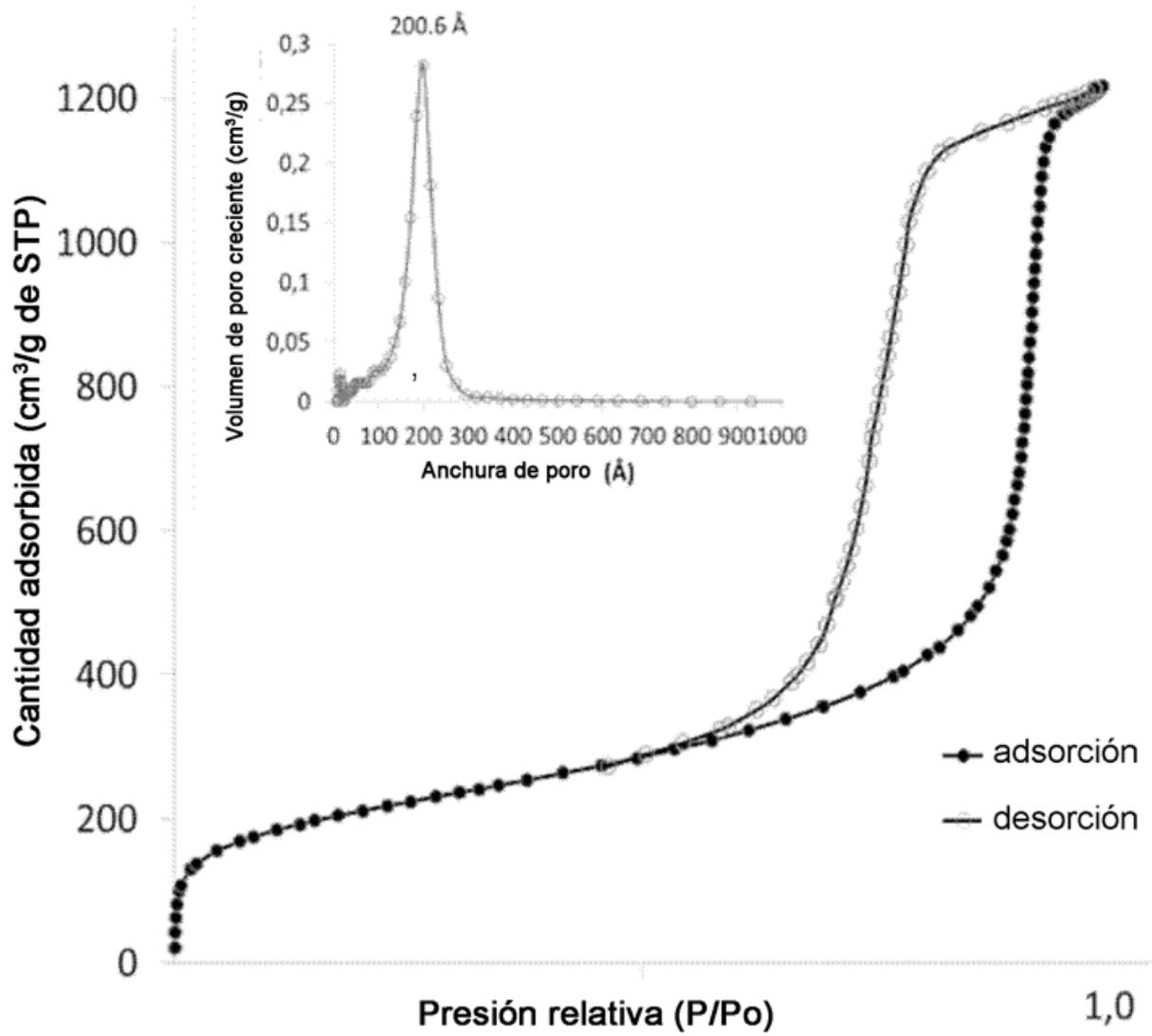


Fig. 11

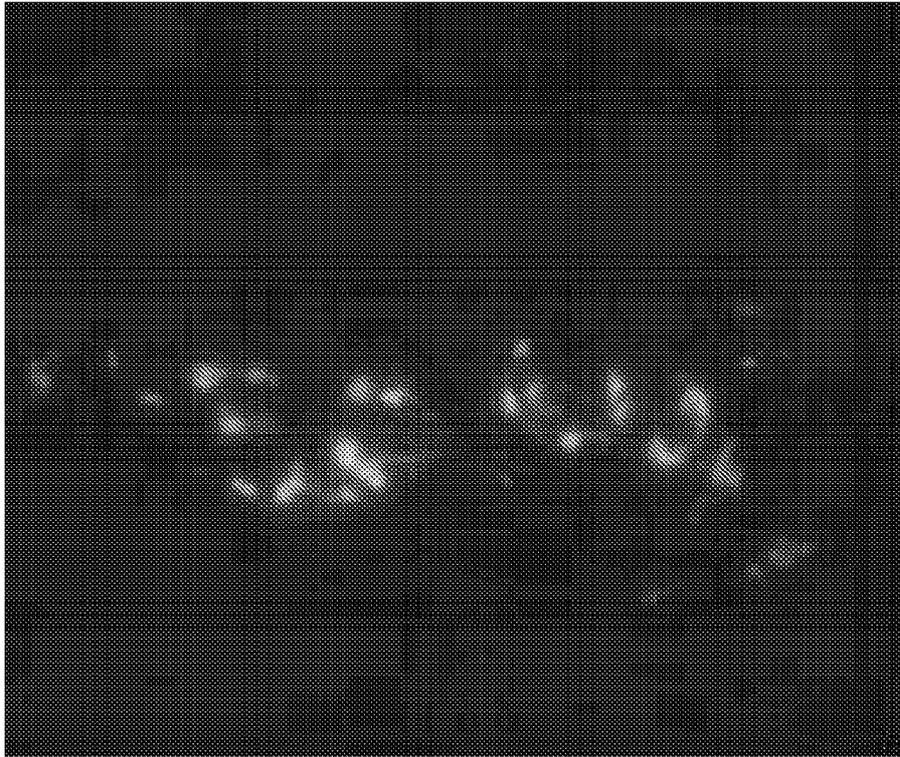


Fig. 12A

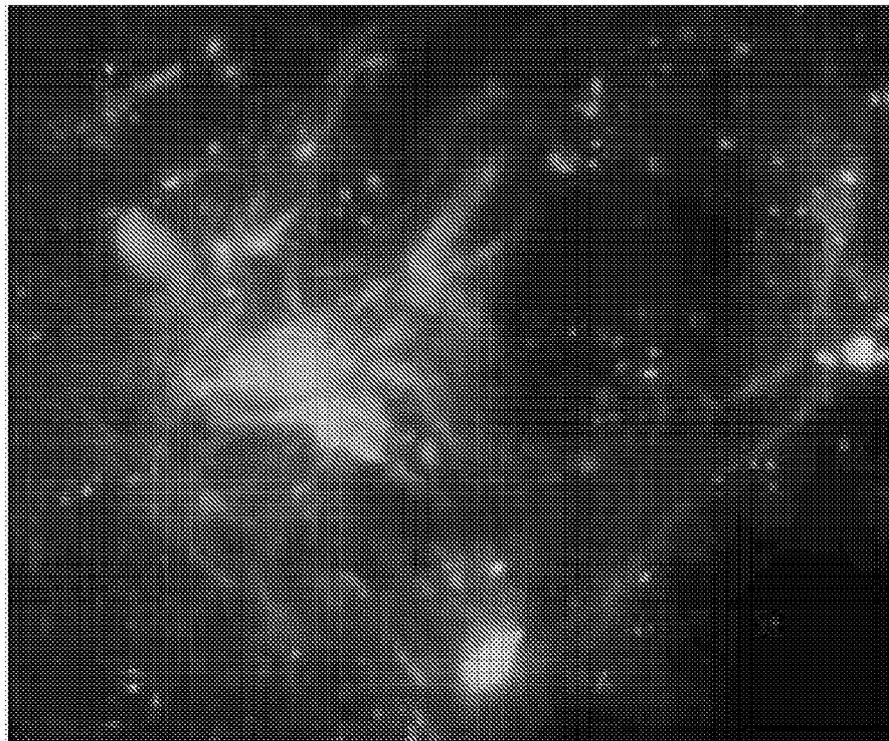


Fig. 12B