



(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 291 793**

(51) Int. Cl.:
C12N 5/06 (2006.01)
C12N 5/00 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Número de solicitud europea: **04023435 .3**
(86) Fecha de presentación : **01.10.2004**
(87) Número de publicación de la solicitud: **1642965**
(87) Fecha de publicación de la solicitud: **05.04.2006**

(54) Título: **Uso de fibroblastos diferenciados o un cultivo de fibroblastos primario para la transdiferenciación en células adiposas, células óseas y células cartilaginosas.**

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.03.2008

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.03.2008

(73) Titular/es: **Curacyte Discovery GmbH**
Deutscher Platz 5D
04103 Leipzig, DE

(72) Inventor/es: **Krieg, Thomas;**
Shephard, Pierre;
Eckes, Beate;
Herrmann, Konrad y
Etges, Robert

(74) Agente: **García-Cabrerizo y del Santo, Pedro María**

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

Uso de fibroblastos diferenciados o un cultivo de fibroblastos primario para la transdiferenciación en células adiposas, células óseas y células cartilaginosas.

La invención se refiere a un método que permite por primera vez diferenciar, a partir de fibroblastos diferenciados animales, preferiblemente humanos, o de cultivos de fibroblastos primarios, otras células de origen mesenquimatoso, como células adiposas (adipocitos), células óseas (osteoblastos) y células cartilaginosas (condrocitos) para usar estas células con propósitos terapéuticos en la medicina regenerativa (sustitución celular y tisular).

Desde hace más de 150 años se ha postulado la existencia de células madre mesenquimatosas en sangre y médula ósea, después que demostrara experimentalmente que desde la sangre migran células similares a fibroblastos hasta las lesiones y se adhieren a componentes del tejido conjuntivo. Sin embargo, los conocimientos respecto a la naturaleza de estas células adherentes son todavía muy deficientes incluso actualmente. Posteriormente se pudo demostrar en el plano del ARNm y también en el plano proteico que estas células sintetizan proteínas de la MEC, como por ejemplo, colágeno de tipo I, colágeno de tipo IV, laminina, fibronectina y numerosos proteoglicanos. Algunas de estas células sintetizan el antígeno asociado al Factor VIII, un hecho que dio pie a la suposición de que estas células también podrían ser precursoras de células endoteliales. Estas células sintetizan y secretan citocinas, como por ejemplo, IL-1, IL-6, IL-7, IL-8, IL-11, el factor estimulador de colonias 1 (CSF-1), GM-CSF y el factor de células madre (ligando de c-kit).

Desde el comienzo de los años 90 se ha conseguido obtener por la individualización de estas células madres mesenquimatosas /células precursoras adherentes y técnicas de clonación especiales, poblaciones celulares más homogéneas. Como una desventaja decisiva de estos trabajos se tiene que considerar el hecho de que todos los grupos de trabajo han trabajado de acuerdo con un protocolo individual, por lo tanto, han partido de poblaciones de células de partida muy diversas, y por tanto, los resultados obtenidos eran solamente difícilmente comparables.

Además, actualmente se conoce todavía muy poco sobre los mecanismos moleculares que conducen a la diferenciación en los diferentes tipos celulares mesenquimatosos. No se conoce si la población discutiblemente unitaria de la células madre mesenquimatosas pasa en primer lugar por una vía común de la diferenciación (células precursoras) para diferenciarse después basándose en etapas de diferenciación adicionales en un fenotipo especial (condrocito, fibroblasto, osteoblasto, adipocito), o si existen células precursoras preformadas actualmente todavía no conocidas para estos fenotipos individuales.

Ya en los años 70 se postuló la transformación de fibroblastos en células adiposas (Green y Kehinde, Cell (1976) 7: 105-113; Broad y Ham, Eur. J. Biochem. (1983) 135:33-39). Se informó de que, sin embargo, solamente muy pocos fibroblastos parecían ser capaces de diferenciarse en células adiposas y globalmente parece cuestionable si se partió realmente de fibroblastos y no de preadipocitos, una forma precursora de los adipocitos, que son morfológicamente muy similares a los fibroblastos, lo que parece probable teniendo en cuenta los conocimientos actuales.

Además se pudo demostrar, por hallazgos experimentales más recientes, que, a partir de células madre hematopoyéticas de la médula ósea se puede diferenciar *in vivo* una pluralidad de líneas celulares no hematopoyéticas. De este modo, entre otras cosas, se pudo demostrar *in vivo* que las células del músculo esquelético (Ferrari G *et al.* Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors. Science (1998) 279: 1528-1530), células del músculo cardíaco (Jackson KA *et al.* Regeneration of ischemic cardiac muscle and vascular endothelium by adult stem cells J. Clin Invest (2001) 107:1395-1402), células neuronales (Mezey E *et al.* Turning blood into brain: cells bearing neuronal antigens generated *in vivo* from bone marrow. Science (2000) 290: 1779-1782) y hepatocitos (Lagasse E *et al.* Purified hematopoietic stem cells can differentiate into hepatocytes *in vivo*. Nat Med (2000) 6: 1229-1234; Krause DS *et al.* Multi-organ, multi-lineage engraftment by a single bone marrow-derived stem cell. Cell (2001) 105:369-377; Alison MR *et al.* Hepatocytes from non-hepatic adult stem cells. Nature (2000) 406:257) se podrían desarrollar a partir de células madre de la médula ósea hematopoyéticas.

En tiempos recientes, diferentes grupos de trabajo pudieron demostrar *in vivo* que después del transplante de células madre hematopoyéticas, las mismas se fusionan con células residentes en tejido ya diferenciadas (Wang X *et al.* Cell fusion is the principal source of bone-marrow-derived hepatocytes. Nature (2003) 422:897-901; Alvarez-Dolado *et al.* Fusion of bone-marrow-derived cells with Purkinje neurons, cardiomyocytes and hepatocytes. Nature (2003) 425: 968-973; Nygren JM *et al.* Bone marrow-derived hematopoietic cells generate cardiomyocytes at a low frequency through cell fusion, but not transdifferentiation. Nat Med (2004) 10: 494-501).

Las investigaciones *in vivo* más recientes demuestran claramente que el transplante de células madre autólogas de la médula ósea y células de músculo esquelético mejora de forma significativa la función cardíaca después de un suceso de infarto. Los mecanismos moleculares de la diferenciación de las células madre a células de músculo cardíaco y la "transformación" de las células de músculo esquelético en células de músculo cardíaco, sin embargo, hasta hoy son desconocidos en su mayor parte.

Harris *et al.* pudieron demostrar que las células madre de médula ósea son capaces de diferenciarse *in vivo* hasta diversas células epiteliales del pulmón, del hígado y de la piel (Harris RG *et al.* Lack of fusion requirement for development of bone marrow-derived epithelia. Science (2004) 305: 90-93).

Actualmente se parte de forma consensuada del hecho de que en la médula ósea hay células madre/células precursoras que no solamente se pueden diferenciar en todas las células hematopoyéticas, sino que también hay células que se pueden diferenciar en células epiteliales (hígado, riñón, pulmón, piel, tracto gastrointestinal), células musculares (músculo esquelético, corazón), células mesenquimatosas (fibroblastos, células adiposas, células óseas, células cartilaginosas), en células endoteliales y en células neuronales (Herzog *et al.* Plasticity of marrow-derived stem cells. Blood (2003) 102: 3438-3493).

En los últimos años se han realizado grandes esfuerzos para utilizar la pluripotencia de estas células madre mesenquimatosas con propósitos terapéuticos. De este modo, estas células se obtuvieron de acuerdo con la técnica de adherencia clásica a partir de médula ósea autóloga, se pasaron las células por varios tiempos de duplicación y después estas células se inyectaron en las articulaciones del mismo paciente con artritis degenerativa. Un enfoque terapéutico adicional consistió en propagar las células madres mesenquimatosas autólogas de la médula ósea en primer lugar *in vitro* y diferenciarlas después mediante señales de diferenciación específicas hasta condrocitos y transplantar estas células después al paciente como sustitución tisular. Se realizaron intentos de curación correspondientes de forma exitosa en pacientes con sucesos de infarto cardíaco y fracturas de mala curación.

Para muchos ámbitos de la investigación y de la medicina es deseable poder influir sobre la diferenciación de células de forma dirigida. Esto se aplica particularmente a la diferenciación de células madre pluripotenciales. Adicionalmente, terapéuticamente es deseable poder pasar células diferenciadas a un estadio menos diferenciado, por ejemplo para

(a) poder obtener a partir de células ya diferenciadas de nuevo células con mayor plasticidad, lo que tiene la ventaja de que para la obtención de células pluripotenciales no se tienen que volver a usar células madre embrionarias, lo que está unido, en células madre embrionarias humanas, a una serie de problemas legales y éticos, o

(b) poder poner a disposición otras células fenotípicas para la medicina regenerativa.

Desafortunadamente, hasta hoy en día no ha sido posible obtener a partir de células primarias ya diferenciadas en la medida deseada otras células fenotípicas, y hasta ahora tampoco se ha partido del hecho de que lo mismo básicamente es posible.

El estadio de diferenciación o de función conocido desde hace más tiempo de fibroblastos es el miofibroblasto, que se caracteriza principalmente por la expresión de vimentina y α -actina de músculo liso y miofilamentos (Gabbiani, G, Chaponnier C, Huttner I. Cytoplasmic filaments and gap junctions in epithelial cells and myofibroblasts during wound healing. J Cell Biol (1978) 76: 561-568). Esta etapa de diferenciación, que se presenta principalmente durante la curación de lesiones, se desencadena por el efecto orquestado de citocinas solubles, principalmente TGF β y PDGF, fibronectina y estrés mecánico. Hasta hoy en día no se ha decidido de forma general si en los miofibroblastos se trata de una diferenciación real o de un estado funcional pasajero.

En el pasado se ha descrito múltiples veces la diferenciación de fibroblastos en histiocitos/macrófagos (Kaye GI *et al.* The colonic pericryptal fibroblast sheath: replication, migration and cytodifferentiation of a mesenchymal cell system in adult tissue. Gastroenterology (1986) 54: 852-865; Kopelovich L. Conversion of human fibroblasts to tissue macrophages by the Snyder-Theilen feline sarcoma virus (ST:FeSV) is associated with the de-novo expression of IL-1 alpha, IL-1 beta, IFN-alpha, TNF-alpha, GM-CSF, and CD4. Eur Cytokine Netw (1991) 2: 99-106). En trabajos adicionales también se observó una diferenciación de monocitos/macrófagos en fibroblastos (Labat ML *et al.* Monocytic origin of fibrosis. *In vivo* transformation of HLA-DR monocytes into neo-fibroblasts: inhibitory effect of all-trans retinoic acid on this process. Biomed Pharmacother (1994) 48: 103-111).

De forma interesante también se pudo demostrar que los macrófagos se pueden transdiferenciar en fibroblastos después de una infección con *Schistosoma mansoni* (Bertrand S *et al.* Transdifferentiation of macrophages into fibroblasts as a result of *Schistosoma mansoni* infection. Int J Dev Biol (1992) 36: 179-184).

Además existen indicios experimentales de que los fibroblastos incubados con un extracto celular de linfocitos o células nerviosas adoptaron el fenotipo de linfocitos o células nerviosas (Hakelien AM *et al.* Reprogramming fibroblasts to express T-cell functions using cell extracts. Nature Biotechnol (2002) 20: 460-466).

Toma *et al.* pudieron demostrar recientemente que se pueden aislar células precursoras a partir de la dermis de roedores, que se pueden diferenciar en células neuronales y de la glía, en células de músculo liso y en adipocitos (Toma JG *et al.* Isolation of multipotent adult stem cells from the dermis of mammalian skin. Nature Cell Biology (2001) 3:778-784).

Chen *et al.* han descrito recientemente que les fue posible, con ayuda de reservina, un compuesto heterocíclico, desdiferenciar, a partir de una línea celular miogénica de ratón (C2C12), células progenitoras multipotenciales y diferenciar las mismas en adipocitos y osteoblastos (Chen S *et al.* Dedifferentiation of lineage-committed cells by a small molecule. J Am Chem Soc (2004) 126: 410-411). Se tiene que señalar en este caso que Chen *et al.* han usado una línea celular inmortalizada que no se puede comparar con las características biológicas y bioquímicas de una célula primaria.

Para las necesidades terapéuticas del ámbito de la ingeniería tisular se plantea la urgente necesidad de generar células madre/células precursoras autólogas multipotentes y diferenciarlas *in vitro* o *in vivo* en el tipo celular deseado y transplantarlas al paciente. En primera línea se consideran células madre de la médula ósea. Durante este procedimiento no se puede evitar una punción quirúrgica de médula ósea, que de acuerdo con la experiencia, choca con una
5 baja conformidad en los pacientes, la mayoría de las veces, de más edad.

Se han establecido numerosos enfoques para usar fuentes diferentes de la médula ósea para la obtención de células madre. En la diferenciación de queratinocitos esto ya se consiguió hace años, sirviendo como lugar de origen para estas células el folículo piloso. Para la diferenciación de células óseas y de cartilaginosas no se ha obtenido hasta el
10 día de hoy ninguna fuente de acceso sencillo de células madre/células precursoras.

Por lo tanto, la presente invención se basa en el problema técnico de poner a disposición células de partida y métodos para la obtención de células diferenciadas deseadas, evitando el uso de células madre.

La solución de este problema técnico se realizó por la provisión de las realizaciones caracterizadas en las reivindicaciones.

Sorprendentemente se observó que el anterior problema técnico se puede resolver por el uso de fibroblastos obtenidos a partir de biopsias cutáneas como células de partida y en condiciones de cultivo determinadas.

En los experimentos que han conducido a la presente invención se ha partido de que células animales ya diferenciadas, como por ejemplo, fibroblastos, en condiciones reguladoras determinadas, pueden someterse a una desdiferenciación o transdiferenciación para diferenciarse después en otro fenotipo, como por ejemplo, células adiposas, células cartilaginosas u óseas. En experimentos repetidos se pudo demostrar claramente que una parte de los fibroblastos obtenidos por biopsia y cultivados, de forma similar a células madre mesenquimatosas adultas, se pueden diferenciar en los fenotipos que se han mencionado anteriormente (adipocitos, condrocitos, osteoblastos).

De este modo, por primera vez, se pudo establecer un método practicable en el que fibroblastos obtenidos por biopsia del mismo paciente se pudieron transformar por medios de diferenciación correspondientes en células adiposas, óseas y de cartilaginosas. Los hallazgos obtenidos, en cualquier caso, demuestran claramente que en las condiciones de diferenciación seleccionadas se pueden producir las poblaciones celulares que se han mencionado anteriormente *in vitro* y, por tanto, entre otras cosas, se ha encontrado una vía rápida, económica y sencilla para cultivar células potenciales autólogas (del mismo paciente) para una sustitución tisular.

De este modo, los hallazgos que conducen a la presente invención demuestran que los fibroblastos cultivados tienen la potencialidad de poder usarse como fuente que se puede obtener de forma muy sencilla, por ejemplo, para una “ingeniería tisular”. Todos los enfoques conocidos hasta ahora parten del uso de células madre adultas o embrionarias, cuya obtención posee no solamente obstáculos éticos, como en las células madre embrionarias, sino además, en el caso de las células madre adultas, es compleja, cara y no carece de riesgo para el paciente.

Mediante los ejemplos especificados, los inventores pudieron demostrar claramente que o bien los fibroblastos cultivados primarios son capaces de someterse a una transdiferenciación con el resultado de la formación de otro fenotipo mesenquimatoso, o bien en los cultivos de fibroblastos primarios, y esto también después de múltiples pases de los cultivos celulares, posiblemente hay células madre/células precursoras dérmicas que se pueden diferenciar después a su vez en condiciones de diferenciación correspondientes en los respectivos fenotipos.

La expresión usada en la presente solicitud “células animales” comprende todas las células animales, preferiblemente células de mamífero, por ejemplo, de seres humanos, rata, hámster, cerdo, vaca o conejo, sin embargo, las células humanas son mucho más preferidas.

Preferiblemente, los fibroblastos (o los fibroblastos del cultivo de fibroblastos) son fibroblastos que se han obtenido de biopsias de tejidos correspondientes, por ejemplo, tejido conjuntivo de la piel, del prepucio, del cuero cabelludo o incluso tejido conjuntivo con otro origen, que comprende fibroblastos como componente celular principal. La biopsia es, por ejemplo, una biopsia con aguja, de aspiración, con sacabocados, escisional o de punción con aguja fina, sin embargo, se prefieren la biopsia con sacabocados y escisional.

En un uso preferido, los fibroblastos son fibroblastos dérmicos.

En un uso preferido adicional, las células animales diferenciadas son células adiposas, células cartilaginosas o células óseas.

En una realización preferida de la invención, la obtención de las células animales diferenciadas se realiza cultivando los fibroblastos en un medio que contiene los factores de crecimiento necesarios para la diferenciación en las respectivas células. El especialista conoce métodos y medios de cultivo adecuados para poder cultivar fibroblastos (Freshney RI Culture of animal cells. A manual of technique. 2ª Edición ed, Wiley-Liss. New York (19879). El “medio base”, que contiene entre otras cosas factores de crecimiento, puede ser cualquier medio que se usa habitualmente para el cultivo de células animales. Las células deseadas se cultivan en el anterior medio en condiciones adecuadas, en un caso dado, con sustitución (parcial) del medio a intervalos temporales adecuados. El especialista conoce las

ES 2 291 793 T3

condiciones adecuadas, por ejemplo, respecto a recipientes adecuados, temperatura, humedad relativa, contenido de O₂ y contenido de CO₂ de la fase gaseosa. Preferiblemente, las células se cultivan en el anterior medio en las siguientes condiciones: (a) 36-38°C, preferiblemente 37°C, (b) humedad relativa del 90-100%, preferiblemente humedad relativa del 95%, (c) O₂ al 5-15%, preferiblemente O₂ al 10%, y (d) CO₂ del 3 al 10%, preferiblemente CO₂ del 5 al 7%. El especialista también puede supervisar el control deseado de la diferenciación de las células animales mediante criterios habituales (criterios morfológicos, presencia o ausencia de proteínas de superficie específicas, etc.).

Por la adición de compuestos correspondientes al medio de cultivo, por ejemplo, citocinas, se puede controlar la obtención del tipo celular deseado.

Se ha demostrado como preferible para la diferenciación adipogénica de fibroblastos animales cultivar los mismos en primer lugar en un medio denominado "medio de inducción" durante 2-5 días antes de que se sigan cultivando en un medio denominado "medio de mantenimiento" durante 2-5 días. Después se volvió a cambiar al medio de inducción. Habitualmente se usa un cambio de 2-5 veces entre el medio de inducción y de mantenimiento. Después del último cambio se debe continuar cultivando aproximadamente de 5 a 10 días en el medio de mantenimiento.

El "medio de inducción" tiene preferiblemente la siguiente composición:

- Medio DMEM alto en glucosa, suplementado con
- dexametasona 0,1 - 3 μ M (preferiblemente 0,5-2 μ M, mucho más preferiblemente 1 μ M)
- indometacina 0,1 - 0,4 mM (preferiblemente 0,2 μ M)
- 0,005 - 0,05 mg/ml de TGF β (preferiblemente 0,01 mg/ml)
- 0,005 - 0,05 mg/ml de insulina (preferiblemente 0,01 mg/ml)
- 3-isobutil-metilxantina 0,1 - 2 mM (0,5 mM)
- 1 - 5 μ g/ml de transferrina (preferiblemente 2 μ g/ml)
- suero fetal bovino al 5 - 20% (preferiblemente al 10%)
- 0,005 - 0,1 U/ml de penicilina (preferiblemente 0,05 U/ml)
- 0,005 - 0,1 μ g/ml estreptomicina (preferiblemente 0,05 μ g/ml)

El "medio de mantenimiento" tiene preferiblemente la siguiente composición:

- Medio DMEM alto en glucosa, suplementado con
- 0,005 - 0,05 μ g/ml de TGF β 3 (preferiblemente 0,01 μ g/ml)
- 0,005 - 0,05 mg/ml de insulina (preferiblemente 0,01 μ g/ml)
- suero fetal bovino al 5 - 20% (preferiblemente al 10%)
- 0,005 - 0,1 U/ml de penicilina (preferiblemente 0,05 U/ml)
- 0,005 - 0,1 μ g/ml de estreptomicina (preferiblemente 0,05 μ g/ml).

Para la diferenciación osteogénica de fibroblastos animales se ha demostrado que es preferible el siguiente método.

Las células se siembran y cultivan en placas de cultivo celular en medio de mantenimiento osteogénico [Medio DMEM alto en glucosa, que contenía 3-8 μ g/ml de insulina bovina (preferiblemente 6-7 μ g/ml), 4-9 μ g/ml de transferrina (preferiblemente 6-8 μ g/ml, mucho más preferiblemente 7 μ g/ml), 4-9 μ g/ml de ácido selenioso (preferiblemente 6-8 μ g/ml, mucho más preferiblemente 7 μ g/ml), 4-9 μ g/ml de ácido linoleico (preferiblemente 6-8 μ g/ml, mucho más preferiblemente 7 μ g/ml) y albúmina sérica bovina al 0,5-3% (preferiblemente al 1-2%)]. Después de 12-48 horas (preferiblemente 24 horas) de cultivo, el medio se sustituye por medio de inducción osteogénico [Medio DMEM alto en glucosa, que contenía 3-8 μ g/ml de insulina bovina (preferiblemente 6-7 μ g/ml), 4-9 μ g/ml de transferrina (preferiblemente 6-8 μ g/ml, mucho más preferiblemente 7 μ g/ml), 4-9 μ g/ml de ácido selenioso (preferiblemente 6-8 μ g/ml, mucho más preferiblemente 7 μ g/ml), 4-9 μ g/ml de ácido linoleico (preferiblemente 6-8 μ g/ml, mucho más preferiblemente 7 μ g/ml) y albúmina sérica bovina al 0,5-3% (preferiblemente al 1-2%), dexametasona 0,01-0,1 μ M (preferiblemente 0,1-0,15 μ M, mucho más preferiblemente 0,12 μ M), ácido ascórbico-2-fosfato 0,01-0,1 mM (preferiblemente 0,05 mM), 0,5-2 μ g/ml de fibronectina humana (preferiblemente 1 μ g/ml) y glicerofosfato 1-30 mM (preferiblemente 5-20 mM, mucho más preferiblemente 10 mM)], durante al menos 2-4, preferiblemente 3 semanas. El medio de inducción osteogénico se cambió preferiblemente cada dos a cinco días, preferiblemente cada tres.

ES 2 291 793 T3

Para la diferenciación condrogénica de fibroblastos animales se ha demostrado como preferido el siguiente método.

Las células se cultivan como sedimentos, se retira el medio de cultivo celular normal y se sustituye por medio de inducción condrogénico durante 12-48, preferiblemente 24 horas.

El medio de inducción condrogénico comprende preferiblemente la siguiente composición:

Medio DMEM alto en glucosa, suplementado con

dexametasona 0,1-0,2 μ M (preferiblemente 0,15 μ M)

piruvato sódico 0,5-3 mM (preferiblemente 1 mM)

ácido ascórbico-2-fosfato 0,1-0,2 mM (preferiblemente 0,17 mM)

prolina 0,1-1 mM (preferiblemente 0,4 mM)

4-9 μ g/ml de insulina bovina (preferiblemente 6-7 μ g/ml)

4-9 μ g/ml de transferrina (preferiblemente 6-8 μ g/ml, mucho más preferiblemente 7 μ g/ml)

4-9 μ g/ml de ácido selenioso (preferiblemente 6-8 μ g/ml, mucho más preferiblemente 7 μ g/ml)

4-9 μ g/ml de ácido linoleico (preferiblemente 6-8 μ g/ml, más preferiblemente 7 μ g/ml)

albúmina sérica bovina al 1-2% (preferiblemente al 1,25%)

0,01-0,05 μ g/ml de TGF β 3 (preferiblemente 0,02 μ g/ml)

10-500 U/ml de penicilina (preferiblemente 50-200 U/ml, mucho más preferiblemente 100 U/ml) y

10-500 U/ml de estreptomicina (preferiblemente 50-200 U/ml, mucho más preferiblemente 100 U/ml).

Los sedimentos celulares se desprendieron por una ligera agitación breve y se cultivaron durante al menos 1-5, preferiblemente 3 semanas en medio de inducción condrogénico. El medio de inducción condrogénico se sustituyó preferiblemente cada dos a cinco, preferiblemente cada tres.

Las células diferenciadas que se pueden obtener por el método de acuerdo con la invención son interesantes sobre todo para el uso terapéutico en la curación de lesiones y en la medicina de trasplantes.

La invención se explica mediante los siguientes ejemplos con más detalle.

Descripción de los métodos

1. Obtención de cultivos de fibroblastos primarios humanos

Para las investigaciones se usó piel humana que se obtuvo después de operaciones cosméticas. En cada caso se obtuvo el consentimiento del paciente.

Las biopsias cutáneas se cortaron después de retirar el tejido adiposo en trozos de aproximadamente 1 mm² de tamaño, que después se distribuyeron en frascos de cultivo tisular de poliestirol de 250 ml, se secaron durante 1 h en el incubador y se cultivaron finalmente en medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), que estaba suplementado con suero fetal bovino al 10% (FCS), L-glutamina (292 μ g/ml), ácido ascórbico (50 μ g/ml) penicilina (200 UI/ml) y estreptomicina (200 mg/ml). El cultivo se realizó a 37°C y con un contenido de CO₂ de 5% (v/v) y humedad relativa del 95% (v/v). Después de 2-3 semanas se desarrollaron a partir de los trozos de tejido en primer lugar queratinocitos y posteriormente fibroblastos. Después de alcanzar una monocapa confluyente, las células se lavaron con PBS, se incubaron 2 min con tripsina al 0,05%/EDTA al 0,02% (p/v) y después se desprendieron. El efecto de la tripsina se detuvo por la adición de medio, se distribuyeron las células en 2-4 frascos nuevos y se siguieron cultivando. Después de 1-2 semanas, los fibroblastos eran de nuevo confluentes y después se pasaron y subcultivaron como se ha descrito anteriormente.

Después del segundo pase, mediante comprobación morfológica e inmunohistoquímica ya solamente se pudieron observar fibroblastos en el cultivo.

2. Aislamiento de células madre mesenquimatosas humanas a partir de la médula ósea

Se obtuvieron células madre mesenquimatosas humanas (MSC) mediante aspiración con aguja fina de la médula ósea de la cresta iliaca de donantes sanos voluntarios o se adquirieron en la empresa Cambrex (Verviers, Bélgica).

ES 2 291 793 T3

El aspirado de aguja fina se alojó en 1 a 2 ml de medio MDM de Iscove, que contenía suero fetal bovino al 2%. La suspensión celular se transfirió a matraces de cultivo celular y se cultivó durante 7 días en Medio de Cultivo de Células Madre Mesenquimatosas de Poietics™ (MSCGM™, Cambrex) en el incubador a 37°C y con un contenido de CO₂ del 5% (v/v) y humedad relativa del 95% (v/v). Todas las células no adherentes se desecharon y las células adherentes se cultivaron en una etapa adicional hasta la confluencia de la monocapa en las mismas condiciones.

Después de la adición de tripsina, todas las células mostraron una reacción positiva en la citometría de flujo respecto a los marcadores de células madre mesenquimatosas conocidos y aceptados CD-44, CD-90 y CD-105.

3. *Comprobación del depósito lipídico (diferenciación adipogénica)*

La comprobación de la formación de gotitas lipídicas en las células diferenciadas adipogénicamente se realizó de acuerdo con indicaciones conocidas por la bibliografía mediante tinción con Rojo Aceite O.

Se obtuvo una solución madre de Rojo Aceite O por la disolución de 0,5 g de Rojo Aceite O en 100 ml de isopropanol al 99%. Para la solución de trabajo se diluyeron 6 partes en volumen de la solución madre con 4 partes de agua destilada y después se filtraron. Las células cultivadas sobre portaobjetos se fijaron durante 7 min mediante paraformaldehído al 10% en PBS a temperatura ambiente y se lavaron con agua destilada. Después se incubaron los portaobjetos en una solución acuosa de isopropanol al 60% durante 5 min a temperatura ambiente y se lavaron con agua destilada. Después, los portaobjetos se transfirieron durante 10 min a la solución de trabajo de Aceite Rojo O, se incubaron brevemente con isopropanol al 60% y se lavaron varias veces con agua destilada. Los núcleos de las células se contratiñeron con hematoxilina.

4. *Comprobación de fosfato cálcico depositado (diferenciación osteogénica)*

La comprobación de los depósitos de fosfato cálcico en las células después de la diferenciación osteogénica se realizó de acuerdo con la metodología descrita por von Kossa (von Kossa Über die im Organismus künstlich erzeugbaren Verkalkungen. Beitr Pathol Anat Alig Pathol (1901); 29: 162-202).

Las células cultivadas sobre portaobjetos se fijaron durante 7 min en paraformaldehído al 1% en PBS. Después de un breve lavado de los portaobjetos en agua destilada, los portaobjetos se incubaron durante 30 min en una solución de nitrato de plata al 5% y a continuación se sometieron a una intensa exposición a luz. Después, los portaobjetos se lavaron en agua destilada y se incubaron durante 3 min en una solución acuosa de ácido clorhídrico al 1%. Después de múltiples lavados de los portaobjetos en agua destilada, los mismos se incubaron durante 5 min en solución acuosa de tiosulfato al 5%, se lavaron varias veces con agua destilada y se secaron para la evaluación microscópica.

5. *Comprobación de la actividad de la fosfatasa alcalina*

La comprobación de la actividad de la fosfatasa alcalina se realizó con el kit de fosfatasa alcalina (Sigma; 86-R) de acuerdo con las indicaciones del fabricante. Wlodarski y Reddi pudieron demostrar claramente que la actividad de la fosfatasa alcalina se tiene que comprender como un marcador de la diferenciación osteogénica (Wlodarski KH y Reddi AH Alkaline phosphatase as a marker of osteoinductive cells. Calcif Tissue (1986) 39:382-385).

6. *Inmunofluorescencia*

Se investigaron cortes de secciones de sedimentos celulares después de la diferenciación condrogénica mediante anticuerpos contra colágeno de tipo II respecto a la expresión típica de condrocitos de colágeno de tipo II.

Los cortes se fijaron en paraformaldehído al 2% durante 10 min a temperatura ambiente. Los cortes se digirieron después con 2 mg/ml de pepsina en HCl 0,01 N durante 45 min a 37°C, para posibilitar al anticuerpo un reconocimiento y una unión del colágeno tipo II intracelular. Los cortes se bloquearon con suero de cabra al 5% y albúmina sérica bovina al 1% en PBS (tampón de bloqueo) durante 30 minutos a temperatura ambiente. El anticuerpo de ratón anti-colágeno II humano (MAB8887, Chemicon, Hofheim, Alemania) se diluyó hasta 4 µg/ml en tampón de bloqueo y los cortes se incubaron durante una noche a 4°C. El control de isotipos con MOPC21 (Sigma, Taufkirchen, Alemania) se trató en las mismas condiciones. Los cortes se lavaron con PBS varias veces el día siguiente. La comprobación de los anticuerpos primarios anti-colágeno de tipo II unidos se realizó después de 1 hora de incubación a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario de cabra anti-ratón marcado con Alexa 488 (Molecular Probes, Leiden, Países Bajos) diluido 1:1000 en tampón de bloqueo con 1 µg/ml de 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI, Sigma). Después de varias etapas de lavado con PBS, los cortes teñidos se evaluaron en un microscopio Nikon Eclipse 800 con ayuda de una cámara digital (Nikon, Düsseldorf, Alemania) y un software de análisis de imágenes (Lucia G, Laboratory imaging).

7. *Aislamiento y transcripción inversa de ARN*

El ARN total de los cultivos celulares se aisló de acuerdo con las indicaciones del fabricante mediante columnas Qiagen RNeasy. Para la transcripción inversa se usó respectivamente 1 µg de ARN total y se realizó la misma con ayuda del kit Superscript II de Invitrogen de acuerdo con el protocolo del fabricante. La eficacia de la transcripción inversa se supuso del 100% de forma correspondiente a experiencias anteriores.

8. PCR cuantitativa

Los experimentos de PCR cuantitativos se realizaron respectivamente por triplicado para cada sonda, con ayuda del kit Quantitec SYBRgreen de Quiagen, de acuerdo con las indicaciones del fabricante. Para cada reacción de PCR se usaron 10 ng de ADNc. Los cebadores se diseñaron con ayuda del software Primer Express de Applied Biosystems. Se usaron los siguientes cebadores:

1. cebador directo de adipina 5' CCGACACCATCGACCACG 3'

2. cebador inverso de adipina 5' AGAGTTCCCGGTGCCACG 3'

Los resultados se normalizaron mediante ARN de proteína ribosómica MRPS26.

1. cebador directo de MRPS26 5' CCGACACCATCGACCACG 3'

2. cebador inverso de MRPS26 5' TTCACATACAGCTTGGAAGCA 5'

A continuación se indican los parámetros de ciclo usados:

50°C durante 2 min, 95°C durante 15 min seguido de 40 ciclos a 94°C durante 15 s; 55°C durante 30 s; 72°C durante 30 s.

Los experimentos de PCR cuantitativos se realizaron en un Sistema de Detección de Secuencia Genmap 5700 de ABI Biosystems. Los resultados se analizaron con el software SDS adjunto. La especificidad de las reacciones de amplificación se evaluó mediante el análisis de curva de desnaturalización correspondiente al protocolo de ABI Biosystems.

Ejemplo 1

Diferenciación de fibroblastos y MSC en adipocitos

Se usaron MSC humanos de forma general como control positivo para la diferenciación de fibroblastos.

La diferenciación en adipocitos se caracteriza por una acumulación de gotitas lipídicas en las células y por la regulación positiva de marcadores de células adiposas específicos, como por ejemplo, la adipina. Una diferenciación en adipocitos de MSC se puede inducir una vez cultivando las células durante un tiempo prolongado en un estadio superconfluyente, o por una estimulación con insulina (Prockop DJ Marrow stromal cells as stem cells for nonhemapoietic tissues. Science (1997) 276: 71-74; Pittenger MF *et al.* Human mesenchymal stem cells: progenitor cells for cartilage, bone, fat and stroma. Curr Top Microbiol Immunol (2000) 251: 3-11).

La diferenciación adipogénica de las células madre mesenquimatosas de la médula ósea y de los fibroblastos primarios humanos se realizó del siguiente modo:

Los fibroblastos o las MSC se sembraron para una diferenciación adipogénica en portaobjetos de cultivo tisular Nunc Lab-Tek-I o II o en placas de cultivo celular de 6 pocillos con una densidad de $2,1 \times 10^4$ células por cm^2 . Las células se cultivaron hasta la confluencia en medio MSCGM[™] en el incubador a 37°C y con un contenido de CO₂ del 5% (v/v) y con humedad relativa del 95% (v/v). Con una confluencia del 100% de la monocapa se indujo la diferenciación adipogénica con un denominado medio de inducción. Con el medio de inducción adipogénico, que contenía medio DMEM alto en glucosa y dexametasona 1 μM , indometacina 0,02 mM, 0,01 mg/ml de TGF β , 0,01 mg/ml de insulina, 3-isobutil-l-metilxantina 0,5 mM, 2 μg /ml de transferrina, suero fetal bovino al 10% (ensayado respecto a actividad inductora de crecimiento), 0,05 U/ml de penicilina y 0,05 μg /ml de estreptomina, las células se cultivaron durante 3 días. Después, el medio se sustituyó por el medio de mantenimiento adipogénico (DMEM alto en glucosa, que contenía 0,01 μg /ml de TGF β 3 (R&D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt, Alemania), 0,01 mg/ml de insulina, suero fetal bovino al 10%, 0,05 U/ml de penicilina y 0,05 μg /ml de estreptomina). Este cambio del medio de inducción al medio de mantenimiento y viceversa se repitió 3 veces. Después del último cambio, las células se cultivaron durante 7 días en el medio de mantenimiento. Después de este momento, las células (fibroblastos, MSC) se analizaron. Los cultivos de control se sembraron de forma idéntica y se cultivaron todo el tiempo en medio de mantenimiento adipogénico (Fig. 1).

La Fig. 1 presenta en el lado izquierdo las células 3 semanas después de la diferenciación adipogénica con medio adipogénico (= combinación de medios de inducción/medio de mantenimiento) y en el lado derecho células que se cultivaron con medio de control (solamente medio de mantenimiento adipogénico; control negativo) del mismo modo durante 3 semanas. La comprobación de gotitas lipídicas mediante Aceite Rojo O mostró una reacción positiva fuerte en los fibroblastos diferenciados del paciente P2 y claramente debilitada de los del paciente P3, también dependiendo del número de pases respectivo (t1, t2, t5, t7). La diferenciación adipogénica de las células madre mesenquimatosas de la médula ósea (BM-MSC) también mostró un depósito claro de gotitas lipídicas teñidas de rojo. Las células representadas en la hilera derecha (sin cultivo en medio de inducción adipogénico; control negativo), no mostraron comprobación de gotitas lipídicas positivas. Los núcleos celulares se tiñeron azules mediante HE. Como se puede observar adicionalmente en la Figura 1, existen diferencias individuales entre cultivos de fibroblastos de pacientes

individuales en su potencialidad de diferenciación, ya que en el cultivo celular del paciente P3 se pudieron comprobar considerablemente menos adipocitos. La edad de este paciente era de 32 años en comparación al paciente P2 con 63 años. A continuación se comprobó la dependencia del tiempo de la diferenciación adipogénica. Una comprobación de gotitas lipídicas era negativa directamente después de la adición del medio adipogénico el día 0, el día 3 y el día 8. En el día 13 del cultivo con medio adipogénico se pudo observar una coloración positiva en el cultivo de fibroblastos y en el cultivo de MSC. Después de un cultivo de 4 semanas de las células en medio adipogénico se pudo observar una coloración claramente positiva (depósito lipídico intracelular) (Fig. 2).

La columna superior de la Fig. 2 representa a la derecha fibroblastos P2 diferenciados adipogénicamente del pase 4 y a la izquierda células madre mesenquimatosas BM-MSC del pase 4. En la hilera inferior se representan los controles correspondientes (medio de inducción adipogénico). Los núcleos celulares de los cultivos se contratiñeron con HE.

Como comprobación adicional de la diferenciación adipogénica que se ha producido se determinó mediante PCR cuantitativa la expresión de ARNm específica de la proteína específica de adipocitos adiposina.

En la Fig. 3 se representa la relación de la expresión de ARNm de adiposina de diferentes cultivos de fibroblastos (P1, P2, P3) y de células madre mesenquimatosas (MSC) después de la diferenciación adipogénica en relación a los cultivos control correspondientes (sin diferenciación adipogénica) como inducción múltiple. Como se puede observar en la figura, las MSC diferenciadas adipogénicamente muestran un aumento de un factor mayor de 35 de la expresión de ARNm de adiposina. También en todos los fibroblastos investigados después la diferenciación adipogénica se pudo observar un claro aumento de la expresión hasta por encima de un factor 12 en el paciente P2.

En resumen, por lo tanto, se pudo observar que de forma similar a las células madre mesenquimatosas, también los fibroblastos primarios se pueden diferenciar en adipocitos. Evidentemente, parece existir una dependencia del grado de diferenciación de la edad del paciente y del número de pases.

Ejemplo 2

Diferenciación de fibroblastos y MSC en osteoblastos

Se añadieron MSC humanas de forma general como control positivo para la diferenciación de fibroblastos.

La diferenciación osteogénica de las células madre mesenquimatosas de la médula ósea y de los fibroblastos primarios humanos se realiza del siguiente modo:

Las células se sembraron en placas de cultivo celular con una densidad celular de $3,1 \times 10^3$ por cm^2 durante 24 horas en medio de mantenimiento osteogénico (medio DMEM alto en glucosa que contenía $6,5 \mu\text{g/ml}$ de insulina bovina, $7 \mu\text{g/ml}$ de transferrina, $7 \mu\text{g/ml}$ de ácido selenioso, $7 \mu\text{g/ml}$ de ácido linoleico y de albúmina sérica bovina al 1,25%). El cultivo se realizó en un incubador a 37°C y CO_2 al 5%. Después de 24 horas de cultivo, el medio se sustituyó por medio de inducción osteogénico (medio DMEM alto en glucosa que contenía $6,5 \mu\text{g/ml}$ de insulina bovina, $7 \mu\text{g/ml}$ de transferrina, $7 \mu\text{g/ml}$ de ácido selenioso, $7 \mu\text{g/ml}$ de ácido linoleico y albúmina sérica bovina al 1,25%, dexametasona $0,12 \mu\text{M}$, ácido ascórbico-2-fosfato $0,05 \text{ mM}$, $1 \mu\text{g/ml}$ de fibronectina humana y glicerofosfato 10 mM), durante al menos 3 semanas. El medio de inducción osteogénico se sustituyó cada tres días. Las células del control negativo solamente se cultivaron en medio de mantenimiento osteogénico durante el mismo intervalo temporal y en condiciones idénticas.

La diferenciación producida en células óseas (osteoblastos) se caracteriza porque se produce una acumulación de fosfato cálcico y una expresión aumentada de la enzima fosfatasa alcalina. Con ayuda de este marcador aceptado internacionalmente se debe comprobar si es posible, de forma similar a la diferenciación adipogénica, también una diferenciación osteogénica de fibroblastos humanos primarios.

En la Fig. 4 se representa el resultado de la diferenciación osteogénica de fibroblastos y células madre mesenquimatosas mediante la comprobación positiva del depósito de fosfato cálcico en la tinción de von Kossa (tinción marrón/negra). En los cultivos de fibroblastos de los paciente P1 y P2 se pudo comprobar, como en las células madre mesenquimatosas, un depósito masivo de fosfato cálcico. Esta comprobación evidente no se consiguió en el alcance suficiente en los fibroblastos del paciente P2.

En la Fig. 5 se representa la diferenciación osteogénica de fibroblastos y células madre mesenquimatosas mediante el aumento de la expresión/actividad de la fosfatasa alcalina. Cada célula tiene un cierto nivel basal de actividad de fosfatasa alcalina, pero la expresión y actividad de esta enzima aumenta mucho solamente después de la diferenciación osteogénica.

La tinción representada en la Fig. 5 de la fosfatasa alcalina después de la diferenciación osteogénica y de los controles correspondientes se realizó después de un tiempo de diferenciación de 3 semanas y se puede observar como tinción rojo/violeta. En el lado izquierdo se representan los fibroblastos diferenciados osteogénicamente (P1, P2) y las células madre mesenquimatosas (BM-MSC) como control positivo. Se puede observar claramente que las células diferenciadas osteogénicamente (izquierda), en comparación con las células de control correspondientes (derecha), presentan una actividad de fosfatasa alcalina significativamente mayor. Los núcleos celulares se contratiñeron con HE.

Estos datos demuestran claramente el hecho de que los fibroblastos primarios humanos se pueden diferenciar en las condiciones de diferenciación indicadas en células óseas.

Ejemplo 3

Diferenciación de fibroblastos y MSC en condrocitos

La diferenciación condrogénica de, por ejemplo, células madre mesenquimatosas, se caracteriza por la regulación positiva de diferentes proteoglicanos, como por ejemplo, el agregano y el colágeno de tipo II típico de células cartilaginosas. Mediante este ejemplo se quiere demostrar que los fibroblastos control no secretan el colágeno de tipo II, sin embargo, que después de la diferenciación condrogénica, esta proteína específica se puede comprobar.

La diferenciación condrogénica de las células madre mesenquimatosas de la médula ósea y de los fibroblastos primarios humanos se realiza del siguiente modo.

Las células se cultivaron como sedimentos de aproximadamente $2,5 \times 10^5$ células en tubos de polipropileno (tubos Eppendorf estériles). Para obtener una formación de sedimento, las células se centrifugaron durante 3 min a 150x g, se retiró el medio de cultivo celular normal y se sustituyó por medio de inducción condrogénico durante 24 horas. El medio de inducción condrogénico consistía en medio DMEM alto en glucosa, que contenía dexametasona $0,15 \mu\text{M}$, piruvato sódico 1 mM, ácido ascórbico 2-fosfato $0,17 \text{ mM}$, prolina $0,4 \text{ mM}$, $6,5 \mu\text{g/ml}$ de insulina bovina, $7 \mu\text{g/ml}$ de transferrina, $7 \mu\text{g/ml}$ de ácido selenioso, $7 \mu\text{g/ml}$ de ácido linoleico, albúmina sérica bovina al 1,25%, $0,02 \mu\text{g/ml}$ de TGF- β_3 (R&D Systems, Alemania), 100 U/ml de penicilina y 100 U/ml de estreptomicina. Los sedimentos celulares se desprendieron por una ligera agitación breve y se cultivaron durante al menos 3 semanas en medio de inducción condrogénico a 37°C , CO_2 al 5%. El medio de inducción condrogénico se cambio cada tres días. Se cultivaron cultivos de control con medio DMEM que contenía suero fetal bovino al 10%.

Los cultivos de células madre mesenquimatosas (BM-MSC) se cultivaron en condiciones de diferenciación condrogénica (Fig. 6A y B), se realizaron cortes de los sedimentos celulares y se tiñeron con anticuerpos contra colágeno de tipo II. En las imágenes B y C de la Fig. 6 se representan las células de control correspondientes sin diferenciación condrogénica. La tinción verde representa el colágeno detectado por el anticuerpo específico contra colágeno de tipo II y la tinción azul refleja los núcleos celulares contrateñidos con DAPI. El aumento de las imágenes A y B comprende 40x y de las imágenes C y D 80x.

En la Fig. 7 se representa la diferenciación condrogénica de fibroblastos de los pacientes P1 y P2, de células madre mesenquimatosas (BM-MSC) en comparación con los controles correspondientes. Las imágenes A, B, C muestra la tinción inmunohistoquímica con un anticuerpo específico contra colágeno de tipo II con un aumento de 40x y las imágenes D, E y F con aumento de 80x. Las imágenes G, H e I representan los controles correspondientes (sin medio de diferenciación condrogénico) en el aumento 40x. Como se puede observar en la Fig. 7, las células madre mesenquimatosas y los fibroblastos son capaces de secretar, en condiciones de diferenciación condrogénica, el colágeno de tipo II selectivo y típico de células cartilaginosas (fluorescencia verde). El anticuerpo específico de isotipo usado en el control (imagen G, H e I) no mostró unión inespecífica. Los núcleos celulares de los cortes se contratiñeron con DAPI y se observan azules.

REIVINDICACIONES

1. Un uso de fibroblastos diferenciados o de un cultivo de fibroblastos primario para la transdiferenciación *in vitro* en células adiposas, cartilaginosas u óseas.

2. El uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que los fibroblastos o el cultivo de fibroblastos primario se obtuvieron de material de biopsia.

3. El uso de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2, en el que los fibroblastos proceden de seres humanos, rata, hámster, cerdo, vaca o conejo.

4. El uso de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 3, en el que los fibroblastos son fibroblastos dérmicos.

5. Un método *in vitro* para la obtención de células adiposas a partir de fibroblastos diferenciados o un cultivo de fibroblastos primario, en el que los fibroblastos se cultivan en primer lugar en un medio de cultivo, que está suplementado con dexametasona, indometacina, TGF β , insulina, 3-isobutil-l-metilxantina, transferrina, suero fetal bovino, penicilina y estreptomycin, y después en un medio de cultivo que está suplementado con TGF β 3, insulina, suero fetal bovino, penicilina y estreptomycin, en el que se produce entre 2 a 5 veces un cambio entre los medios de cultivo.

6. Un método *in vitro* para la obtención de células cartilaginosas a partir de fibroblastos diferenciados o un cultivo de fibroblastos primario, en el que los fibroblastos se cultivan en un medio de cultivo que está suplementado con dexametasona, piruvato sódico, ácido ascórbico-2-fosfato, prolina, insulina, transferrina, ácido selenioso, ácido linoleico, albúmina sérica bovina, TGF- β 3, penicilina y estreptomycin.

7. Un método *in vitro* para la obtención de células óseas a partir de fibroblastos diferenciados o un cultivo de fibroblastos primario, en el que los fibroblastos se siembran y se cultivan durante varias horas en un medio de cultivo que está suplementado con insulina, transferrina, ácido selenioso, ácido linoleico y albúmina sérica bovina y después se cultivan varias semanas en un medio de cultivo que está suplementado con insulina, transferrina, ácido selenioso, ácido linoleico, albúmina sérica bovina, dexametasona, ácido ascórbico-2-fosfato, fibronectina humana y glicerofosfato.

8. El método de acuerdo con una de las reivindicaciones 5 a 7, en el que los fibroblastos o el cultivo de fibroblastos primario se obtuvo de material de biopsia.

9. El método de acuerdo con una de las reivindicaciones 5 a 8, en el que los fibroblastos proceden de seres humanos, rata, hámster, cerdo, vaca o conejo.

10. El método de acuerdo con una de las reivindicaciones 5 a 9, en el que los fibroblastos son fibroblastos dérmicos.

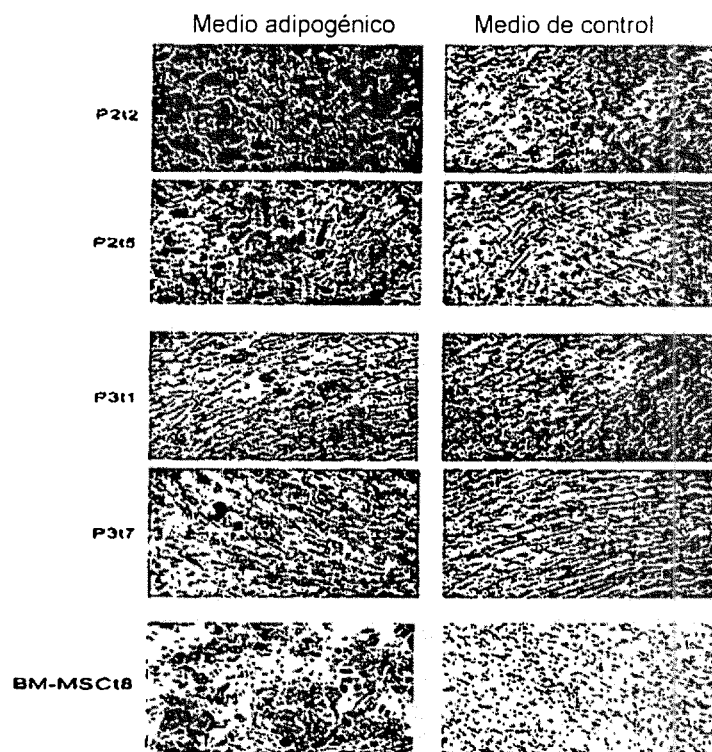


Fig 1. Diferenciación adipogénica de fibroblastos dérmicos humanos (P2/P3) y MSC de la médula ósea (BM-MS18)

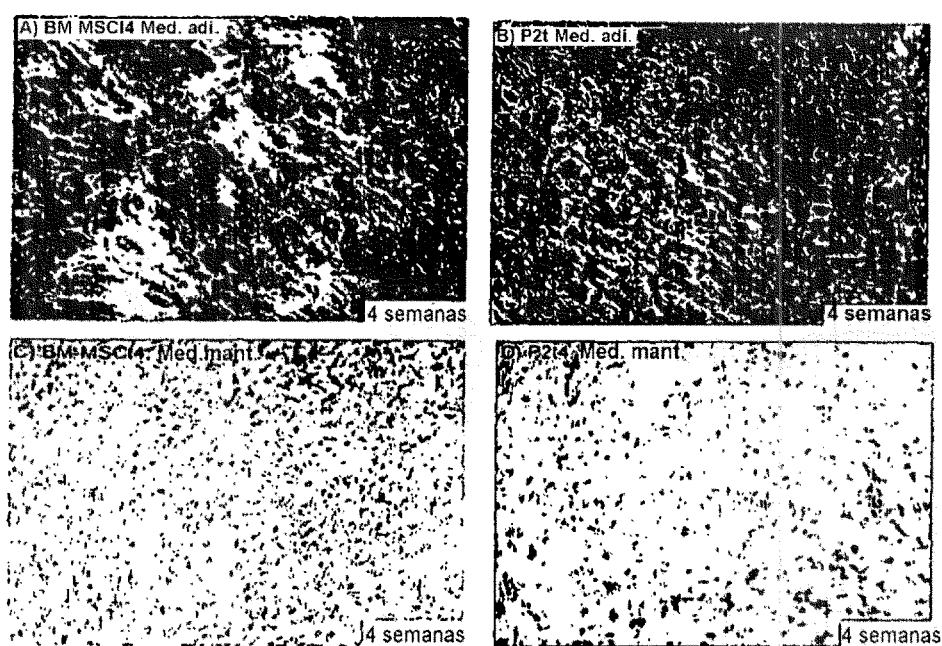


Fig 2. Desarrollo temporal de la diferenciación adipogénica de fibroblastos humanos (P2) y MSC de la médula ósea (BM-MS)

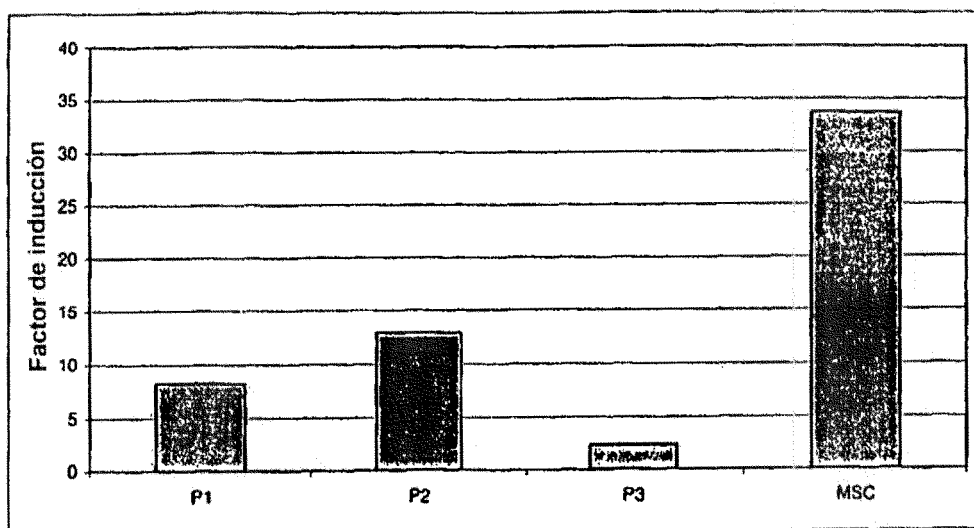


Fig 3. Expresión del marcador de diferenciación adipogénica adipina en fibroblastos diferenciados adipogénicamente y MSC

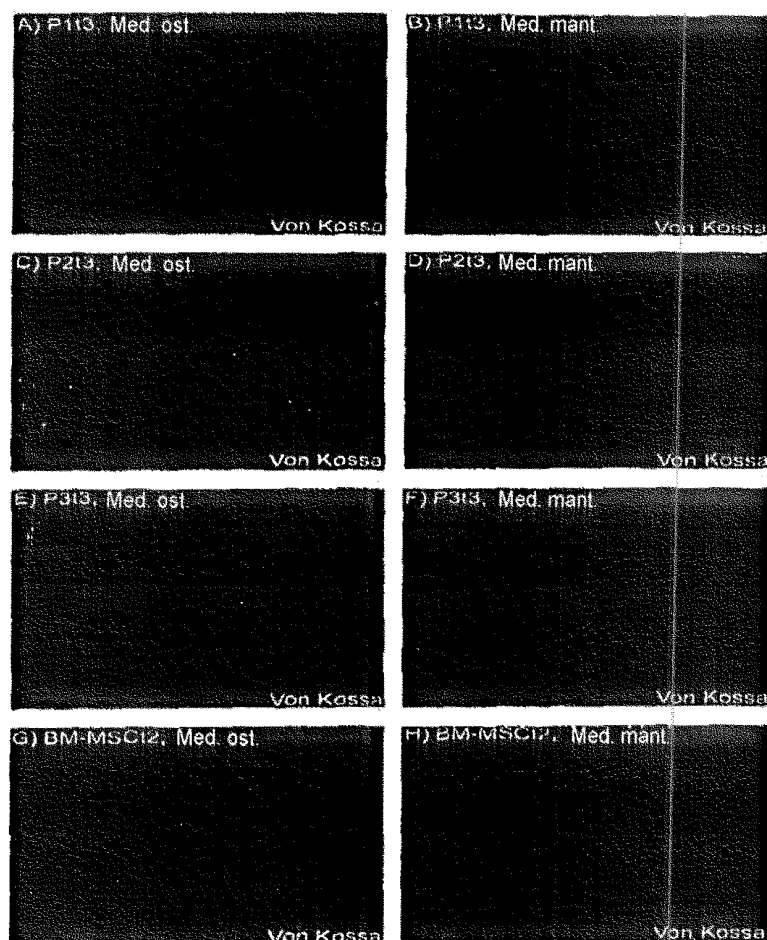


Fig 4. Diferenciación osteogénica de fibroblastos humanos (P1, P2, P3) y células madre mesenquimatosas (BM-MSCI2)

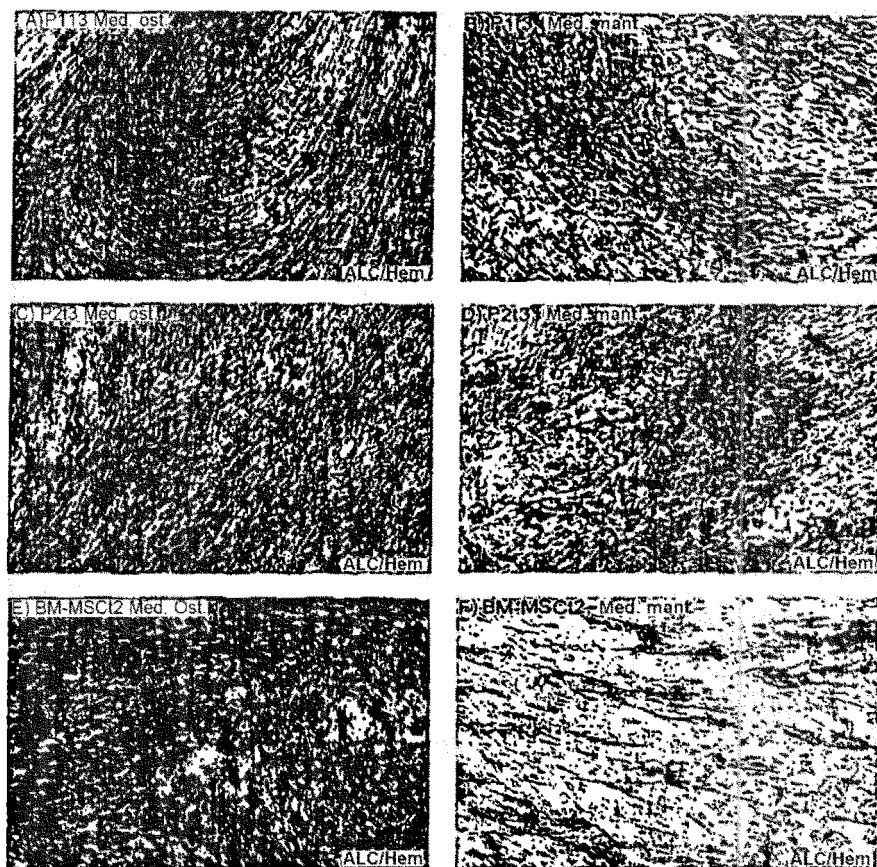


Fig 5. Diferenciación osteogénica de fibroblastos humanos (P1, P2) y células madre mesenquimatosas (BM-MSc)

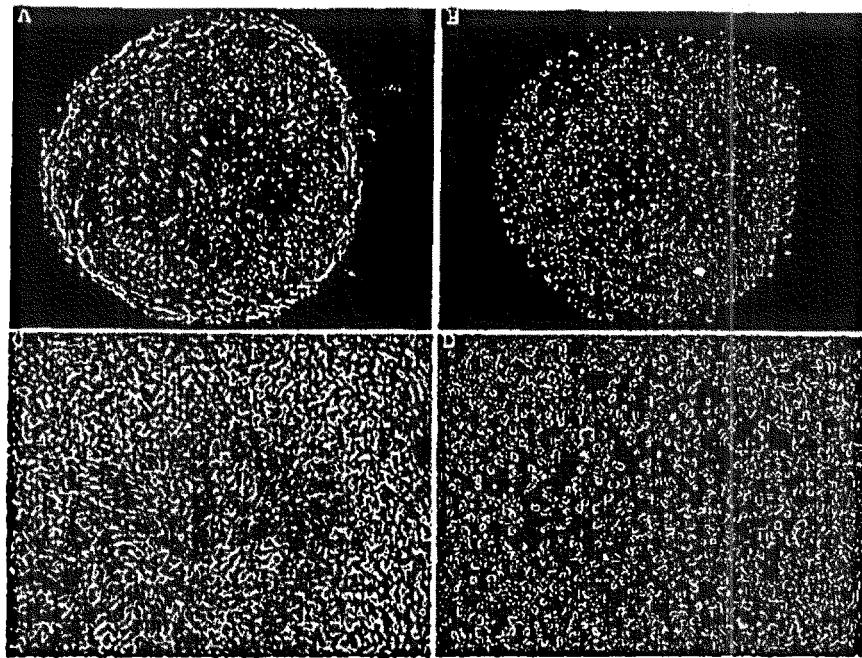


Fig 6. Diferenciación condrogénica de células madre mesenquimatosas (BM-MSC)

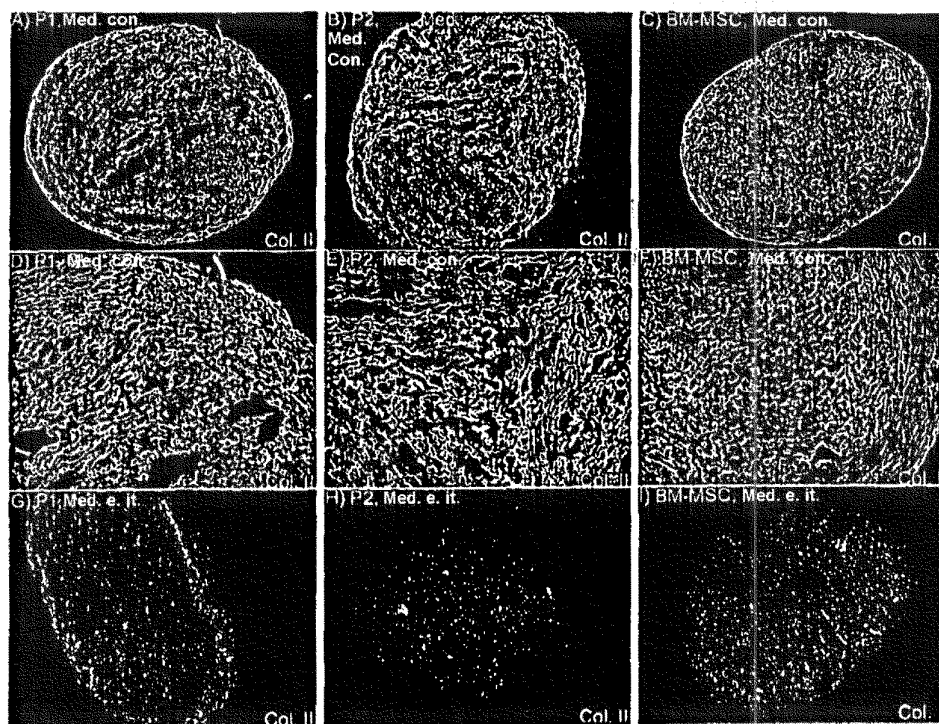


Fig 7. Diferenciación condrogénica de fibroblastos humanos (P1, P2) y células madre mesenquimatosas (BM-MSK)