(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 716 015**

(51) Int. CI.:

A61K 35/28 (2015.01)
C12N 5/077 (2010.01)
C12N 5/0789 (2010.01)
A61P 25/14 (2006.01)
A61K 38/00 (2006.01)
C12N 5/0775 (2010.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **04.06.2012 PCT/AU2012/000630**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **06.12.2012 WO12162758**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.06.2012 E 12793424 (8)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.12.2018 EP 2714058**

(54) Título: **Procedimiento para tratar los efectos de un accidente cerebrovascular**

(30) Prioridad:

03.06.2011 US 201161493057 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
07.06.2019

(73) Titular/es:

MESOBLAST, INC. (50.0%)
275 Madison Ave, 4th Floor
New York, New York 10016, US y
CENTRAL ADELAIDE LOCAL HEALTH NETWORK INC (50.0%)

(72) Inventor/es:

KOBLAR, SIMON ANDREA;
GRONTHOS, STAN y
ARTHUR, AGNIESZKA

(74) Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

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

Procedimiento para tratar los efectos de un accidente cerebrovascular

Campo

La presente descripción se refiere a procedimientos para tratar los efectos de un accidente cerebrovascular en un sujeto.

Antecedentes

Los accidentes cerebrovasculares son la segunda causa principal de mortalidad después de las enfermedades cardiovasculares y la causa principal de discapacidad en Australia. Son la tercera causa de muerte en los Estados Unidos, con más de 140.000 fallecidos cada año a causa de accidentes cerebrovasculares. Asimismo son la causa principal de discapacidad grave y a largo plazo en los Estados Unidos. Los costes previstos relacionados con los accidentes cerebrovasculares en Estados Unidos para el período de 2005 a 2050 son USD 2,2 billones.

La discapacidad afecta a 75 % de los supervivientes de accidentes cerebrovasculares lo suficiente como para reducir su empleabilidad. Los accidentes cerebrovasculares pueden afectar a los sujetos física, mental, emocionalmente, o de las tres formas combinadas.

Algunas de las discapacidades físicas que pueden resultar de los accidentes cerebrovasculares incluyen debilidad muscular, entumecimiento, llagas por presión, neumonía, incontinencia, apraxia (incapacidad de realizar movimientos aprendidos), dificultad para llevar a cabo actividades de la vida cotidiana, pérdida de apetito, pérdida del habla, pérdida de visión, y dolor. Si el accidente cerebrovascular es lo suficientemente severo, o se produce en ciertos puntos tales como partes del tronco encefálico, se puede producir un estado de coma o fallecimiento.

Los problemas emocionales que se producen a raíz de los accidentes cerebrovasculares pueden ser causados por daño directo en los centros emocionales del cerebro o por la frustración o dificultad para adaptarse a las nuevas limitaciones. Las dificultades post-accidente cerebrovascular incluyen depresión, ansiedad, ataques de pánico, poca afectividad (incapacidad de expresar emociones), manía, apatía y psicosis.

Los déficits cognitivos que se producen por los accidentes cerebrovasculares incluyen trastornos perceptivos, problemas de habla, demencia, y problemas de atención y memoria. Una víctima de accidente cerebrovascular puede no darse cuenta de sus propias discapacidades; dicha afección se conoce como anosognosia. En una afección denominada negligencia espacial cerebral, el paciente es incapaz de responder a un estímulo en el lado opuesto al hemisferio dañado.

Hasta 10 % de todos los pacientes de accidentes cerebrovasculares sufren de convulsiones, más comúnmente en la semana siguiente a la que se produce el episodio. La gravedad del accidente cerebrovascular aumenta la probabilidad de que se produzcan convulsiones.

Un accidente cerebrovascular es la pérdida rápida e incremental de una o más funciones cerebrales debido a una interrupción en la irrigación de sangre al cerebro. Esto se puede deber a una isquemia (falta de flujo sanguíneo) producida por un bloqueo (trombosis, embolia arterial), o a una hemorragia (pérdida de sangre). Como resultado, la zona del cerebro afectada es incapaz de funcionar, lo cual podría producir que el sujeto no fuera capaz de mover una o más extremidades en un lado del cuerpo, que no fuera capaz de comprender o formular palabras habladas, o que no fuera capaz de ver un lado del campo visual. Los accidentes cerebrovasculares producen muerte celular neuronal y pueden terminar en fallecimiento.

Existen dos tipos comunes de accidente cerebrovascular: (i) accidente cerebrovascular isquémico, provocado por una oclusión temporal o permanente del flujo sanguíneo al cerebro, y supone 85 % de los casos de accidente cerebrovascular, y (ii) accidente cerebrovascular hemorrágico, provocado por la ruptura de un vaso sanguíneo y supone la mayoría de los casos restantes. La causa más común de accidente cerebrovascular isquémico es la oclusión de la arteria cerebral media (la arteria intracraneal corriente abajo de la arteria carótida interna), que daña el telencéfalo (p. ej., la corteza cerebral), p. ej., las cortezas motora y sensorial del cerebro. Dicho daño produce hemiplejia, hemianestesia y, según el hemisferio cerebral dañado, o bien déficits en el lenguaje o déficits visuo-espaciales.

Los tratamientos actuales para el accidente cerebrovascular isquémico se han centrado en el rescate de la penumbra isquémica, es decir, la región moderadamente hipoperfundida del cerebro que retiene la integridad estructural pero

que ha perdido la función eléctrica. En la actualidad, únicamente existen cuatro tratamientos clínicamente probados para mejorar las consecuencias de un accidente cerebrovascular:

- aspirina para prevenir otro accidente cerebrovascular,
- trombólisis para coágulos agudos con activador tisular del plasminógeno para revertir la oclusión,
- tratamiento en una unidad de accidentes cerebrovasculares, y
- hemicraniectomía para reducir la presión intracraneal.

No obstante, dichos tratamientos solo intentan mitigar el daño neurológico continuo, y no restauran las neuronas o la función cerebral perdidas.

Algunos agentes neuroprotectores han sido analizados en cuanto a su eficacia en el tratamiento de accidentes cerebrovasculares y han fallado, incluyendo antagonistas de receptores de N-metil-D-aspartato, nalmefeno, lubeluzol, clometiazol, bloqueadores de los canales de calcio (incluyendo antagonistas del ácido a-amino-3-hidroxi-5-metilisoxazol-4-propiónico, agonistas de serotonina (p. ej., repinotan), y moduladores de los canales de potasio transmembrana), tirilazad, anticuerpo anti-ICAM-I, anticuerpo antileucocítico humano (Hu23F2G), anticuerpo antiplaquetario (p. ej., abciximab), citicolina (una forma exógena de citidina-5'-difosfocolina), y factor de crecimiento de fibroblastos básico.

La publicación de la solicitud de patente internacional N.º WO 2008/036372 A2 describe procedimientos, células y composiciones de materia para llevar a cabo trasplantes de células madre en pacientes que no han sido previamente inmunosuprimidos.

La publicación de la solicitud de patente internacional N.º WO 2008/052046 A2 describe composiciones que administran células que comprenden una célula progenitora y una fracción de direccionamiento, y procedimientos relacionados con estas.

La publicación de la solicitud de patente internacional N.º WO 2008/148105 A1 describe células madre pluripotentes y procedimientos para crear y utilizar células madre pluripotentes, y dichas células madre pluripotentes, entre otras cosas, pueden diferenciarse en distintos linajes celulares *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo.*

La publicación de la solicitud de patente internacional N.º WO 2004/084921 A1 describe el aislamiento de células precursoras mesenquimales de nichos perivasculares a partir de una variedad de tejidos utilizando un marcador perivascular, tal como 3G5, y preferentemente también alfa actina de músculo liso junto con marcadores de desarrollo temprano tales como STRO-1 y CD146/MUC18.

La publicación de la solicitud de patente internacional N.º WO 2011/007348 A2 proporciona un procedimiento que incluye obtener una población de células presentadoras de antígeno, enriquecer una población de células madre/progenitoras dentro de una población de células mayor, activar la población de células presentadoras de antígeno y, después de la activación, inducir al menos un proceso seleccionado de entre el grupo compuesto por: diferenciación, expansión, activación, secreción de una molécula, y expresión de un marcador, exponiendo la población de células madre/progenitoras enriquecidas a la población de células presentadoras de antígeno.

Bakondi et al., 2009, Molecular Therapy 17:1938-1947 describe que $CD133^+$ identifica una subpoblación de células madre/progenitoras de médula ósea humana con un repertorio de factores secretados que protegen contra un accidente cerebrovascular.

Resultará evidente de lo expuesto anteriormente que existe una necesidad en la técnica de desarrollar productos terapéuticos para los accidentes cerebrovasculares. Un producto terapéutico deseable reparará al menos parte del daño neurológico provocado por un accidente cerebrovascular y/o restaurará al menos parte de las funciones cerebrales perdidas como consecuencia del accidente cerebrovascular.

Resumen

La presente invención se refiere al tema expuesto en las reivindicaciones adjuntas.

La presente descripción se basa en la identificación por parte de los autores de la invención de poblaciones de células que son útiles para el tratamiento de los efectos de un accidente cerebrovascular. Como se ejemplifica en el presente documento, los autores de la invención han demostrado que las células $STRO\text{-}1^+$ y/o su progenie y/o factores secretados por ellas son capaces de restaurar la función cerebral perdida después de un accidente cerebrovascular.

Las células STRO-1$^+$ ejemplares son derivadas de médula ósea y/o pulpa dental y pueden ser cultivadas y/o almacenadas antes de su uso en terapias. Los autores de la invención utilizaron un modelo animal aceptado para accidente cerebrovascular isquémico, p. ej., con el telencéfalo afectado, para demostrar la eficacia de las células y/o los factores secretados para tratar los efectos del accidente cerebrovascular.

Por ejemplo, los autores de la invención mostraron que podían restaurar la función cerebral y/o tratar un trastorno de movimiento después de un accidente cerebrovascular. Los autores de la invención también mostraron que las células STRO-1$^+$ secretan factores (p. ej., SDF-1), que producen el crecimiento de axones a partir de neuronas. Sin restringirse a ninguna consideración teórica o modo de acción,los autores de la invención proponen que estos factores pueden contribuir con la neuroprotección, angiogénesis, inmuno-modulación y/o neuroplasticidad.

Los autores de la invención también mostraron que las células STRO-1$^+$ son capaces de diferenciarse en células de tipo neuronal. Sin embargo, después de inyectarse en el cerebro de un sujeto que ha sufrido un accidente cerebrovascular, pocas de estas células sobreviven después de varias semanas. Estos resultados indican que las células STRO-1$^+$ y/o su progenie y/o factores secretados por estas contribuyen con la supervivencia y/o regeneración de las propias neuronas del sujeto después de un accidente cerebrovascular.

Los hallazgos presentados en el presente documento proporcionan la base para los procedimientos para tratar uno o más efectos de un accidente cerebrovascular. Por ejemplo, dichos procedimientos comprenden administrar a un sujeto que ha sufrido un accidente cerebrovascular una población de células enriquecidas para STRO-1$^+$ y/o su progenie y/o factores solubles derivados de las mismas.

La presente descripción proporciona un procedimiento para mejorar la función cerebral o prevenir la pérdida de función cerebral en un sujeto que ha sufrido un accidente cerebrovascular, comprendiendo el procedimiento administrar al sujeto una población de células enriquecidas para células STRO-1$^+$ y/o su progenie y/o factores solubles derivados de estas.

En un ejemplo, mejorar la función cerebral en el sujeto mejora un trastorno de movimiento en el sujeto. En un ejemplo, la función cerebral es la función de la corteza cerebral, tal como la función de la corteza motora y/o la función de la corteza sensorial.

De manera adicional o alternativa, la presente descripción proporciona un procedimiento para tratar o prevenir un trastorno de movimiento en un sujeto que ha sufrido un accidente cerebrovascular, comprendiendo el procedimiento administrar al sujeto una población de células enriquecidas para células STRO-1$^+$ y/o su progenie y/o factores solubles derivados de estas.

En un ejemplo de un procedimiento descrito en el presente documento, el trastorno de movimiento es parálisis, parálisis parcial, problemas de dicción, movimientos descoordinados, debilidad muscular, hipotonicidad, hipertonicidad o movimientos anormales involuntarios.

De manera adicional, la presente descripción proporciona un procedimiento para regenerar neuronas cerebrales en un sujeto que ha sufrido un accidente cerebrovascular, comprendiendo el procedimiento administrar al sujeto una población de células enriquecidas para células STRO-1$^+$ y/o su progenie y/o factores solubles derivados de estas.

De manera adicional, la presente descripción proporciona un procedimiento para tratar, reducir o prevenir atrofia cerebral en un sujeto que ha sufrido un accidente cerebrovascular, comprendiendo el procedimiento administrar al sujeto una población de células enriquecidas para células STRO-1$^+$ y/o su progenie y/o factores solubles derivados de estas. En un ejemplo, la atrofia está en el cuerpo calloso.

En un ejemplo, las neuronas cerebrales regeneradas poniendo en práctica un procedimiento de la descripción están en la corteza cerebral, por ejemplo, en la corteza motora y/o en la corteza sensorial.

En un ejemplo, el accidente cerebrovascular es un accidente cerebrovascular isquémico.

Un accidente cerebrovascular ejemplar contemplado en la presente descripción es un accidente cerebrovascular isquémico provocado por una oclusión de una arteria cerebral media en un sujeto.

En un ejemplo, un procedimiento de la presente descripción comprende administrar al sujeto la población de células enriquecidas para células STRO-1$^+$ y/o su progenie y/o factores solubles derivados de estas entre 1 hora y 1 mes, por ejemplo, entre una 1 hora y 2 semanas, tal como entre 1 hora y 1 semana después del accidente cerebrovascular. Por

ejemplo, la población de células enriquecidas para células STRO-1$^+$ y/o su progenie y/o factores solubles derivados de estas se administran dentro de aproximadamente 72 horas después del accidente cerebrovascular. Por ejemplo, la población de células enriquecidas para células STRO-1$^+$ y/o su progenie y/o factores solubles derivados de estas se administran dentro de aproximadamente 48 horas después del accidente cerebrovascular.

En otro ejemplo, el procedimiento comprende administrar al sujeto la población de células enriquecidas para células STRO-1$^+$ y/o su progenie y/o factores solubles derivados de estas dentro de las 24 horas después del accidente cerebrovascular. Por ejemplo, la población de células enriquecidas para células STRO-1$^+$ y/o su progenie y/o factores solubles derivados de estas se administran aproximadamente a las 24 horas después del accidente cerebrovascular.

En un ejemplo, el procedimiento comprende administrar una población de células enriquecidas para células STRO-1^{bright} y/o su progenie y/o factores solubles derivados de estas En un ejemplo, la progenie es enriquecida adicionalmente para células STRO-1^{bright}.

Las células ejemplares y/o su progenie expresan adicionalmente fosfatasa alcalina no específica de tejido (TNAP) y/o proteína de choque térmico 90β (HSP90β) y/o CD146.

En un ejemplo, la población de células se deriva de médula ósea o pulpa dental.

En un ejemplo, la población enriquecida para células STRO-1$^+$ y/o su progenie y/o factores solubles derivados de estas se administran de manera sistémica.

En un ejemplo alternativo, la población enriquecida para células STRO-1$^+$ y/o su progenie y/o factores solubles derivados de estas se administran de manera local en el cerebro del sujeto. Por ejemplo, la población enriquecida para células STRO-1$^+$ y/o su progenie y/o factores solubles derivados de estas se administran de manera local en el telencéfalo de un sujeto. En un ejemplo, la población y/o progenie y/o factores solubles se administran de manera adicional (o alternativa) en el cuerpo estriado del sujeto.

En un ejemplo, la población enriquecida para células STRO-1$^+$ y/o su progenie se administran en un sitio alejado del sitio del accidente cerebrovascular y migran al sitio del accidente cerebrovascular, p. ej., al infarto isquémico o zona limítrofe que rodea el infarto isquémico.

Cualquier procedimiento ejemplar descrito en el presente documento según cualquier ejemplo comprende administrar una dosis de la población y/o la progenie y/o los factores solubles en cantidad suficiente como para mejorar la función cerebral y/o regenerar las neuronas cerebrales.

En un ejemplo, el procedimiento comprende administrar una dosis efectiva o una dosis terapéuticamente efectiva de la población y/o progenie y/o factores solubles.

En un ejemplo, el procedimiento comprende administrar entre 0,1 x 10^6 y 5 x 10^6 células STRO-1$^+$ y/o su progenie por kg. Por ejemplo, el procedimiento comprende administrar entre 0,3 x 10^6 y 2 x 10^6 células STRO-1$^+$ y/o su progenie por kg. Por ejemplo, el procedimiento comprende administrar entre 0,5 x 10^6 y 2 x 10^6 de células STRO-1$^+$ y/o su progenie por kg. Por ejemplo, el procedimiento comprende administrar entre 0,5 x 10^6 y 1,5 x 10^6 células STRO-1$^+$ y/o su progenie por kg. Por ejemplo, el procedimiento comprende administrar alrededor de 5 x 10^5 células STRO-1$^+$ y/o su progenie por kg o alrededor de 1,5 x 10^6 células STRO-1$^+$ y/o su progenie por kg. Por ejemplo, el procedimiento comprende administrar alrededor de 1,8 x 10^6 células STRO-1$^+$ y/o su progenie por kg.

En un ejemplo, un procedimiento descrito en el presente documento según cualquier ejemplo comprende administrar una dosis baja de células STRO-1$^+$ y/o su progenie. Por ejemplo, la dosis baja de células STRO-1$^+$ y/o su progenie comprende entre 0,1 x 10^5 y 0,5 x 10^6 células STRO-1$^+$ y/o su progenie por kg.

En un ejemplo, la población y/o la progenie y/o los factores solubles se administran una pluralidad de veces. Por ejemplo, la población y/o la progenie y/o los factores solubles se administran una vez cada cuatro o más semanas.

En un ejemplo, menos de 25 % de las células STRO-1$^+$ y/o su progenie permanecen en el cerebro (p. ej., telencéfalo) del sujeto 28 días después de la administración. Por ejemplo, menos de 10 % de las células STRO-1$^+$ y/o su progenie permanecen en el cerebro (p. ej., telencéfalo) del sujeto 28 días después de la administración. Por ejemplo, menos de 5 % o 3 % de las células STRO-1$^+$ y/o su progenie permanecen en el cerebro (p. ej., telencéfalo) del sujeto 28 días después de la administración.

En un ejemplo, la población enriquecida para células STRO-1$^+$ y/o células de progenie es autogénica o alogénica y/o los factores solubles pueden derivarse de las células autogénicas o alogénicas. En un ejemplo, un procedimiento descrito en el presente documento según cualquier ejemplo comprende aislar o enriquecer la población y/o la progenie y/o aislar los factores solubles.

En ejemplos de un procedimiento descrito en el presente documento según cualquier ejemplo, la población enriquecida para células STRO-1$^+$ y/o células de progenie se han expandido mediante cultivo antes de la administración y/o antes de obtener los factores solubles. En un ejemplo, un procedimiento descrito en el presente documento comprende adicionalmente cultivar la población y/o progenie. En un ejemplo, el procedimiento comprende adicionalmente almacenar la población y/o progenie.

En un ejemplo, la población y/o células de su progenie y/o factores solubles derivados de estas se administran en forma de una composición que comprende dichas células STRO-1$^+$ y/o células de su progenie y/o factores solubles derivados de estas y un vehículo y/o excipiente. En un ejemplo, un procedimiento descrito en el presente documento según cualquier ejemplo comprende adicionalmente formular la población y/o progenie y/o factores solubles con un vehículo y/o excipiente.

En un ejemplo, un procedimiento descrito en el presente documento según cualquier ejemplo comprende adicionalmente analizar la función cerebral del sujeto después del tratamiento. Por ejemplo, el procedimiento comprende adicionalmente analizar movimiento y/o fuerza y/o habla y/o fuerza del sujeto. En un ejemplo, si la función cerebral del sujeto no ha aumentado significativamente en comparación a como estaba antes de la administración de la población y/o progenie y/o factores solubles, el procedimiento comprende administrar una dosis adicional de la población y/o progenie y/o factores solubles.

En un ejemplo, el sujeto que se está tratando es un mamífero, tal como un primate, por ejemplo, un humano.

La presente descripción también proporciona una población de células enriquecidas para células STRO-1$^+$ y/o su progenie y/o factores solubles derivados de estas para usar con el fin de mejorar la función cerebral en un sujeto después de un accidente cerebrovascular o tratar un trastorno de movimiento en un sujeto después de un accidente cerebrovascular o regenerar neuronas cerebrales en un sujeto después de un accidente cerebrovascular.

La presente descripción proporciona adicionalmente un uso de una población de células enriquecidas para células STRO-1$^+$ y/o su progenie y/o factores solubles derivados de estas para fabricar un medicamento para mejorar la función cerebral en un sujeto después de un accidente cerebrovascular o tratar un trastorno de movimiento en un sujeto después de un accidente cerebrovascular o regenerar neuronas cerebrales en un sujeto después de un accidente cerebrovascular.

La presente descripción también proporciona un kit que comprende una población de células enriquecidas para células STRO-1$^+$ y/o su progenie y/o factores solubles derivados de estas envasado con instrucciones para uso en un procedimiento descrito en el presente documento según cualquier ejemplo.

Por ejemplo, la presente descripción proporciona un kit que comprende una composición que comprende la población y/o la progenie y/o los factores solubles envasado con información del producto que indica el uso de la composición en un procedimiento descrito en el presente documento según cualquier ejemplo.

La presente descripción también proporciona un kit para aislar o cultivar células STRO-1$^+$ y/o su progenie envasado con instrucciones para uso en un procedimiento descrito en el presente documento según cualquier ejemplo.

La presente descripción también proporciona un procedimiento que proporciona una población de células enriquecidas para células STRO-1$^+$ y/o su progenie y/o factores solubles derivados de estas con instrucciones para uso en un procedimiento descrito en el presente documento según cualquier ejemplo.

La presente descripción también proporciona un procedimiento que comprende aislar u ofrecer aislar o almacenar u ofrecer almacenar una población de células enriquecidas para células STRO-1$^+$ y/o su progenie y/o factores solubles derivados de estas para uso posterior en un procedimiento descrito en el presente documento según cualquier ejemplo.

Los procedimientos descritos en el presente documento se entiende aplican *mutatis mutandis* a procedimientos para reducir el riesgo de un nuevo accidente cerebrovascular.

Breve descripción de los dibujos

Figura 1. Coexpresión de TNAP (STRO-3) y el marcador celular de precursor mesenquimal, STRO-1^{bright} por células morfonucleares de médula ósea (BMMNC, por su sigla en inglés) humana adulta. Se practicó una inmunofluorescencia de color doble y citometría de flujo por incubación de BMMNC de STRO-1 seleccionadas por MACS y marcadas indirectamente con un anticuerpo de IgM de cabra anti-murina acoplado a FITC (eje x) y AcM STRO-3 (IgG1 murina) marcado indirectamente con una IgG de cabra anti-murina acoplada a PE (eje y). El histograma de gráfico de puntos representa 5 x 10^4 eventos recogidos como datos a modo de lista. Se configuraron las líneas vertical y horizontal a niveles de reactividad de <1,0 % de fluorescencia media obtenidos con los anticuerpos de control de isotipo coincidente, 1B5 (IgG) y 1A6.12 (IgM) tratados en las mismas condiciones. Los resultados demuestran que una población minoritaria de células STRO-1^{bright} coexpresaron TNAP (cuadrante superior derecho), mientras que el resto de células STRO-1^+ no consiguieron reaccionar con el AcM STRO-3.

Figura 2. Perfil de expresión génica de STRO-1^{bri} o progenie de STRO-1^{dim} de MPC STRO-1^{bri} expandidas y cultivadas. Se prepararon suspensiones de células únicas de MPC de médula ósea expandidas *ex vivo* mediante tratamiento con tripsina/EDTA. Las células se tiñeron con el anticuerpo STRO-1 que después se reveló mediante incubación con IgM anti-murina de cabra-isotiocianato de fluoresceína. Se preparó ARN celular total a partir de poblaciones purificadas de células que expresan STRO-1^{dim} o STRO-1^{bri}, después de la clasificación celular activada por fluorescencia (A). Utilizando el procedimiento de extracción RNAzolB y procedimientos estándar, se aisló ARN total de cada subpoblación y se utilizó como una plantilla para la síntesis de ADNc. Se evaluó la expresión de diversas transcripciones mediante amplificación por PCR utilizando un protocolo estándar tal como se describió anteriormente (Gronthos et al. J Cell Sci. 116:1827-1835, 2003). Los conjuntos de cebadores utilizados en el presente estudio se muestran en la Tabla 2. Después de la amplificación, se analizó cada mezcla de reacción por electroforesis en gel de agarosa al 1,5 % y se visualizó por tinción con bromuro de etidio (B). Se evaluó la expresión génica relativa para cada marcador celular con referencia a la expresión del gen constitutivo, GAPDH, utilizando el software ImageQant (C).

Figura 3. La progenie de STRO-1^{bri} de MPC STRO-1^+ cultivadas y expandidas expresan niveles elevados de SDF-1, lo cual no sucede con la progenie de STRO-1^{dim}. (A) Las preparaciones aisladas por MACS de BMMNC STRO-1^+ se dividieron en distintos subgrupos de STRO-1 según las regiones, STRO-1^{bright} y STRO-$1^{dim/dull}$ utilizando FACS. Se preparó ARN total de cada subpoblación de STRO-1 y se utilizó para construir una biblioteca de hibridación sustractiva de STRO-1^{bright} (B-C). Los filtros de nitrocelulosa replicada, que se han transferido con productos de PCR representativos se amplificaron a partir de clones bacterianos transformados con ADNc sustraído de STRO-1^{bright}. A continuación, los filtros se sondearon con o bien STRO-1^{bright} marcadas con [^{32}P] desoxicitidina trifosfato (dCTP)(B) o ADNc sustraído de STRO-$1^{dim/dull}$ (C). Las flechas indican la expresión diferencial de 1 clon que contiene un fragmento de ADNc correspondiente a SDF-1 humano. (D) Análisis PCR-transcriptasa inversa (RT) que demuestra la expresión relativa del SDF-1 y transcripciones de gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) en ARN total preparado a partir de poblaciones de STRO-1 de BMMNC recién aisladas por MACS/FACS antes del cultivo. pb indica par de bases.

Figura 4. Las CMPD humanas se diferencian en células de tipo neuronales. (A) Copia de una fotomicrografía que muestra que los fibroblastos de prepucio humano (FPH) no responden a medios de inducción neuronal *in vitro.* (B) Copia de una fotomicrografía que muestra que las CMPD**h** humanas se diferencian en un fenotipo neuronal en medios de inducción neuronal *in vitro.* (C) Representación gráfica que muestra ejemplos representativos de indicios de corrientes de Na^+ registradas en CMPD diferenciadas en respuesta a etapas de 30 ms que oscilan entre -44 y 36 mV en incrementos de 10 mV. (D) Representación gráfica que muestra gráficos promedio I-V de corrientes de Na^+ máximas obtenidas en CMPD diferenciadas (D) y no diferenciadas (ND). CMPD en respuesta a etapas de tensión eléctrica.

Figura 5. Serie de representaciones que muestran el procedimiento utilizado para tratar un modelo de accidente cerebrovascular. El panel A muestra una sección coronal de cerebro de rata representativa teñida con cloruro de 2,3,5-trifeniltetrazolio para visualizar tejido infartado (blanco) 1 día después de la oclusión de la arteria cerebral media (OACM). El panel B muestra una sección coronal de cerebro de rata representativa teñida con anticuerpo de antígeno mitocondrial anti-humano y hematoxilina. Los puntos negros en los paneles A y B indican el primer sitio de inyección en el cuerpo estriado -0,40 mm anterior-posterior, -4,00 mm medio-lateral respecto del bregma, -5,50mm dorsal-ventral respecto de la duramadre, y el segundo sitio de inyección cortical - 1,75mm dorsal-ventral respecto de la duramadre. El panel C muestra una representación esquemática del programa de tratamiento en el cual los animales fueron entrenados durante 3 días antes de la OACM (indicada como día 0), y la tercera sesión se utilizó como la línea de referencia pre-operativa (día -1). Los animales se asignaron de manera aleatoria para recibir CMPD humanas o únicamente medio de cultivo a las 24 horas después de la OACM. La evaluación del comportamiento por parte de los investigadores que desconocían la asignación del tratamiento se llevó a cabo los días 1, 7, 14, 21 y 28 después de la OACM. Todos los animales recibieron una inyección subcutánea diaria de 10 mg/kg de ciclosporina A a lo largo de la duración del experimento. Los animales se sacrificaron, y sus cerebros se procesaron para inmunohistoquímica a la finalización de los estudios neuroconductuales. Barras de escala: 2 mm (A, B). Abreviaturas: Cx, corteza cerebral; CMPD, célula madre de pulpa dental; OACM, oclusión de arteria cerebral media; C. estr., cuerpo estriado.

Figura 6. Serie de representaciones gráficas que muestran los efectos del tratamiento con CMPD humanas en resultados neuroconductuales post-OACM. Después de la OACM, todos los animales mostraron déficits funcionales en todas las pruebas conductuales (día 1 o 7 vs día -1). El panel A muestra que a las 4 semanas después del trasplante, los animales tratados con CMPD mostraron mejora significativa en las puntuaciones neurológicas brutas en comparación con los animales tratados con vehículo ($p < 0,018$ grupo x interacción diaria, análisis de varianza [ANOVA] con medidas repetidas; $p<0,05$ y $p<0,01$ entre grupos de tratamiento los días 21 y 28, respectivamente; diferencia menos significativa protegida de Fisher post hoc). Como se muestra en el panel B, el grupo con CMPD trasplantadas también mostró capacidades sensoriales y motoras de las extremidades delanteras significativamente mejoradas, como se demostró con una cantidad significativamente mayor de pasos dados con la extremidad delantera contralateral en la prueba de pasos ($p=0,045$ efecto global del tratamiento). El panel C también muestra que el grupo con CMPD trasplantadas también mostró una proporción significativamente menor de tiempo intentando quitar la etiqueta de la pata delantera contralateral en la prueba de la retirada de la cinta adhesiva ($p=0,049$ efecto global del tratamiento) en comparación con el grupo tratado con vehículo. Las diferencias en rendimiento conductual entre los grupos de tratamiento no consiguieron alcanzar significación estadística ($p > 0,05$, ANOVA con medidas repetidas) en la prueba del rotarod (panel D) y la prueba de caminata sobre viga de sección decreciente/con cornisa (panel E). Los animales con accidente cerebrovascular no pudieron completar la tarea de caminar sobre la viga el día 1 post-OACM debido a su comportamiento circular. Los datos se representaron como gráficos de cajas para visualizar la distribución de los valores. El asterisco central en la caja representa el medio, y la caja representa el 50 % medio de los valores (es decir, oscila entre el percentil 25º y 75º). Los bigotes muestran la extensión de los datos, representándose las observaciones de extremo mediante los círculos alejados. Abreviaturas: CMPD, células madre de pulpa dental; OACM, oclusión de arteria cerebral media.

Figura 7. Copias de representaciones fotográficas que muestran la distribución de CMPD supervivientes en cerebro post-isquémico. Las secciones coronales de cerebro de rata representativas muestran el patrón de supervivencia y migración de CMPD trasplantadas (células individuales indicadas como puntos negros) a las 4 semanas del trasplante. Las secciones se tiñeron para antígeno mitocondrial humano para detectar células humanas a partir de tejido de cerebro de rata. Obsérvese la migración direccionada de CMPD hacia la lesión del accidente cerebrovascular y la consiguiente acumulación alrededor del infarto. Barra de escala = 2 mm. Abreviaturas: B, bregma; CC, cuerpo calloso; Cx, corteza cerebral; GD, giro dentado del hipocampo dorsal; VL, ventrículo lateral; C. estr., cuerpo estriado.

Figura 8. Copias de representaciones fotográficas que muestran la morfología de CMPD humanas injertadas a los 28 días del accidente cerebrovascular. El gran aumento de las CMPD humanas (células con antígeno mitocondrial humano positivo teñidas de gris oscuro; parte derecha de la figura) en el cerebro de roedor después de 4 semanas de la oclusión de arteria cerebral media demostró acumulación en los alrededores inmediatos del núcleo del infarto (panel A) y la aparente migración a lo largo del CC (panel B). Obsérvese la distribución escasa de CMPD dentro del hemisferio cerebral contralateral al sitio de la inyección y accidente cerebrovascular. Los puntos indican CMPD humanas individuales. El panel C muestra que algunas células derivadas de CMPD parecieron injertarse en la pared de los vasos sanguíneos cerebrales, con apariencias morfológicas acordes con las células endoteliales (flechas), pericitos, o células de músculo liso (punta de flecha). El panel D muestra que la morfología de células derivadas de CMPD sugirió astrocitos (flechas) y una neurona (punta de flecha). Barras de escala = 2 mm (paneles A, B) y 25 µm (paneles C, D y recuadros de gran aumento =40 en los paneles A, B). Abreviaturas: B, bregma; CC, cuerpo calloso.

Figura 9. Serie de representaciones que muestran los efectos del tratamiento con CMPD en atrofia de CC ipsilesional. El panel A muestra una sección de cerebro de rata representativa a nivel del bregma en la cual se indican los dos sitios utilizados para la medición del grosor del CC en la línea media del cerebro (L1) y en el borde lateral de los ventrículos laterales (L2) tanto en el hemisferio ipsilateral como contralateral. El panel B muestra que hubo una tendencia hacia una disminución de la atrofia del cuerpo calloso en el hemisferio ipsilesional de los animales tratados con CMPD en comparación con los animales tratados con vehículo a las 4 semanas del trasplante. La normalización de las mediciones de CC de L2 (ipsilateral) hacia L1 (línea media) no tuvo significación estadística ($p > 0,05$). No hubo diferencia en las mediciones del grosor de CC contralesional entre los grupos de tratamiento. Los datos se expresaron como media ± EEM. Barra de escala = 100 µm. Abreviaturas: CC, cuerpo calloso; Contra, contralateral; Cx, corteza cerebral; CMPD, células madre de pulpa dental; Ipsi, ipsilateral; VL, ventrículo lateral.

Figura 10. Representaciones gráficas que muestran histogramas citométricos de flujo representativos producidos utilizando suspensiones de células únicas de MPC de monos Cynomolgus derivadas de médula ósea expandidas mediante cultivo con expresión en superficie celular positiva de los marcadores de células madres mesenquimales, STRO-1, STRO-4 y CD146 (línea continua) respecto de los controles negativos de isotipo (IgM, IgG2a y IgG1) (línea borrosa) detectados utilizando anticuerpos secundarios de IgM o IgG de cabra anti-murinos conjugados con FITC. Los histogramas representativos también muestran que las MPC de monos Cynomolgus carecen de expresión en superficie celular para marcadores de monocitos/macrófagos (CD14), células madre/progenitoras hematopoyéticas (CD34) y leucocitos maduros (CD45). Los niveles superiores a 1 % de fluorescencia en comparación con el control de isotipo indican positividad.

Códigos para el listado de secuencias

SEQ ID NO: 1 oligonucleótido para amplificación de ácido nucleico que codifica para GAPDH
SEQ ID NO: 2 oligonucleótido para amplificación de ácido nucleico que codifica para GAPDH
SEQ ID NO: 3 oligonucleótido para amplificación de ácido nucleico que codifica para SDF-1
SEQ ID NO: 4 oligonucleótido para amplificación de ácido nucleico que codifica para SDF-1
SEQ ID NO: 5 oligonucleótido para amplificación de ácido nucleico que codifica para IL-1β
SEQ ID NO: 6 oligonucleótido para amplificación de ácido nucleico que codifica para IL-1β
SEQ ID NO: 7 oligonucleótido para amplificación de ácido nucleico que codifica para FLT-1
SEQ ID NO: 8 oligonucleótido para amplificación de ácido nucleico que codifica para FLT-1
SEQ ID NO: 9 oligonucleótido para amplificación de ácido nucleico que codifica para TNF-α
SEQ ID NO: 10 oligonucleótido para amplificación de ácido nucleico que codifica para TNF-α
SEQ ID NO: 11 oligonucleótido para amplificación de ácido nucleico que codifica para KDR
SEQ ID NO: 12 oligonucleótido para amplificación de ácido nucleico que codifica para KDR
SEQ ID NO: 13 oligonucleótido para amplificación de ácido nucleico que codifica para RANKL
SEQ ID NO: 14 oligonucleótido para amplificación de ácido nucleico que codifica para RANKL
SEQ ID NO: 15 oligonucleótido para amplificación de ácido nucleico que codifica para Leptina
SEQ ID NO: 16 oligonucleótido para amplificación de ácido nucleico que codifica para Leptina
SEQ ID NO: 17 oligonucleótido para amplificación de ácido nucleico que codifica para CBFA-1
SEQ ID NO: 18 oligonucleótido para amplificación de ácido nucleico que codifica para CBFA-1
SEQ ID NO: 19 oligonucleótido para amplificación de ácido nucleico que codifica para PPARγ2
SEQ ID NO: 20 oligonucleótido para amplificación de ácido nucleico que codifica para PPARγ2
SEQ ID NO: 21 oligonucleótido para amplificación de ácido nucleico que codifica para OCN
SEQ ID NO: 22 oligonucleótido para amplificación de ácido nucleico que codifica para OCN
SEQ ID NO: 23 oligonucleótido para amplificación de ácido nucleico que codifica para MyoD
SEQ ID NO: 24 oligonucleótido para amplificación de ácido nucleico que codifica para MyoD
SEQ ID NO: 25 oligonucleótido para amplificación de ácido nucleico que codifica para SMMHC
SEQ ID NO: 26 oligonucleótido para amplificación de ácido nucleico que codifica para SMMHC
SEQ ID NO: 27 oligonucleótido para amplificación de ácido nucleico que codifica para GFAP
SEQ ID NO: 28 oligonucleótido para amplificación de ácido nucleico que codifica para GFAP
SEQ ID NO: 29 oligonucleótido para amplificación de ácido nucleico que codifica para Nestina
SEQ ID NO: 30 oligonucleótido para amplificación de ácido nucleico que codifica para Nestina
SEQ ID NO: 31 oligonucleótido para amplificación de ácido nucleico que codifica para SOX9
SEQ ID NO: 32 oligonucleótido para amplificación de ácido nucleico que codifica para SOX9
SEQ ID NO: 33 oligonucleótido para amplificación de ácido nucleico que codifica para Colágeno tipo X
SEQ ID NO: 34 oligonucleótido para amplificación de ácido nucleico que codifica para Colágeno tipo X
SEQ ID NO: 35 oligonucleótido para amplificación de ácido nucleico que codifica para Agrecano
SEQ ID NO: 36 oligonucleótido para amplificación de ácido nucleico que codifica para Agrecano

Descripción detallada

Técnicas generales y definiciones seleccionadas

A lo largo de la presente memoria descriptiva, a menos que se especifique lo contrario o que el contexto lo exija de otro modo, la referencia a una etapa, composición de materia, grupo de etapas o grupo de composiciones de materia únicos se entenderá como si abarcara una y una pluralidad (es decir, uno o más) de dichas etapas, composiciones de materia, grupos de etapas o grupo de composiciones de materia.

Cada ejemplo de la descripción se ha de aplicar *mutatis mutandis* a cada otro ejemplo a menos que se indique específicamente lo contrario.

Los expertos en la técnica entenderán que la presente descripción es susceptible de variaciones y modificaciones distintas de las descritas específicamente. Se ha de entender que la descripción incluye todas dichas variaciones y modificaciones. La descripción también incluye todas las etapas, rasgos, composiciones y compuestos mencionados o indicados en la presente memoria descriptiva, individual o colectivamente, y cualquiera y todas las combinaciones o dos o más cualquiera de dichas etapas o rasgos.

El alcance de la presente descripción no ha de estar limitado por los ejemplos específicos descritos en el presente documento, que se incluyen únicamente a modo de ejemplo. Los productos, composiciones y procedimientos funcionalmente equivalentes están claramente comprendidos dentro del alcance de la descripción.

La presente descripción se lleva a cabo sin experimentación indebida utilizando, a menos que se indique lo contrario, técnicas convencionales de biología molecular, microbiología, virología, tecnología de ADN recombinante, síntesis de péptidos en disolución, síntesis de péptidos en fase sólida, e inmunología. Dichos procedimientos se describen, por ejemplo, en Sambrook, Fritsch & Maniatis, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratories, Nueva York, segunda edición (1989), Vol. I, II, y III completos; DNA Cloning: A Practical Approach, Vol. I y II (D. N. Glover, ed., 1985), IRL Press, Oxford, texto completo; Oligonucleotide Synthesis: A Practical Approach (M. J. Gait, ed, 1984) IRL Press, Oxford, texto completo, y concretamente los trabajos de Gait, pág. 1-22; Atkinson *et al*, pág. 35-81; Sproat *et al*, pág. 83-115; y Wu *et al*, pág. 135-151; 4. Nucleic Acid Hybridization: A Practical Approach (B. D. Hames & S. J. Higgins, eds., 1985) IRL Press, Oxford, texto completo; Immobilized Cells and Enzymes: A Practical Approach (1986) IRL Press, Oxford, texto completo; Perbal, B., A Practical Guide to Molecular Cloning (1984); Methods In Enzymology (S. Colowick y N. Kaplan, eds., Academic Press, Inc.), serie completa; J.F. Ramalho Ortigao, «The Chemistry of Peptide Synthesis» En: Base de datos de conocimientos de acceso a sitio web de laboratorio virtual (Interactiva, Alemania); Sakakibara, D., Teichman, J., Lien, E. Land Fenichel, R.L. (1976). Biochem. Biophys. Res. Commun. 73 336-342; Merrifield, R.B. (1963). J. Am. Chem. Soc. 85, 2149-2154; Barany, G. y Merrifield, R.B. (1979) en The Peptides (Gross, E. y Meienhofer, J. editores.), vol. 2, pág. 1-284, Academic Press, Nueva York. 12. Wünsch, E., ed. (1974) Synthese von Peptiden in Houben-Weyls Metoden der Organischen Chemie (Müler, E., ed.), vol. 15, 4ª ed., Partes 1 y 2, Thieme, Stuttgart; Bodanszky, M. (1984) Principles of Peptide Synthesis, Springer-Verlag, Heidelberg; Bodanszky, M. & Bodanszky, A. (1984) The Practice of Peptide Synthesis, Springer-Verlag, Heidelberg; Bodanszky, M. (1985) Int. J. Peptide Protein Res. 25, 449-474; Handbook of Experimental Immunology, Vol. I-IV (D. M. Weir y C. C. Blackwell, editores, 1986, Blackwell Scientific Publications); y Animal Cell Culture: Practical Approach, tercera edición (John R. W. Masters, ed., 2000), ISBN 0199637970, texto completo.

A lo largo de esta memoria descriptiva, a menos que el contexto lo exija de otro modo, se entenderá que el término «comprende», o variaciones tales como «comprenden» o «que comprende/comprenden» implican la inclusión de determinada etapa o elemento o número entero o grupo de etapas o elementos o números enteros, pero no la exclusión de cualquier otra etapa o elemento o número entero o grupo de elementos o números enteros.

Como se utiliza en el presente documento, el término «derivados/derivadas de» se entenderá que indica que un número entero especificado se puede obtener de una fuente en particular aunque no necesariamente directamente de dicha fuente. En el contexto de los factores solubles derivados de células STRO-1$^+$ y/o células de su progenie, este término se entenderá que significa uno o más factores, p. ej., proteínas, péptidos, carbohidratos, etc. producidos durante el cultivo *in vitro* de células STRO-1$^+$ y/o células de su progenie.

Como se utiliza en el presente documento, el término «accidente cerebrovascular» se entenderá que significa pérdida de una o más funciones cerebrales, por lo general rápidamente y de manera incremental, que se debe a una alteración del flujo sanguíneo hacia el cerebro o tronco encefálico. La alteración puede ser isquemia (falta de sangre) provocada por, p. ej., trombosis o embolia, o puede deberse a una hemorragia. En un ejemplo, la pérdida de la función cerebral está acompañada por muerte celular neuronal. En un ejemplo, el accidente cerebrovascular se produce por una alteración o pérdida de sangre del telencéfalo o una región del mismo. En un ejemplo, un accidente cerebrovascular es un déficit neurológico de causa cerebrovascular que perdura más allá de las 24 horas o es interrumpido por fallecimiento dentro de las 24 horas (como lo define la Organización Mundial de la Salud). La duración de los síntomas más allá de las 24 horas diferencia el accidente cerebrovascular del Ataque Isquémico Transitorio (AIT), en el cual los síntomas se mantienen durante menos de 24 horas. Entre los síntomas del accidente cerebrovascular se incluyen: hemiplejia (parálisis de un lado del cuerpo); hemiparesia (debilidad en un lado del cuerpo); debilidad de los músculos faciales; entumecimiento; disminución de sensibilidad; sentido del olfato, sentido del gusto, audición, o visión alterados; pérdida del olfato, gusto, audición o visión; párpado caído (ptosis); debilidad detectable de un músculo ocular; reflejo nauseoso disminuido; capacidad para tragar disminuida; reactividad de la pupila a la luz disminuida; sensibilidad del rostro disminuida; equilibrio disminuido; nistagmus; ritmo respiratorio alterado; ritmo cardíaco alterado; debilidad del músculo esternocleidomastoideo con capacidad disminuida o incapacidad para girar la cabeza hacia un lado; debilidad lingual; afasia (incapacidad para hablar o entender un idioma); apraxia (movimientos voluntarios alterados); defecto del campo visual; déficit de memoria; heminegligencia o negligencia espacial cerebral (déficit de atención al espacio en el lado del campo visual opuesto a la lesión); pensamiento desorganizado; confusión; desarrollo de gestos hipersexuales; anosognosia (negación continua de la existencia de un déficit); dificultad para andar; coordinación de movimientos alterada; vértigo; desequilibrio; pérdida de conciencia; dolor de cabeza; y/o vómitos.

El experto en la materia sabrá que el «telencéfalo» incluye la corteza cerebral (o cortezas de los hemisferios cerebrales), los ganglios basales (o núcleos basales) y el sistema límbico.

El término «función cerebral» incluye:

• razonamiento, planificación, articulación del lenguaje, movimiento, emociones, y resolución de problemas (asociados al lóbulo frontal);
• movimiento, orientación, reconocimiento, percepción de los estímulos (asociados al lóbulo parietal);
• procesamiento visual (asociado al lóbulo occipital); y
• percepción y reconocimiento de estímulos auditivos, memoria, y habla (asociados al lóbulo temporal).

Como se utiliza en el presente documento, el término «trastorno de movimiento» se entenderá que significa cualquier cambio en la capacidad de un sujeto para moverse en comparación a como lo hacía antes del accidente cerebrovascular. Los trastornos de movimiento ejemplares incluyen parálisis, parálisis parcial, problemas de dicción, movimientos descoordinados, debilidad muscular, hipotonicidad, hipertonicidad o movimientos anormales involuntarios.

Como se utiliza en el presente documento, se entenderá que «regenerar» neuronas significa que las neuronas endógenas de un sujeto se inducen a crecer (p. ej., a desarrollar axones) y/o dividirse y/o una célula madre neuronal endógena se induce a crecer y/o dividirse y/o diferenciarse para producir nuevas neuronas. Esto es diferente de una célula administrada que se diferencia para producir una neurona. Este término no significa que un procedimiento para regenerar neuronas no pueda incluir adicionalmente diferenciación de células administradas en neuronas u otros tipos celulares.

Como se utiliza en el presente documento, se entenderá que el término «cantidad efectiva» significa una cantidad suficiente de la población enriquecida para las células STRO-1^+ y/o células de su progenie y/o factores solubles derivados de estas para inducir regeneración de neuronas cerebrales en un sujeto que ha sufrido un accidente cerebrovascular y/o para diferenciarse en neuronas en el sujeto. Una cantidad efectiva no necesariamente tiene que ser suficiente para proporcionar un beneficio terapéutico por sí misma, por ejemplo, una pluralidad de administraciones de una cantidad efectiva de la población y/o células y/o factores solubles pueden proporcionar un beneficio terapéutico.

Como se utiliza en el presente documento, se entenderá que el término «cantidad terapéuticamente efectiva» significa una cantidad suficiente de población enriquecida para las células STRO-1^+ y/o células de su progenie y/o factores solubles derivados de estas para mejorar la función cerebral y/o tratar un trastorno de movimiento y/o regenerar neuronas cerebrales en un sujeto que ha sufrido un accidente cerebrovascular.

Como se utiliza en el presente documento, se entenderá que el término «dosis baja» significa una cantidad de células STRO-1^+ y/o su progenie inferior a $1x10^6$, pero que todavía es suficiente para ser una «cantidad efectiva» como se define en el presente documento y/o una «cantidad terapéuticamente efectiva» como se define en el presente documento. Por ejemplo, una dosis baja comprende $0,5 \times 10^6$ o menos células, o $0,4 \times 10^6$ o menos células o $0,3 \times 10^6$ o menos células o $0,1 \times 10^6$ o menos células.

Como se utiliza en el presente documento, se entenderá que el término «tratar» o «tratamiento» significa administrar una cantidad de factores solubles y/o células y reducir la gravedad de un trastorno de movimiento.

Como se utiliza en el presente documento, los términos «prevenir» o «que previene» o «prevención» se entenderá que significan administrar una cantidad de factores solubles y/o células y detener o impedir o retrasar el desarrollo o progresión de un trastorno de movimiento o pérdida de función cerebral después de un accidente cerebrovascular. Por consiguiente, se entenderá que los procedimientos de la presente descripción aplican *mutatis mutandis* a los procedimientos para prevenir un trastorno de movimiento o pérdida de función cerebral en un sujeto que ha sufrido un accidente cerebrovascular.

Como se utiliza en el presente documento, se entenderá que el término «factores solubles» significa cualquier molécula, p. ej., proteína, péptido, glicoproteína, glicopéptido, lipoproteína, lipopéptido, carbohidrato, etc. producida por células STRO-1^+ y/o su progenie que son solubles en agua. Dichos factores solubles pueden ser intracelulares y/o secretados por una célula. Dichos factores solubles pueden ser una mezcla compleja (p. ej., sobrenadante) y/o una fracción de estos y/o pueden ser un factor purificado. En un ejemplo de la presente descripción los factores solubles son o están contenidos dentro de un sobrenadante. En consecuencia, se entenderá que cualquier ejemplo del presente documento dirigido a administración de uno o más factores solubles aplica *mutatis mutandis* a la administración de sobrenadante.

Como se utiliza en el presente documento, el término «sobrenadante» se refiere al material no celular producido después del cultivo *in vitro* de células STRO-1^+ y/o su progenie en un medio adecuado, tal como un medio líquido. Normalmente, el sobrenadante se produce cultivando las células en el medio en condiciones y tiempo adecuados, y a continuación se elimina el material celular mediante un proceso tal como centrifugación. El sobrenadante puede o

puede no haber sido sometido a etapas de purificación adicionales antes de la administración. En un ejemplo, el sobrenadante comprende menos de 10^5, más por ejemplo menos de 10^4, tal como menos de 10^3 y, por ejemplo, no comprende células vivas.

Como se utiliza en el presente documento, se entenderá que la expresión «individuo normal o sano» significa un sujeto que no ha sufrido un accidente cerebrovascular.

En la presente memoria descriptiva, se entenderá que la expresión «efecto de un accidente cerebrovascular» incluye y proporciona apoyo literal para una o más de las siguientes acciones: mejorar la función cerebral, tratar o prevenir un trastorno de movimiento y/o regenerar neuronas cerebrales.

Células STRO-1$^+$ o células de progenie, y sobrenadante o uno o más factores solubles derivados de estos

Las células STRO-1$^+$ son células que se encuentran en la médula ósea, sangre, células de pulpa dental, tejido adiposo, piel, bazo, páncreas, cerebro, riñón, hígado, corazón, retina, cerebro, folículos pilosos, intestino, pulmón, ganglio linfático, timo, hueso, ligamento, tendón, músculo esquelético, dermis y periostio; y son capaces de diferenciarse en líneas germinales tales como mesodermo y/o endodermo y/o ectodermo. Las fuentes ejemplares de células STRO-1$^+$ se derivan de la médula ósea y/o la pulpa dental.

En un ejemplo, las células STRO-1$^+$ son células multipotenciales que son capaces de diferenciarse en un gran número de tipos celulares incluyendo, sin carácter restrictivo, tejido adiposo, óseo, cartilaginoso, elástico, muscular, y conectivo fibroso. El compromiso con un linaje específico y la ruta de diferenciación que estas células toman depende de diversas influencias, desde influencias mecánicas y/o factores bioactivos endógenos, tales como factores de crecimiento, citocinas y/o condiciones microambientales locales establecidas por los tejidos huésped. Por lo tanto, las células STRO-1$^+$ multipotenciales son células progenitoras no hematopoyéticas que se dividen para producir células hija que son o bien células madre o células precursoras que, con el tiempo, se diferenciarán irreversiblemente para producir una célula fenotípica.

En un ejemplo, una célula STRO-1$^+$ es capaz de diferenciarse en una neurona o en una célula de tipo neurona.

En un ejemplo, una célula STRO-1$^+$ secreta uno o más factores que inducen o promueven crecimiento de axones a partir de una neurona.

En un ejemplo, las células STRO-1$^+$ son enriquecidas a partir de una muestra obtenida de un sujeto, p. ej., un sujeto que va a ser tratado o un sujeto relacionado o un sujeto no relacionado (ya sea de la misma especie o de una especie diferente). Los términos «enriquecido», «enriquecimiento» o variaciones de los mismos se usan en el presente documento para describir una población de células en la cual la proporción de un tipo celular particular o la proporción de una serie de tipos celulares particulares aumenta en comparación con una población de células no tratada (p. ej., células en su entorno nativo). En un ejemplo, una población enriquecida para células STRO-1$^+$ comprende al menos alrededor de 0,1 % o 0,5 % o 1 % o 2 % o 5 % o 10 % o 15 % o 20 % o 25 % o 30 % o 50 % o 75 % de células STRO-1$^+$. En este sentido, se entenderá que la expresión «población de células enriquecidas para células STRO-1$^+$» proporciona apoyo explícito a la expresión «población de células que comprende X % de células STRO1$^+$», donde X % es un porcentaje como se indica en el presente documento. Las células STRO-1$^+$ pueden, en algunos ejemplos, formar colonias clonogénicas, p. ej., UFC-F (fibroblastos) o un subgrupo de los mismos (p. ej., 50 % o 60 % o 70 % o 70 % o 90 % o 95 %) pueden tener esta actividad.

En un ejemplo, la población de células se enriquece a partir de una preparación de células que comprende células STRO-1$^+$ en una forma seleccionable. En este sentido, se entenderá que el término «forma seleccionable» significa que las células expresan un marcador (p. ej., un marcador de superficie celular) que permite la selección de las células STRO-1$^+$. El marcador puede ser, pero no necesariamente, STRO-1. Por ejemplo, como se describe y/o ejemplifica en el presente documento, las células (p. ej., MPC) que expresan STRO-2 y/o STRO-3 (TNAP) y/o STRO-4 y/o VCAM-1 y/o CD146 y/o 3G5 también expresan STRO-1 (y pueden ser STRO-1^{bright}). En consecuencia, una indicación de que las células son STRO-1$^+$ no significa que las células son seleccionadas por expresión de STRO-1. En un ejemplo, las células se seleccionan según al menos expresión de STRO-3, p. ej., son STRO-3$^+$ (TNAP$^+$).

La referencia a selección de una célula o población de las mismas no requiere selección de una fuente de tejido específica. Como se describe en el presente documento, las células STRO-1$^+$ se pueden seleccionar o aislar o enriquecer a partir de una gran variedad de fuentes. Dicho esto, en algunos ejemplos, estos términos proporcionan apoyo para la selección a partir de cualquier tejido que comprende células STRO-1$^+$ (p. ej., MPC) o tejido vascularizado o tejido que comprende pericitos (p. ej., pericitos de STRO-1$^+$) o uno o más cualquiera de los tejidos indicados en el

presente documento.

En un ejemplo, las células expresan uno o más marcadores individual o colectivamente seleccionados de entre el grupo que consiste en TNAP$^+$, VCAM-1$^+$, THY-1$^+$, STRO-2$^+$, STRO-4$^+$ (HSP-90β), CD45$^+$, CD146$^+$, 3G5$^+$ o cualquier combinación de los mismos.

En un ejemplo, las células expresan o la población de células está enriquecida para células precursoras mesenquimales que expresan STRO-1$^+$ (o STRO-1^{bright}) y CD146$^+$.

Con «individualmente» se refiere a que la descripción engloba los marcadores o grupos de marcadores indicados por separado, y que, a pesar de que los marcadores individuales o grupos de marcadores pueden no estar mencionados por separado en el presente documento, las reivindicaciones que lo acompañan pueden definir dicho marcador o grupos de marcadores por separado y divisiblemente entre sí.

Con «colectivamente» se refiere a que la descripción engloba cualquier cantidad o combinación de los marcadores o grupos de péptidos indicados, y que, a pesar de que dichas cantidades y combinaciones de marcadores o grupos de marcadores pueden no estar mencionados específicamente en el presente documento, las reivindicaciones que lo acompañan pueden definir dichas combinaciones o subcombinaciones por separado y divisiblemente respecto de cualquier otra combinación de marcadores o grupos de marcadores.

En un ejemplo, las células STRO-1$^+$ son STRO-1^{bright} (*sin.* STRO-1^{bri}). En un ejemplo, las células Stro-1^{bri} son preferentemente enriquecidas respecto de las células STRO-1^{dim} o STRO-1^{intermediate}.

Por ejemplo, las células STRO-1^{bright} son adicionalmente una o más de TNAP$^+$, VCAM-1$^+$, THY-1$^+$, STRO-2$^+$, STRO-4$^+$ (HSP-90β) y/o CD146$^+$. Por ejemplo, las células se seleccionan para uno o más de los marcadores anteriores y/o muestran expresión de uno o más de los marcadores anteriores. En este sentido, una célula que muestra expresión de un marcador no necesita ser específicamente analizada, más bien, se pueden analizar las células previamente enriquecidas o aisladas, y se puede asumir razonablemente que las células posteriormente utilizadas, aisladas o enriquecidas también expresan el mismo marcador.

En un ejemplo, las células precursoras mesenquimales son células precursoras mesenquimales perivasculares como se define en la publicación internacional WO 2004/85630. Por ejemplo, las células precursoras mesenquimales expresan un marcador de una célula perivascular, p. ej., las células son STRO-1$^+$ o STRO-1^{bright} y/o 3G5$^+$. En un ejemplo, las células son o fueron previamente o son progenie de células que se aislaron de tejido vascularizado u órganos o partes de los mismos.

Cuando se hace referencia a una célula como «positiva» para un marcador dado, puede ser que tenga una expresión baja (lo o dim) o alta (bright, bri) de ese marcador, dependiendo del grado en que el marcador esté presente sobre la superficie celular, donde los términos se relacionan con la intensidad de fluorescencia u otro marcador usado en el proceso de clasificación de las células. La distinción entre lo (o dim o dull) y bri se entenderá en el contexto del marcador usado en una población de células particular que se está clasificando. Si se refiere a una célula como «negativa» para determinado marcador, no quiere decir que dicho marcador está necesariamente ausente por completo en dicha célula. Este término significa que el marcador está expresado a un nivel relativamente muy bajo por dicha célula, y que genera una señal muy baja cuando se marca de manera detectable o es indetectable por encima de niveles de base, p. ej., niveles detectados utilizando un anticuerpo de control de isotipo.

El término «bright», cuando se usa en la presente invención, hace referencia a un marcador sobre una superficie celular que genera una señal relativamente alta cuando se marca de manera detectable. Sin restringirse a consideraciones teóricas, se propone que las células «bright» expresan más de la proteína marcadora diana (por ejemplo, el antígeno reconocido por STRO-1) que otras células en la muestra. Por ejemplo, las células STRO-1^{bri} producen una mayor señal de fluorescencia cuando se marcan con un anticuerpo STRO-1 conjugado con FITC, como se determina por análisis de clasificación celular activada por fluorescencia (FACS), que las células no bright (STRO-1$^{dull/dim}$). Por ejemplo, las células «bright» constituyen al menos alrededor de 0,1 % de las células mononucleares de médula ósea más fuertemente marcadas contenidas en la muestra de partida. En otros ejemplos, las células «bright» constituyen al menos alrededor de 0,1 %, al menos alrededor de 0,5 %, al menos alrededor de 1 %, al menos alrededor de 1,5 % o al menos alrededor de 2 % de las células mononucleares de médula ósea más fuertemente marcadas contenidas en la muestra de partida. En un ejemplo, las células STRO-1^{bright} tienen una expresión de 2 órdenes de magnitud mayor de expresión en superficie de STRO-1 respecto de la «base», a saber células que son STRO-1$^-$. En comparación, las células STRO-1^{dim} y/o STRO-1^{intermediate} tienen una expresión menos de 2 órdenes de magnitud mayor de expresión en superficie de STRO-1, típicamente alrededor de 1 orden de magnitud o menos que la «base».

Como se utiliza en el presente documento, el término «TNAP» pretende englobar todas las isoformas de fosfatasa alcalina no específica de tejido. Por ejemplo, el término abarca la isoforma hepática (LAP), la isoforma ósea (BAP) y la isoforma renal (KAP). En un ejemplo, la TNAP es BAP. En un ejemplo, la TNAP como se usa en el presente documento hace referencia a una molécula que puede unirse al anticuerpo STRO-3 producido por la línea celular de hibridoma depositada en la ATCC el 19 de diciembre de 2005 bajo las disposiciones del Tratado de Budapest, con número de acceso al depósito PTA-7282.

Asimismo, en un ejemplo de la descripción, las células STRO-1$^+$ son capaces de dar origen a UFC-F clonogénicas.

En un ejemplo, una proporción significativa de las células multipotenciales STRO-1$^+$ es capaz de diferenciarse en al menos dos líneas germinales distintas. Los ejemplos no limitantes de los linajes con los que pueden estar comprometidas las células multipotenciales incluyen células precursoras óseas; progenitores hepatocíticos, que son multipotentes para células epiteliales de conducto biliar y hepatocitos; células restringidas neurales, que pueden generar precursores de células gliales que evolucionan hasta oligodendrocitos y astrocitos; precursores neuronales que evolucionan hasta neuronas; precursores para músculo cardíaco y cardiomiocitos y líneas celulares beta pancreáticas secretoras de insulina sensibles a glucosa. Otros linajes incluyen, pero sin limitación, odontoblastos, células productoras de dentina y condrocitos y células precursoras de las siguientes: células epiteliales de pigmento retinal, fibroblastos, células cutáneas tales como queratinocitos, células dendríticas, células de folículo piloso, células epiteliales de conducto renal, células de músculo liso y esquelético, progenitores testiculares, células endoteliales vasculares, tendón, ligamento, cartílago, adipocito, fibroblasto, estroma medular, músculo cardiaco, músculo liso, músculo esquelético, pericito, células vasculares, epiteliales, gliales, neuronales, astrocíticas y oligodendrocíticas.

En otro ejemplo, las células STRO-1$^+$ no son capaces de dar origen, tras el cultivo, a células hematopoyéticas.

En un ejemplo, las células se extraen del sujeto que va a tratarse, cultivadas *in vitro* utilizando técnicas estándar y se utilizan para obtener sobrenadante o factores solubles o células expandidas para administrar al sujeto como una composición autóloga o alogénica. En un ejemplo alternativo, se utilizan las células de una o más de las líneas celulares humanas establecidas. En otro ejemplo útil, se utilizan las células de un animal no humano (o si el paciente no es humano, de otra especie).

La presente descripción también contempla el uso de sobrenadante o factores solubles obtenidos o derivados de células STRO-1$^+$ y/o células de su progenie (estas últimas también denominadas células expandidas) que se producen a partir de cultivo *in vitro*. Las células expandidas de la descripción pueden tener una amplia variedad de fenotipos dependiendo de las condiciones de cultivo (incluyendo el número y/o tipo de factores estimulantes en el medio de cultivo), el número de pases y similares. En ciertos ejemplos, las células de progenie se obtienen después de alrededor de 2, alrededor de 3, alrededor de 4, alrededor de 5, alrededor de 6, alrededor de 7, alrededor de 8, alrededor de 9 o alrededor de 10 pases de la población parental. No obstante, las células de progenie se pueden obtener después de cualquier número de pases de la población parental.

Las células de progenie se pueden obtener cultivando en cualquier medio adecuado. El término «medio», como se usa en referencia a un cultivo celular, incluye los componentes del entorno que rodea a las células. Los medios pueden ser sólidos, líquidos, gaseosos o una mezcla de fases y materiales. Los medios incluyen medios de crecimiento líquidos así como medios líquidos que no admiten crecimiento celular. Los medios también incluyen medios gelatinosos tales como agar, agarosa, gelatina y matrices de colágeno. Entre los medios gaseosos ejemplares se incluyen la fase gaseosa a la cual están expuestas las células que crecen en una placa de Petri u otro soporte sólido o semi-sólido. El término «medio» también se refiere a material que fue concebido para uso en un cultivo celular, incluso si todavía no se ha puesto en contacto con células. Dicho de otro modo, un líquido rico en nutrientes preparado para cultivo bacteriano es un medio. Una mezcla en polvo que, cuando se mezcla con agua u otro líquido, se vuelve adecuado para cultivo celular se puede denominar un «medio en polvo».

En un ejemplo, las células de progenie útiles para los procedimientos de la descripción se obtienen aislando o enriqueciendo células TNAP$^+$ STRO-1$^+$ a partir de médula ósea utilizando perlas magnéticas marcadas con el anticuerpo STRO-3, y a continuación expandiendo las células aisladas mediante cultivo (véase Gronthos et al. Blood 85: 929-940, 1995 para un ejemplo de condiciones de cultivo adecuadas).

En un ejemplo, dichas células expandidas (progenie) (por ejemplo, tras al menos 5 pases) pueden ser TNAP$^-$, CC9$^+$, HLA de clase I$^+$, HLA de clase II$^-$, CD14$^-$, CD19$^-$, CD3$^-$, CD11a-c$^-$, CD31$^-$, CD86$^-$, CD34$^-$ y/o CD80$^-$. Sin embargo, es posible que, en condiciones de cultivo diferentes a las descritas en la presente memoria, la expresión de los diferentes marcadores pueda variar. También, aunque las células de estos fenotipos pueden predominar en la población de

células expandida, no significa que no haya una proporción minoritaria de las células que no tengan este fenotipo o fenotipos (por ejemplo, un pequeño porcentaje de las células expandidas puede ser $CC9^-$). En un ejemplo, las células expandidas todavía tienen la capacidad de diferenciarse en diferentes tipos celulares.

En un ejemplo, una población de células expandida utilizada para obtener sobrenadante o factores solubles, o células propiamente dichas comprende células donde al menos 25 %, tal como al menos 50 % de las células son $CC9^+$

En otro ejemplo, una población de células expandida utilizada para obtener sobrenadante o factores solubles, o células propiamente dichas comprende células donde al menos 40 %, tal como al menos 45 % de las células son STRO-1^+

En un ejemplo adicional, las células expandidas pueden expresar uno o más marcadores seleccionados colectiva o individualmente de entre el grupo consistente en: LFA-3, THY-1, VCAM-1, ICAM-1, PECAM-1, P-selectina, L-selectina, 3G5, CD49a/CD49b/CD29, CD49c/CD29, CD49d/CD29, CD 90, CD29, CD18, CD61, integrina beta 6-19, trombomodulina, CD10, CD13, SCF, PDGF-R, EGF-R, IGF1-R, NGF-R, FGF-R, leptina-R (STRO-2 = leptina-R), RANKL, STRO-4 (HSP-90β), STRO-1^{bright} y CD146 o cualquier combinación de estos marcadores.

En un ejemplo, las células de progenie son progenie de células multipotenciales STRO-1^+ expandidas multipotenciales (MEMP) como se definen y/o describen en la publicación internacional WO 2006/032092. Los procedimientos para preparar poblaciones enriquecidas de células multipotenciales STRO-1^+ a partir de las cuales se puede derivar progenie se describen en las publicaciones internacionales WO 01/04268 y WO 2004/085630. En un contexto *in vitro* las células multipotenciales STRO-1^+ raramente estarán presentes como una preparación absolutamente pura y, por lo general, estarán presentes con otras células que son células comprometidas específicas de tejido (TSCC, por su sigla en inglés). La publicación internacional WO 01/04268 se refiere a recolectar dichas células a partir de médula ósea con niveles de pureza de alrededor de 0,1 % a 90 %. La población que comprende MPC de las cuales se deriva la progenie se puede recolectar directamente de una fuente de tejido o alternativamente puede ser una población que ya se ha expandido *ex vivo*.

Por ejemplo, la progenie se puede obtener de una población de células multipotenciales STRO-1^+ sustancialmente purificada recolectada, no expandida, que comprende al menos alrededor de 0,1, 1, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 o 95 % de células totales de la población en la cual están presentes. Este nivel se puede lograr, por ejemplo, seleccionando células que son positivas para al menos un marcador seleccionado individual o colectivamente de entre el grupo que consiste en TNAP, STRO-4 (HSP-90β), STRO-1^{bright}, 3G5$^+$, VCAM-1, THY-1, CD146 y STRO-2..

Las MEMPS se pueden distinguir de células multipotenciales STRO-1^+ recién recolectadas por ser positivas para el marcador STRO-1^{bri} y negativas para el marcador fosfatasa alcalina (ALP). En cambio, las células multipotenciales STRO-1^+recién aisladas son positivas para STRO-1^{bri} y ALP. En un ejemplo de la presente descripción, al menos 15 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o 95 % de las células administradas tienen el fenotipo STRO-1^{bri}, ALP^-. En un ejemplo adicional, las MEMPS son positivas para uno o más de los marcadores Ki67, CD44 y/o CD49c/CD29, VLA-3, α3β1. En aun otro ejemplo, las MEMP no presentan actividad TERT y/o son negativas para el marcador CD18.

La población que inicia las células STRO-1^+ se puede derivar de uno cualquiera o más tipos de tejidos presentados en la publicación internacional WO 01/04268 o WO2004/085630, a saber, médula ósea, células de pulpa dental, tejido adiposo y piel, o tal vez más ampliamente de tejido adiposo, dientes, pulpa dental, piel, hígado, riñón, corazón, retina, cerebro, folículos pilosos, intestino, pulmón, bazo, ganglio linfático, timo, páncreas, hueso, ligamento, médula ósea, tendón y músculo esquelético.

Se entenderá que al llevar a la práctica los procedimientos descritos en la presente descripción, la separación de las células que poseen cualquier marcador superficial de célula dado se puede efectuar a través de una serie de procedimientos diferentes, sin embargo, los procedimientos preferidos se basan en la unión de un agente de unión (p. ej., un fragmento de unión a anticuerpo o antígeno del mismo) al marcador en cuestión seguido de una separación de los que presentan unión, ya sea unión de alto nivel o unión de bajo nivel o ausencia de unión. Los agentes de unión más convenientes son anticuerpos o moléculas basadas en anticuerpo, por ejemplo, anticuerpos monoclonales o basados en anticuerpos monoclonales (p. ej., proteínas que comprenden fragmentos de unión a antígeno de los mismos) debido a la especificidad de estos últimos agentes. Se pueden utilizar anticuerpos para ambas etapas, sin embargo, también se podrían utilizar otros agentes, por lo tanto, también se pueden emplear ligandos para estos marcadores para enriquecer las células que los poseen o que carecen de estos.

Los anticuerpos o ligandos pueden enlazarse con un soporte sólido para permitir una separación bruta. En un ejemplo, las técnicas de separación maximizan la retención de viabilidad de la fracción que se ha de recoger. Pueden emplearse

diversas técnicas de diferente eficacia para obtener separaciones relativamente brutas. La técnica particular empleada dependerá de la eficiencia de separación, la citotoxicidad asociada, la facilidad y velocidad de rendimiento y la necesidad de un equipo sofisticado y/o habilidades técnicas. Los procedimientos para la separación pueden incluir, sin carácter restrictivo, separación magnética usando perlas magnéticas recubiertas con anticuerpo, cromatografía de afinidad e «inmunopurificación» con anticuerpo enlazado con una matriz sólida. Las técnicas que proporcionan separación precisa incluyen, pero sin limitación, FACS. Los procedimientos para llevar a cabo FACS serán evidentes para los expertos en la materia.

Los anticuerpos contra cada uno de los marcadores descritos en el presente documento están disponibles en el mercado (p. ej., los anticuerpos monoclonales contra STRO-1 se pueden conseguir en R&D Systems, EE. UU.), se pueden conseguir en ATCC u otra organización depositaria y/o se pueden producir utilizando técnicas reconocidas en la materia.

En un ejemplo, el procedimiento para aislar células STRO-1$^+$ comprende una primera etapa de clasificación en fase sólida utilizando, por ejemplo, clasificación celular activada magnéticamente (MACS) que reconoce expresión de alto nivel de STRO-1. Después, se puede continuar con una segunda etapa de clasificación, si se desea, para producir un mayor nivel de expresión de células precursoras tal como se describe en la memoria descriptiva WO 01/14268. Esta segunda etapa de clasificación podría comprender el uso de dos o más marcadores.

El procedimiento para obtener células STRO-1$^+$también podría incluir la recolección de una fuente de las células antes de la primera etapa de enriquecimiento utilizando técnicas conocidas. Por ende, el tejido se retirará quirúrgicamente. Las células que comprenden el tejido de fuente después se separarán en una denominada suspensión de células únicas. Esta separación puede conseguirse por medios físicos y/o enzimáticos.

Una vez obtenida una población de células STRO-1$^+$adecuada, se puede cultivar o expandir a través de cualquier medio adecuado para obtener MEMP.

En un ejemplo, las células se extraen del sujeto que va a tratarse, cultivadas *in vitro* utilizando técnicas estándar y se utilizan para obtener sobrenadante o factores solubles o células expandidas para administrar al sujeto como una composición autóloga o alogénica. En un ejemplo alternativo, se utilizan las células de una o más de las líneas celulares humanas establecidas para obtener el sobrenadante o factores solubles. En otro ejemplo útil, se utilizan células de un animal no humano (o si el paciente no es humano, de otra especie) para obtener sobrenadante o factores solubles.

Los procedimientos y usos de la presente descripción se pueden llevar a la práctica utilizando células de cualquier especie animal no humana, incluyendo, sin carácter restrictivo, células de primate no humano, células de ungulados, caninas, felinas, de lagomorfos, de roedores, aviares y de peces. Las células de primates con las cuales se pueden llevar a la práctica los procedimientos de la descripción incluyen, sin carácter restrictivo, células de chimpancés, babuinos, monos Cynomolgus, y de cualquier otro mono del nuevo o viejo mundo. Las células de ungulados con las cuales se pueden llevar a la práctica los procedimientos de la descripción incluyen, sin carácter restrictivo, células de bovinos, porcinos, caprinos, equinos, de búfalo y de bisonte. Las células de roedores con las cuales se pueden llevar a la práctica los procedimientos de la descripción incluyen, sin carácter restrictivo, células de ratón, rata, cobaya, hámster y jerbo. Los ejemplos de las especies de lagomorfos con las cuales se pueden llevar a la práctica los procedimientos de la descripción incluyen conejos domesticados, liebres de Norteamérica, liebres, conejos de cola de algodón, liebres americanas y picas. Los pollos (*Gallus gallus*) son un ejemplo de una especie aviar con la cual se pueden llevar a la práctica los procedimientos de la descripción.

En un ejemplo, las células son células humanas.

Las células útiles para los procedimientos de la presente descripción se pueden almacenar antes de su uso o antes de obtener el sobrenadante o los factores solubles. Los procedimientos y protocolos para conservar y almacenar células eucariotas, y en particular células de mamíferos, son conocidos en la técnica (cf., por ejemplo, Pollard, J. W. y Walker, J. M. (1997) Basic Cell Culture Protocols, segunda edición, Humana Press, Totowa, N.J.; Freshney, R. I. (2000) Culture of Animal Cells, cuarta edición, Wiley-Liss, Hoboken, N.J.). Cualquier procedimiento que mantiene la actividad biológica de las células madre aisladas tales como células madre/progenitoras mesenquimales, o su progenie, se puede utilizar en relación con la presente descripción. En un ejemplo, las células se mantienen y almacenan utilizando criopreservación.

Células genéticamente modificadas

En un ejemplo, las células STRO-1$^+$ y/o células de su progenie están genéticamente modificadas, p. ej., para expresar y/o secretar una proteína de interés. Por ejemplo, las células se modifican genéticamente para expresar una proteína útil en el tratamiento de trastornos de movimiento u otros efectos de un accidente cerebrovascular, tales como, factor de crecimiento nervioso o péptidos descritos, por ejemplo, en Meade et al., J Exp Stroke Transl Med 2: 22-40, 2009.

Los procedimientos para modificar genéticamente una célula serán evidentes para los expertos en la materia. Por ejemplo, un ácido nucleico que se ha de expresar en una célula está operativamente ligado a un promotor para inducir expresión en la célula. Por ejemplo, el ácido nucleico está ligado a un promotor operativo en una variedad de células de un sujeto, tal como, por ejemplo, un promotor viral, p. ej., un promotor de CMV (p. ej., un promotor CMV-IE) o un promotor SV-40. En la técnica se conocen otros promotores adecuados y se entenderá que se aplican *mutatis mutandis* al presente ejemplo de la descripción.

En un ejemplo, el ácido nucleico se proporciona en forma de un constructo de expresión. Como se utiliza en el presente documento, el término «constructo de expresión» se refiere a un ácido nucleico que tiene la capacidad de otorgar expresión en un ácido nucleico (p. ej., un gen reportero y/o un gen reportero contra-seleccionable) al cual está operativamente conectado, en una célula. Dentro del contexto de la presente descripción, se ha de entender que un constructo de expresión puede comprender o ser un plásmido, bacteriófago, fagémido, cósmido, fragmento subgenómico o genómico de virus, u otro ácido nucleico capaz de mantener y/o replicar ADN heterólogo en un formato expresable.

Los procedimientos para la construcción de un constructo de expresión adecuado para el funcionamiento de la descripción serán evidentes para el experto en la materia y se describen, por ejemplo, en Ausubel et al (En: Current Protocols in Molecular Biology. Wiley Interscience, ISBN 047 150338, 1987) o Sambrook et al (En: Molecular Cloning: Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratories, Nueva York, tercera edición 2001). Por ejemplo, cada uno de los componentes del constructo de expresión se amplifica a partir de un ácido nucleico plantilla adecuado utilizando, por ejemplo, PCR y posteriormente se clona en un constructo de expresión adecuado, tal como, por ejemplo, un plásmido o un fagémido.

Los vectores adecuados para dicho constructo de expresión son conocidos en la técnica y/o se describen en el presente documento. Por ejemplo, un vector de expresión adecuado para uso en un procedimiento de la presente descripción en una célula de mamífero es, por ejemplo, un vector del grupo de vectores pcDNA suministrado por Invitrogen, un vector del grupo de vectores pCI (Promega), un vector del grupo de vectores pCMV (Clontech), un vector pM (Clontech), un vector pSI (Promega), un vector VP 16 (Clontech) o un vector del grupo de vectores pcDNA (Invitrogen).

El experto en la técnica conocerá vectores y fuentes de dichos vectores adicionales, tales como, por ejemplo, Life Technologies Corporation, Clontech o Promega.

Los medios para introducir la molécula de ácido nucleico aislada o un constructo génico que comprende dicha molécula en una célula para expresión son conocidos para los expertos en la técnica. La técnica utilizada para determinado organismo depende de las técnicas exitosas conocidas. Los medios para introducir ADN recombinante en células incluyen microinyección, transfección mediada por DEAE-dextrano, transfección mediada por liposomas utilizando, por ejemplo, lipofectamina (Gibco, MD, EE. UU.) y/o cellfectin (Gibco, MD, EE. UU.), captación de ADN mediada por PEG, electroporación y bombardeo de micropartículas utilizando, por ejemplo, tungsteno recubierto por ADN o partículas de oro (Agracetus Inc., WI, EE. UU.)

Como alternativa, un constructo de expresión de la descripción es un vector viral. Los vectores virales adecuados son conocidos en la técnica y están disponibles en el mercado. Los sistemas basados en virus convencionales para la administración de un ácido nucleico e integración de dicho ácido nucleico en un genoma de célula huésped incluyen, por ejemplo, un vector retroviral, un vector lentiviral o un vector viral adeno-asociado. Como alternativa, un vector adenoviral es útil para introducir un ácido nucleico que permanece episomal en una célula huésped. Los vectores virales son un procedimiento eficiente y versátil de transferencia génica en células y tejidos diana. De manera adicional, se han observado las eficiencias de alta transducción en muchos tipos celulares y tejidos diana diferentes.

Por ejemplo, un vector retroviral por lo general comprende repeticiones terminales largas (RTL) que actúan en cis con capacidad de empaquetado para como máximo 6-10 kb de secuencia extraña. Las RTL que actúan en cis mínimas son suficientes para replicar y empaquetar un vector, que luego se utiliza para integrar el constructo de expresión en la célula diana para proporcionar expresión a largo plazo. Los vectores retrovirales comúnmente utilizados incluyen los que están basados en virus de leucemia murino (VLMu), virus de leucemia de mono gibón (VLMG), virus de inmunodeficiencia en simios (VIS), virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), y combinaciones de los mismos

(véase, p. ej., Buchscher et al., J Virol. 56:2731-2739 (1992); Johann et al, J. Virol 65:1635-1640 (1992); Sommerfelt et al, Virol. 76:58-59 (1990); Wilson et al, J. Virol. 63:274-2318 (1989); Miller et al., J. Virol. 65:2220-2224 (1991); PCT/US94/05700; Miller & Rosman BioTechniques 7:980-990, 1989; Miller, A. D. Human Gene Therapy 7:5-14, 1990; Scarpa et al Virology 75:849-852, 1991; Burns et al. Proc. Natl. Acad. EE. UU. 90:8033-8037 (1993).

También se han desarrollado diversos sistemas de vectores de virus adeno-asociados (AAV, por su sigla en inglés) para administración de ácido nucleico. Los vectores AAV se pueden construir fácilmente utilizando técnicas conocidas en la materia. Véase, por ejemplo, la patente de EE. UU. N.º 5.173.414 y 5.139.941; publicaciones internacionales N.º WO 92/01070 y WO 93/03769; Lebkowski et al. Molec. Cell. Biol. 5:3988-3996, 1988; Vincent et al. (1990) Vaccines 90 (Cold Spring Harbor Laboratory Press); Carter Current Opinion in Biotechnology 5:533-539, 1992; Muzyczka. Current Topics in Microbiol, and Immunol. 158:97-129, 1992; Kotin, Human Gene Therapy 5:793-801, 1994; Shelling and Smith Gene Therapy 7:165-169, 1994; y Zhou et al. J. Exp. Med. 779:1867-1875, 1994.

Los vectores virales adicionales útiles para administrar un constructo de expresión de la descripción incluyen, por ejemplo, los derivados de la familia de los poxvirus, tal como virus vacuna y poxvirus aviar o un alfavirus o un vector de virus conjugado (p. ej., el descrito en Fisher-Hoch et al., Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU. 56:317-321, 1989).

Análisis del potencial terapéutico/profiláctico de células y factores solubles

Los procedimientos para determinar la capacidad de las células o factores solubles para mejorar la función cerebral y/o tratar un trastorno de movimiento y/o regenerar neuronas cerebrales serán evidentes para el experto en la materia.

Por ejemplo, las células o factores solubles se cultivan con neuronas y se evalúa la capacidad de las células o factores solubles para inducir crecimiento axonal, p. ej., mediante técnicas microscópicas. Se puede llevar a cabo un ensayo similar *in vivo* inyectando las células y/o factores solubles en el cerebro de un embrión de pollo y evaluando el crecimiento de axones, p. ej., como se ejemplifica en el presente documento.

En un ejemplo, las neuronas se exponen a oxígeno y/o deprivación de glucosa antes de o en el momento del cultivo con las células y/o factores solubles. La deprivación de oxígeno y glucosa es un modelo de isquemia.

En otro ejemplo, las células se cultivan en condiciones que inducen diferenciación neuronal, p. ej., con hidroxianisol butilado y ácido valproico o 5-azacitidina o indometacina e isobutilmetilxantina e insulina. Las células que se diferencian en neuronas se consideran adecuadas para fines terapéuticos.

En un ejemplo adicional, las células o factores solubles (p. ej., una mezcla de factores o un factor único o una fracción de factores (p. ej., derivada mediante purificación o cromatografía por afinidad)) se administran a un modelo de accidente cerebrovascular y se evalúa el efecto en la función cerebral, en la regeneración de neuronas cerebrales y/o en un trastorno de movimiento.

Existen diversas técnicas conocidas para inducir un accidente cerebrovascular isquémico en un sujeto animal no humano, tal como oclusión de aorta o vena cava, torniquete o manguito externo de cuello, hemorragia o hipotensión, hipertensión intracraneal u oclusión de arteria carótida común, oclusión e hipotensión de dos vasos, oclusión de cuatro vasos, oclusión de arteria carótida común unilateral (solo en algunas especies), estrangulación de arterias y venas inducida por endotelina-1, oclusión de arteria cerebral media, infarto cerebral espontáneo (en ratas con hipertensión espontánea), embolización con macroesferas, embolización de coágulos sanguíneos o embolización con microesferas. El accidente cerebrovascular hemorrágico se puede modelar por infusión de colagenasa en el cerebro.

En un ejemplo, el modelo de accidente cerebrovascular comprende oclusión de arteria cerebral media para producir un accidente cerebrovascular isquémico.

Para analizar la capacidad de una población y/o progenie y/o factores secretados para tratar los efectos de un accidente cerebrovascular, la población y/o progenie y/o factores secretados se administra/administran después de la inducción del accidente cerebrovascular, p. ej., dentro del plazo de una hora hasta 1 día del accidente cerebrovascular. Después de la administración, se lleva a cabo un análisis de la función cerebral y/o trastorno de movimiento, p. ej., en varias ocasiones.

Los procedimientos para analizar la función cerebral y/o los trastornos de movimiento serán evidentes para los expertos en la técnica e incluyen, por ejemplo, prueba del rotarod, prueba del laberinto elevado en cruz, prueba de campo abierto, laberinto acuático de Morris, laberinto en T, laberinto de brazos radiales, evaluación de movimiento (p. ej., superficie cubierta en un período de tiempo), prueba de retirada de la cola o prueba conductual de De Ryck (De

Ryck et al., Stroke. 20:1383-1390, 1989). Las pruebas adicionales serán evidentes para los expertos en la técnica y/o se describen en el presente documento.

En otro ejemplo, el efecto de la población y/o progenie y/o factores secretados en el telencéfalo se evalúa mediante técnicas de diagnóstico por imagen. Por ejemplo, es posible detectar apoptosis, autofagia y unidad neurovascular mediante formación de imágenes ópticas *in vivo* (Liu et al., Brain Res. 27 abril 2011), y se pueden utilizar TEP, IRM o TC para analizar diversos factores, tal como tamaño del infarto, tamaño de la penumbra y/o alcance del daño cerebral.

También se analiza el efecto de la población y/o progenie y/o factores secretados en las neuronas cerebrales. Por ejemplo, se extrae el cerebro o una región del telencéfalo del mismo y se evalúa o estima el número de neuronas o un subtipo de neuronas. Según el modelo utilizado, este número se puede comparar con el número en un animal de control, o si solo se induce isquemia focal, con una región de control del cerebro del mismo animal.

Composiciones celulares

En un ejemplo de la presente descripción se administran células STRO-1$^+$ y/o células de su progenie en forma de una composición. En un ejemplo, dicha composición comprende un vehículo y/o excipiente farmacéuticamente aceptable.

Los términos «vehículo» y «excipiente» se refieren a composiciones de materia que son convencionalmente utilizadas en la técnica para facilitar el almacenamiento, administración y/o la actividad biológica de un compuesto activo (véase, p. ej., Remington's Pharmaceutical Sciences, 16ª ed., Mac Publishing Company (1980). Un vehículo también puede reducir cualquier efecto secundario no deseado del compuesto activo. Un vehículo adecuado es, por ejemplo, estable, p. ej., incapaz de reaccionar con otros ingredientes en el vehículo. En un ejemplo, el vehículo no produce efectos adversos locales o sistémicos significativos en receptores en las dosificaciones y concentraciones empleadas para tratamiento.

Los vehículos adecuados para la presente descripción incluyen los convencionalmente utilizados, p. ej., agua, solución salina, dextrosa acuosa, lactosa, disolución de Ringer, una disolución tamponada, hialurano y glicoles, que son vehículos líquidos ejemplares, en particular (cuando son isotónicos) para disoluciones. Los vehículos y excipientes farmacéuticos adecuados incluyen almidón, celulosa, glucosa, lactosa, sacarosa, gelatina, malta, arroz, harina, tiza, gel de sílice, estearato de magnesio, estearato de sodio, monoestearato de glicerol, cloruro sódico, glicerol, propilenglicol, agua, etanol y similares.

En otro ejemplo, un vehículo es una composición de medio, p. ej., en la cual una célula se cultiva o se pone en suspensión. En un ejemplo, dicha composición de medio no induce ningún efecto adverso en un sujeto a quien se le administra.

Los vehículos y excipientes ejemplares no afectan de manera adversa la viabilidad de una célula y/o la capacidad de una célula para reducir, prevenir o retrasar un efecto de un accidente cerebrovascular.

En un ejemplo, el vehículo o excipiente proporciona una actividad de tampón para mantener las células y/o los factores solubles con un pH adecuado para, de este modo, llevar a cabo una actividad biológica, p. ej., el vehículo o excipiente es tampón fosfato salino (PBS). El PBS representa un vehículo o excipiente atractivo puesto que interactúa mínimamente con células y factores y permite la liberación rápida de las células y factores, en cuyo caso, la composición de la descripción se puede producir como un líquido para aplicación directa en el flujo sanguíneo o en un tejido o una región que rodea o es adyacente a un tejido, p. ej., mediante inyección.

Las células STRO-1$^+$ y/o células de su progenie también se pueden incorporar o incrustar en andamios que sean compatibles con el receptor y que se degraden en productos que no sean dañinos para el receptor. Estos andamios proporcionan soporte y protección para las células que se han de trasplantar en los sujetos receptores. Los andamios biodegradables naturales y/o sintéticos son ejemplos de dichos andamios.

En la práctica de la descripción se puede utilizar con éxito una variedad de distintos andamios. Los andamios ejemplares incluyen, sin carácter restrictivo, andamios biológicos, degradables. Los andamios biodegradables naturales incluyen colágeno, fibronectina y andamios de laminina. Un material sintético adecuado para un andamio de trasplante celular debería ser capaz de soportar crecimiento celular y función celular importantes. Dichos andamios también pueden ser reabsorbibles. Entre los andamios adecuados se incluyen andamios de ácido poliglicólico, p. ej., como describen Vacanti, et al. J. Ped. Surg. 23:3-9 1988; Cima, et al. Biotechnol. Bioeng. 38:145 1991; Vacanti, et al. Plast. Reconstr. Surg. 88:753-9 1991; o polímeros sintéticos tales como polianhídridos, poliortoésteres y ácido poliláctico.

En otro ejemplo, las células se pueden administrar en un andamio de gel (tal como Gelfoam de Upjohn Company).

Las composiciones celulares útiles para los procedimientos descritos en el presente documento pueden administrarse solas o como mezclas con otras células. Las células que pueden administrarse junto con las composiciones de la presente descripción incluyen, sin carácter restrictivo, otras células multipotentes o pluripotentes o células madre o células de médula ósea. Pueden mezclarse células de diferentes tipos con una composición de la descripción inmediatamente o poco antes de la administración, o pueden cocultivarse conjuntamente durante un periodo de tiempo antes de la administración.

En un ejemplo, la composición comprende una cantidad efectiva o una cantidad terapéuticamente o profilácticamente efectiva de células. Por ejemplo, la composición comprende alrededor de $1x10^5$ células STRO-1^+/kg a alrededor de $1x10^7$ células STRO-1^+/kg o alrededor de $1x10^6$ células STRO-1^+/kg a alrededor de $5x10^6$ células STRO-1^+/kg. La cantidad exacta de células que se han de administrar depende de una variedad de factores, incluyendo la edad, peso, y sexo del paciente, y el alcance y gravedad del accidente cerebrovascular y/o sitio del accidente cerebrovascular.

En un ejemplo, al sujeto se le administra una dosis baja de células. Las dosificaciones ejemplares incluyen entre alrededor de 0,1 x 10^4 y 0,5 x 10^6 células por kg, por ejemplo, entre alrededor de 0,1 x 10^5 y 0,5 x 10^6 células por kg, tal como, entre alrededor de 0,5 x 10^5 y 0,5 x 10^6 células por kg, por ejemplo, entre alrededor de 0,1 x 10^6 y 0,5 x 10^6 células por kg, p. ej., alrededor de 0,2 x 10^6 o 0,3 x 10^6 o 0,4 x 10^6 células por kg.

En algunos ejemplos, las células están contenidas dentro de una cámara que no permite que las células salgan a la circulación del sujeto, aunque permite que los factores secretados por las células entren en la circulación. De esta manera, los factores solubles se pueden administrar a un sujeto permitiendo que las células secreten los factores en la circulación del sujeto. Dicha cámara se puede implantar de igual manera en un sitio de un sujeto para aumentar los niveles locales de los factores solubles, p. ej., se puede implantar en o cerca del páncreas.

En algunos ejemplos de la descripción, puede no ser necesario o deseable inmunosuprimir con composiciones celulares a un paciente antes del inicio de la terapia. Por consiguiente, el trasplante con células STRO-1^+ alogénicas, o incluso xenogénicas, o su progenie puede tolerarse en algunos casos.

Sin embargo, en otros casos, puede ser deseable o apropiado inmunosuprimir farmacológicamente a un paciente antes de iniciar una terapia celular y/o reducir una respuesta inmune de un sujeto contra la composición celular. Esto puede lograrse mediante el uso de agentes inmunosupresores sistémicos o locales, o puede lograrse suministrando las células en un dispositivo encapsulado. Las células pueden encapsularse en una cápsula que sea permeable a los nutrientes y oxígeno requeridos por la célula y a factores terapéuticos, pero la célula es impermeable a células y factores humorales inmunitarios. En un ejemplo, el encapsulante es hipoalergénico, se sitúa de manera sencilla y estable en un tejido diana y proporciona una protección añadida a la estructura implantada. Son conocidos en la materia estos y otros medios para reducir o eliminar una respuesta inmunitaria ante las células trasplantadas. Como alternativa, las células pueden modificarse genéticamente para reducir su inmunogenicidad.

Composiciones de factores solubles

En un ejemplo de la presente descripción, el sobrenadante o factores solubles derivados de células STRO-1^+ y/o derivados de células de su progenie se administran en forma de una composición, p. ej., que comprende un vehículo y/o excipiente adecuado. En un ejemplo, el vehículo o excipiente no afecta de manera adversa el efecto biológico de los factores solubles o sobrenadante.

En un ejemplo, la composición comprende una composición de materia para estabilizar un factor soluble o un componente de sobrenadante, p. ej., un inhibidor de proteasa. En un ejemplo, el inhibidor de proteasa no se incluye en una cantidad suficiente para tener un efecto adverso en un sujeto.

Las composiciones que comprenden sobrenadante o factores solubles derivados de células STRO-1^+ y/o derivados de células de su progenie se pueden preparar como suspensiones líquidas apropiadas, p. ej., en medio de cultivo o en un vehículo estable o una disolución tamponada, p. ej., tampón fosfato salino. Los vehículos adecuados se describen anteriormente en el presente documento. En otro ejemplo, las suspensiones que comprenden sobrenadante o factores solubles derivados de células STRO-1 y/o derivados de células de su progenie son suspensiones oleosas inyectables. Los disolventes o vehículos lipófilos adecuados incluyen aceites grasos tales como aceite de sésamo; o ésteres de ácido graso sintético tales como oleato de etilo o triglicéridos; o liposomas. Las suspensiones que se usan para inyección pueden contener también sustancias que aumentan la viscosidad de la suspensión, tales como

carboximetilcelulosa de sodio, sorbitol o dextrano. Opcionalmente, la suspensión puede contener también estabilizantes o agentes adecuados que aumentan la solubilidad de los compuestos para permitir la preparación de disoluciones altamente concentradas.

Las disoluciones inyectables estériles se pueden preparar incorporando el sobrenadante o factores solubles en la cantidad requerida en un disolvente apropiado con uno o una combinación de ingredientes enumerados anteriormente, según se requiera, seguido de esterilización por filtración.

Generalmente, las dispersiones se preparan incorporando el sobrenadante o factores solubles a un vehículo estéril que contiene un medio de dispersión básico y los otros ingredientes requeridos de aquellos enumerados anteriormente. En el caso de los polvos estériles para la preparación de disoluciones inyectables estériles, los procedimientos de preparación ejemplares son secado a vacío y liofilización, que procuran un polvo del ingrediente activo más cualquier ingrediente adicional deseado de una disolución previamente esterilizada por filtración. De acuerdo con un aspecto alternativo de la descripción, el sobrenadante o factores solubles pueden formularse con uno o más compuestos adicionales que potencien su solubilidad.

Otros vehículos o excipientes ejemplares se describen, por ejemplo, en Hardman, et al. (2001) Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, McGraw-Hill, Nueva York, N. Y.; Gennaro (2000) Remington: The Science and Practice of Pharmacy, Lippincott, Williams, y Wilkins, Nueva York, N. Y.; Avis, et al. (editores) (1993) Pharmaceutical Dosage Forms: Parenteral Medications, Marcel Dekker, NY; Lieberman, et al. (editores) (1990) Pharmaceutical Dosage Forms: Tablets, Marcel Dekker, NY; Lieberman, et al. (editores) (1990) Pharmaceutical Dosage Forms: Disperse Systems, Marcel Dekker, NY;Weiner y Kotkoskie (2000) Excipient Toxicity and Safety, Marcel Dekker, Inc., Nueva York, N. Y.

Las composiciones terapéuticas deberían ser típicamente estériles y estables en las condiciones de fabricación y almacenamiento. La composición puede formularse en forma de disolución, microemulsión, liposoma u otra estructura ordenada. El vehículo puede ser un disolvente o medio de dispersión que contiene, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido y similares), y mezclas adecuadas de los mismos. La fluidez adecuada se puede mantener, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersiones y mediante el uso de tensioactivos. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes tales como manitol, sorbitol o cloruro sódico en la composición. La absorción prolongada de las composiciones inyectables se puede lograr incluyendo en la composición un agente que retrase la absorción, por ejemplo, sales de monoestearato y gelatina. Además, los factores solubles pueden administrarse en una formulación de liberación retardada, por ejemplo en una composición que incluye un polímero de liberación lenta. Los compuestos activos pueden prepararse con vehículos que protegerán al compuesto frente a una liberación rápida, tal como una formulación de liberación controlada, incluyendo implantes y sistemas de suministro microencapsulados. Pueden usarse polímeros biodegradables biocompatibles, tales como acetato de etilenvinilo, polianhídridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres, ácido poliláctico y copolímeros poliláctico-poliglicólicos (PLG). Muchos procedimientos para la preparación de tales formulaciones están patentados o son generalmente conocidos para los expertos en la materia.

El sobrenadante o factores solubles se pueden administrar en combinación con una matriz apropiada, por ejemplo, para proporcionar liberación lenta de los factores solubles.

Componentes adicionales de las composiciones

El sobrenadante o factores solubles derivados de células STRO-1$^+$, las células STRO-1$^+$ o su progenie se pueden administrar con otros fármacos o moléculas biológicas beneficiosos (factores de crecimiento, factores tróficos). Cuando se administran con otros agentes, pueden administrarse conjuntamente en una sola composición farmacéutica, o en composiciones farmacéuticas separadas, simultánea o secuencialmente con los otros agentes (antes o después de la administración de los otros agentes). Los factores bioactivos que pueden coadministrarse incluyen agentes antiapoptóticos (p. ej., EPO, mimeticuerpos de EPO, TPO, FCI-I y FCI-II, FCH, inhibidores de caspasa); agentes antiinflamatorios (p. ej., inhibidores de p38 MAPK, inhibidores de TGF-beta, estatinas, inhibidores de IL-6 e IL-1, PEMIROLAST, TRANILAST, REMICADE, SIROLIMÚS y AINE (fármacos antiinflamatorios no esteroideos; p. ej., TEPOXALINA, TOLMETINA, SUPROFENO); agentes inmunosupresores/inmunomoduladores (p. ej., inhibidores de calcineurina tales como ciclosporina, tacrolimús; inhibidores de mTOR (p. ej., SIROLIMÚS, EVEROLIMÚS); antiproliferativos (p. ej., azatioprina, micofenolato de mofetilo); corticosteroides (p. ej., prednisolona, hidrocortisona); anticuerpos tales como anticuerpos monoclonales anti-receptor IL-2Ralfa (p. ej., basiliximab, daclizumab), anticuerpos policlonales anti-linfocitos T (p. ej., anti-globulina de timocito (ATG); anti-globulina de linfocito (ALG); anticuerpo monoclonal anti-linfocitos T OKT3)); agentes antitrombogénicos (p. ej., heparina, derivados de heparina, urocinasa,

PPack (dextrofenilalanina prolina arginina clorometilcetona), compuestos antitrombina, antagonistas de receptor de plaquetas, anticuerpos anti-trombina, anticuerpos anti-receptor de plaquetas, aspirina, dipiridamol, protamina, hirudina, inhibidores de prostaglandina e inhibidores de plaquetas); y antioxidantes (p. ej., probucol, vitamina A, ácido ascórbico, tocoferol, coenzima Q-10, glutatión, L-cisteína, N-acetilcisteína) así como anestésicos locales.

En un ejemplo, una composición como se describe en el presente documento de acuerdo con cualquier ejemplo comprende un factor adicional para mejorar la función cerebral y/o regenerar las neuronas cerebrales y/o tratar un trastorno de movimiento, p. ej., un factor de crecimiento nervioso.

Como alternativa, o de manera adicional, las células, factores secretados y/o una composición como se describe en el presente documento según cualquier ejemplo se combina con un tratamiento conocido para efectos de accidente cerebrovascular, p. ej., fisioterapia y/o logopedia.

En un ejemplo, una composición farmacéutica como se describe en el presente documento según cualquier ejemplo comprende un compuesto utilizado para tratar los efectos de un accidente cerebrovascular. De manera alternativa, un procedimiento de tratamiento/profilaxis como se describe en el presente documento según cualquier ejemplo de la descripción comprende adicionalmente administrar un compuesto utilizado para tratar los efectos de un accidente cerebrovascular. Los compuestos ejemplares se describen en el presente documento y se entiende que aplican *mutatis mutandis* a estos ejemplos de la presente descripción.

En otro ejemplo, una composición como se describe en el presente documento según cualquier ejemplo comprende adicionalmente un factor que induce o potencia la diferenciación de una célula progenitora en una célula vascular. Los factores ejemplares incluyen factor de crecimiento endotelial vascular (FCEV), factor de crecimiento derivado de plaquetas (FCDP; p. ej., FCDP-BB), y FCF.

En otro ejemplo, una composición como se describe en el presente documento según cualquier ejemplo comprende adicionalmente una célula comprometida específica de tejido (TSCC). A este respecto, la solicitud internacional de patente N.º PCT/AU2005/001445 demuestra que la administración de una TSCC y una célula STRO-1$^+$ puede producir la proliferación potenciada de la TSCC. En un ejemplo, la TSCC es una célula vascular. La administración de dicha composición a un sujeto puede dar pie a una mayor producción de vasculatura, p. ej., dando pie a una mayor administración de nutrientes al tejido afectado.

Dispositivos médicos

La presente descripción también proporciona dispositivos médicos para uso o cuando se usan en un procedimiento como se describe en el presente documento según cualquier ejemplo. Por ejemplo, la presente descripción proporciona una jeringa o catéter u otro dispositivo de administración adecuado que comprende células STRO-1$^+$ y/o células de su progenie y/o factores solubles de las mismas y/o una composición como se describe en el presente documento según cualquier ejemplo. De manera opcional, la jeringa o catéter está empaquetado con instrucciones para uso en un procedimiento como se describe en el presente documento según cualquier ejemplo.

En otro ejemplo, la presente descripción proporciona un implante que comprende células STRO-1$^+$ y/o células de su progenie y/o factores solubles de las mismas y/o una composición como se describe en el presente documento según cualquier ejemplo. De manera opcional, el implante está empaquetado con instrucciones para uso en un procedimiento como se describe en el presente documento según cualquier ejemplo. Los implantes adecuados se pueden formar con un andamio, p. ej., como se describe en el presente documento y células STRO-1$^+$ y/o células de su progenie y/o factores solubles obtenidos de las mismas.

Modos de administración

El sobrenadante o factores solubles derivados de células STRO-1$^+$, las células STRO-1$^+$ o su progenie se pueden implantar por vía quirúrgica, inyectar, administrar (p. ej., mediante catéter o jeringa), o administrarse de otro modo directa o indirectamente al sitio que necesite reparación o aumento, p. ej., en una almohadilla grasa.

En un ejemplo, el sobrenadante o factores solubles derivados de células STRO-1$^+$, las células STRO-1$^+$ o su progenie se administra/administran en el flujo sanguíneo de un sujeto. Por ejemplo, el sobrenadante o factores solubles derivados de células STRO-1$^+$, las células STRO-1$^+$ o su progenie se administran por vía parenteral. Entre las vías de administración parenteral ejemplares se incluyen, sin carácter restrictivo, las vías intraperitoneal, intraventricular, intracerebroventricular, intratecal, o intravenosa. En un ejemplo, el sobrenadante o factores solubles derivados de células STRO-1$^+$, las células STRO-1$^+$ o su progenie se administran por vía intraarterial, dentro de la aorta, en un atrio

o ventrículo del corazón o dentro de un vaso sanguíneo, p. ej., por vía intravenosa.

En el caso de administración de células en un atrio o ventrículo del corazón, las células pueden administrarse en el atrio o ventrículo izquierdo para evitar complicaciones que puedan surgir de la rápida administración de células a los pulmones.

En un ejemplo, la población y/o la progenie y/o los factores solubles se administran en la arteria carótida.

En un ejemplo, la población y/o la progenie y/o los factores solubles se administran en el cerebro de un sujeto, p. ej., por vía intracraneal. Por ejemplo, la población y/o células y/o factores solubles se administran en el telencéfalo y/u opcionalmente en el cuerpo estriado

En un ejemplo, la población y/o células y/o factores solubles se administran en el sitio de la isquemia y/o en la periferia del sitio de la isquemia. Dichos sitios pueden determinarse utilizando procedimientos conocidos en la técnica, p. ej., imagen por resonancia magnética y/o tomografía computarizada y/o ultrasonido.

La elección de un régimen de administración para una formulación terapéutica depende de distintos factores, incluyendo la velocidad de recambio sérico o tisular de la entidad clínica, el nivel de los síntomas, y la inmunogenicidad de la entidad clínica.

En un ejemplo, el sobrenadante o factores solubles derivados de células STRO-1$^+$, las células STRO-1$^+$ o su progenie se administran en una dosis de bolo única. Como alternativa, el sobrenadante o factores solubles derivados de células STRO-1$^+$, las células STRO-1$^+$ o su progenie se administran mediante infusión continua, o mediante dosis a intervalos de, p. ej., un día, una semana, o 1-7 veces por semana. Un protocolo de dosis ejemplar es el que incluye la dosis máxima o frecuencia de dosis que evita efectos secundarios no deseados significativos. Una dosis semanal total depende del tipo y actividad de los factores/células que se están utilizando. La dosis apropiada es determinada por un médico clínico, p. ej., utilizando los parámetros o factores que se sabe o se supone según la técnica que afectan el tratamiento o que se predice afectan dicho tratamiento. Como regla general, la dosis comienza con una cantidad un tanto inferior a la dosis óptima y se aumenta lentamente a partir de entonces hasta que se consigue el efecto deseado u óptimo en cuanto a cualquier efecto secundario negativo.

La presente descripción incluye los siguientes ejemplos no restrictivos.

Ejemplos

Ejemplo 1: Inmunoselección de MPC mediante selección de células STRO-3$^+$

Se recolecta médula ósea (MO) de voluntarios adultos sanos normales (20-35 años de edad). En resumen, se aspiran 40 ml de MO de la cresta ilíaca posterior en tubos que contienen anticoagulante de litio-heparina.

Se preparan BMMNC mediante separación por gradiente de densidad usando Lymphoprep™ (Nycomed Pharma, Oslo, Noruega) como se describió anteriormente (Zannettino, A.C. et al. (1998) Blood 92: 2613-2628). Después de centrifugación a 400 x g durante 30 minutos a 4 °C, se retira la capa leucocítica con una pipeta de transferencia y se lavan tres veces con «HHF» compuesto por solución salina equilibrada de Hank (HBSS; Life Technologies, Gaithersburg, MD), que contiene suero fetal de ternero al 5 % (FCS, CSL Limited, Victoria, Australia).

A continuación, las células STRO-3$^+$ (o TNAP$^+$) se aislaron por clasificación celular activada magnéticamente como se describió anteriormente (Gronthos et al. (2003) Journal of Cell Science 116: 1827-1835; Gronthos, S. y Simmons, P.J. (1995) Blood 85: 929-940). En resumen, se incuban aproximadamente 1-3 x 10^8 BMMNC en tampón de bloqueo, consistente en suero de conejo normal al 10 % (v/v) en HHF durante 20 minutos sobre hielo. Se incuban las células con 200 µl de una disolución de 10 µg/ml de AcM STRO-3 en tampón de bloqueo durante 1 hora sobre hielo. Se lavan posteriormente las células dos veces con HHF por centrifugación a 400 x g. Se añade una dilución de 1/50 de γ-biotina de cabra anti-ratón (Southern Biotechnology Associates, Birmingham, RU) en tampón HHF y se incuban las células durante 1 hora sobre hielo. Se lavan las células dos veces con tampón de MACS (PBS exento de Ca^{2+} y Mn^{2+} suplementado con BSA al 1 %, EDTA 5 mM y azida de sodio al 0,01 %) como se indicó anteriormente y se vuelven a colocar en suspensión en un volumen final de 0,9 ml de tampón de MACS.

Se añaden 100 µl de microperlas de estreptavidina (Miltenyi Biotec; Bergisch Gladbach, Alemania) a la suspensión celular y se incuban sobre hielo durante 15 minutos. La suspensión celular se lava dos veces y se vuelve a colocar en suspensión en 0,5 ml de tampón de MACS y, a continuación, se carga en una mini-columna de MACS (Columnas MS,

Miltenyi Biotec), y se lava tres veces con 0,5 ml de tampón de MACS para recuperar las células que no se unieron al AmC STRO-3 (depositadas el 19 de diciembre de 2005 en la Recolección Estadounidense de Cultivos Tipo (ATCC, por su sigla en inglés) con número de acceso al depósito PTA-7282 - véase la publicación internacional N.º WO 2006/108229). Después de la adición de 1 ml adicional de tampón de MACS, se retira la columna del imán y se aíslan las células TNAP$^+$ por presión positiva. Puede teñirse una alícuota de células de cada fracción con estreptavidina-FITC y valorarse la pureza por citometría de flujo.

Ejemplo 2: Las células seleccionadas mediante AcM STRO-3 son células STRO-1^{bright}

Se diseñaron experimentos para confirmar el potencial de uso del AcM STRO-3 como reactivo único para el aislamiento de células STRO-1^{bright}.

Dado que el de STRO-3 (IgG1) es un isotipo diferente al de STRO-1 (IgM), se valoró la capacidad de STRO-3 de identificar UFC-F clonogénicas mediante análisis FACS de dos colores basado en su coexpresión con células STRO-1$^+$ aisladas usando el procedimiento de MACS (Figura 1). El histograma de gráfico de puntos representa 5 x 10^4 eventos recogidos como datos a modo de lista. Se configuraron las líneas vertical y horizontal a niveles de reactividad de <1,0 % de fluorescencia media obtenidos con los anticuerpos de control de isotipo coincidente, 1B5 (IgG) y 1A6.12 (IgM) tratados en las mismas condiciones. Los resultados demuestran que una población minoritaria de células STRO-1^{bright} coexpresaron TNAP (cuadrante superior derecho), mientras que el resto de células STRO-1$^+$ no consiguieron reaccionar con el AcM STRO-3. La incidencia de UFC-F se ensayó posteriormente en las células aisladas por FACS de los cuatro cuadrantes (Tabla 1).

Tabla 1: Enriquecimiento de células de médula ósea humana por análisis FACS de color doble basado en la coexpresión de los marcadores de superficie celular STRO-1 y TNAP (véase la Figura 1). Se cultivaron células clasificadas por FACS en condiciones clonogénicas estándar en alfa-MEM suplementado con FCS al 20 %. Los datos representan el número medio de células formadoras de colonias (UFC-F) por 10^5 células sembradas ± EE (n= 3 aspirados de médula ósea diferentes) el día 14. Estos datos sugieren que las MPC humanas están exclusivamente restringidas a la fracción positiva de TNAP de MO que coexpresa el antígeno de STRO-1 fuertemente.

Fracción de médula ósea	Frecuencia de UFC-F/10^5 células	Enriquecimiento (aumento en veces)
BMMNC no fraccionadas	11,0 ± 2,2	1,0
TNAP$^+$/STRO-1^{bright}	4.511 ± 185	410
TNAP$^+$/STRO-1^{dull}	0,0	0,0

Ejemplo 3: Expresión génica y de proteína superficial relativa de células STRO-1^{dull} y STRO-1^{bri}

En la primera serie de experimentos, se empleó análisis RT-PCR semicuantitativo para examinar el perfil de expresión génica de diversos genes asociados con linaje expresado por poblaciones de STRO-1^{dull} o STRO-1^{bri}, aisladas por clasificación celular activada por fluorescencia (Figura 2A). En la segunda serie de experimentos, se empleó citometría de flujo y análisis de los canales medios de fluorescencia para examinar el perfil de expresión de proteína superficial de diversas proteínas asociadas con linaje expresado por poblaciones de STRO-1^{dull} o STRO-1^{bri}, aisladas por clasificación celular activada por fluorescencia.

Se preparó ARN celular total a partir de o bien 2 x 10^6células primarias clasificadas STRO-1^{bri} o STRO-1^{dull}, sedimentos de condrocitos y otros cultivos inducidos y se lisó utilizando el procedimiento de extracción RNAzolB (Biotecx Lab. Inc., Houston, TX) de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. Se usó entonces ARN aislado de cada subpoblación como plantilla para la síntesis de ADNc, preparado usando un kit de síntesis de ADNc de primera hebra (Pharmacia Biotech, Upsala, Suecia). Se evaluó la expresión de diversas transcripciones mediante amplificación por PCR, utilizando un protocolo estándar tal como se describió anteriormente (Gronthos et al., J. Bone and Min. Res. 14:48-57, 1999). Los conjuntos de cebadores utilizados en el presente estudio se muestran en la Tabla 2. Después de la amplificación, se analizó cada mezcla de reacción por electroforesis en gel de agarosa al 1,5 % y se visualizó por tinción con bromuro de etidio. Se valoró la integridad del ARN mediante la expresión de GAPDH.

Se evaluó la expresión génica relativa para cada marcador celular con referencia a la expresión del gen constitutivo, GAPDH, utilizando el software ImageQant (Figura 2B, C). Además, se utilizó análisis de citometría de flujo de color doble para examinar el perfil de expresión de proteínas de MPC expandidas *ex vivo* basándose en su expresión de una gama más amplia de marcadores asociados con linaje celular en combinación con el anticuerpo STRO-1. En la Tabla 3 se presenta un resumen del fenotipo general basado en la expresión génica y de proteínas de células

cultivadas STRO-1^{dull} y STRO-1^{bri}. Los datos indican que las MPC STRO-1^{bri} expandidas *ex vivo* presentan una expresión diferencialmente mayor de marcadores asociados con células perivasculares, incluidos angiopoyetina-1, VCAM-1, SDF-1, IL-1$_{\beta}$, TNFα y RANKL. Las comparaciones entre los perfiles de expresión génica y de proteínas de las células cultivadas STRO-1^{dull} y STRO-1^{bri} se resumen en las Tablas 3 y 4.

También se llevaron a cabo estudios de hibridación sustractiva para identificar genes únicamente expresados por células STRO-1^{bri}. En resumen, las células STRO-1^{dull} y STRO-1^{bri} se aislaron como se describió anteriormente (véase la Figura 3A). Se preparó ARN total a partir de células STRO-1^{dull} y STRO-1^{bri} agrupadas de 5 muestras de médula diferentes utilizando el sistema ARN STAT-60 (TEL-TEST). Se llevó a cabo síntesis de primera hebra utilizando el kit de síntesis de ADNc SMART (Clontech Laboratories). El híbrido de ARNm/ADNc monocatenario resultante se amplificó mediante PCR de larga distancia (kit de PCR Advantage 2; Clontech) utilizando sitios de cebador específicos en los extremos de cebador 3' y 5' formados durante el proceso de RT inicial según las especificaciones del fabricante. Después de la digestión RsaI del ADNc de STRO-1^{bright}, se utilizaron 2 alícuotas para enlazar distintos oligonucleótidos adaptadores específicos utilizando el kit de sustracción de ADNc con selección por PCR de Clontech. Se llevaron a cabo dos rondas de hibridación sustractiva utilizando ADNc de STRO-1^{bri} (de prueba) y STRO-1^{dull} (propulsor) y viceversa, según el protocolo del fabricante. Este procedimiento también se llevó a cabo a la inversa utilizando ADNc de STRO-1^{dull} de prueba hibridado contra ADNc de STRO-1^{bri} propulsor.

Para identificar los genes únicamente expresados por la población de STRO-1^{bri}, se utilizó ADNc sustraído de STRO-1^{bri} para construir filtros de micromatriz de baja densidad replicados que comprendían 200 clones bacterianos seleccionados de forma aleatoria transformados con los ADNc sustraídos de STRO-1^{bri} enlazados a un vector de clonación T/A. A continuación se sondearon las micromatrices con o bien STRO-1^{bri} marcadas con [^{32}P] dCTP o ADNc sustraído de STRO-1^{dull} (Figura 3B-C). Con el cribado diferencial se identificaron un total de 44 clones, muy diferencialmente expresados entre las subpoblaciones de STRO-1^{dull} y STRO-1^{bright}. La secuenciación de ADN de todos los clones expresados diferencialmente mostró que solo 1 clon era representativo de un mitógeno de célula estromal conocido; a saber, factor de crecimiento derivado de plaquetas (FCDP) (Gronthos y Simmons, Blood. 85: 929-940, 1995). Curiosamente se descubrió que 6 de los 44 clones contenían insertos de ADN correspondientes a quimiocina, factor derivado de células estromales 1 (SDF-1). La alta abundancia de transcripciones de SDF-1 en células STRO-1^{bright} humanas fue confirmada por RT-PCR semicuantitativa de ARN total preparado a partir de subpoblaciones de médula ósea de STRO-1^{bright}, STRO-1^{dull}, y STRO-1^{negative} (Figura 3D y Tabla 3).

Tabla 2 Cebadores de RT-PCR y condiciones para la amplificación específica de ARNm humano

Gen diana	**Secuencias de cebadores sentido/antisentido (5'-3')**	**Tamaño de producto**
GAPDH	CACTGACACGTTGGCAGTGG (SEQ ID NO: 1) CATGGAGAAGGCTGGGGCTC (SEQ ID NO: 2)	417
SDF-1	GAGACCCGCGCTCGTCCGCC (SEQ ID NO: 3) GCTGGACTCCTACTGTAAGGG (SEQ ID NO: 4)	364
IL-1β	AGGAAGATGCTGGTTCCCTCTC (SEQ ID NO: 5) CAGTTCAGTGATCGTACAGGTGC (SEQ ID NO: 6)	151
FLT-1	TCACTATGGAAGATCTGATTTCTTACAGT (SEQ ID NO: 7) GGTATAAATACACATGTGCTTCTAG (SEQ ID NO: 8)	380
TNF-α	TCAGATCATCTTCTCGAACC (SEQ ID NO: 9) CAGATAGATGGGCTCATACC (SEQ ID NO: 10)	361
KDR	TATAGATGGTGTAACCCGGA (SEQ ID NO: 11) TTTGTCACTGAGACAGCTTGG (SEQ ID NO: 12)	450
RANKL	AACAGGCCTTTCAAGGAGCTG (SEQ ID NO: 13) TAAGGAGGGGTTGGAGACCTCG (SEQ ID NO: 14)	538
Leptina	ATGCATTGGGAACCCTGTGC (SEQ ID NO: 15) GCACCCAGGGCTGAGGTCCA (SEQ ID NO: 16)	492
CBFA-1	GTGGACGAGGCAAGAGTTTCA (SEQ ID NO: 17) TGGCAGGTAGGTGTGGTAGTG (SEQ ID NO: 18)	632
PPARγ2	AACTGCGGGGAAACTTGGGAGATTCTCC (SEQ ID NO: 18) AATAATAAGGTGGAGATGCAGGCTCC (SEQ ID NO: 19)	341

OCN	ATGAGAGCCCTCACACTCCTC (SEQ ID NO: 20) CGTAGAAGCGCCGATAGGC (SEQ ID NO: 21)	289
MyoD	AAGCGCCATCTCTTGAGGTA (SEQ ID NO: 22) GCGAGAAACGTGAACCTAGC (SEQ ID NO: 23)	270
SMMHC	CTGGGCAACGTAGTAAAACC (SEQ ID NO: 24) TATAGCTCATTGCAGCCTCG (SEQ ID NO: 25)	150
GFAP	CTGTTGCCAGAGATGGAGGTT (SEQ ID NO: 26) TCATCGCTCAGGAGGTCCTT (SEQ ID NO: 27)	370
Nestina	GGCAGCGTTGGAACAGAGGTTGGA (SEQ ID NO: 28) CTCTAAACTGGAGTGGTCAGGGCT (SEQ ID NO: 29)	460
SOX9	CTCTGCCTGTTTGGACTTTGT (SEQ ID NO: 30) CCTTTGCTTGCCTTTTACCTC (SEQ ID NO: 31)	598
Colágeno tipo X	AGCCAGGGTTGCCAGGACCA (SEQ ID NO: 32) TTTTCCCACTCCAGGAGGGC (SEQ ID NO: 33)	387
Agrecano	CACTGTTACCGCCACTTCCC (SEQ ID NO: 34) ACCAGCGGAAGTCCCCTTCG (SEQ ID NO: 35)	184

Tabla 3. Resumen de la expresión génica relativa en poblaciones de STRO-1^{Bri} y STRO-1^{Dull}. Se presenta una lista de genes que mostraron expresión cuantificable y diferencial entre las poblaciones de STRO-1^{Bri} y STRO-1^{Dull} según lo determinado mediante PCR de transcripción inversa. Los valores representan la expresión génica relativa con referencia al gen constitutivo, GAPDH.

		Expresión génica relativa a GAPDH	
Tejido	**Marcador**	**STRO-1^{Bri}**	**STRO-1^{Dull}**
Células gliales (dentro de tejido neural)	*GFAP (proteína ácida fibrilar glial)*	0,1	0,7
Hueso	*OCN (osteocalcina)*	1,1	2,5
	OSX (Osterix)	0,4	1,3
	CBFA-1 (proteína de unión al factor central-1)	0,3	0,6
Inmunoregulador	*RANKL (activador del receptor del factor nuclear κ B)*	1,6	0,3
Neuroprotector/neuro-quimioatrayente	*SDF-1-alfa (factor-1-alfa derivado estromal)*	3,2	0,1
Grasa	*Leptina*	3,1	4,2
Cardiomiocitos	*GATA-4*	1,1	2,9
Células endoteliales	*Ang-1 (angiopoyetina-1)*	1,5	0,8
Condrocitos	*Sox 9*	0,3	1,1
	COL X (Colágeno X)	3,5	2,8
Citocinas proinflamatorias	*TNF-alfa (necrosis tumoral alfa)*	1,7	0,9

Se prepararon suspensiones de células únicas de células expandidas *ex vivo* derivadas de MPC de médula ósea mediante desprendimiento de tripsina/EDTA y posteriormente se incubaron con el anticuerpo STRO-1 en combinación con anticuerpos que identifican una amplia gama de marcadores asociados con linaje celular para correlacionar expresión superficial de proteína con densidad de expresión de STRO-1. Se identificó STRO-1 utilizando IgM anti-murina de cabra-isotiocianato de fluoresceína, mientras que se identificaron todos los otros marcadores utilizando IgG antirratón o anticonejo de cabra-ficoeritrina. Para aquellos anticuerpos que identifican antígenos intracelulares, las preparaciones de células primero se marcaron con el anticuerpo STRO-1, se fijaron con etanol al 70 % frío para permeabilizar la membrana celular y después se incubaron con anticuerpos específicos del antígeno intracelulares. Se utilizaron anticuerpos de control de isotipo coincidente en condiciones idénticas. Se realizó análisis de citometría de flujo de color doble utilizando un citómetro de flujo COULTER EPICS y se recogieron los datos a modo de lista. Los gráficos de puntos representan 5.000 eventos en modo de lista que indican el nivel de intensidad de fluorescencia para cada marcador de células de linaje (eje y) y STRO-1 (eje x). Los cuadrantes vertical y horizontal se establecieron con referencia a los anticuerpos de control negativo de isotipo coincidente.

Tabla 4 Resumen de la expresión de la proteína relativa en poblaciones de STRO-1^{Bri} y STRO-1^{Dull}. Se presenta una lista de proteínas que mostraron expresión diferencial entre las poblaciones de STRO-1^{Bri} y STRO-1^{Dull} según lo

determinado mediante citometría de flujo. Los valores representan la intensidad de fluorescencia media relativa de la tinción.

		Intensidad de fluorescencia media	
Tejido	**Marcador**	**STRO-1^{Bri}**	**STRO-1^{Dull}**
Neuronas	*Neurofilamento*	1,7	20,5
Hueso	*ALK PHOS (fosfatasa alcalina)*	5,7	44,5
Inmunoregulador	*RANKL (activador del receptor del factor nuclear κ B)*	658,5	31,0
Células epiteliales	*Citoqueratina 10+13*	1,2	23,3
	Citoqueratina 14	1,8	8,8
Músculo liso	*α-SMA (alfa actina de músculo liso*)	318,0	286,0
Condrocitos	*Biglicano*	84,4	65,9
Fibroblasto basal	*Tenascina C*	22,2	6,9
Cardiomiocito	*Troponina C*	2,5	15,0

Ejemplo 4: Las células madre de pulpa dental humana (CMPDh) se diferencian en neuronas

Aislar CMPD y fibroblastos de prepucio humano

CMPD y dientes temporales exfoliados (SHED, por su sigla en inglés) humanos se aislaron esencialmente como lo describieron Gronthos et al., Proc Natl Acad Sci EE. UU. 97:13625-13630, 2000. En resumen, se recogieron terceros molares impactados humanos normales descartados de adultos (19-35 años de edad) o dientes exfoliados (7-8 años de edad) con consentimiento informado de los pacientes sometidos a extracciones de rutina en la clínica dental de la Universidad de Adelaida, según pautas aprobadas estipuladas por la Universidad de Adelaida y los comités de investigación de sujetos humanos del Institute of Medical and Veterinary Science (H-73-2003). Se limpiaron las superficies de los dientes y los dientes se partieron utilizando un tornillo de banco para dejar a la vista la cavidad pulpar. El tejido pulpar se separó cuidadosamente de la corona y la raíz y, a continuación, se digirió en una disolución de 3 mg/ml de colagenasa tipo I y 4 mg/ml de dispasa durante 1 hora a 37°C. Se obtuvieron suspensiones de células únicas pasando las células por un filtro de 70-μM. Los cultivos se formaron sembrando suspensiones de células únicas ($1\text{-}2 \times 10^5$) de pulpa dental en matraces T-25 en medio de crecimiento, (una modificación del medio de Eagle suplementado con suero fetal de ternero al 20 %, 100 μM de ácido 1-ascórbico 2-fosfato, 2 mM de 1-glutamina, 100 U/ml de penicilina, y 100 μg/ml de estreptomicina), y luego se incubaron a 37°C en CO2 al 5 %.

Los fibroblastos de prepucio humano (FPH) se aislaron mediante digestión de colagenasa/dispasa a partir de explantes de biopsias de prepucio de donantes neonatos varones, con consentimiento informado de los padres.

Ensayo de inducción neural

Los matraces o pocillos de cultivo tisular se revistieron con poliornitina (concentración final: 10 μg/ml) durante la noche a temperatura ambiente. Los matraces y pocillos se lavaron dos veces con agua y a continuación se revistieron con laminina (concentración final 5 μg/ml) durante la noche a 37 °C en una incubadora húmeda. Los matraces y pocillos se lavaron con tampón fosfato salino (PBS), y a continuación con medio de crecimiento antes de añadir las células. Las células se descongelaron y se cultivaron en matraces T25 revestidos hasta alcanzar 80 % de confluencia. Las células se volvieron a sembrar a una densidad de 1,5 × 105/pocillo en 2 ml/pocillo de medio de crecimiento, durante 3 días en placas revestidas de 6 pocillos, o 2 × 103 células en portaobjetos de cámara revestidos de 8 pocillos. A continuación las células se cultivaron en o bien medio A o medio B durante 3 semanas. El medio A consiste en medio Neurobasal A (10888-022; Invitrogen, Carlsbad, CA, EE. UU.), 100 U/ml de penicilina, 1× B27 de suplemento, 100 μg/ml de estreptomicina, 20 ng/ml de factor de crecimiento epidérmico (FCE, 100-15; PeproTech, Rocky Hill, NJ, EE. UU.), y 40 ng/ml de factor de crecimiento de fibroblastos básico (FCF, N.º 104FGFB01; Prospec Tany Techno Gene, Rehovot, Israel). El medio B comprende tres condiciones de medio separadas para el período de 3 semanas: la primera incubación fue medio A durante 7 días, seguida de un cambio en el medio que consistía en una proporción de 50:50 de medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM, por su sigla en inglés, 12100-046; Invitrogen) y medio F12 (21700-075; Invitrogen), y suplemento de insulina-transferrina-sodio-selenita (ITTS, por su sigla en inglés, 11074547001; Roche Diagnostics, Basilea, Suiza), 100 U/ml de penicilina, 100 μg/ml de estreptomicina, y 40 ng/ml de FCF durante 7 días. Los 7 días finales de incubación consistieron en un medio que contenía una proporción 50:50 de DMEM y medio F12, ITTS, 100 U/ml de penicilina y 100 μg/ml de estreptomicina, 40 ng/ml de FCF, y 0,5 μM de ácido retinoico (RA, R2625; Sigma-Aldrich, St. Louis, EE. UU.). Las muestras de control se mantuvieron en medio de

crecimiento el tiempo que duró el ensayo de inducción neuronal. Los medios para todas las condiciones se reemplazaron dos veces a la semana.

Electrofisiología

Cuando se completó el ensayo de diferenciación neuronal de 3 semanas, las células se liberaron con tripsina y se volvieron a sembrar en cubreobjetos de vidrio tratados con ácido hidroclórico a una concentración de 2×10^4 células/500 µL en medio de diferenciación neuronal o medio de crecimiento y se incubaron durante 24 horas. Se practicó la técnica de fijación de membranas de célula entera a temperatura ambiente utilizando un amplificador de fijación de membranas basado en ordenador (EPC-9; HEKA Electronics, Lambrecht/Palatinado, Alemania) y el software PULSE (HEKA Electronics). La disolución de baño contenía (en mM): NaCl, 140; KCl, 4; CaCl2, 2; MgCl2, 2; glucosa, 10; y HEPES, 10; ajustados a pH 7,4 con NaOH. Para bloquear los canales de K^+ y las corrientes separadas de Na^+, el K-glutamato y KCl en la disolución interna se reemplazaron por cantidades equimolares de Cs-glutamato y CsCl. Las pipetas de fijación se fabricaron con vidrio borosilicatado y se pulieron con fuego; la resistencia de las pipetas oscilaba entre 2-4 MΩ. Todas las tensiones eléctricas mostradas se corrigieron para potencial de unión líquida (-14 mV y -18 mV para disoluciones internas basadas en K^+- y Cs^+-, correspondientemente), estimado mediante JPCalc (proporcionado por el Dr. P.H. Barry, Universidad de Nueva Gales del Sur, Sidney, Australia, 1994). El potencial de retención fue -90 mV a lo largo de toda la prueba.

Inyecciones aviares in ovo

Se colocaron huevos de gallina (Leghorn blancas; HICHICK Breeding Company, Bethal, Australia) en hueveras en sentido longitudinal y se incubaron en una incubadora humidificada a 37 °C durante aproximadamente 40 horas para alcanzar las etapas 10-12 antes de la inyección. Se inyectaron CMPD o FPH adultas humanas (5×10^3 células/µL) transducidas con proteína verde fluorescente (GFP, por su sigla en inglés) en el embrión aviar en desarrollo. Se añadió colorante verde rápido (2 µL) a las células para visualizarlas durante el procedimiento de la inyección. Se prepararon los embriones limpiando el huevo con etanol al 70 %, se extrajo albúmina del huevo utilizando una aguja, se hizo un recorte en la parte superior del huevo, y se visualizó el embrión inyectando tinta india (Winsor & Newton, Middlesex, Inglaterra) (1:10 preparada en disolución de Ringer [7,2 g $NaCl_2$, 0,17 g $CaCl_2$, 0,37 g KCl, 0,115 g Na_2HPO_4 en 1 L de ddH_2O, pH ajustado a 7,4, filtro esterilizado]) debajo del embrión. La disolución de Ringer se colocó encima del embrión para mantener la humedad. Se retiró la membrana vitelina de alrededor de la cabeza del embrión utilizando alambre de tungsteno. Las células se colocaron en una aguja capilar de vidrio (GC100TF-10; SDR Clinical Technology, Sidney, Australia), incorporada a un micromanipulador e inyector de presión (Narishage, Tokio) programado a 25 voltios. El micromanipulador se utilizó para guiar la aguja hacia dentro de la región directamente adyacente al rombómero 2 del rombencéfalo en desarrollo. Las células se inyectaron en el embrión utilizando una bomba de pie incorporada al inyector de presión. Se retiró la aguja de vidrio y se dejaron caer algunas gotas de disolución de Ringer sobre el embrión. El huevo se selló con cinta adhesiva y se volvió a colocar en la incubadora humidificada. Una vez finalizado el período de incubación, los embriones se extrajeron del huevo y se colocaron en PBS frío; las células inyectadas con GFP se visualizaron utilizando un microscopio de disección fluorescente. A continuación los embriones se diseccionaron; se les cortó la cabeza como un libro abierto, es decir, desde la nariz hacia el rombencéfalo y hacia abajo, a lo largo del lado ventral. Los embriones diseccionados se fijaron en PFA al 4 % durante o bien 2 horas a temperatura ambiente o durante la noche a 4 °C y, a continuación, se lavaron dos veces con PBS antes de la tinción inmunofluorescente.

Inmunocitoquímica de preparaciones de células cultivadas

Los portaobjetos de cámara se fijaron con PFA al 4 % durante 30 minutos a temperatura ambiente y, a continuación, se lavaron con PBS y Tween 20 al 0,1 % (Sigma-Aldrich) (PBS-T). Los cultivos se bloquearon (suero equino al 10 % en PBS-T) durante 30 minutos a temperatura ambiente y, a continuación, se incubaron con anticuerpo primario (1:100 Nestina (611658; BD Biosciences, San Diego, EE. UU.); 1:500 ácido polisiálico-molécula de adhesión neural (APS-NCAM) (donados por el Dr. T. Seki), 1:500 clon de β-tubulina de clase III, TUJ1 (MMS-435P, 1 mg/ml; Covance, Princeton, NJ, EE. UU.); 1:200 NF-M (13-0700, 0,5 mg/ml; Zymed, San Francisco del Sur, CA); 1:500 NF-H (AB1991; Chemicon, Temécula, CA, EE. UU.) en disolución de bloqueo durante la noche a 4 °C. Los controles de ratón, cabra y conejo (Ig) se trataron con las mismas condiciones. Después del lavado, los anticuerpos secundarios (1:200 Alexa 488 de cabra anti-ratón [A11029, 1,5 mg/ml; Jackson Immunoresearch Laboratories, West Grove, PA, EE. UU.]; 1:200 Alexa 488 de cabra anti-conejo [A11034, 2 mg/ml [Molecular Probes Inc., Eugene, OR, EE. UU.]) se añadieron en disolución de bloqueo durante 2 horas a temperatura ambiente en la oscuridad. Finalmente, los portaobjetos se lavaron y se taparon con cubreobjetos con medio de montaje Anti-fade ProLong Gold con diclorhidrato de 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI, P36931; Invitrogen).

Resultados

Como se muestra en la Figura 4, cuando se cultivan CMPDh en un medio de inducción neuronal se diferencian en células multi-proceso de tipo neuronales con la propiedad biofísica para producir una corriente de sodio. Asimismo, cuando se trasplantan CMPDh en el cerebro de un embrión de pollo se diferencian en células de tipo neuronales que expresan neurofilamento.

Ejemplo 4: El tratamiento con CMPDh mejora la función motora de las extremidades delanteras después después del accidente cerebrovascular en un modelo de roedor.

La eficacia terapéutica de las CMPDh se analizó en un modelo de rata de oclusión de arteria cerebral media (OACM) que da como resultado un accidente cerebrovascular isquémico. La OACM es la forma de presentación más común del accidente cerebrovascular isquémico en seres humanos y este modelo de roedor pre-clínico de OACM resume la condición humana. En este modelo, la OACM se produce insertando un filamento de nylon en la arteria carótida interna que se presiona hacia adelante para ocluir la arteria cerebral media, situada distal a la arteria carótida interna.

Procedimientos

Cultivo y preparación de CMPD humanas

Las CMPD humanas se aislaron de terceros molares impactados (que no consiguieron salir a su posición prevista) adultos mediante digestión de tejido pulpar y se transdujeron retroviralmente con el marcador de fluorescencia proteína verde fluorescente (GFP). En los pases 3-5 las CMPD se crioconservaron en sulfóxido de dimetilo al 10 % en suero fetal de ternero. Las células se descongelaron y se sometieron a pases al menos una vez antes de utilizarse para trasplante intracerebral. Las CMPD se cultivaron en medio de Eagle modificado (Sigma-Aldrich, St. Louis, http://www.sigmaaldrich.com) suplementado con suero fetal de ternero al 20 %, 100 ┐ M de ácido L-ascórbico 2-fosfato (Wako, Richmond, VA), 2 mM de L-glutamina, 100 U/ml de penicilina, y 100 µg/ml de estreptomicina a 37°C en CO_2 al 5 %. Las células se disociaron con tripsina y se volvieron a colocar en suspensión en medio de Eagle modificado sin suplementos con una concentración final de 1,5 x 10^5 células por microlitro. La viabilidad de las células se determinó mediante el procedimiento de exclusión del colorante azul de tripán.

Oclusión de arteria cerebral media y trasplante cerebral de roedor

Cincuenta y cuatro ratas Sprague-Dawley adultas macho con un peso de 300±20 g se mantuvieron en un ciclo de 12 horas de claridad/oscuridad con acceso a alimento y agua a voluntad.

Las ratas se anestesiaron con isoflurano y se sometieron a isquemia cerebral focal temporal mediante oclusión de arteria cerebral media OACM proximal intraluminal [esencialmente como se describe en Aspey et al., Neuropathol Appl Neurobiol., 26: 232-242, 2000 y Spratt et al., JNeurosci Methods, 155: 285-290, 2006]. La temperatura rectal se mantuvo a 37 ± 1°C mediante una almohadilla térmica, y se monitorizaron la saturación de oxígeno en sangre y el pulso y se mantuvieron dentro de parámetros fisiológicos con un pulsioxímetro (modelo 8500AV; Nonin Medical, Plymouth, MN). En resumen, la arteria carótida común derecha, la arteria carótida externa (ACE), la arteria carótida interna (ACI) y la arteria pterigomaxilar se expusieron mediante disección roma, seguida de cauterización y ligadura de la ACE. Un hilo de nylon monofilamento 4-0 (Dynek, Hendon, SA, Australia) con una punta revestida con silicona (diámetro 0,35 mm, longitud 5 mm) se hizo pasar desde el muñón de la ACE, a través de la ACI, y hasta el origen de la arteria cerebral media (ACM) derecha. El hilo se aseguró en su sitio y se cerró la incisión. Al cabo de 2 horas de la oclusión, las ratas se volvieron a anestesiar y el hilo se retiró para permitir la reperfusión. Se dejó que las ratas se recuperaran de la cirugía y se analizó la flexión de las extremidades delanteras contralaterales haciendo colgar al animal brevemente por la cola y se evaluó su comportamiento circular sobre el suelo para verificar OACM a las 2 horas. A las 24 horas de la OACM, los animales se seleccionaron de manera aleatoria para recibir tratamiento con CMPD humanas (n = 31) o vehículo (n = 23) (véase la Figura 5 que muestra la programación del tratamiento). Un volumen total de 4µl de suspensión de células (6x10^5 células) se inyectó (1 µL/minuto) en el parénquima ipsilateral en dos coordenadas esterotáxicas (anterior-posterior, media-lateral respecto del bregma; dorsal-ventral de la duramadre); 2 µl en el cuerpo estriado (-0,40, +4,00; -5,50 mm) y otros 2µl en la corteza (-0,40, +4,00; -1,75 mm) utilizando un marco estereotáxico (Kopf Instruments, Tujunga, CA). Los animales tratados con vehículo se trataron de manera similar, con administración de medio de Eagle α-modificado como vehículo. Todos los animales recibieron una inyección subcutánea diaria de 10 mg/kg de ciclosporina A.
(Novartis, Basilea, Suiza).

Tinción con cloruro de 2,3,5-Trifeniltetrazolio

Se llevó a cabo tinción con cloruro de 2,3,5-Trifeniltetrazolio (CTT) para confirmar la isquemia. Los cerebros recién extraídos se cortaron en lonchas de 2 mm y se incubaron en CTT al 2 % (Sigma-Aldrich) a 37°C durante 10 minutos en la oscuridad. Se obtuvieron imágenes a color de las lonchas de cerebro con un escáner plano LiDE210 (Canon, Tokio).

Evaluación funcional

Los animales fueron entrenados durante 3 días consecutivos antes de la OACM y la tercera sesión (día 1) se utilizó como la línea de referencia pre-operativa. La evaluación ciega de comportamiento se llevó a cabo durante el ciclo de claridad los días 1 (antes del trasplante de CMPD), 7, 14, 21 y 28 después de la OACM (tres intentos en cada prueba) (Figura 1C). Se excluyeron los animales que fracasaron en el entrenamiento neuroconductual pre-OACM (porque los animales no consiguieron las puntuación de línea de referencia en cada prueba) y que mostraron o bien pocos a ningún déficit funcional o déficits funcionales muy graves al menos 1 semana después de la OACM. Los experimentos se llevaron a cabo con asignación aleatoria de tratamiento y evaluación ciega de resultados, conforme a STAIR (mesa redonda de la industria académica de la terapia del accidente cerebrovascular) y pautas similares.

Neuropuntuación

Después de la OACM se evaluó la disfunción neurológica bruta para cada animal utilizando un sistema de puntuación modificado respecto de estudios previos [Barry et al., Brain Res, 1389: 143-151, 2011; Bederson Stroke, 17: 472-476, 1986; y Thal et al., J. Neurol. Sci, 286: 150-159, 2008]. Las puntuaciones más altas indican mayor deterioro neurológico.

Prueba de la retirada de la cinta adhesiva

Las etiquetas adhesivas (15 mm2) se aplicaron en la parte media de las patas delanteras de las ratas [Bouet et al., Nat Protoc 4: 1560-1564, 2009]. El orden de colocación de las etiquetas adhesivas sobre la pata delantera contralateral o ipsilateral fue aleatorio. Tras volver a la jaula de prueba, se registró el tiempo transcurrido intentando retirar la etiqueta adhesiva y el tiempo total empleado en retirar la etiqueta (máximo asignado de 2 minutos) de cada pata. El tiempo que tardaron en retirar (o intentar retirar) la etiqueta se expresó como un porcentaje del tiempo total empleado.

Prueba de los pasos

Se sujetó cada rata con firmeza utilizando una mano para levantar levemente el torso de la rata y las extremidades traseras y la otra mano para contener una de las patas delanteras como para cargar peso en la otra pata delantera que no estaba limitada [Schallert et al., Exp Neurol, 64: 33-43, 1979]. A continuación se movió la rata hacia un costado (30 cm) de modo que la pata delantera que cargaba el peso avanzara en dirección contraria para compensar el movimiento del cuerpo. El orden de la prueba de las patas delanteras fue aleatorio. Se registró la cantidad de pasos dados con cada extremidad delantera.

Rotarod

Las ratas se colocaron en un dispositivo rotarod compuesto por un conjunto de rotación motorizado de 18 rodillos de 1-mm [28]. Se hizo caminar a los animales sobre el aparato a medida que la velocidad de rotación aceleraba de 0 a 24 rpm en un período de 2 minutos. Se registró el tiempo en el cual los animales completaban la prueba, se caían del dispositivo o se cogían de los peldaños y giraban durante dos rotaciones consecutivas sin intentar caminar sobre los peldaños.

Caminata sobre viga de sección decreciente/con cornisa

Se hizo que los animales recorrieran una viga elevada de sección decreciente en sentido longitudinal hasta una caja oscurecida al final [Schallert T, Woodlee MT. Orienting and placing. En: Whishaw IQ, Kolb B, editores. The Behavior of the Laboratory Rat: A Handbook with Tests. Oxford, Reino Unido: Oxford University Press 2005;129 -140], y su rendimiento se grabó en vídeo. La cantidad de resbalones con cada extremidad trasera sobre una cornisa inferior (2 cm por debajo de la superficie de la viga superior) se calculó como un porcentaje del número total de pasos dados para recorrer la viga. La caminata por la viga no se pudo completar el día 1 después de la OACM debido al comportamiento circular de los animales con accidente cerebrovascular.

Inmunohistoquímica y formación de imágenes

A la finalización de la evaluación neuroconductual, las ratas fueron totalmente anestesiadas, se les inyectaron 1.000 U de heparina directamente en el corazón, y se les practicó una perfusión transcardíaca con solución salina helada seguida de paraformaldehído al 4 % (p/v) en tampón fosfato salino (PBS). Se les extrajeron los cerebros y se refijaron en el mismo adhesivo a 4 °C durante la noche. Para llevar a cabo la detección clorimétrica de CMPD humanas supervivientes, los cerebros se incrustaron en parafina y se cortaron en secciones coronales en serie de 5 µm. Las secciones se bloquearon con suero equino normal al 3 % en PBS y se lavaron dos veces en PBS antes de la incubación con mitocondrias de ratón anti-humana (1:1.500; Millipore, Billerica), seguida de IgG anti-ratón biotinilada (1:250; Vector Laboratories, Burlingame, CA) y de anticuerpo conjugado con estreptavidina peroxidasa de rábano picante (1:1.000; Thermo Scientific, Rockford, IL). Los anticuerpos se diluyeron en disolución de bloqueo. Se visualizaó la tinción del anticuerpo con 3,3-diaminobencidina (Sigma-Aldrich). Se adquirieron imágenes de campo brillante y se analizaron utilizando el sistema de escaneo NanoZoomer Digital Pathology System (Hamamatsu Photonics, Shizuoka, Japón). El número de células injertadas que permanecían en el cerebro del roedor (n = 3) a las 4 semanas después del trasplante se contabilizó cada dos secciones coronales de 5-µm, y se analizó la distribución de células injertadas.

Para los estudios de doble inmunofluorescencia, se bloquearon secciones de flotación libre de 100 µm con suero equino normal al 10 % en PBS con Triton X-100 al 0,3 %, antes de que las CMPD humanas se identificaran utilizando anti-GFP de cabra (1:250; Rockland, Gilbertsville, PA), neuronas maduras utilizando núcleos anti-neuronales de ratón (NeuN; 1:500; Millipore) o astrocitos utilizando proteína ácida fibrilar anti-glial de conejo (GFAP; 1:250; DAKO, Glostrup, Dinamarca). Otros anticuerpos primarios utilizados fueron anti-β-III-tubulina (1:500; Millipore), anti-nestina de ratón (1:100; Abcam, Cambridge, Reino Unido), molécula de adhesión neural anti ácido polisiálico de ratón (APS-NCAM; 1:200; Millipore) y anti-O4 de ratón (1: 500; Sigma-Aldrich). Los anticuerpos secundarios fueron o bien IgG anti-cabra conjugada con Cy2, IgG anti-conejo conjugada con Cy3 o IgG anti-ratón conjugada con Cy3 (1:300; Jackson Immunoresearch Laboratories, West Grove, PA). Los anticuerpos se diluyeron en disolución de bloqueo. Todas las secciones se montaron con reactivo Anti-fade ProLong Gold (Invitrogen, Carlsbad, CA). Para estimar el porcentaje de células GFP positiva que coexpresaban NeuN o GFAP, se tomaron imágenes para apilamiento de enfoque con un aumento de ┐ 40 en cinco campos, que consistían en dos regiones corticales y tres regiones de cuerpo estriado en el hemisferio ipsilateral al nivel del trasplante de CMPD (n=3 animales). Las imágenes confocales se adquirieron secuencialmente utilizando un microscopio confocal TCS SP5 y se procesaron con su software LAS AF (Leica Microsystems, Wetzlar). Se llevaron a cabo proyecciones ortogonales con ImageJ (NIH).

Medición de grosor del cuerpo calloso

Se tiñeron secciones de parafina, a nivel del bregma y ±0,1 mm del bregma con violeta de cresilo al 0,1 % (n = 6 tratadas con CMPD, n = 2 tratadas con vehículo). Las mediciones del grosor del cuerpo calloso se llevaron a cabo en la línea media (punto medio entre los dos hemisferios) y en el costado lateral de los ventrículos en ambos hemisferios del cerebro. Las mediciones se expresaron como un porcentaje de las mediciones de línea media correspondientes y se llevaron a cabo utilizando un software de formación de imágenes AxioVision (Carl Zeiss, Oberkochen, Alemania).

Análisis estadístico

El análisis se llevó a cabo utilizando GenStat (13ª edición; VSN International, Hemel Hempstead, Reino Unido). El efecto del tratamiento sobre las puntuaciones de pruebas conductuales se analizó utilizando análisis de varianza (ANOVA) con medidas repetidas, con una corrección de Greenhouse-Geisser para justificar la correlación entre las mediciones sucesivas de una rata individual, y con ajustes para datos pre-accidente cerebrovascular como covariables para permitir posibles diferencias en la capacidad inicial de las ratas. Se llevó a cabo una prueba de diferencia menos significativa protegida de Fisher post hoc (LSD) si el análisis ANOVA era significativo. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas si $p< 0,05$. Los datos se presentaron como gráficos de cajas utilizando R (versión 2.10.1; R Development Core Team, Viena, Austria) o como gráficos de barras utilizando Prism (versión 5.02, GraphPad Software, Inc., San Diego). Los valores informados son media ± EEM

Resultados

Recuperación sensorial y motora de las extremidades delanteras potenciada después del accidente cerebrovascular con CMPD humanas trasplantadas

Se investigó la capacidad del tratamiento con CMPD humanas después de isquemia cerebral focal para mejorar la función neuroconductual con el tiempo. No se observaron efectos perjudiciales después del tratamiento con CMPD en comparación con los controles en cuanto a las tasas de morbilidad o mortalidad. Las tasas de mortalidad obtenidas después del trasplante intracerebral fueron comparables (aproximadamente 9 %) en ambos grupos de tratamiento.

El modelo de roedor clínicamente pertinente de OACM unilateral produce daño isquémico sustancial en el cuerpo estriado dorsolateral y la corteza frontal/parietal suprayacente en el hemisferio ipsilateral del cerebro del roedor. Como resultado, los animales desarrollaron déficits neuroconductuales demostrados por un aumento en la neuropuntuación de 11,7 ± 0,4 puntos el día 1 después del accidente cerebrovascular (Figura 6A). Asimismo, se mostraron asimetrías motoras y somatosensoriales marcadas de las extremidades delanteras en la prueba de los pasos (Figura 6B; una disminución de 82,2 ± 6,6% en la cantidad de pasos dados por la extremidad delantera contralateral el día 1 después de la OACM) y en la prueba de la retirada de la cinta adhesiva (Figura 6C; una disminución de 93,7±2,8% en el tiempo para intentar retirar el estímulo externo de la pata delantera contralateral el día 1 después de la OACM).

Tras el accidente cerebrovascular experimental, también se observó pérdida de equilibrio motor y coordinación en la prueba del rotarod (Figura 6D; una disminución de 53,0 ± 2,0 % en el tiempo transcurrido en el rotarod el día 1 después de la OACM).

Los animales afectados por el accidente cerebrovascular mostraron una asimetría en las extremidades traseras (Figura 6E, un aumento de 21,7 ± 6,2 %) en los resbalones de extremidades traseras contralesionales durante la caminata sobre la viga 1 semana después de la OACM. Las extremidades ipsilaterales mostraron función neuroconductual normal después del accidente cerebrovascular.

Todos los animales mostraron una recuperación gradual en la función neuroconductual durante 4 semanas después del accidente cerebrovascular (Figura 6). Los animales tratados con CMPD demostraron una función neuroconductual global significativamente potenciada (Figura 6A; $p < 0,018$ grupo x interacción diaria, ANOVA con medidas repetidas) y neuropuntuaciones significativamente inferiores en comparación con el grupo tratado con vehículo, específicamente los días 21 ($p < 0,05$, diferencia menos significativa protegida de Fisher post hoc LSD) y 28 ($p<0,01$) después del accidente cerebrovascular. En los estudios neuroconductuales específicos de extremidades, los animales tratados con CMPD demostraron recuperación sensorial y motora de extremidades delanteras contralaterales (afectadas por el accidente cerebrovascular) significativamente potenciada en comparación con los controles con vehículo en la prueba de los pasos (Figura 6B; $p <0,045$ efecto global del grupo) y la prueba de la retirada de la cinta adhesiva (Fig. 2C; $p <0,049$ efecto global del grupo). Tomados en conjunto, los animales tratados con CMPD mostraron déficits post-accidente cerebrovascular reducidos en el uso de la extremidad delantera contralateral todos los días de las mediciones.

No hubo diferencia significativa en la función de extremidad ipsilateral entre los grupos de tratamiento. Los rendimientos en el rotarod (Figura 6D) y las pruebas de caminata sobre viga de sección decreciente/con cornisa (Figura 6E) no fueron estadística y significativamente diferentes ($p < 0,05$) entre los grupos de tratamiento. Una posible explicación para la diferencia en la mejora funcional potenciada entre las extremidades es que este modelo de OACM de roedor produce más destrucción de la representación cortical sensorial y motora para la función de extremidades delanteras en el cerebro del roedor debido al suministro vascular preferencial en esta región [Salo et al., Soc Neurosc Abstr 13: 1268, 1987]. En apoyo de esta afirmación, en los animales del presente estudio hubo una pérdida grave de función de extremidades delanteras según se midió con las pruebas de los pasos y de la retirada de la cinta adhesiva, pero un deterioro menos dramático de la función de las extremidades traseras según se evaluó con la prueba de caminata sobre viga de sección decreciente/con cornisa inmediatamente después de la OACM. La carrera en el rotarod y la caminata sobre la viga evalúan la coordinación motora y la función de las extremidades traseras respectivamente [Hicks et al., Cell stem Cell, 5: 139-140, 2009], y estas pruebas podrían no ser suficientemente sensibles como para detectar déficits post-accidente cerebrovascular. La mejora funcional potenciada después del tratamiento con CMPD en comparación con los animales tratados con vehículo fue evidente durante las 4 semanas de análisis de función de extremidades delanteras pero no de extremidades traseras.

Una explicación alternativa podría estar relacionada con conductas motoras compensatorias aprendidas en el animal. En las pruebas de carrera en el rotarod y caminata sobre viga de sección decreciente/con cornisa, mediante pruebas repetidas, los roedores pueden haber aprendido nuevas formas para usar las extremidades no afectadas por el accidente cerebrovascular o la desviación de la cola para compensar la pérdida de función en la extremidad afectada por el accidente cerebrovascular [Schaar et al., Exp Transl Stroke Med, 2: 13, 2010]. Las tareas específicas de extremidades delanteras permitieron un uso mínimo de las conductas compensatorias para superar la pérdida post-accidente cerebrovascular de función sensorial y motora, según se midió con las pruebas de los pasos y de la retirada de la cinta adhesiva.

Los datos anteriores indican que el trasplante de CMPDh influyó en el funcionamiento normal del sistema nervioso huésped después del accidente cerebrovascular y dio como resultado una función neurológica mejorada en comparación con los animales de control. Sin restringirse a ninguna consideración teórica o modo de acción, esta

mejora puede haberse producido por cambio neuroplástico dentro del cerebro después del accidente cerebrovascular. Por ejemplo, como se mostró anteriormente las células STRO-1$^+$ expresan SDF-1 (CXCL-12). Las CMPDh también han mostrado que expresan esta quimiocina. Asimismo, las CMPDh atraen químicamente los axones del ganglio del trigémino huésped después del trasplante en la cabeza de un embrión de pollo aunque estos animales demostraron una mejora funcional significativa en los puntos de tiempo posteriores.

Supervivencia de CMPD en cerebro isquémico a las 4 semanas del trasplante

Los hallazgos de los estudios neuroconductuales después del trasplante de CMPD indicaron un beneficio máximo en puntos de tiempo posteriores en puntuaciones neurológicas y función sensorial y motora de extremidades delanteras. Se llevaron a cabo estudios posteriores que investigaron si el mecanismo celular subyacente para explicar estos hallazgos se debía a reemplazo de células neurales después del trasplante de CMPD en el cerebro con accidente cerebrovascular. Por ejemplo, se determinó el número de células donantes que había sobrevivido en el punto final del estudio cuando se observó el beneficio máximo. Las CMPD individuales dentro del cerebro del roedor se visualizaron utilizando un anticuerpo específico contra antígeno mitocondrial humano, que no tiene reacción cruzada con el tejido de rata. Se contó manualmente el número de células marcadas cada dos secciones coronales de cerebro, es decir a intervalos de 10 µm. El número total de células con mitocondrias humana positiva detectadas en el cerebro de cada animal a las 4 semanas después del trasplante osciló entre 9.458 y 22.394 células (Tabla 5). Esto dio un número promedio de 13.807 - 4.293 CMPD humanas restantes y una tasa media de supervivencia de 2,3±0,7 % de las $6x10^5$ células trasplantadas originalmente. Nuestros datos demostraron que el trasplante celular fue exitoso y produjo viabilidad a largo plazo, aunque con números bajos, de células derivadas de CMPD en el cerebro post-isquémico.

Sin restringirse a ninguna consideración teórica o modo de acción, puesto que solo una media de 2,3 % de las CMPDh inicialmente trasplantadas sobreviven a los 28 días del accidente cerebrovascular, es improbable que el reemplazo neuronal sea el mecanismo de acción dominante gracias al cual las CMPDh aumentan la función neurológica. Sin embargo, dicho reemplazo neuronal puede proporcionar cierto beneficio terapéutico. Entre los mecanismos alternativos o adicionales que pueden ser responsables de esta mejora se incluyen la neuroprotección, la angiogénesis, la inmunomodulación y la neuroplasticidad.

Tabla 5: Supervivencia de las CMPD humanas trasplantadas a las 4 semanas

	Rata 1	Rata 2	Rata 3	Media ± EEM
N.º de CMPD humanas supervivientes	9.458	9.570	22.394	13.807 ± 4.293
Tasa de supervivencia de CMPD {%}	1,6	1,6	3,7	2,3 ± 0,7
Número y porcentaje totales de CMPD humanas supervivientes (tomados como porcentaje de 600.000 células trasplantadas originalmente) a las 4 semanas después de la oclusión de la arteria cerebral media. Se tiñeron secciones coronales de cerebro de rata de 5-*µ*m en serie para antígeno mitocondrial humano para demostrar CMPD humanas, y las células con antígeno mitocondrial humano positivo se contaron manualmente sección por medio. Abreviatura: CMPD, célula madre de pulpa dental.				

Migración dirigida de CMPD hacia la lesión del accidente cerebrovascular

También se analizó la distribución espacial de las CMPD humanas después del trasplante en el cerebro isquémico de rata. A las 24 horas del trasplante, se observaron CMPD agrupadas alrededor de ambos sitios de inyección. Después de 4 semanas, las células marcadas con mitocondrias humanas se encontraron predominantemente en la zona que rodeaba el núcleo del infarto (Figuras 7, 8A, 8B), lo cual demostraba que las células trasplantadas habían migrado desde los sitios de trasplante preferentemente hacia el infarto isquémico y se localizaron en la zona limítrofe de la isquemia (IBZ, por su sigla en inglés). Un número pequeño de CMPD se observaron en el hemisferio contralateral al sitio del trasplante celular (Figuras 7, 8A, 8B) y en el cuerpo calloso (Figura 8B). Las células habían migrado al menos 4 mm dentro del hemisferio contralateral en el período de 4 semanas. Las células derivadas de CMPD se distribuyeron ampliamente en el hemisferio contralateral con números bajos en comparación con el hemisferio ipsilesional, y no se produjo migración obvia de CMPD a las regiones dirigidas específicas del hemisferio contralateral. En raras ocasiones, las células derivadas de CMPD se incorporaron en y alrededor de las paredes de microvasos cerebrales con apariencias morfológicas acordes con las células endoteliales (Figura 4C, flechas), pericitos, o células de músculo liso (Figura 4C, punta de flecha).

CMPD humanas trasplantadas diferenciadas en neuronas y astrocitos in vivo

A continuación se examinaron las morfologías de las células con antígeno mitocondrial humano positivo en el cerebro post-isquémico de 4 semanas. Las células parecían tener morfologías acordes con las células astrocíticas que demostraban una apariencia de tipo estelar (Figura 8D, flechas), mientras que las células presuntamente neuronales mostraban procesos largos (Figura 8D, punta de flecha). Para verificar estos fenotipos, se utilizaron un análisis de inmunofluorescencia doble y formación confocal de imágenes. Las CMPD humanas trasplantadas habían sido previamente transducidas retroviralmente para expresar GFP, lo cual permitió el comarcaje con o bien NeuN o GFAP para identificar neuronas maduras o astrocitos, respectivamente. La colocalización de GFAP con expresión de GFP en células dentro de la cicatriz glial confimó que las células derivadas de CMPD se habían diferenciado en astrocitos. Dentro de la región cortical ipsilateral peri-infarto, las células con doble positivo de NeuN y GFP indicaron diferenciación de CMPD trasplantadas en neuronas. La distribución de astrocitos y neuronas en el hemisferio cerebral ipsilateral post-isquémico no fue uniforme. En la IBZ en la región del cuerpo estriado predominaban esos astrocitos derivados de CMPD (51,0±8,6 % células con doble positivo de GFAP/GFP, expresado como porcentaje de células solo marcadas con GFP), mientras que, en comparación, hubo una pequeña proporción de neuronas derivadas de CMPD (8,7 ± 6,1% células con NeuN/GFP). En la región cortical peri-infarto, la proporción de astrocitos y neuronas pareció similar (38 ± 0,6 % células con GFAP/GFP y 32,1 ± 1,8% células con NeuN/GFP, respectivamente). Las CMPD trasplantadas encontradas a lo largo de la IBZ del cuerpo estriado predominantemente se diferenciaron en astrocitos, que parecieron estar incorporados en la cicatriz glial. Había más neuronas derivadas de CMPD presentes en la región cortical peri-infarto en comparación con el cuerpo estriado. Curiosamente, alrededor de un tercio de las células con GFP en la región cortical peri-infarto también fueron marcadas con el marcador neuronal temprano/intermedio β-tubulina de clase III. No obstante, dentro de la cicatriz glial a lo largo de la IBZ, muchas células con GFP también coexpresaron el marcador progenitor neural nestina. Hubo poca evidencia de células con nestina/GFP en la corteza. Algunas células con GFP también dieron positivo para el marcador de neuroblastos migratorios APS-NCAM en la corteza peri-infarto. En raros casos se observaron oligodendrocitos derivados de CMPD (células con O4/GFP) en el cerebro del roedor a las 4 semanas del trasplante.

Atrofia del cuerpo calloso post-accidente cerebrovascular reducida con tratamiento con CMPD

También se investigó el efecto del tratamiento con CMPD sobre la pérdida de conectividad interhemisférica en el cuerpo calloso después del ataque de un accidente cerebrovascular. A las 4 semanas del accidente cerebrovascular, hubo una disminución no significativa en la atrofia del cuerpo calloso ipsilateral en animales tratados con CMPD en comparación con el grupo tratado con vehículo (tratado con CMPD, 67,6 ± 12,5 %, mediciones L2 expresadas como porcentaje de mediciones L1 de línea media correspondientes; tratado con vehículo, 56,6 ± 3,0 %; p > ,05) (Figura 9). En los cerebros tratados con CMPD, el grosor del cuerpo calloso en el hemisferio ipsilateral mostró una tendencia hacia una mejor conservación y se consiguió un grosor de cuerpo calloso similar del hemisferio contralesional (no afectado por el accidente cerebrovascular). No hubo diferencia de grosor de cuerpo calloso en el hemisferio contralateral entre los grupos de tratamiento (tratado con CMPD, 66,1 ± 14,0 %; tratado con vehículo, 66,5 ± 1,6%)

Ejemplo 5: Caracterización de MPC STRO-3$^+$ de mono Cynomolgus

Se aislaron células progenitoras de médula de simio (de monos Cynomolgus; cyno-MPC) de ~15 ml de aspirado de médula ósea recogido de una *Macaca fascicularis* hembra. La suspensión de aspirado de médula se separó utilizando un gradiente de Ficoll y se lavó para eliminar células no nucleadas (eritrocitos). Las células nucleadas se contaron y, a continuación, se separaron incorporando un anticuerpo CA12 (anti-STRO-3) y Dynabeads. Las células con anticuerpo y perlas incorporadas se seleccionaron positivamente mediante el campo magnético de un imán MPC-1. Se contaron las células seleccionadas positivas y se sembraron en matraces T en el pase (p.) 0 en medio de crecimiento. Las células de pre-selección, positivas y negativas se utilizaron en un ensayo de formación de colonias (UFC-F)

Las células cyno-MPC se alimentaron con medio de cultivo. Todos los cultivos (p.0 - p.5) fueron alimentados cada 2 a 4 días hasta que alcanzaron la confluencia deseada. A continuación, las células se sometieron a pases y se recolectaron utilizando lavado con HBSS y luego colagenasa seguida de tripsina/versene. Se contaron las células del p.1 y se sembraron en matraces T. Cuando las cyno-MPC del p.1 alcanzaron la confluencia deseada, se recolectaron las células y se criopreservaron utilizando una velocidad controlada.

Las cyno-MPC criopreservadas del pase 1 se descongelaron y se sembraron en matraces T (p.2). Las células del p.2 se sometieron a pases en una fábrica celular en el p.3. Las células del p.3 se recolectaron y se sometieron al p.4 en una fábrica celular. Las células adicionales del p.3 se criopreservaron. Las células del p.4 se sometieron a 6 pases x fábricas celulares en el p.5. Cuando las cyno-MPC del p.5 alcanzaron la confluencia deseada, las células se recolectaron y se criopreservaron utilizando una velocidad controlada. Las células fueron criopreservadas en

AlphaMEM al 50 %, Profreeze al 42,5 % y DMSO al 7,5 %. Las muestras se analizaron en cuanto a ensayo de UFC-F, FACS, esterilidad, micoplasma y endotoxina.

Los resultados del análisis de citometría de flujo representativo del inmunofenotipo de las cyno-MPC cultivadas se muestran en la Figura 10. Como se muestra, estas células son STRO-1$^+$, STRO-4$^+$ y CD146$^+$.

Ejemplo 6: Aislamiento posible de CMPD de primate no humano (nhp, por su sigla en inglés):

El uso de clasificación por perlas magnéticas permite la purificación de CMPD raras a partir de tejido pulpar fibroso. Después de la recolección de tejido de pulpa dental y de la digestión enzimática, se pueden recuperar aproximadamente 1-2 x 10^5 células de un tercer molar humano adulto. En vista de ello, se recogen células agrupadas derivadas de múltiples dientes del mismo animal. Las suspensiones de células únicas de pulpa dental de primate no humano se incuban con anticuerpos dirigidos contra antígenos humanos asociados a MPC que han mostrado previamente que reaccionan con células de médula ósea de primate no humano (Figura 10), incluyendo STRO-1 (MPC anti-humana de IgM de ratón; Developmental Studies Hybridoma Bank, Universidad de Iowa, Iowa City, IA, EE. UU.); CD146 (CD146/MUC-18 anti-humanos de IgG2a de ratón; 9); o STRO-4 (proteína-β de choque térmico anti-humana de IgG1 de ratón). Las células de pulpa marcadas se incuban con perlas magnéticas Dynabeads o bien conjugadas con IgG de oveja anti-ratón o conjugadas con IgM de rata anti-ratón (4 perlas por célula: Dynal, Oslo, Noruega). Las células con perlas magnéticas positivas se recogen utilizando el concentrador de partículas magnéticas MPC-1 (Dynal) según el protocolo recomendado por el fabricante. Las células con perlas positivas STRO-1, STRO-4 o CD146 se siembran aproximadamente 3 x 10^4 células por cm^2 en medio de crecimiento para generar cultivos primarios en medio de crecimiento normal (a-MEM suplementado con FBS al 20 % (v/v), 2 mM de L-glutamina, 100 mM de L-ascorbato-2-fosfato, 50 U/ml de penicilina, 50 mg/ml de estreptomicina). Después de alcanzar alrededor de 90 % de confluencia, las CMPD primarias se subcultivan con una densidad de siembra de alrededor de 0,5-1 x 10^4 células por cm^2.

Ejemplo 7. Evaluación de frecuencia de colonia de CMPDnhp: Uso de ensayos de formación de colonias-fibroblastos

Se evaluó la eficacia de los anticuerpos STRO-1, STRO-4 o CD146 como reactivos únicos para purificar las CMPDnhp. Se siembran células no fraccionadas y fracciones de células seleccionadas positivas y negativas STRO-1, STRO-4 o CD146 en placas de cultivo de 6 pocillos a 0,3, 1,0 y 3,0 x 10^4 células por pocillo en medio de crecimiento normal, por triplicado y se incuban a 37 °C en CO_2 al 5 % y >90 % de humedad durante 12 días. Los agregados de más de ≥50 células se puntúan como unidades formadoras de colonias-fibroblásticos (UFC-F). El protocolo de selección de anticuerpos que da como resultado la mayor incidencia de formación de colonias UFC-F se utiliza para generar CMPDnhp de grado BPL para los estudios de caracterización funcional.

Ejemplo 8. Caracterización de CMPDnhp

El análisis de citometría de flujo sirve para caracterizar el inmunofenotipo de CMPD expandidas *ex vivo*. La expresión de marcadores superficiales asociados a células madre mesenquimales y no mesenquimales en distintos pases celulares se evalúa como se describió anteriormente. Puesto que las CMPDnhp alogénicas se utilizan para tratar accidentes cerebrovasculares isquémicos, se evalúa la capacidad inmunomoduladora de estas células para suprimir las células inmunes activadas cuando se cocultivan en una reacción de linfocitos mixtos o con linfocitos estimulados con mitógenos in vitro (p. ej., como se describe en Wada et al., J Cell Physiol., 219: 667-676, 2009).

La capacidad de las CMPD para generar tejidos mesodérmicos y ectodérmicos, incluyendo aquellos similares a los tejidos de los cuales derivan, es un rasgo típico de estas células. La capacidad de las CMPD para diferenciarse en distintos linajes celulares *in vitro* se investiga cultivando en condiciones de inducción. Las CMPDnhp expandidas *ex vivo* se utilizan para evaluar la capacidad de diferenciación multi-linaje en osteoblastos (tinción con carmín alizarina de depósitos minerales), adipocitos (tinción con Oil red O de gotas de lípidos) y condrocitos (tinción con azul de toluidina de proteoglicanos sulfatados y expresión de colágeno tipo II) p. ej., como se describe en Grontos et al., J Cell Sci., 116: 1827-2835, 2003).

Las suspensiones de células únicas de CMPDnhp expandidas *ex vivo* pre-marcadas con GFP se trasplantan adicionalmente por vía subcutánea en la superficie dorsal de ratones con inmunodeficiencia severa (NOD/SCID) (n=3) durante un período de alrededor de ocho semanas en combinación con partículas cerámicas de hidroxiapatita/fosfato tricálcico (HA/FTC) como vehículo. Después de ocho semanas del trasplante, los animales receptores se sacrifican para recuperar los trasplantes para análisis histológicos.

La evaluación de la diferenciación *in vitro* de CMPDnhp en células neurales se lleva a cabo en portaobjetos de cámara

revestidos con poliornitina en condiciones de cultivo de inducción neural como se describió anteriormente.

Se utilizó PCR en tiempo real e inmunohistoquímica para evaluar la expresión génica y de proteína de antes (NeuroD, Nestina, NeuN, b-tubulina de clase III) y después (GFAP, cadenas de neurofilamento media y pesada).

Se llevó a cabo fijación de membranas para determinar la capacidad de CMPDnhp diferenciadas para iniciar un potencial de acción *in vitro.*

Además, el potencial neurogénico y neuroplástico de las CMPDnhp marcadas con GFP se determina inyectando estas células *in ovo* en embriones de pollo, p. ej., como se describió anteriormente.

Las propiedades electrofisiológicas de las CMPD implantadas marcadas con GFP se evaluaron midiendo la presencia de canales de sodio y potasio dependientes de la tensión eléctrica en secciones de 300 mm de tejido cerebral los días 7 y 14 después del injerto.

Estos estudios definen colectivamente la población de CMPDnhp alogénicas utilizada para tratar accidentes cerebrovasculares en un estudio pre-clínico de primates no humanos.

Ejemplo 9: Uso de CMPDnhp para mejorar la función motora en un modelo de accidente cerebrovascular isquémico de primate no humano

Las similitudes entre primates humanos y no humanos en cuanto a capacidades cognitivas complejas, gran complejidad social y complejidad de organización cerebral hacen que sean buenos modelos para estudiar enfermedades y trastornos neurológicos.

Un modelo de primate no humano de accidente cerebrovascular se produce con un procedimiento de OACM utilizando obstrucción con filamento de nylon a través de la arteria carótida interna (p. ej., como se describe en Freret et al., J Cereb Blood Flow Metab., 28: 786-796, 2008). El modelo de primate no humano se produce en macacos Cynomolgus, un mono del viejo mundo (*Macaca fascicularis*). A continuación se incluye un programa del diseño experimental para el estudio del accidente cerebrovascular isquémico:

(i) Se llevan a cabo pruebas neuroconductuales de línea de referencia en todos los animales antes del accidente cerebrovascular.

(ii) Se induce el modelo de OACM de accidente cerebrovascular isquémico.

En resumen, los monos son anestesiados, intubados y ventilados mecánicamente con monitorización intensiva de niveles de oxígeno en sangre, temperatura central, presión sanguínea, ECG y flujometría por láser doppler del flujo sanguíneo intracraneal. Un neurocientífico experto practica cirugía detallada para exponer la arteria carótida común derecha en la bifurcación de las arterias carótidas externa e interna. La arteria carótida externa y las otras arterias ramificadas se cauterizan para asegurar el paso fluido del filamento a lo largo de la arteria carótida interna hasta el origen de la arteria cerebral media. Se inserta un filamento de nylon recubierto por goma de silicona de 3 mm de largo y 0,54 mm de diámetro en la arteria carótida interna y se empuja hasta que hace resistencia, lo cual indica que el filamento ha ocluido la arteria cerebral media. El filamento se mantiene en su sitio mediante una ligadura. Tres horas después de la OACM se retira el filamento de nylon recubierto por goma de silicona, lo cual produce una reperfusión, un proceso que se aproxima al accidente cerebrovascular isquémico de la arteria cerebral media en seres humanos.

(iii) Se lleva a cabo IRM dentro de los 7 días después de la OACM para determinar si se ha producido un accidente cerebrovascular isquémico de tamaño y sitio apropiados.

(iv) El diseño de la terapia celular comprende tres grupos con inyección intraestriatal de $5x10^5$ o $1,5x10^6$ de CMPDnhp o medio solo (sin células) a la semana del accidente cerebrovascular. Al igual que en los roedores, hay un límite en cuanto al volumen de fluido que se puede inyectar de manera segura en el telencéfalo después de un accidente cerebrovascular debido a la morbilidad producida por el aumento de presión intracraneal. Se estima que el volumen es de 12 µL en el macaco. Por lo tanto, todas las inyecciones intraestriatales serán de 12 µL con concentraciones celulares variables. El mono es anestesiado como se indicó anteriormente y se practica una trepanación para la inyección intraestriatal esterotáxica.

(iv) Se llevan a cabo pruebas neuroconductuales semanales durante las 6 semanas que dura el estudio. Para investigar adecuadamente el alcance del déficit sensorial y motor después del accidente cerebrovascular isquémico de la ACM, se utilizan las siguientes pruebas: Monkey CANTAB® (batería automatizada de pruebas neuropsicológicas de Cambridge), neuropuntuación, prueba de las escaleras de montaña y valle y de estimulación táctil de extremidades delanteras (p. ej., como se describen en Bihel et al., J Cereb Blood Flow Metab., 30: 273-285, 2010).

(Vi) Estudio completado la 6ª semana después del accidente cerebrovascular.

Ejemplo 10: Interacción entre CMPDnhp injertadas y tejido cerebral de primate no humano (NHP)

10.1 Rescate de la penumbra isquémica:

Alrededor del accidente cerebrovascular isquémico hay una región de tejido de penumbra que corre riesgo de muerte pero que puede ser rescatado. La terapia de células STRO-1$^+$ puede interactuar con esta penumbra isquémica y, por ende, limitar el tamaño del accidente cerebrovascular.

Los monos se anestesian y se posicionan boca abajo en un escáner .0T Siemens Trio y se adquieren imágenes de turbo espín-eco potenciadas en T2 (potenciadas en T2, TR/TE=4800/86 ms) con un campo visual (180 x 180 mm) y matriz de adquisición de imágenes de 0,5 x 0,5 en resolución plana. Se adquieren doce imágenes coronales potenciadas en T2 con un grosor de corte de 2 mm y un espaciado de 0,2 mm. El volumen de infarto potenciado en T2 se delinea con un software de IRM Siemens para cada mono.

10.2 Reemplazo y conectividad neuronal en cerebro con accidente cerebrovascular NHP

El infarto produce la pérdida de neuronas y glía en aproximadamente 2/3 de un hemisferio cerebral. El objetivo de esta serie de investigaciones es determinar lo siguiente: (1) el número de CMPDnhp que sobreviven, (2) el número de CMPDnhp que se diferencian en neuronas o glía, y (3) si las neuronas derivadas de CMPDnhp hacen conexiones funcionales. Para llevar esto a cabo, las CMPDnhp se transducen retroviralmente para expresar GFP y se cultivan, antes del trasplante, en BrdU (alrededor de 20 µM durante 24 horas) para marcaje de núcleos. Estos dos procedimientos de marcaje proporcionan identificación formal de las CMPDnhp injertadas dentro del cerebro huésped.

El número de CMPDnhp que se han diferenciado en un fenotipo neural se estima estereológicamente estableciendo la densidad de CMPDnhp en un volumen especificado. A partir del estudio en roedores, se ha descubierto que a las 4 semanas, las CMPDnhp migran dentro del sitio del accidente cerebrovascular a aproximadamente 1 mm en cualquier dirección antero-posterior desde el sitio de la inyección (que es evidente a partir de la cicatriz sobre la superficie del cerebro). Por lo tanto, un grosor de 8 mm de cerebro de mono en un eje antero-posterior al sitio de la inyección incluye la mayor parte de las células humanas trasplantadas antes de las 6 semanas después del accidente cerebrovascular. Se toman secciones coronales en serie de 100 mm a lo largo de este eje (~ 4x103mm ancho de tejido @ 100 mm = 40 secciones coronales por animal tratado). Se construye un protocolo de muestreo aleatorio (utilizando Image J) para contar el número de células con BrdU positivo en un volumen de tejido estandarizado. Se lleva a cabo un recuento tridimensionanl directo de células humanas teñidas positivamente utilizando un microscopio confocal Bio-Rad MRC-1000UV (Adelaide Microscopy). La microscopía confocal identifica CMPDnhp GFP positiva o BrdU positiva para ser colocalizadas con antígenos citoplásmicos expresados por células diferenciadas (p. ej., neuronas que utilizan anticuerpos contra la cadena media de neurofilamento (NF-M) o β-tubulina de clase III, astrocitos que expresan proteína ácida fibrilar glial, GFAP o tirosina hidroxilasa).

También se evalúan las propiedades electrofisiológicas de las neuronas derivadas de CMPDnhp injertadas en el accidente cerebrovascular del mono. En primer lugar, se evalúan las propiedades biofísicas de neuronas derivadas de CMPDnhp simples aisladas del cerebro con accidente cerebrovascular de roedor. En resumen, los animales se decapitan, se les extrae el cerebro y se coloca en solución salina oxigenada helada. Las lonchas de cerebro con un grosor de 300-500 mm se cortan utilizando un cortador de tejido vibratorio, se lavan y luego se someten a digestión enzimática con una mezcla de tripsina y colagenasa. Se obtienen neuronas simples pipeteando suavemente el tejido, se lavan y se colocan en cubreobjetos de vidrio tratados con colágeno. Después de una recuperación de 24 horas, las células se utilizan para fijación de membranas de célula entera. Las neuronas derivadas de CMPDnhp se identifican como células GFP positivas. Se utilizan los protocolos de tensión eléctrica e inhibidores de canales apropiados para identificar los tipos de canales dependientes de tensión eléctrica expresados por estas células.

Se investiga la capacidad de las neuronas derivadas de CMPDnhp para generar potenciales de acción (PA) y para formar conexiones con otras neuronas mediante fijación de membranas y formación de imágenes de células en lonchas de cerebro. Las lonchas de cerebro de 250-400 mm de grosor se cortan con un vibratome cerca del sitio de la inyección. Después de un período de recuperación de 1 hora a temperatura ambiente y oxigenación constante, las lonchas individuales se transfieren a una cámara de registro montada en un microscopio vertical BX51WI Olympus con accesorio de fluorescencia, óptica DIC e IR. En primer lugar, las CMPDnhp se identifican utilizando fluorescencia de GFP y luego se visualizan con un filtro IR (720-850 nm) y una cámara sensible a IR Rolera-XR. La fijación de membranas de célula entera de neuronas en lonchas de cerebro se lleva a cabo utilizando un amplificador controlado por ordenador EPC-10 y equipos asociados. Se provocan los PA inyectando corriente despolarizante y se registran en modo de pinza amperimétrica.

Para investigar si los PA generados por las CMPDnhp pueden propagarse a las neuronas cercanas a través de o bien

uniones herméticas o conexiones sinápticas, se utiliza fluorescencia de Fura-2 para visualizar los cambios de concentración de $Ca2^+$ intracelular junto con fijación de membranas. En resumen, se carga una loncha de cerebro con Fura-2AM permeable a membranas, se lava y se coloca en la cámara de registro. Se identifican las neuronas derivadas de CMPDnhp mediante fluorescencia de GFP y se fijan las membranas con IR. A continuación, la configuración de la fluorescencia se cambia a la apropiada para las mediciones de Fura-2. Se provocan los PA en CMPDnhp pasando corriente despolarizante y se mide la fluorescencia en las neuronas huésped de roedor circundantes.

10.3 IRM funcional (IRMf) e imágenes por tensor de difusión (ITD) de cerebros con accidente cerebrovascular de primate no humano para investigar la neuroplasticidad

Estas tecnologías permiten la investigación no invasiva de la neuroplasticidad después del tratamiento con CMPDnhp en comparación con monos de control. En el modelo de accidente cerebrovascular isquémico, la IRMf se utiliza para evaluar el control motor de las extremidades delanteras y determinar si hay una mayor activación de la corteza motora después del tratamiento con CMPDnhp. Los estudios de IRMf se llevan a cabo a las 3 y 6 semanas después de los tratamientos.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Meoblast, Inc

<120> PROCEDIMIENTOS PARA TRATAR LOS EFECTOS DE UN ACCIDENTE CEREBROVASCULAR

<130> 512140

<150> 61/493057
<151> 03/06/2011

<160> 36

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1
<211> 20
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> oligonucleótido para amplificar GAPDH

<400> 1
cactgacacg ttggcagtgg 20

<210> 2
<211> 20
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> oligonucleótido para amplificar GAPDH

<400> 2
catggagaag gctggggctc 20

<210> 3
<211> 20
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> oligonucleótido para amplificar SDF-1

<400> 3
gagacccgcg ctcgtccgcc 20

<210> 4
<211> 21
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> oligonucleótido para amplificar SDF-1

<400> 4
gctggactcc tactgtaagg g 21

<210> 5
<211> 22
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> oligonucleótido para amplificar IL-lbeta

<400> 5
aggaagatgc tggttccctc tc 22

<210> 6
<211> 23
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> oligonucleótido para amplificar IL-lbeta

<400> 6
cagttcagtg atcgtacagg tgc 23

<210> 7
<211> 29
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> oligonucleótido para amplificar FLT-1

<400> 7
tcactatgga agatctgatt tcttacagt 29

<210> 8
<211> 25
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> oligonucleótido para amplificar FLT-1

<400> 8
ggtataaata cacatgtgct tctag 25

<210> 9

<211> 20
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> oligonucleótido para amplificar TNFalfa

<400> 9
tcagatcatc ttctcgaacc 20

<210> 10
<211> 20
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> oligonucleótido para amplificar TNFalfa

<400> 10
cagatagatg ggctcatacc 20

<210> 11
<211> 20
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> oligonucleótido para amplificar KDR

<400> 11
tatagatggt gtaacccgga 20

<210> 12
<211> 21
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> oligonucleótido para amplificar KDR

<400> 12
tttgtcactg agacagcttg g 21

<210> 13
<211> 21
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> oligonucleótido para amplificar ligando de RANK

<400> 13
aacaggcctt tcaaggagct g 21

<210> 14
<211> 22
<212> ADN
<213> Artificial

<220>

<223> oligonucleótido para amplificar ligando de RANK

<400> 14
taaggagggg ttggagacct cg 22

<210> 15
<211> 20
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> oligonucleótido para amplificar Leptina

<400> 15
atgcattggg aaccctgtgc 20

<210> 16
<211> 20
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> oligonucleótido para amplificar Leptina

<400> 16
gcacccaggg ctgaggtcca 20

<210> 17
<211> 21
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> oligonucleótido para amplificar CBFA-1

<400> 17
gtggacgagg caagagtttc a 21

<210> 18
<211> 21
<212> ADN
<213> Artificial
<220>
<223> oligonucleótido para amplificar CBFA-1

<400> 18
tggcaggtag gtgtggtagt g 21

<210> 19
<211> 28
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> oligonucleótido para amplificar PPARgamma2

<400> 19
aactgcgggg aaacttggga gattctcc 28

<210> 20

<211> 26
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> oligonucleótido para amplificar PPARgamma2

<400> 20
aataataagg tggagatgca ggctcc 26

<210> 21
<211> 21
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> oligonucleótido para amplificar OCN

<400> 21
atgagagccc tcacactcct c 21

<210> 22
<211> 19
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> oligonucleótido para amplificar OCN

<400> 22
cgtagaagcg ccgataggc 19

<210> 23
<211> 20
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> oligonucleótido para amplificar MyoD

<400> 23
aagcgccatc tcttgaggta 20

<210> 24
<211> 20
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> oligonucleótido para amplificar MyoD

<400> 24
gcgagaaacg tgaacctagc 20

<210> 25
<211> 20
<212> ADN
<213> Artificial

<220>

<223> oligonucleótido para amplificar SMMHC

<400> 25
ctgggcaacg tagtaaaacc 20

<210> 26
<211> 20
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> oligonucleótido para amplificar SMMHC

<400> 26
tatagctcat tgcagcctcg 20

<210> 27
<211> 21
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> oligonucleótido para amplificar GFAP

<400> 27
ctgttgccag agatggaggt t 21

<210> 28
<211> 20
<212> ADN
<213> Artificial
<220>
<223> oligonucleótido para amplificar GFAP

<400> 28
tcatcgctca ggaggtcctt 20

<210> 29
<211> 24
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> oligonucleótido para amplificar nestina

<400> 29
ggcagcgttg gaacagaggt tgga 24

<210> 30
<211> 24
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> oligonucleótido para amplificar nestina

<400> 30
ctctaaactg gagtggtcag ggct 24

<210> 31
<211> 21
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> oligonucleótido para amplificar SOX9

<400> 31
ctctgcctgt ttggactttg t 21

<210> 32
<211> 21
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> oligonucleótido para amplificar SOX9

<400> 32
cctttgcttg ccttttacct c 21

<210> 33
<211> 20
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> oligonucleótido para amplificar colágeno tipo X

<400> 33
agccagggtt gccaggacca 20

<210> 34
<211> 20
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> oligonucleótido para amplificar colágeno tipo X

<400> 34
ttttcccact ccaggagggc 20

<210> 35
<211> 20
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> oligonucleótido para amplificar agrecano

<400> 35
cactgttacc gccacttccc 20

<210> 36
<211> 20
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> oligonucleótido para amplificar agrecano

<400> 36
accagcggaa gtccccttcg 20

REIVINDICACIONES

1. Una población de células enriquecidas para células multipotenciales STRO-1$^+$ no hematopoyéticas para uso en la regeneración de neuronas en un sujeto que ha sufrido un accidente cerebrovascular, donde la población de células se ha de administrar entre 24 horas y 1 mes después del accidente cerebrovascular.

2. La población de células para uso según la reivindicación 1, donde las neuronas cerebrales están en la corteza cerebral.

3. La población de células para uso según la reivindicación 2, donde las neuronas cerebrales están en la corteza motora y/o en la corteza sensorial.

4. La población de células para uso según la reivindicación 1, que es mejorar la función cerebral o prevenir la pérdida de función cerebral en el sujeto que ha sufrido un accidente cerebrovascular.

5. La población de células para uso según la reivindicación 1, que es tratar o prevenir un trastorno de movimiento en el sujeto que ha sufrido un accidente cerebrovascular.

6. La población de células para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, donde el accidente cerebrovascular es un accidente cerebrovascular isquémico.

7. La población de células para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, donde la población de células se ha de administrar entre 48 horas y 1 mes después del accidente cerebrovascular.

8. La población de células para uso según la reivindicación 7, donde la población de células se ha de administrar entre 72 horas y 1 mes después del accidente cerebrovascular.

9. La población de células para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, donde la población de células se enriquece para células STRO-1^{bright}.

10. La población de células para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, donde la población de células deriva de la médula ósea o de la pulpa dental.

11. La población de células para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, donde la población de células se ha de administrar de manera sistémica o local al cerebro del sujeto.

12. La población de células para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, donde la población de células se ha de administrar una pluralidad de veces.

13. La población de células para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, donde se han de administrar entre 0,1 x 10^6 y 5 x 10^6 de células STRO-1$^+$ por kg o se han de administrar entre 0,3 x 10^6 y 2 x 10^6 de células STRO-1$^+$ por kg o se han de administrar entre 0,1 x 10^5 y 0,5 x 10^6 de células STRO-1$^+$ por kg.

14. La población de células para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, donde la población de células se ha expandido mediante cultivo antes de la administración.

15. La población de células para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, donde la población de células se ha de administrar entre 48 horas y 2 semanas después del accidente cerebrovascular.

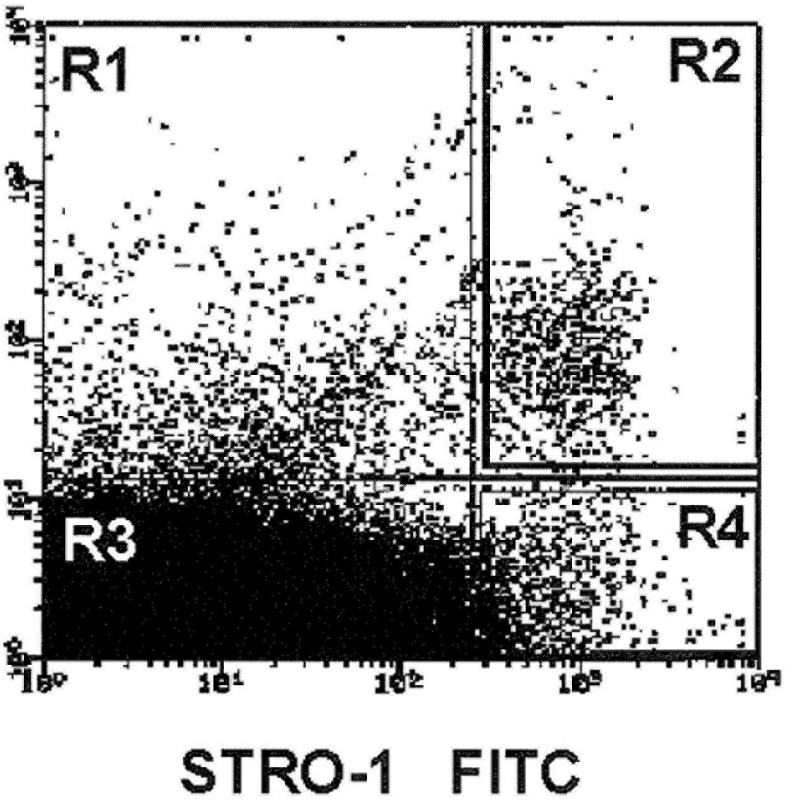
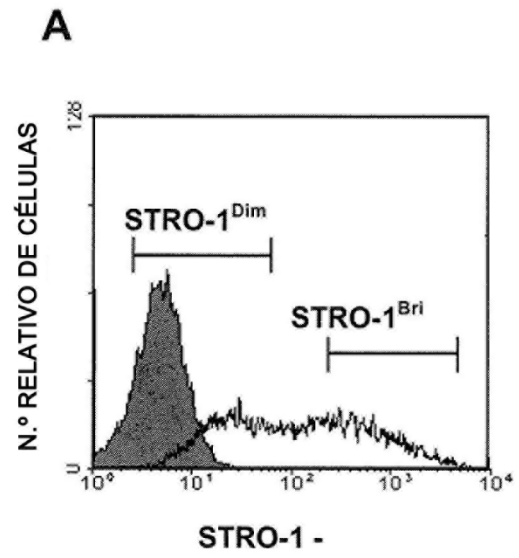


FIGURA 1


A
N.º RELATIVO DE CÉLULAS
STRO-1Dim
STRO-1Bri
STRO-1 -

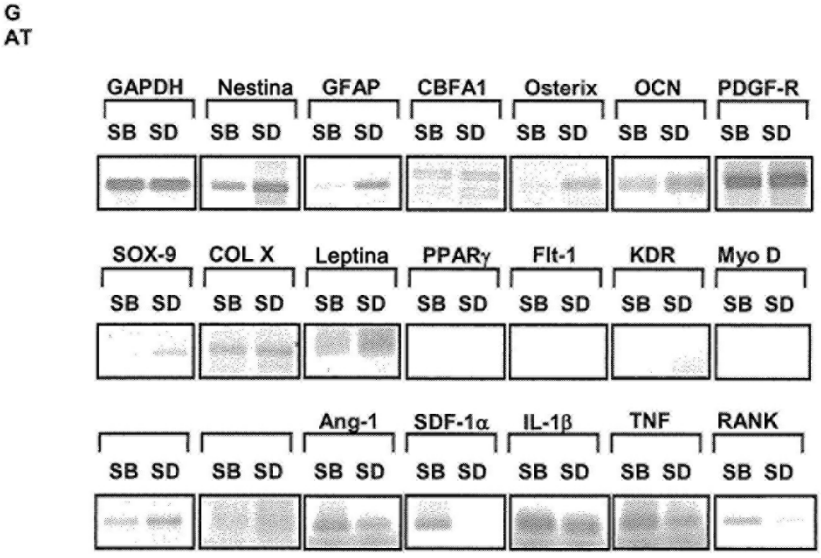

G
AT
GAPDH
Nestina
GFAP
CBFA1
Osterix
OCN
PDGF-R
SOX-9
COL X
Leptina
PPARγ
Flt-1
KDR
Myo D
Ang-1
SDF-1α
IL-1β
TNF
RANK
SB SD

Figura 2

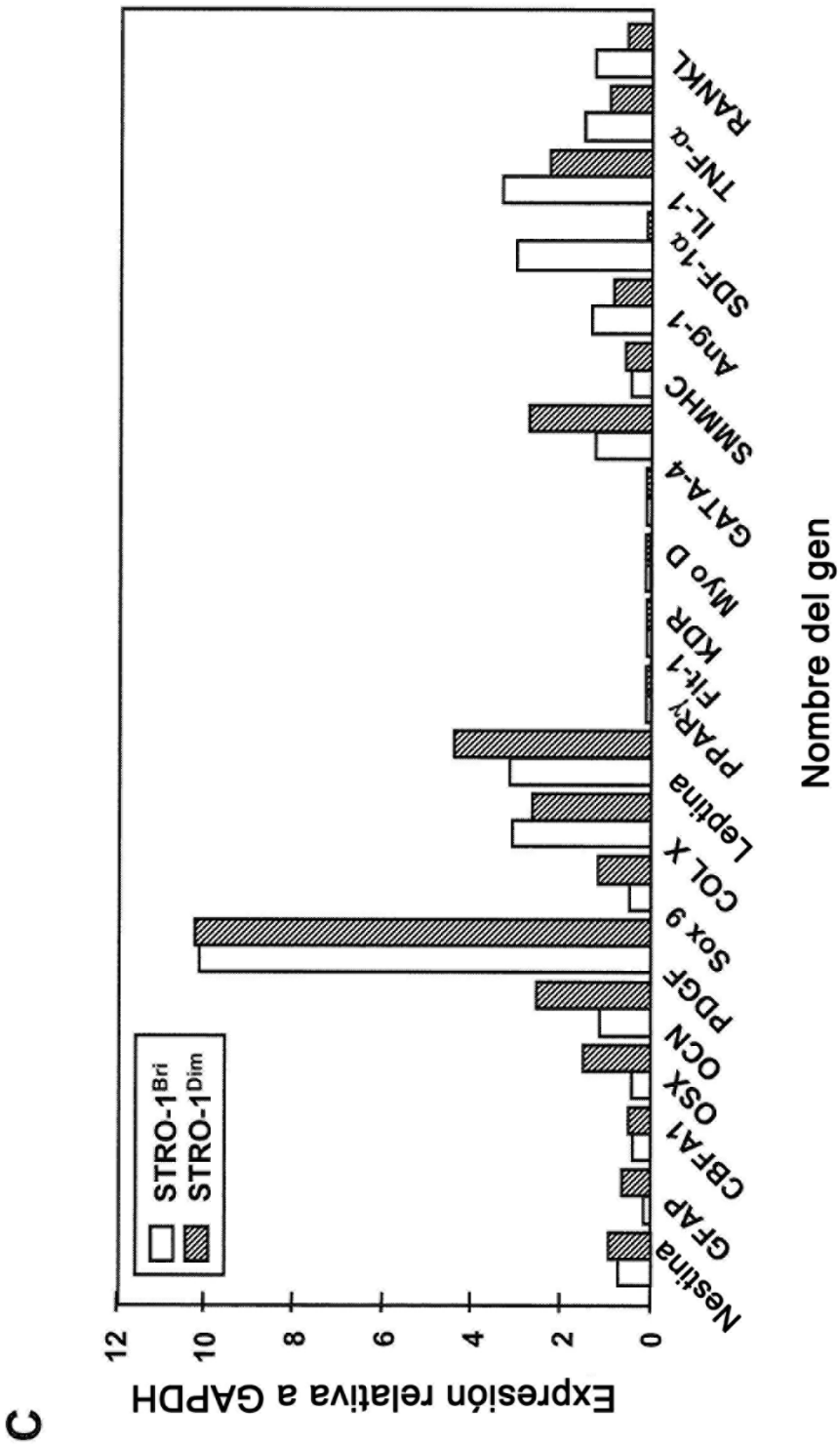


Figura 2 (continuación)

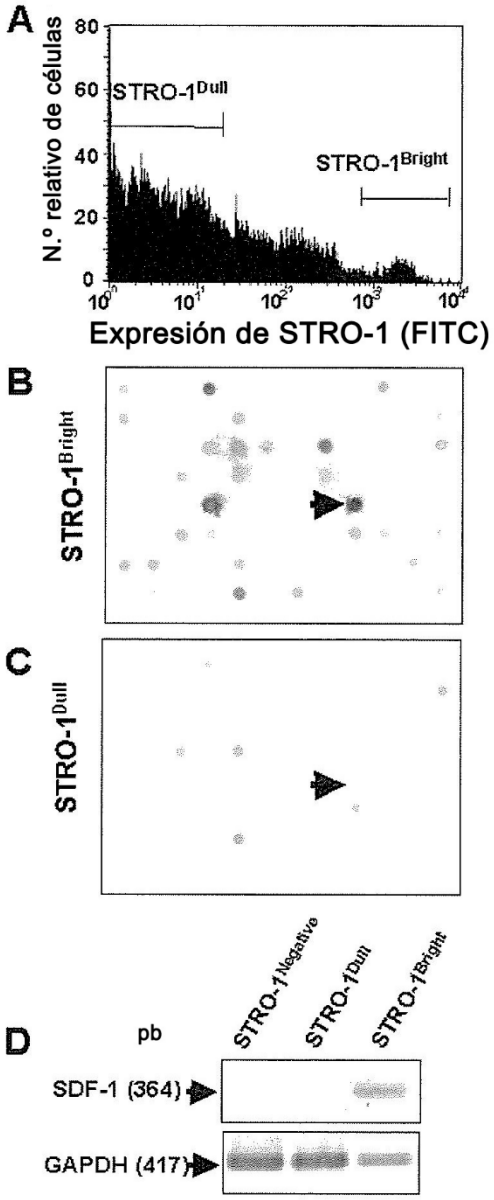

A
N.º relativo de células
80
60
40
20
0
STRO-1Dull
STRO-1Bright
Expresión de STRO-1 (FITC)
B
STRO-1Bright
C
STRO-1Dull
D
pb
STRO-1Negative
STRO-1Dull
STRO-1Bright
SDF-1 (364)
GAPDH (417)

Figura 3

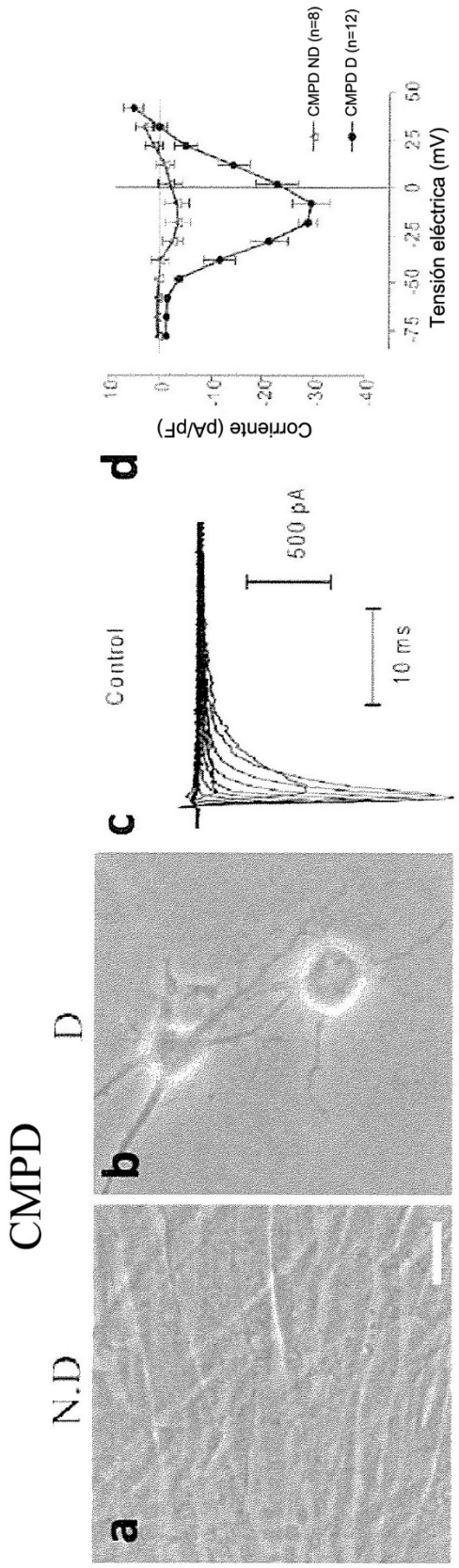

CMPD
N.D
D
a
b
c
Control
500 pA
10 ms
d
Corriente (pA/pF)
CMPD ND (n=8)
CMPD D (n=12)
Tensión eléctrica (mV)

Figura 4

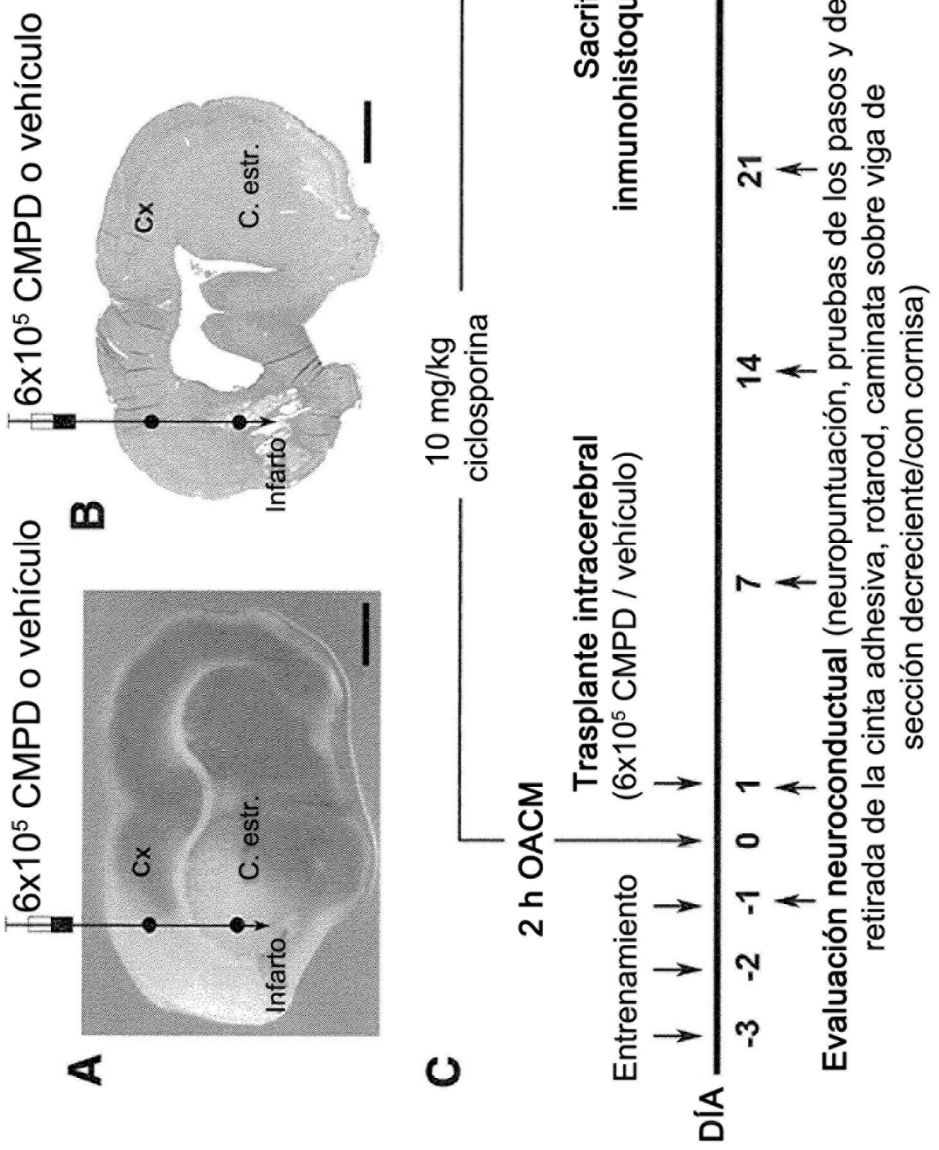

A
6x10⁵ CMPD o vehículo
Cx
C. estr.
Infarto
B
6x10⁵ CMPD o vehículo
Cx
C. estr.
Infarto
C
10 mg/kg ciclosporina
2 h OACM
Trasplante intracerebral (6x10⁵ CMPD / vehículo)
Sacrificio + inmunohistoquímica
Entrenamiento
DÍA
-3 -2 -1 0 1 7 14 21 28
Evaluación neuroconductual (neuropuntuación, pruebas de los pasos y de la retirada de la cinta adhesiva, rotarod, caminata sobre viga de sección decreciente/con cornisa)

Figura 5

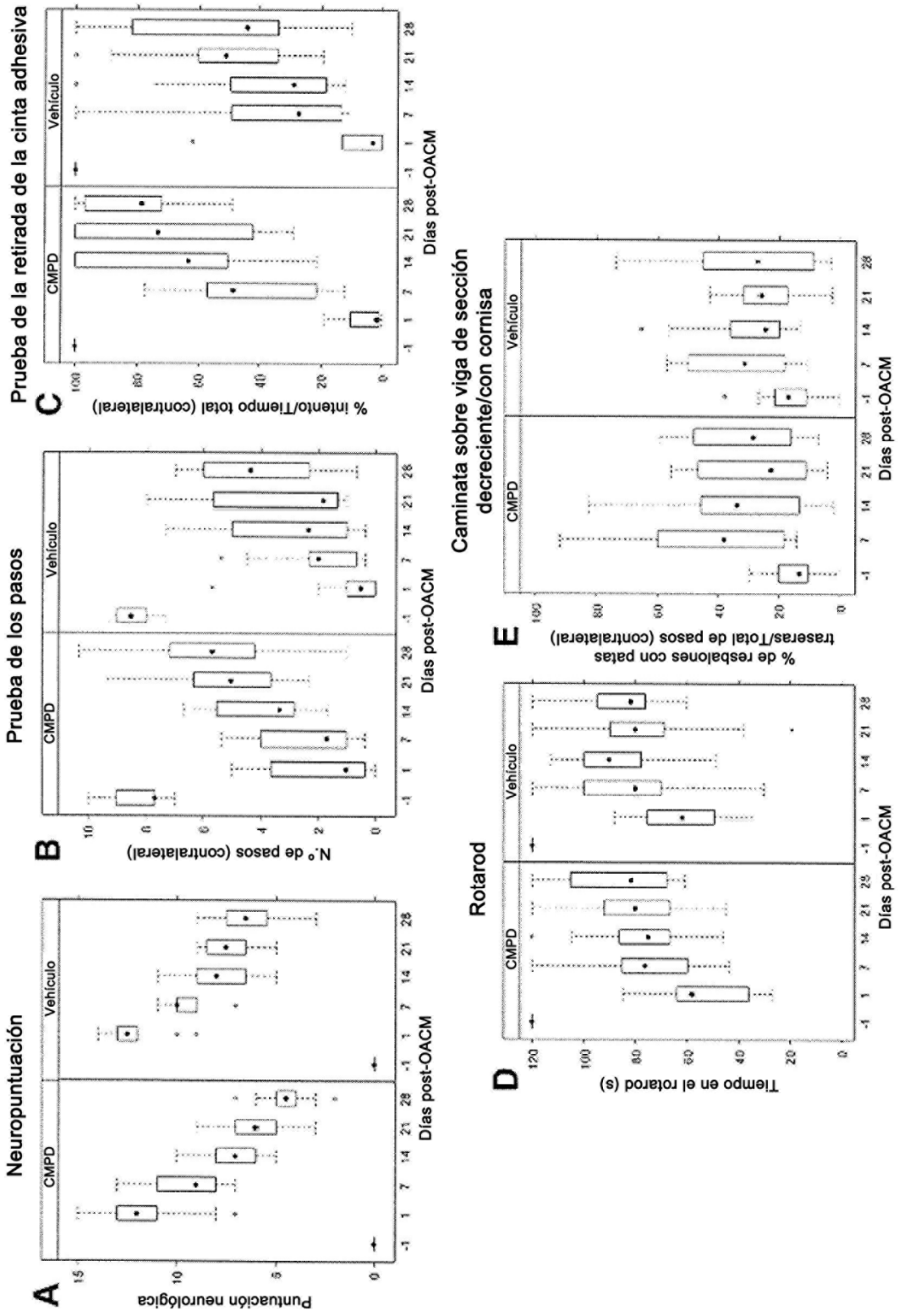

A
Neuropuntuación
Puntuación neurológica
CMPD
Vehículo
Días post-OACM
B
Prueba de los pasos
N.º de pasos (contralateral)
C
Prueba de la retirada de la cinta adhesiva
% Intento/Tiempo total (contralateral)
D
Rotarod
Tiempo en el rotarod (s)
E
Caminata sobre viga de sección decreciente/con cornisa
% de resbalones con patas traseras/Total de pasos (contralateral)

Figura 6

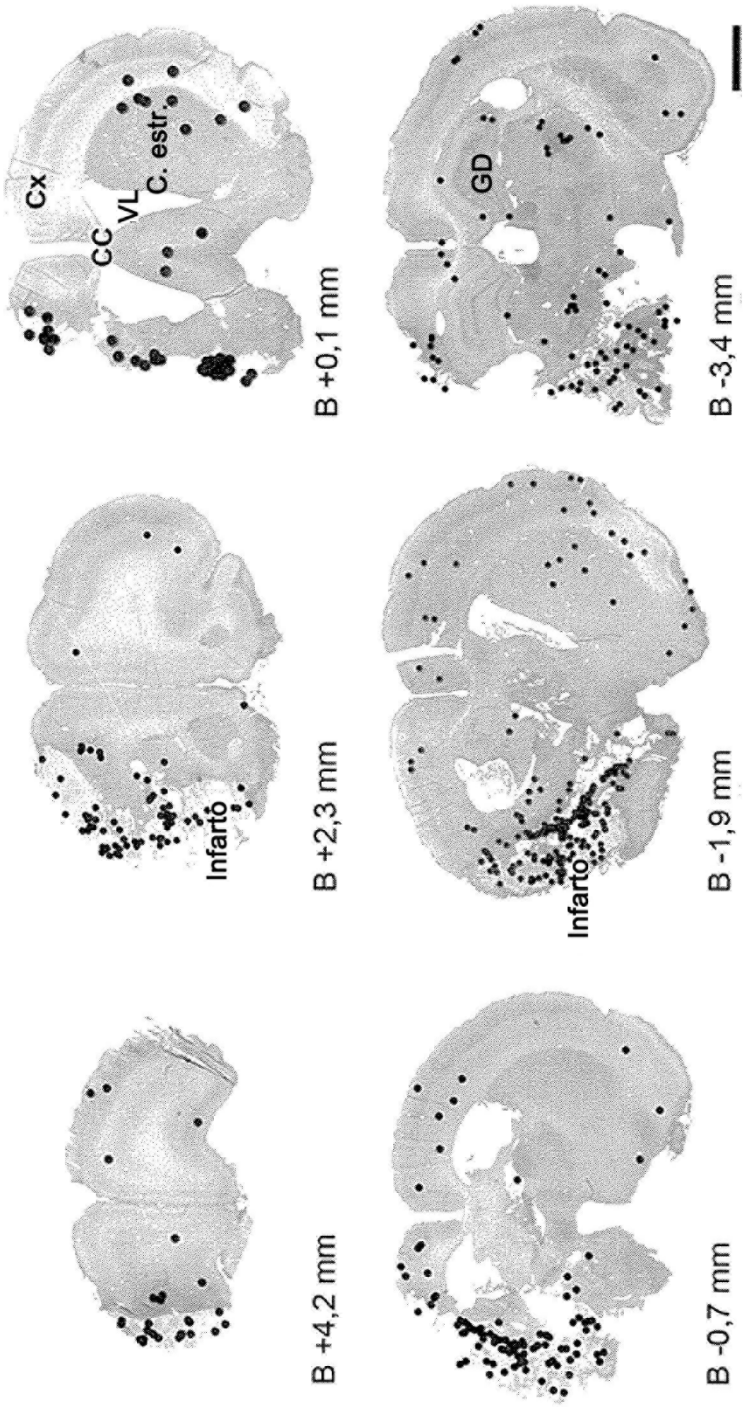

Cx
CC
VL
C. estr.
B +0,1 mm
GD
B -3,4 mm
Infarto
B +2,3 mm
Infarto
B -1,9 mm
B +4,2 mm
B -0,7 mm

Figura 7

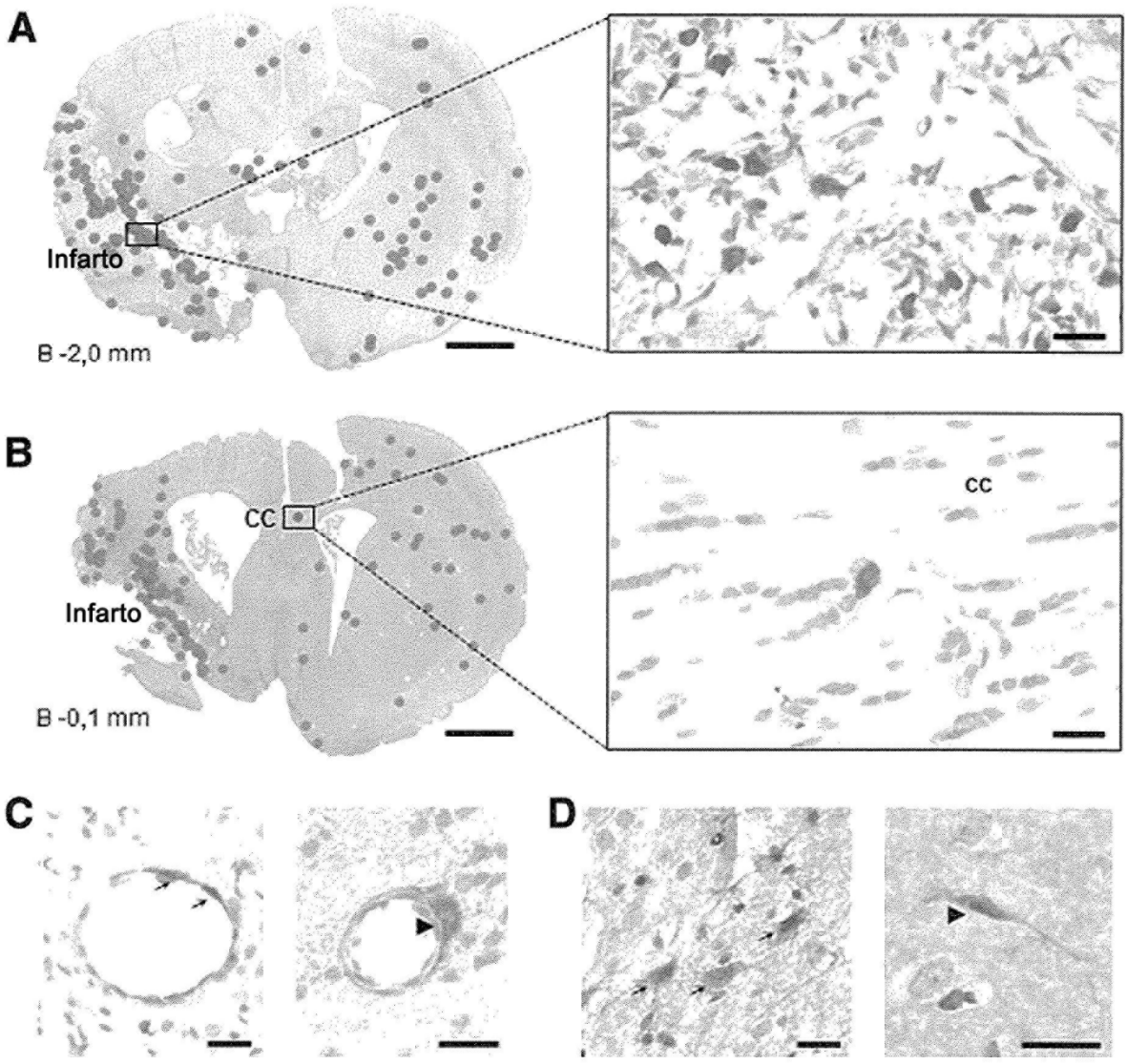
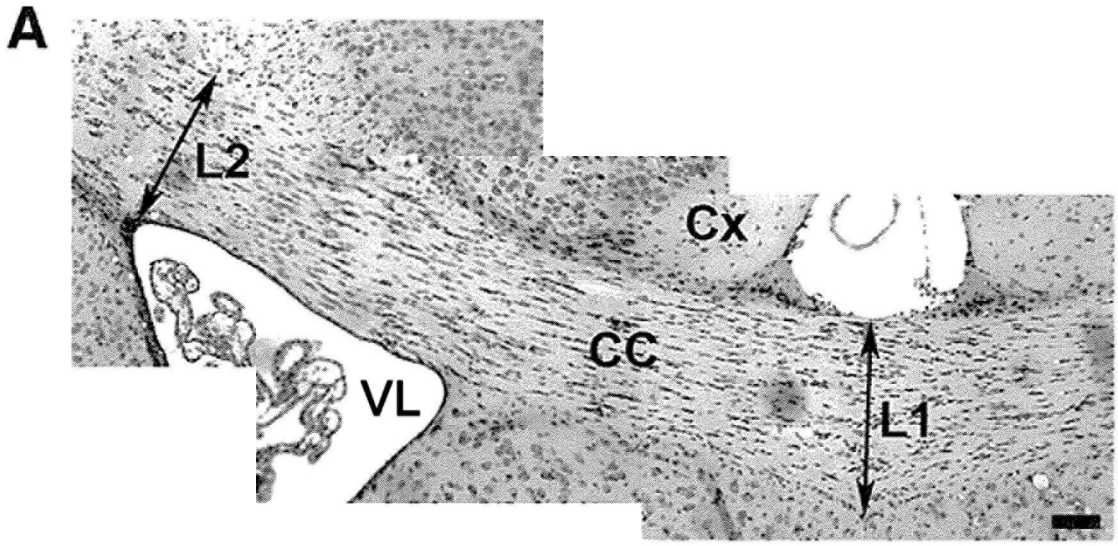


Figura 8


A
L2
Cx
CC
VL
L1

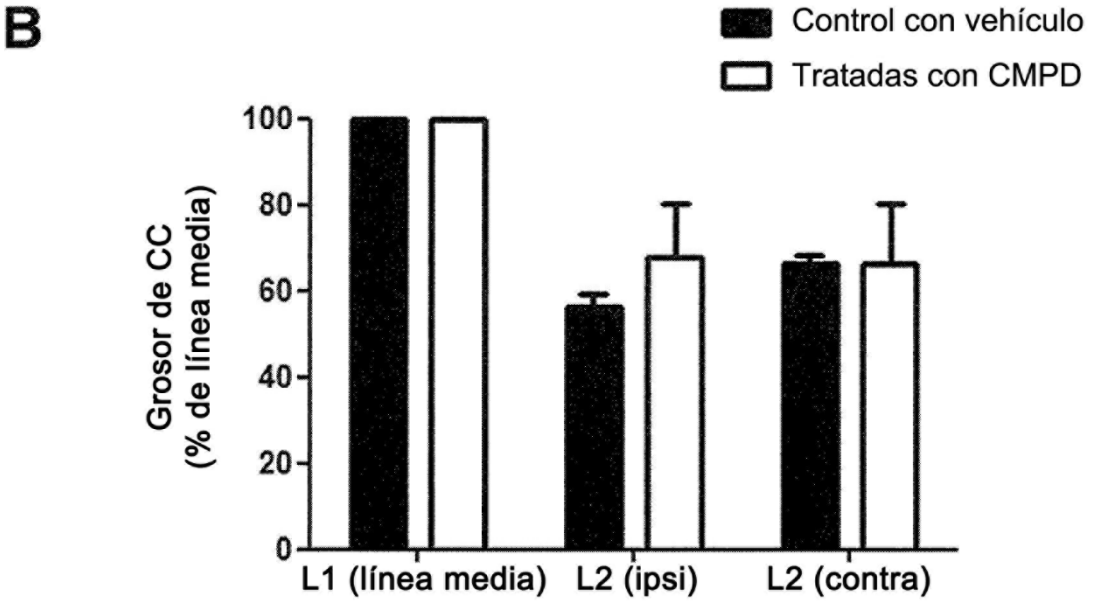

B
Control con vehículo
Tratadas con CMPD
Grosor de CC
(% de línea media)
100
80
60
40
20
0
L1 (línea media)
L2 (ipsi)
L2 (contra)

Figura 9

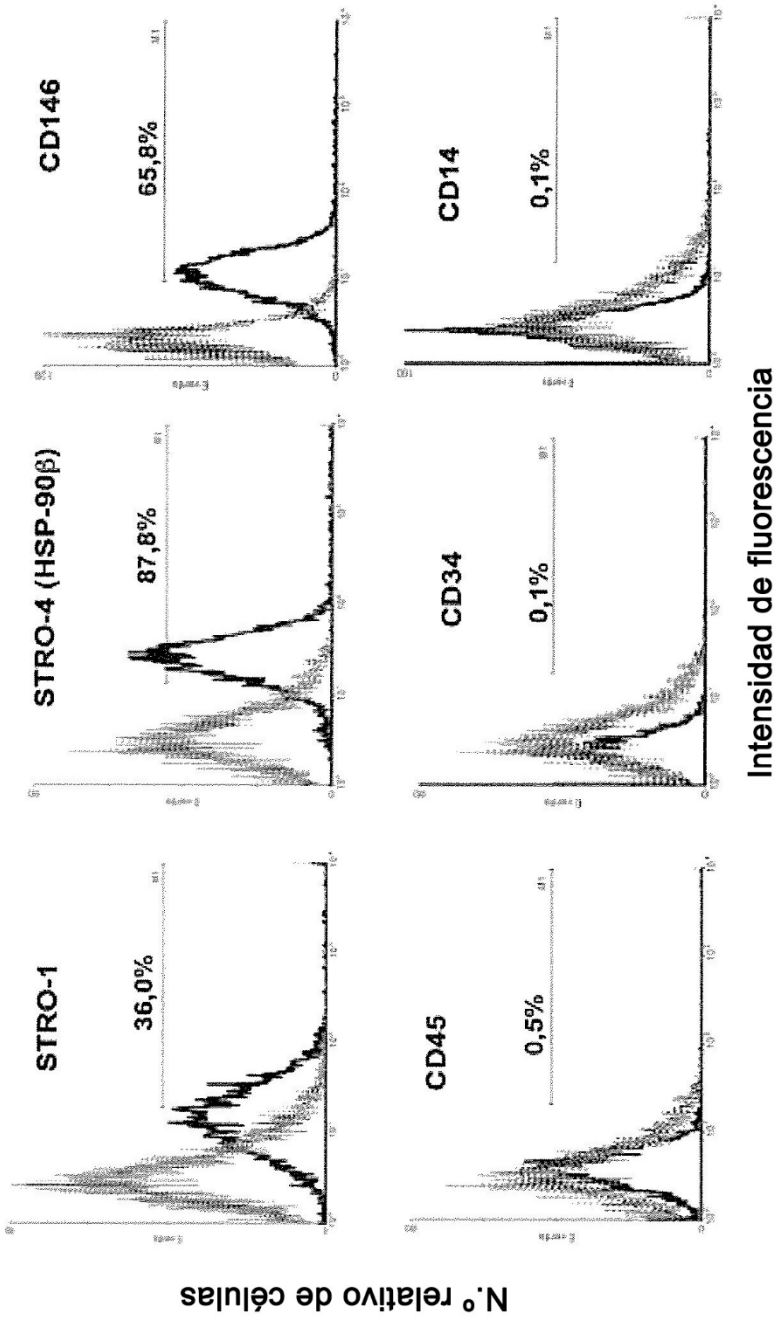

CD146
65,8%
CD14
0,1%
STRO-4 (HSP-90β)
87,8%
CD34
0,1%
STRO-1
36,0%
CD45
0,5%
Intensidad de fluorescencia
N.º relativo de células

Figura 10