

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 848 075**

51 Int. Cl.:

A61L 27/38 (2006.01)

A61L 27/54 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **13.03.2014 PCT/US2014/026461**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **18.09.2014 WO14143632**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.03.2014 E 14763985 (0)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.11.2020 EP 2970879**

54 Título: **Método de tratamiento de las enfermedades hepáticas mediante el trasplante de células madre a las paredes de los conductos biliares**

30 Prioridad:

13.03.2013 US 201361780644 P
12.03.2014 US 201414207191

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
05.08.2021

73 Titular/es:

UNIVERSITY OF NORTH CAROLINA AT CHAPEL HILL (33.3%)
Office of Commercialization and Economic, Development, 109 Church St. Chapel Hill, NC 27516;
UNIVERSITY OF MIAMI (33.3%) y
SAPIENZA UNIVERSITA DI ROMA (33.3%)

72 Inventor/es:

REID, LOLA, MCADAMS;
WANG, YUNFANG;
GERBER, DAVID, A.;
LANZONI, GIACOMO;
INVERARDI, LUCA;
DOMINGUEZ-BENDALA, JUAN;
ALVARO, DOMENICO;
CARDINALE, VINCENZO;
GAUDIO, EUGENIO y
CARPINO, GUIDO

74 Agente/Representante:

TOMAS GIL, Tesifonte Enrique

ES 2 848 075 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Método de tratamiento de las enfermedades hepáticas mediante el trasplante de células madre a las paredes de los conductos biliares

5

Referencia cruzada a aplicaciones relacionadas

[0001] Esta aplicación reivindica el beneficio de la solicitud provisional de EE. UU. N.º 61/780.644, presentada el 13 de marzo de 2013; y la solicitud de patente de EE. UU. N.º 14/207.191, presentada el 12 de marzo de 2014.

10

Campo de la invención

[0002] La presente invención está dirigida generalmente al campo de las terapias basadas en células. Más específicamente, la invención se refiere a terapias basadas en células, particularmente terapias con células madre/progenitores, para el tratamiento de afecciones hepáticas. Las poblaciones de células madre/progenitores determinadas pueden ser células madre de árboles biliares, células madre hepáticas o progenitores comprometidos derivados de esas células madre. Esta aplicación reivindica la prioridad respecto de la solicitud provisional de EE. UU. N.º 61/780.644, presentada el 13 de marzo de 2013.

15

20

Antecedentes de la invención

[0003] La medicina regenerativa ha entrado en una nueva fase en la que se trasplantan poblaciones de células madre a pacientes para restaurar tejidos dañados o enfermos como el hígado y el páncreas. Las enfermedades hepáticas, que pueden provocar insuficiencia orgánica debido a los virus de la hepatitis, el consumo de alcohol, los trastornos dietéticos y metabólicos y otras causas, constituyen una importante carga médica en todo el mundo. De manera similar, las afecciones pancreáticas, en particular la diabetes, son una de las principales causas de problemas de salud y muerte en todo el mundo. Las terapias con células madre/progenitores representan posibles enfoques para abordar estas necesidades de tratamiento, y los programas clínicos se están expandiendo en todo el mundo para seguir explorando estas nuevas terapias. Aunque se están probando muchos tipos de precursores para programas clínicos que tratan el hígado y el páncreas, solo algunos son posibles para los programas clínicos a corto plazo.

25

30

[0004] En la patente EE. UU. 6.805.860 se describe un método para reparar el hígado en el cuerpo de un paciente, que comprende administrar en el sitio donde está el tejido que se va a reparar células madre que pueden reemplazar tejido de dicho órgano defectuoso, mediante aplicación intraluminal a través del conducto biliar. Se hace avanzar un catéter a través de dicho conducto para administrar las células a dicho sitio, y el conducto se ocluye temporalmente cerca de la ubicación de dicha aplicación intraluminal durante dicha administración de células para aumentar la concentración de células liberadas en dicho sitio.

35

40

Descripción general de la biología de las células madre

[0005] Las células madre o sus descendientes, los progenitores comprometidos, son capaces tanto de proliferación sostenida como de diferenciación en células especializadas. La distinción crucial que define a las células madre es su capacidad para autorrenovarse, es decir, de mantener indefinidamente una población con propiedades idénticas a través de divisiones celulares simétricas o asimétricas. Los progenitores, por el contrario, cumplen una función transitoria en la amplificación de una población celular durante el desarrollo o la regeneración. Cuando no se puede determinar con rigor la capacidad de autorrenovación de los precursores, los investigadores a veces utilizan la terminología «células madre/progenitores». El término también se usa para terapias celulares que implican el uso de células madre y/o progenitores.

45

50

[0006] Las células madre en las primeras etapas del embrión de mamífero en desarrollo, junto con las células germinales primordiales en etapas posteriores, tienen la notable capacidad de dar lugar a todos los tipos de células del cuerpo y, por lo tanto, se denominan pluripotentes. Las células madre embrionarias (ES) mantienen la pluripotencia durante su expansión extensa como líneas celulares establecidas. El potencial de autorrenovación de las células madre embrionarias parece prácticamente ilimitado, aunque la acumulación de mutaciones espontáneas y reordenamientos cromosómicos termina por degradar su utilidad práctica. De manera similar, se pueden generar células madre pluripotentes mediante la reprogramación de células somáticas maduras mediante la introducción de pequeños conjuntos de factores genéticos definidos, y las células se denominan células madre pluripotentes inducidas (iPS).

55

60

[0007] Las células madre mesenquimales o MSC pueden obtenerse de la médula ósea, del tejido adiposo, del tejido del cordón umbilical, de la gelatina de Wharton y del líquido amniótico, pueden crecer fácilmente en cultivos bajo condiciones de cultivo normales, pueden trasplantarse por vía vascular o mediante injerto, y el linaje se restringe a cualquier destino mesodérmico (por ejemplo, hueso, cartílago, tendón, músculo). Son capaces de restringir el linaje a destinos endodérmicos o ectodérmicos pero con una eficiencia extremadamente baja, tanto que esta característica no es de utilidad práctica con respecto a los programas clínicos. La utilidad de las MSC

65

para los programas clínicos está demostrando ser principalmente debida a su producción de señales paracrinas secretadas (matriz y factores solubles) o a sus mecanismos inmunomoduladores, hallazgos que han dado como resultado su uso en programas clínicos en todo el mundo para aliviar las afecciones hepáticas y afecciones pancreáticas, incluida la diabetes.

5

Tabla 1. Rasgos fenotípicos intrahepáticos dependientes del linaje en hígados humanos			
Etapas de linaje madurativo	Temprano (etapas 1-4; zona 1)	Intermedio (etapas 5-6; zona 2)	Tardío (etapas 7-10; zona 3)
Tamaños de célula	Células madre 7-9 µm	~20-25 µm	~25-35 µm
	Hepatoblastos 10-12 µm		
	Progenitores comprometidos 12-15 µm		
	Células adultas 17-18 µm		
Ploidía	Diploide	Diploide con algo de tetraploide (depende de la edad de la persona)	Tetraploide o superior
Proliferación	Crecimiento hiperplásico (síntesis de ADN con citocinesis)	Crecimiento hiperplásico con algo de crecimiento hipertrófico (depende del grado de citocinesis)	Crecimiento hipertrófico (síntesis de ADN con citocinesis insignificante)
Genes representativos expresados	Células madre: NCAM, EpCAM, CD44H (sin AFP y poca o ninguna albúmina), CS-PG ^{1,4}	Transferrina ³ , albúmina regulable, TAT ¹ , totalmente	P4503A4 ¹ , glutatión-S-transferasa ¹ , HP-PG ⁴ factores asociados con la apoptosis ¹
	Hepatoblastos: ICAM-1 ¹ , EpCAM, AFP ¹ , CD44H, albúmina constitutiva ² , P450A7 ¹ , HS-PG ^{1,4}		
	Hepatocitos: enzimas en la síntesis de glucógeno ¹ , CX 28 ¹ , HS-PG ⁴ , albúmina parcialmente regulable ²		
Los niveles de expresión se deben a la activación de la transcripción dependiente del linaje ¹ , la adquisición de elementos reguladores relevantes en la transcripción ² , el(los) mecanismo(s) de traslación ³ , las modificaciones postranscripcionales (por ejemplo, en Golgi) ⁴			
AFP, alfafetoproteína; CD44, receptor de hialuronanos; CS-PG, proteoglicano condroitín sulfato; CX, conexasinas (proteínas de unión gap); Cyp450, citocromo P450; HS-PG, proteoglicano heparán sulfato; ICAM-1, molécula de adhesión intercelular-1; NCAM, molécula de adhesión de células neurales; TAT, tirosina aminotransferasa			

10 [0008] Las células madre determinadas, comúnmente llamadas «células madre adultas», se encuentran en tejidos fetales y posnatales, pero están restringidas a linajes específicos definidos por una capa germinal (ectodermo, mesodermo, endodermo). Las células madre determinadas (y sus descendientes, los progenitores comprometidos) reponen las células maduras que se pierden por la renovación normal o por lesiones y enfermedades. Algunos tipos de células maduras, como las células sanguíneas y las que recubren el intestino o la capa externa de la piel, tienen una vida útil limitada y deben reemplazarse rápidamente. Otras células maduras, como los cardiomiocitos y ciertas neuronas, pueden persistir durante años. La proliferación y diferenciación de las células madre deben regularse estrictamente para asegurar el mantenimiento durante toda la vida de un número apropiado de células especializadas y del propio compartimento de células madre, en condiciones normales y cuando las células se reemplazan debido a una enfermedad o lesión.

20 [0009] En el presente documento se describe un método para el suministro de cualquier población de células madre, más especialmente para determinadas células madre o sus progenitores comprometidos, dirigiendo su suministro mediante inyección directa o mediante estrategias de injerto al depósito de nichos de células madre que dan lugar al hígado y al páncreas. Para una discusión sobre los métodos de injerto y los «efectos alimentadores» en cultivos de células madre, consulte las solicitudes de patente EE. UU N.º 12/213.100 y 13/102.939.

25 [0010] El hígado, el árbol biliar y el páncreas son órganos endodérmicos del intestino medio fundamentales para gestionar el metabolismo del glucógeno y los lípidos, la desintoxicación de xenobióticos, el procesamiento de

nutrientes para una utilización óptima, la regulación de las necesidades energéticas y la síntesis de diversos factores que van desde proteínas de coagulación hasta proteínas transportadoras (p. ej., AFP, albúmina, transferrina). La integridad del cuerpo depende en gran medida de las funciones del hígado, el árbol biliar y el páncreas, y una insuficiencia en cualquiera de ellos, especialmente en el hígado, resulta en una muerte rápida. En los últimos años se ha hecho evidente que estos tejidos comprenden linajes madurativos de células que se encuentran en asociaciones de células epiteliales-mesenquimales. Cada árbol de linaje comienza con una célula madre epitelial (por ejemplo, una célula madre hepática) asociada a una célula madre mesenquimales (por ejemplo, un angioblasto).

[0011] Estas dan lugar a descendientes celulares que maduran de forma coordinada. El proceso de maduración genera células epiteliales y mesenquimales que cambian paso a paso con respecto a su morfología, ploidía, potencial de crecimiento, biomarcadores, expresión génica y otros rasgos fenotípicos. Las funciones hepática y pancreática son la suma neta de las propiedades fenotípicas de todas las células en todos los linajes de maduración. En la tabla 1 proporcionamos un ejemplo representativo de esto al resumir las propiedades fenotípicas de las células parenquimatosas dentro del hígado y en diferentes etapas de linaje de maduración. Se supone que existen etapas de linaje comparables desde las células madre o progenitores hasta las células maduras y existentes en el páncreas, pero estos aún no se han definido completamente.

[0012] El páncreas se ubica retroperitonealmente y proporciona enzimas digestivas al duodeno y hormonas que regulan el metabolismo. El órgano es particularmente sensible a la manipulación mecánica y tiene una propensión a liberar localmente sus enzimas lo que provoca autólisis. Esta tendencia ha limitado los tipos de cirugía que se pueden realizar con este órgano, incluida la terapia celular para una enfermedad o afección pancreática. El hígado es menos sensible a la manipulación manual que el páncreas, pero acceder a él requiere cirugía abdominal o laparoscopia o acceso a través del árbol biliar por endoscopia.

[0013] En el presente documento se describe la introducción de células en el hígado y el páncreas sin alterar físicamente o comprometer la integridad física de estos órganos.

Resumen de la invención

[0014] El alcance de esta invención está definido por las reivindicaciones. Las realizaciones de la descripción relativas a métodos de tratamiento no están cubiertas por las reivindicaciones. Cualquier «realización» o «ejemplo» que se divulgue en la descripción pero que no esté cubierto por las reivindicaciones debe considerarse tal como se presenta solo con fines ilustrativos.

[0015] En una realización de la presente invención, se proporciona una suspensión de células madre/progenitores para su uso en el tratamiento de una disfunción o afección hepática, en la que el tratamiento comprende: introducir la suspensión en o sobre una pared del árbol biliar de un sujeto que padece la disfunción o afección hepática, en la que una parte de las células introducidas se instala en al menos una parte del hígado como células hepáticas maduras *in vivo*, tratando así la disfunción o afección hepática, en la que las células madre/progenitores son células madre de árbol biliar o células madre hepáticas o progenitores comprometidos derivados de esas células madre, y en la que la suspensión se combina con uno o más biomateriales para formar un complejo matriz, en el que el uno o más biomateriales comprenden colágenos, moléculas de adhesión, proteoglicanos, hialuronanos, cadenas de glicosaminoglicanos, quitosano, alginato y polímeros sintéticos, biodegradables o biocompatibles, o combinaciones de los mismos. En el futuro, si hay éxito en el control de las células madre embrionarias o células iPS con respecto al potencial tumorigénico para que puedan usarse clínicamente, entonces también podrían administrarse de esta manera para el tratamiento de enfermedades del hígado o del páncreas.

[0016] La suspensión de células se puede combinar preferiblemente con uno o más factores de crecimiento (por ejemplo, R-espondina, factores de crecimiento de fibroblastos (FGF), factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor de crecimiento de células endoteliales vasculares (VEGF), factor de crecimiento tipo insulina I (IGF-1), factor de crecimiento tipo insulina II (IGF-2), oncostatina-M, factor inhibidor de la leucemia (LIF), transferrina, insulina, glucocorticoides, hormonas de crecimiento, estrógenos, andrógenos, hormonas tiroideas, hormonas hipofisarias y combinaciones de las mismas), células adicionales o combinaciones de las mismas, para formar un complejo de injerto.

[0017] Las células adicionales pueden comprender las células madre epiteliales y sus compañeros mesenquimales. Por ejemplo, células madre del árbol biliar (o células madre hepáticas), angioblastos y precursores de endotelio y células estrelladas o combinaciones de las mismas, y pueden obtenerse de una porción del árbol biliar de un sujeto que no esté enfermo o sea disfuncional y/o del árbol biliar de un donante no autólogo. El complejo de injerto (células + biomateriales + hormonas/factores de crecimiento) puede introducirse mediante cirugía laparoscópica o mediante endoscopia por inyección, mediante injerto en la superficie de los conductos biliares y con una cubierta biodegradable alrededor del(los) conducto(s), o mediante una esponja .

[0018] La invención reivindicada y las realizaciones adicionales descritas en este documento se basan en el entendimiento de que las poblaciones de células madre dentro del árbol biliar son los precursores que contribuyen

a la organogénesis del hígado y el páncreas. Los linajes de células comienzan dentro de nichos de células madre, glándulas peribiliares y progresan a células maduras dentro de los órganos. Las glándulas peribiliares por todo el árbol biliar contienen células que exhiben rasgos fenotípicos que lo que constituye una evidencia de linajes de maduración que van desde poblaciones de células madre en lo profundo de las paredes del conducto biliar (cerca de las capas fibromusculares) hasta células maduras cerca de los lúmenes de los conductos biliares y con proximidad al hígado o al páncreas. Estas células se han caracterizado y muestran cambios en los rasgos fenotípicos con la proximidad al órgano.

[0019] El árbol biliar es un objetivo lógico para el trasplante de células en terapias con células madre. Existe una red de células madre/progenitores organizados en linajes de maduración en un eje radial y un eje de proximal a distal dentro del árbol biliar y que contribuyen a la organogénesis del hígado y el páncreas a lo largo de la vida. Las ventajas de utilizar el árbol biliar como diana para el trasplante son muchas. Los procedimientos de trasplante se pueden realizar como procedimientos ambulatorios (por ejemplo, endoscopia) o como procedimientos quirúrgicos menores (laparoscopia). La estrategia permite el trasplante de células madre o células progenitoras con inmunogenicidad mínima (o nula) y, por lo tanto, proporciona el potencial de evitar los fármacos inmunosupresores para los pacientes. Los procedimientos implican estrategias de injerto, ya demostradas para facilitar el injerto en el órgano diana; en lugar del injerto de aproximadamente el 20 % en el hígado que ahora documentan muchos investigadores que realizan trasplantes de células por vía vascular, las estrategias de injerto dan como resultado casi el 100 % de injerto. Esto evita la distribución de células ectópicas, un problema grave en el trasplante de células por vía vascular, y optimiza el uso de las células del donante (es decir, evita la pérdida de células por muerte o por distribución de células ectópicas).

[0020] Las ventajas son especialmente profundas para el tratamiento del páncreas, ya que su sensibilidad a la manipulación manual ha evitado cualquier posibilidad de terapia celular directamente en el órgano. Las células madre trasplantadas en la porción del árbol biliar cerca del páncreas, el conducto común hepatopancreático, superan esta gran dificultad y permiten que las terapias con células madre para el páncreas se conviertan en una realidad.

Descripción de las figuras

[0021]

La figura 1 es un esquema del hígado, la vía biliar y el páncreas que muestra su conexión con el duodeno. Las glándulas peribiliares (GPB) intramurales y extramurales, los nichos de las células madre del árbol biliar, se encuentran por todo el árbol biliar. Las GPB intramurales se localizan en grandes cantidades dentro de las paredes de los conductos biliares, desde los sitios más internos dentro de los conductos biliares, sitios cercanos a las capas fibromusculares, hasta los sitios más cercanos a los lúmenes de los conductos biliares. Las células dentro de las GPB cerca de las capas fibromusculares están compuestas por los números más elevados de células que son muy primitivas (tienen altos niveles de genes de pluripotencia y genes de células madre y expresión mínima o nula de genes de células maduras). Con la transición a los lúmenes de los conductos biliares (el eje radial de maduración), la expresión del gen de pluripotencia se desvanece y la expresión de genes de células maduras aumenta.

El número de estas células madre primitivas es notablemente alto en todo el árbol biliar, con un promedio del 2-4 % de las células en estas GPB. Además, las GPB se encuentran en grandes cantidades, particularmente en los puntos de ramificación del árbol biliar. Se muestran algunos de esos sitios donde hay un gran número de GPB (se muestran esquemáticamente con las estrellas azules). Las GPB extramurales contienen principalmente células madre muy primitivas (altos niveles de pluripotencia y genes de células madre; niveles insignificantes de genes de células maduras) y están atadas a la superficie de los conductos biliares por un cordón de tejido. El mayor número de GPB se encuentra en el conducto común hepatopancreático cerca del duodeno, y contiene alrededor del 9 % de sus células como células madre muy primitivas. Por lo tanto, el árbol biliar es un verdadero «sistema de raíces» de células madre para el hígado y el páncreas.

La figura 2 es un esquema más detallado del conducto común hepatopancreático. La formación del hígado y el páncreas ocurre como una extensión de tejido del duodeno en dos sitios: el que forma el conducto pancreático dorsal; y el que forma el conducto pancreático ventral y el árbol biliar que conduce al hígado. La formación del intestino da como resultado un movimiento de torsión que hace oscilar el conducto pancreático ventral y el conducto biliar común 180 grados de manera que el «anlage» pancreático ventral, el tejido que dará lugar al páncreas ventral, se mueve a una posición por debajo de la del páncreas dorsal y el árbol biliar de conexión ahora se encuentra en el lado izquierdo del duodeno. Los conductos hepático y pancreático fusionados se denominan: «conducto común hepatopancreático».

Las GPB dentro del conducto común hepatopancreático contienen células madre del árbol biliar que pueden dar lugar al hígado y/o al páncreas. También es el sitio de mayor número de células madre pancreáticas, descendientes de células madre del árbol biliar y con rasgos fenotípicos que indican que ahora son células madre determinadas para el páncreas. Aunque también hay una subpoblación de células cualificadas para ser células madre hepáticas, el número de ellas aumenta con la progresión a lo largo del árbol biliar hasta las proximidades del hígado. Cabe señalar que incluso dentro del hígado, en los grandes conductos biliares intrahepáticos, existen GPB que contienen un pequeño porcentaje de células que son precursoras tanto del

hígado como del páncreas y también hay un pequeño porcentaje cualificado para ser células madre pancreáticas y otro conjunto cualificado para ser células madre hepáticas.

La figura 3 muestra variaciones representativas en las conexiones del conducto pancreático y el conducto biliar en la ampolla de Vater. Una de las variaciones más comunes tiene un tabique interpuesto. Existen variaciones en los seres humanos en la forma en que se fusionan los conductos hepático y pancreático. Esto influirá en cómo se puede realizar el trasplante en el conducto común hepatopancreático. Aquellos en los que hay una fusión completa de los dos (por ejemplo, canales comunes largos y cortos) servirán como sitio para la inyección/injerto de las células. Aquellos en los que hay un tabique interpuesto entre los dos o cuando hay canales completamente separados, serán los que requieran trasplante en el que sea relevante para el hígado o el páncreas.

La figura 4 es un diagrama de flujo que muestra una red de nichos de células madre y células progenitoras en el árbol biliar. Los nichos de células madre y células progenitoras se encuentran a lo largo del árbol biliar y se extienden hacia el hígado y el páncreas. Los puntos de inicio hipotéticos de estos nichos son las glándulas de Brunner, que se encuentran como glándulas submucosas dentro del duodeno. Estas glándulas no se encuentran en ningún otro lugar del intestino. En el pasado, se asumió que sus roles estaban asociados con facetas de funciones del estómago y el duodeno. Sin embargo, la estructura morfológica y los rasgos fenotípicos de las células dentro de las glándulas se superponen ampliamente con los de los rasgos de las células dentro de las GPB.

Las GPB se encuentran por todo el árbol biliar. Se encuentran en los conductos císticos que conducen a la vesícula biliar. Dentro de la vesícula biliar, no hay GPB y aquí hemos encontrado que las células madre y los progenitores se organizan de manera diferente en el sentido en que se localizan en las criptas (en patrones similares a criptas dentro del intestino) y dan lugar a células que maduran con la progresión hacia las partes superiores de las vellosidades dentro de la vesícula biliar.

Las GPB dentro del hígado se encuentran en los grandes conductos biliares intrahepáticos y estos se conectan anatómicamente a las placas ductales que se encuentran en los hígados fetales y neonatales y que hacen la transición a los canales de Hering que se encuentran en los hígados pediátricos y adultos. Las GPB, las placas ductales y los canales de Hering contienen células madre y progenitores.

Las GPB en los conductos comunes hepatopancreáticos cerca del duodeno hacen la transición a las glándulas del conducto pancreático dentro del páncreas. Con esta transición, las células se convierten por completo en progenitores comprometidos. Por lo tanto, solo hay células madre muy raramente dentro de los conductos pancreáticos o las glándulas del conducto pancreático. Más bien, las células madre del árbol biliar y las células madre pancreáticas se localizan esencialmente por completo dentro de las GPB que se encuentran en el conducto común hepatopancreático o en otras porciones del árbol biliar que son independientes del páncreas.

La figura 5 es un diagrama de flujo que muestra subpoblaciones de células madre/progenitores que dan lugar al hígado, el árbol biliar y el páncreas. Hay múltiples subpoblaciones de células madre y células progenitoras en todo el árbol biliar. Se muestran las de las GPB intramurales y las que son precursores del hígado o del páncreas (no se muestran las de la vesícula biliar). Se demuestran algunos de los cambios en los rasgos fenotípicos que ocurren dentro del eje radial en todo el árbol biliar (se muestran las primeras tres etapas). Luego se muestran las que se encuentran dentro del conducto común hepatopancreático con proximidad al páncreas (los linajes de células que descienden de las células madre pancreáticas). Alternativamente, están los descendientes de las células madre hepáticas que se encuentran en mayor número en las GPB en los grandes conductos biliares intrahepáticos y en transición a las placas ductales (fetales o neonatales) o canales de Hering (pediátricos o adultos). Los rasgos fenotípicos comunes a todas estas etapas de linaje de células madre y progenitoras son la citoqueratina 8 y 18 y el importador de yoduro de sodio (NIS).

La figura 6 es un esquema de linajes hipotéticos a lo largo de un eje de proximal a distal que comienza en el duodeno y termina con células maduras en el hígado o el páncreas. El eje radial de las etapas del linaje se complementa con un eje de proximal a distal de las etapas del linaje. Por tanto, el mayor número de células madre muy primitivas (altos niveles de expresión génica de pluripotencia y otros marcadores de células madre) se encuentra en el conducto común hepatopancreático cercano al duodeno. Con la progresión hacia los conductos pancreáticos, las GPB contienen un porcentaje cada vez mayor de células con marcadores indicativos de un destino pancreático; una vez dentro del conducto pancreático, hay pocos rasgos de células madre, si es que hay alguno, y solo rasgos de progenitores comprometidos y de intermediarios en linajes que progresan hacia células acinares o de islotes. Con la progresión a lo largo del árbol biliar (conducto común y luego conducto hepático común, etc.) hay un porcentaje creciente de células dentro de las GPB con marcadores indicativos de un destino hepático.

La figura 7 proporciona componentes selectos del medio de Kubota y del medio definido hormonalmente. La capacidad de mantener células madre y progenitores *ex vivo* depende del establecimiento de medios libres de suero, totalmente definidos, compuestos por los componentes esenciales requeridos por las células. El medio de Kubota (KM) se estableció como un medio totalmente definido sin suero para el mantenimiento *ex vivo* de células madre endodérmicas y progenitores. Ha demostrado ser eficaz para las células madre y los progenitores del hígado, las vías biliares, el páncreas y también del pulmón y, con algunas modificaciones, también para el intestino. El medio de Kubota no permite la supervivencia de células maduras, solo células madre y progenitores.

Los medios definidos para las células maduras requieren suplementación con factores adicionales, como se indica en la figura, y con adiciones específicas para destinos adultos específicos. Estos son los factores solubles necesarios para el proceso de diferenciación. Para un logro óptimo de la autorreplicación de las células madre

frente a la maduración a una célula adulta, el destino requiere el uso de sustrato de componentes de la matriz extracelular específicos de la etapa de linaje. Para la autorreplicación, los componentes de la matriz incluyen hialuronanos y formas de proteoglicanos con sulfatación mínima; para la madurez hacia estados de células adultas se requieren múltiples componentes de la matriz, idealmente los que se encuentran en los andamios de biomatriz, extractos de matriz derivados del tejido adulto.

La figura 8 muestra cultivos de células madre de árboles biliares puestos en placas sobre plástico y en medio de Kubota. En estas condiciones, surgen dos categorías principales de células madre de los árboles biliares: las células de tipo 2 expresan EpCAM en todas las células. Las células de tipo 1 no expresan EpCAM pero adquieren la expresión en los bordes de las colonias, sitios en los que experimentan una ligera diferenciación. Las células de tipo 1 dan lugar a células de tipo 2 como se muestra morfológicamente en la figura 8A.

La figura 9 ilustra gráficamente la estrategia aquí descrita para la terapia con células madre del hígado o del páncreas usando una estrategia endoscópica. Si se está tratando el páncreas, el injerto se colocará dentro de las paredes o se colocará como parche sobre las paredes del conducto común hepatopancreático. Si se está tratando el hígado, entonces el endoscopio se moverá al conducto común y posiblemente al conducto hepático común y allí se injertará en la pared del conducto.

La figura 10 es la inmunohistoquímica de la vesícula biliar humana que demuestra la ubicación de las células madre y los progenitores en las criptas.

Descripción detallada de la invención

[0022] La diabetes es una enfermedad genética que afecta al páncreas y que se puede tratar mediante estrategias de terapia celular. (La diabetes es simplemente un representante de una afección que puede tratarse mediante la estrategia de la invención, pero debe tenerse en cuenta que cualquier afección o enfermedad hepática puede tratarse mediante un proceso similar). La incidencia global de la diabetes mellitus ha aumentado drásticamente durante los últimos años y sigue aumentando. La búsqueda de terapias curativas que normalicen los niveles de glucosa en sangre y proporcionen independencia de las terapias de insulina exógena afecta a los pacientes con diabetes tipo 1 (DT1) y a un subconjunto significativo de pacientes con diabetes tipo 2 (DT2) que tienen una deficiencia funcional en la producción de insulina. Se ha intentado el trasplante de islotes, pero el enfoque se ha visto restringido por el rendimiento limitado de páncreas de donantes de calidad que se pueden utilizar para aislar islotes. De este modo, se han realizado intentos para identificar una o más poblaciones precursoras que pueden tener un linaje restringido a células de islotes y, por tanto, constituir un suministro casi ilimitado y reproducible de islotes funcionales y trasplantables.

[0023] En el pasado, las células madre determinadas para el páncreas no se habían considerado una opción debido a los hallazgos de que en el tejido pancreático posnatal solo hay células madre pancreáticas muy raramente y, en cambio, esencialmente solo progenitores comprometidos. Los progenitores comprometidos en el páncreas se encuentran en los conductos pancreáticos, particularmente en las glándulas del conducto pancreático (GCP). El fenotipo de estos progenitores comprometidos y sus contribuciones reales al compartimento endocrino del páncreas siguen siendo objeto de un debate activo, pero en general se acepta que estas son las principales poblaciones precursoras de los islotes y que se encuentran dentro del páncreas propiamente dicho.

[0024] Recientemente, se identificó una nueva fuente de precursores de islotes en árboles biliares en donantes de todas las edades. Ver solicitud de patente EE. UU. N.º 12/926.161. Se ha encontrado que el árbol biliar contiene múltiples subpoblaciones de determinadas células madre con potencial de expansión indefinido en cultivo y que pueden madurar hacia hepatocitos, colangiocitos o islotes dependiendo del microambiente *in vitro* o *in vivo* (se supone, pero aún no se ha demostrado, que las células madre también pueden dar lugar a células acinares).

[0025] Las glándulas peribiliares (GPB) son nichos de células madre que se encuentran dentro de las paredes de los conductos biliares en todo el árbol biliar ramificado desde el duodeno hasta el hígado y el páncreas. Ocurren en grandes cantidades en los puntos de ramificación del árbol biliar y se concentran especialmente en los grandes conductos biliares intrahepáticos y en el conducto común hepatopancreático cerca del duodeno. Las GPB forman conexiones anatómicas directas con reservorios de células madre dentro del hígado, las placas ductales de hígados fetales y neonatales y esa transición a los canales de Hering de hígados pediátricos y adultos, y a reservorios de progenitores comprometidos, las glándulas del conducto pancreático (GCP), dentro del páncreas; esta red es evidente en personas de todas las edades. La red de nichos que contienen células madre y/o progenitores comprometidos da como resultado una red continua de células madre que contribuyen a la formación del hígado, el árbol biliar y el páncreas, lo que respalda la hipótesis de la organogénesis continua del hígado, el árbol biliar y el páncreas durante toda la vida.

[0026] Los mayores números de GPB, aquellos que se encuentran en el conducto común hepatopancreático, se conectan anatómicamente a las GPB que hacen la transición en sus constituyentes celulares con progresión hacia el hígado o el páncreas. Las células dentro de las GPB se transforman de poblaciones de células madre homogéneas en los conductos comunes hepatopancreáticos (o los grandes conductos biliares intrahepáticos) a otras dominadas por progenitores que tienen un destino celular maduro particular: células parenquimatosas hepáticas maduras frente a células maduras del conducto biliar frente a células maduras del páncreas, dependiendo de la ubicación de las GPB dentro del árbol biliar extrahepático.

- 5 [0027] Las transiciones ocurren a lo largo de dos ejes superpuestos: un eje radial y un eje de proximal a distal y la progresión ocurre hipotéticamente en una «forma de cinta transportadora» análoga a la del intestino. El *eje radial* comienza con células madre primitivas ubicadas en GPB intramurales en lo profundo de las paredes de los conductos biliares en sitios cercanos a la capa fibromuscular y termina con células maduras en los lúmenes de los conductos biliares. El eje radial cerca del páncreas muestra transiciones a células de tipo pancreático; que cerca del hígado hacen la transición a células parenquimatosas hepáticas maduras; los que están en el medio, dan como resultado células maduras con rasgos de conductos biliares.
- 10 [0028] El *eje de proximal a distal* progresa desde las GPB que contienen células madre primitivas próximas al duodeno y progresa a lo largo del árbol biliar hasta las GPB ubicadas dentro de los grandes conductos biliares intrahepáticos y de allí a los canales de Hering dentro del acino hepático; contienen una mezcla de células madre y progenitores comprometidos. El proceso de maduración ocurre también desde las células madre en las GPB en el conducto común hepatopancreático cerca del duodeno hasta las glándulas del conducto pancreático (GCP)
- 15 dentro del páncreas y que contienen solo progenitores pancreáticos comprometidos. Las GPB más cercanas al duodeno contienen células madre primitivas que expresan marcadores de pluripotencia (Nanog, OCT4, SOX2, SALL4, KLF4), proliferación (Ki67) y compromiso hepatopancreático temprano (SOX17, SOX9, PDX1, LGR5) pero no expresan marcadores intermedios como EpCAM o marcadores maduros como insulina o albúmina. Con la progresión a lo largo de los ejes de maduración, hay desvanecimiento y luego pérdida de genes de pluripotencia y marcadores de proliferación, mantenimiento de SOX9 pero pérdida de PDX1 para la progresión al hígado, o pérdida de SOX 17, para la progresión al páncreas. EpCAM se activa en células en etapas intermedias de la maduración y va al hígado, las vías biliares o el páncreas. Los marcadores intermedios que van hacia el hígado incluyen albúmina y alfafetoproteína (AFP), mientras que los que van hacia el páncreas incluyen NGN 3, MUC 6 e insulina. Ver figura 5.
- 20 [0029] Las células madre del árbol biliar pueden aislarse mediante inmunoselección o mediante selección de cultivo. Los marcadores identificados hasta la fecha y mediante los cuales se podría realizar la inmunoselección para subpoblaciones de células madre del árbol biliar de suspensiones celulares del árbol biliar incluyen la molécula de adhesión de células epiteliales (EpCAM), LGR5, NCAM, CD44 (receptor de hialuronano) y CXCR4. Para la selección del cultivo, el tejido del árbol biliar se prepara como una suspensión celular y luego se coloca en placas sobre plástico de cultivo y en medio de Kubota sin suero. Los detalles de estos protocolos se dan a continuación.
- 25 [0030] En condiciones de expansión, las células madre derivadas del árbol biliar humano (hBTSC) pueden proliferar durante meses como células indiferenciadas, mientras que los precursores derivados del páncreas se comportan como progenitores comprometidos y experimentan solo aproximadamente 8-10 divisiones, pero luego pasan por una diferenciación endocrina parcial. Un medio hormonalmente definido (HDM) adaptado para la diferenciación de las células en islotes que se utiliza en combinación con la incrustación de las células en mezclas de componentes de la matriz que se encuentran asociados con los islotes *in vivo* da como resultado agregados celulares, esferoides, con características ultraestructurales, electrofisiológicas y funcionales de neoislotes. Estos neoislotes han podido rescatar animales diabéticos al permitirles producir insulina. Por lo tanto, las células madre derivadas de las glándulas peribiliares hacen la transición a progenitores comprometidos de la glándula del conducto pancreático como parte de la organogénesis pancreática continua a lo largo de la vida.
- 30 [0031] La enseñanza descrita en el presente documento se basa en la comprensión de que los tratamientos del páncreas, incluidas las formas de terapia celular, pueden tomar como blanco el conducto común hepatopancreático y estos tratamientos modificarían o regularían las células que dan origen al páncreas. Los tratamientos podrían administrarse al conducto común hepatopancreático mediante cirugía laparoscópica o endoscópica o colocando el injerto en forma de hidrogel alrededor del exterior del conducto junto con una cubierta que forma un manguito alrededor del conducto y que se pega quirúrgicamente al conducto. Una vez liberadas, las células «maduran» y migran, en forma de cinta transportadora, al páncreas, donde realizan funciones «pancreáticas», reemplazando o complementando al páncreas enfermo o disfuncional. De esta manera, el páncreas per se no se ve perturbado al introducir las células. Más bien, las células necesarias se introducen «corriente arriba» y se les permite migrar a su ubicación nativa dentro del páncreas.
- 35 [0032] La presente invención está dirigida a tecnologías de injerto que implican el suministro de células trasplantadas como un agregado en o armazones que se pueden ubicar en el tejido enfermo para promover la proliferación y el injerto necesarios. Por tanto, la invención tiene en cuenta no solo el tipo de célula a trasplantar, sino también el tipo de célula en combinación con los biomateriales apropiados y el método de injerto para las terapias de trasplante más eficaces y exitosas. Las tecnologías de injerto de la presente invención se pueden traducir a usos terapéuticos en pacientes y proporcionan tratamientos alternativos para la medicina regenerativa para reconstituir tejido enfermo o disfuncional. De hecho, aunque la presente solicitud se ha redactado en gran medida con la diabetes como representante de una estrategia para el tratamiento con injerto en el conducto común hepatopancreático, la estrategia también es aplicable para el tratamiento de enfermedades hepáticas mediante el injerto en la pared del conducto biliar en una región diferente del árbol biliar, una cercana al hígado. Esta última estrategia, es decir, el uso en el tratamiento de una disfunción o afección hepática, define la presente invención, que se especifica adicionalmente en las reivindicaciones.
- 40 [0031] La enseñanza descrita en el presente documento se basa en la comprensión de que los tratamientos del páncreas, incluidas las formas de terapia celular, pueden tomar como blanco el conducto común hepatopancreático y estos tratamientos modificarían o regularían las células que dan origen al páncreas. Los tratamientos podrían administrarse al conducto común hepatopancreático mediante cirugía laparoscópica o endoscópica o colocando el injerto en forma de hidrogel alrededor del exterior del conducto junto con una cubierta que forma un manguito alrededor del conducto y que se pega quirúrgicamente al conducto. Una vez liberadas, las células «maduran» y migran, en forma de cinta transportadora, al páncreas, donde realizan funciones «pancreáticas», reemplazando o complementando al páncreas enfermo o disfuncional. De esta manera, el páncreas per se no se ve perturbado al introducir las células. Más bien, las células necesarias se introducen «corriente arriba» y se les permite migrar a su ubicación nativa dentro del páncreas.
- 45 [0032] La presente invención está dirigida a tecnologías de injerto que implican el suministro de células trasplantadas como un agregado en o armazones que se pueden ubicar en el tejido enfermo para promover la proliferación y el injerto necesarios. Por tanto, la invención tiene en cuenta no solo el tipo de célula a trasplantar, sino también el tipo de célula en combinación con los biomateriales apropiados y el método de injerto para las terapias de trasplante más eficaces y exitosas. Las tecnologías de injerto de la presente invención se pueden traducir a usos terapéuticos en pacientes y proporcionan tratamientos alternativos para la medicina regenerativa para reconstituir tejido enfermo o disfuncional. De hecho, aunque la presente solicitud se ha redactado en gran medida con la diabetes como representante de una estrategia para el tratamiento con injerto en el conducto común hepatopancreático, la estrategia también es aplicable para el tratamiento de enfermedades hepáticas mediante el injerto en la pared del conducto biliar en una región diferente del árbol biliar, una cercana al hígado. Esta última estrategia, es decir, el uso en el tratamiento de una disfunción o afección hepática, define la presente invención, que se especifica adicionalmente en las reivindicaciones.
- 50 [0032] La presente invención está dirigida a tecnologías de injerto que implican el suministro de células trasplantadas como un agregado en o armazones que se pueden ubicar en el tejido enfermo para promover la proliferación y el injerto necesarios. Por tanto, la invención tiene en cuenta no solo el tipo de célula a trasplantar, sino también el tipo de célula en combinación con los biomateriales apropiados y el método de injerto para las terapias de trasplante más eficaces y exitosas. Las tecnologías de injerto de la presente invención se pueden traducir a usos terapéuticos en pacientes y proporcionan tratamientos alternativos para la medicina regenerativa para reconstituir tejido enfermo o disfuncional. De hecho, aunque la presente solicitud se ha redactado en gran medida con la diabetes como representante de una estrategia para el tratamiento con injerto en el conducto común hepatopancreático, la estrategia también es aplicable para el tratamiento de enfermedades hepáticas mediante el injerto en la pared del conducto biliar en una región diferente del árbol biliar, una cercana al hígado. Esta última estrategia, es decir, el uso en el tratamiento de una disfunción o afección hepática, define la presente invención, que se especifica adicionalmente en las reivindicaciones.
- 55 [0032] La presente invención está dirigida a tecnologías de injerto que implican el suministro de células trasplantadas como un agregado en o armazones que se pueden ubicar en el tejido enfermo para promover la proliferación y el injerto necesarios. Por tanto, la invención tiene en cuenta no solo el tipo de célula a trasplantar, sino también el tipo de célula en combinación con los biomateriales apropiados y el método de injerto para las terapias de trasplante más eficaces y exitosas. Las tecnologías de injerto de la presente invención se pueden traducir a usos terapéuticos en pacientes y proporcionan tratamientos alternativos para la medicina regenerativa para reconstituir tejido enfermo o disfuncional. De hecho, aunque la presente solicitud se ha redactado en gran medida con la diabetes como representante de una estrategia para el tratamiento con injerto en el conducto común hepatopancreático, la estrategia también es aplicable para el tratamiento de enfermedades hepáticas mediante el injerto en la pared del conducto biliar en una región diferente del árbol biliar, una cercana al hígado. Esta última estrategia, es decir, el uso en el tratamiento de una disfunción o afección hepática, define la presente invención, que se especifica adicionalmente en las reivindicaciones.
- 60 [0032] La presente invención está dirigida a tecnologías de injerto que implican el suministro de células trasplantadas como un agregado en o armazones que se pueden ubicar en el tejido enfermo para promover la proliferación y el injerto necesarios. Por tanto, la invención tiene en cuenta no solo el tipo de célula a trasplantar, sino también el tipo de célula en combinación con los biomateriales apropiados y el método de injerto para las terapias de trasplante más eficaces y exitosas. Las tecnologías de injerto de la presente invención se pueden traducir a usos terapéuticos en pacientes y proporcionan tratamientos alternativos para la medicina regenerativa para reconstituir tejido enfermo o disfuncional. De hecho, aunque la presente solicitud se ha redactado en gran medida con la diabetes como representante de una estrategia para el tratamiento con injerto en el conducto común hepatopancreático, la estrategia también es aplicable para el tratamiento de enfermedades hepáticas mediante el injerto en la pared del conducto biliar en una región diferente del árbol biliar, una cercana al hígado. Esta última estrategia, es decir, el uso en el tratamiento de una disfunción o afección hepática, define la presente invención, que se especifica adicionalmente en las reivindicaciones.
- 65 [0032] La presente invención está dirigida a tecnologías de injerto que implican el suministro de células trasplantadas como un agregado en o armazones que se pueden ubicar en el tejido enfermo para promover la proliferación y el injerto necesarios. Por tanto, la invención tiene en cuenta no solo el tipo de célula a trasplantar, sino también el tipo de célula en combinación con los biomateriales apropiados y el método de injerto para las terapias de trasplante más eficaces y exitosas. Las tecnologías de injerto de la presente invención se pueden traducir a usos terapéuticos en pacientes y proporcionan tratamientos alternativos para la medicina regenerativa para reconstituir tejido enfermo o disfuncional. De hecho, aunque la presente solicitud se ha redactado en gran medida con la diabetes como representante de una estrategia para el tratamiento con injerto en el conducto común hepatopancreático, la estrategia también es aplicable para el tratamiento de enfermedades hepáticas mediante el injerto en la pared del conducto biliar en una región diferente del árbol biliar, una cercana al hígado. Esta última estrategia, es decir, el uso en el tratamiento de una disfunción o afección hepática, define la presente invención, que se especifica adicionalmente en las reivindicaciones.

Obtención de las células

5 [0033] De acuerdo con la invención, las poblaciones de células deseadas se pueden obtener directamente de un donante que tenga tejido y/o células «normales», «sanas», es decir, cualquier tejido y/o célula que no esté afectado o no padezca una enfermedad o disfunción. Por supuesto, dicha población celular puede obtenerse de una persona que sufre de una enfermedad o disfunción en un órgano, aunque de una parte del órgano que no se encuentra en dichas condiciones. Las células se pueden obtener de cualquier tejido de mamífero apropiado, independientemente de la edad, incluyendo tejido fetal, neonatal, pediátrico y adulto, preferiblemente tejido de la vesícula biliar o tejido biliar conectado a hígados y páncreas intactos.

15 [0034] Las células madre multipotentes del árbol biliar humano (hBTSC) son las células preferidas para este método de la invención y pueden aislarse de la vesícula biliar o de cualquier parte del tejido del árbol biliar, pero se encuentran en cantidades especialmente altas en las glándulas peribiliares y en los puntos de ramificación del árbol, particularmente en el conducto común hepatopancreático o en los grandes conductos biliares intrahepáticos. En aras de la claridad para esta solicitud, el término «célula madre del árbol biliar» se utilizará en el presente documento para hacer referencia a la célula madre o progenitora multipotente de mamífero de la invención, a las poblaciones de células que comprenden dichas células de la invención y a las poblaciones de células enriquecidas para las células de la invención. Ver solicitud de patente EE. UU. N.º 12/926.161.

20 [0035] Las vesículas biliares humanas no tienen glándulas peribiliares; sin embargo, contienen una población de células madre/progenitores dentro de las criptas mucosas y con características superpuestas de hBTSC. Por lo tanto, el término «células madre del árbol biliar» incluye también células madre/progenitores aislables de vesículas biliares humanas. Esto es una ventaja, dado que la extirpación de la vesícula biliar se realiza de forma rutinaria por muchas razones y con consecuencias negativas mínimas para el paciente y permite terapias con células autólogas o alogénicas dependiendo de la necesidad del paciente que está siendo tratado con terapia celular.

30 [0036] Las células madre de los árboles biliares se pueden diferenciar hacia múltiples destinos endodérmicos. De hecho, se puede inducir a las células madre a diferenciarse en tipos de células maduras de varios linajes endodérmicos, incluyendo el páncreas o el hígado. Para las células de los islotes pancreáticos, las células madre del árbol biliar se incuban con un medio que se modifica a partir del medio de Kubota preparado sin glucocorticoides y luego mediante suplementación con cobre (10^{-12} M), calcio (niveles aprox. 0.6 mM), factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF) 10 ng/ml, B27 al 2 %, ácido ascórbico 0.1 mM, ciclopamina 0.25 μ M y AR (ácido retinoico) 0.5 μ M. Después de 4-5 días, el bFGF se reemplaza con exendina-4 50 ng/ml. Los andamios de matriz para los injertos utilizados están compuestos por un 60 % de colágeno tipo IV y laminina (estos dos en una proporción de 1: 1) y un 40 % de hialuronanos, y también son eficaces con la adición de colágeno tipo VI y nidógeno a la mezcla de componentes de la matriz. También se pueden usar hialuronanos simples junto con la mezcla hormonal entendiendo que el proceso de restricción del linaje será más lento que con los hialuronanos junto con otros componentes de la matriz.

40 [0037] Las células también pueden obtenerse para diferentes terapias de poblaciones «por etapas de linaje» según la necesidad terapéutica. Por ejemplo, las células «maduras» de etapa tardía pueden ser preferidas en los casos en que existe la necesidad de una rápida adquisición de funciones ofrecidas solo por las células del linaje tardío, o si el receptor tiene un virus dependiente del linaje que infecta preferentemente las células madre y/o progenitores como ocurre con la hepatitis C o el virus del papiloma. En cualquier caso, se pueden usar células «progenitoras» para establecer cualquiera de las etapas de linaje de sus respectivos tejidos. Para obtener más información sobre las poblaciones de células hepáticas clasificadas por linaje y el método de aislamiento, consulte las solicitudes de patente EE. UU. N.º 11/560.049 y 12/213.100.

50 [0038] Las muestras de tejido del árbol biliar se pueden diseccionar quirúrgicamente a partir de hígados o páncreas obtenidos y luego rechazados para trasplante debido a razones como esteatosis; anomalías anatómicas o enfermedades vasculares importante; o se pueden obtener a partir de material de resección. Pueden ser de vesículas biliares extraídas por diversas razones. Luego, el tejido se divide en segmentos y se procesa adicionalmente. Los segmentos que son especialmente ricos en células madre del árbol biliar incluyen: los grandes conductos biliares intrahepáticos, el hilio, el conducto hepático común, el conducto cístico, el conducto común, el conducto hepatopancreático común y la vesícula biliar. Cada parte se puede seguir diseccionando en más en pedazos cortando a lo largo del diámetro longitudinal.

60 [0039] Se ha demostrado que las células madre del árbol biliar dan lugar a múltiples destinos endodérmicos, incluyendo las células del hígado, el árbol biliar y el páncreas. Como células madre primitivas, expresan genes de pluripotencia (Nanog, SOX2, KLF4, OCT4, SALL4); factores de transcripción endodérmica hepáticos y pancreáticos (p. ej., SOX17, SOX 9, FOXA2, PDX 1); y marcadores de superficie típicos de las células madre, incluyendo LGR5 (repetición rica en leucina que contiene receptor 5 acoplado a proteína G), CD44 (receptor de hialuronano), CD133 (prominina); CD56/molécula de adhesión de células neuronales o NCAM); y CXCR4 (receptor 4 de quimiocina CXC). A medida que comienzan a madurar hacia un destino pancreático o hepático, adquieren expresión de CD326/molécula de adhesión de células epiteliales o EpCAM.

[0040] Además, con la progresión en el linaje de maduración hacia el hígado, las células madre del árbol biliar pierden marcadores pancreáticos (p. ej., PDX1) y adquieren y luego aumentan de manera estable la expresión de marcadores de linaje temprano del hígado, como HNF6, HES1, alfafetoproteína (AFP) y albúmina.

[0041] Con la progresión madurativa hacia el páncreas, las células madre del árbol biliar pierden marcadores hepáticos (p. ej., SOX 17) pero no pancreáticos (p. ej., PDX1) y adquieren y luego aumentan de manera estable la expresión de marcadores de linaje temprano del páncreas (p. ej., NGN3, MUC6, insulina, amilasa). En particular, se sabe que PDX1 y NGN3 son esenciales para el desarrollo del páncreas y del páncreas endocrino, respectivamente.

[0042] Sin embargo, las células madre del árbol biliar no expresan (o solo expresan débilmente) marcadores de células maduras como los marcadores maduros de colangiocitos (p. ej., el receptor de secretina, CFTR, acuaporinas), hepatocitos (p. ej., tirosina aminotransferasa o TAT, transferrina o P450 «tardíos» como P450-3A4) o células de islotes (por ejemplo, glucagón, somatostatina, niveles altos de insulina). No expresan en absoluto los marcadores de células mesenquimales (p. ej., CD146, desmina), células endoteliales (p. ej., receptor de VEGF, CD31, factor de Van Willebrand) o células hematopoyéticas (p. ej., CD45). El patrón de expresión de los antígenos es estable durante toda la vida de los cultivos siempre que se mantengan en condiciones de autorreplicación constituidas por el medio de Kubota o su equivalente y con un sustrato de cultivo plástico o hialuronanos.

[0043] Estos rasgos fenotípicos se pueden determinar mediante ensayos de punto final y cuantitativos (q)-RT-PCR y mediante inmunohistoquímica de tejidos *in vivo*, de células recién aisladas o de células cultivadas. La coexpresión en las mismas células o en células dentro de la misma glándula peribiliar de múltiples marcadores de células madre endodérmicas/progenitores (p. ej., SOX 9, SOX17, PDX1, NGN3, FOXA2) es una característica única y sorprendente distintiva de los hallazgos con respecto a las células madre embrionarias (ES) que experimentan restricción de linaje hacia el páncreas y en las que estos factores de transcripción se observan secuencialmente, pero no todos al mismo tiempo. Además, la expresión de estos factores de transcripción está ausente en las células biliares maduras en la superficie luminal de los conductos biliares.

[0044] Las células madre del árbol biliar de la presente invención, como se explicó anteriormente, son células madre/progenitores que dan lugar a células maduras de los múltiples tejidos endodérmicos que incluyen hígado, árbol biliar y páncreas.

[0045] Las poblaciones de células madre del tejido del árbol biliar humano pueden aislarse mediante tecnologías de inmunoselección (por ejemplo, citometría de flujo, cribado y aislamiento de perlas magnéticas). Alternativamente, o además de la inmunoselección, las células madre del árbol biliar pueden identificarse y aislarse mediante tecnologías de selección de cultivo que comprenden el cultivo de tejido de las células en condiciones específicas. Por ejemplo, las suspensiones de células preparadas a partir del tejido del árbol biliar se pueden colocar sobre plástico o sobre (o incrustadas en) hialuronanos. En otras realizaciones, el plástico se recubre opcionalmente con componentes de matriz que se encuentran en tejidos embrionarios/fetales tales como colágeno tipo III o hialuronanos, o combinaciones de los mismos.

[0046] El medio utilizado para la selección de cultivos, el medio de Kubota sin suero o su equivalente, es fuertemente selectivo para la supervivencia y proliferación de las células madre del árbol biliar y sus células mesenquimales asociadas, angioblastos y precursores de células estrelladas, pero no es selectivo para células maduras de el árbol biliar. La esencia de este medio es que es cualquier medio basal sin cobre, nivel de calcio bajo (<0.5 mM), insulina, transferrina/Fe, ácidos grasos libres unidos a albúmina purificada y, opcionalmente, también lipoproteínas de alta densidad.

[0047] El medio de Kubota o su equivalente no contienen suero y solo contienen una mezcla definida y purificada de hormonas, factores de crecimiento y nutrientes. Más específicamente, el medio está compuesto por un medio basal sin suero (p. ej., RPMI 1640 o DME/F12) que no contiene cobre, con bajo contenido de calcio (<0.5 mM) y complementado con insulina (5 µg/ml), transferrina/Fe (5 µg/ml), lipoproteínas de alta densidad (10 µg/ml), selenio (10⁻¹⁰ M), zinc (10⁻¹² M), nicotinamida (5 µg/ml) y una mezcla de ácidos grasos libres purificados unidos a una forma de albúmina purificada. Los métodos detallados para la preparación de este medio se han publicado en otros lugares, por ejemplo, Kubota H, Reid LM, Proceedings of the National Academy of Sciences (EE. UU.) 2000; 97: 12132-12137.

[0048] Además de las células requeridas para proporcionar la «función» per se de un órgano interno enfermo o disfuncional, el injerto incluye preferiblemente componentes celulares adicionales que preferiblemente imitan las categorías de células que comprenden la relación de células epiteliales-mesenquimales, la base celular de todos los tejidos. Las relaciones entre las células epiteliales y mesenquimales son distintas en cada etapa del linaje de maduración. Las células madre epiteliales se asocian con las células madre mesenquimales y su maduración se coordina entre sí a medida que maduran en todos los tipos de células adultas dentro de un tejido. Las interacciones entre las dos están mediadas por señales paracrinas que comprenden señales solubles (por ejemplo, factores de crecimiento) y componentes de la matriz extracelular.

[0049] De acuerdo con una realización de la invención, las poblaciones de células aisladas se combinan con señales paracrinas conocidas (comentadas más adelante) y parejas epiteliales-mesenquimales «nativas», según sea necesario, para optimizar el injerto. Por tanto, los injertos comprenderán las células madre epiteliales (por ejemplo, las células madre hepáticas) mezcladas con sus socios mesenquimales nativos (por ejemplo, angioblastos). Para un injerto de nicho celular amplificador de tránsito, los hepatoblastos pueden asociarse con precursores de células estrelladas hepáticas y/o endotelio. En algunos injertos, se puede hacer una mezcla de los dos conjuntos de socios epiteliales-mesenquimales: células madre hepáticas con angioblastos y hepatoblastos con precursores de células estrelladas hepáticas y precursores de células endoteliales para optimizar el establecimiento de las células hepáticas en el tejido del huésped. El microambiente del injerto en el que se siembran las células estará compuesto por las señales paracrinas, la matriz y las señales solubles, que se producen en las etapas de linaje relevantes utilizadas para el injerto.

[0050] Los injertos también se pueden adaptar para controlar un estado de la enfermedad. Por ejemplo, para minimizar los efectos de los virus dependientes del linaje (p. ej., ciertos virus de la hepatitis) que infectan las etapas tempranas del linaje y luego maduran coordinadamente con las células huésped, se pueden preparar injertos de la etapa tardía del linaje (p. ej., hepatocitos y sus parejas nativas, las células endoteliales sinusoidales) que no son permisivas para la infección viral por parte de algunos virus.

[0051] Un ejemplo de un injerto de células madre, usando terapias con células pancreáticas como modelo, comprendería las células madre del árbol biliar y los angioblastos. Por el contrario, un injerto de células hepáticas «maduras» comprendería hepatocitos, células endoteliales maduras y células estrelladas maduras. Para una discusión de la relación de células epiteliales-mesenquimales en el hígado, ver la solicitud de patente EE. UU. N.º 11/753.326.

Materiales de injerto

[0052] El uso de biomateriales según la invención proporciona un andamio para el soporte celular y las señales que ayudan al éxito de los procesos de injerto y regeneración. A medida que el tejido de los órganos sólidos de un organismo experimenta una remodelación constante, las células disociadas tienden a reformar sus estructuras nativas en condiciones ambientales adecuadas. Para una discusión sobre los métodos de injerto adecuados para la solicitud con la presente invención, ver solicitud de patente EE. UU. N.º 13/102.939.

[0053] En todos los tejidos, la señalización paracrina comprende señales tanto solubles (innumerables factores de crecimiento y hormonas) como insolubles (señales de la matriz extracelular (MEC)). Los efectos sinérgicos entre los factores de la matriz solubles e insolubles dictan el crecimiento y las respuestas diferenciadoras de las células trasplantadas. Los componentes de la matriz son los determinantes primarios de la unión, la supervivencia, la forma celular (así como la organización del citoesqueleto) y la estabilización de los receptores de la superficie celular necesarios que ceban las células para responder a señales extracelulares específicas.

[0054] Se sabe que la MEC regula la morfología celular, el crecimiento y la expresión génica celular. Sustancias químicas específicas de tejidos similares a las *in vivo* se pueden lograr *ex vivo* mediante el uso de componentes de MEC purificados. Muchos de estas están disponibles comercialmente y son propicias para que el comportamiento celular imite el comportamiento *in vivo*.

[0055] Los componentes de matriz adecuados incluyen colágenos, moléculas de adhesión (por ejemplo, moléculas de adhesión celular, uniones estrechas, moléculas de adhesión basal), elastinas y carbohidratos que forman proteoglicanos (PG) y glicosaminoglicanos (GAG). Cada una de estas categorías define un género de moléculas. Por ejemplo, hay al menos 25 tipos de colágeno presentes, cada uno codificado por genes distintos y con una regulación y funciones únicas. Los diversos componentes de la matriz que son proteínas (por ejemplo, colágenos, proteínas de unión) generalmente están disponibles comercialmente. Las formas específicas de tejido de glicosaminoglicanos (p. ej., heparinas específicas de tejido) pueden purificarse a partir de fuentes naturales y/o algunas pueden sintetizarse. Sin duda, los injertos pueden tener éxito sin los glicosaminoglicanos, pero pueden tardar más y pueden no tener algunas de las especificidades que dictan los glicosaminoglicanos.

[0056] Los biomateriales adicionales que podrían ofrecer métodos de injerto incluyen materiales naturales inorgánicos como el quitosano y el alginato, así como muchos polímeros sintéticos, biodegradables y biocompatibles. Estos materiales a menudo se «solidifican» (por ejemplo, se convierten en un gel) mediante métodos que incluyen gelificación térmica, fotorreticulación o reticulación química. Sin embargo, con cada método, es necesario tener en cuenta el daño celular (por ejemplo, por rangos de temperatura excesivos, exposición a los rayos UV). Para una discusión más detallada sobre biomateriales, específicamente el uso de hidrogeles de hialuronano, ver la solicitud de patente EE. UU. N.º 12/073.420.

[0057] La selección particular por la que los componentes de la matriz pueden estar guiados por gradientes *in vivo*, por ejemplo, ese cambio del compartimento de células madre a las células en etapa de linaje tardío. Los biomateriales de injerto imitan preferiblemente la química de la matriz de las etapas de linaje particulares deseadas

para el injerto. La eficacia de la mezcla elegida de componentes de la matriz puede ensayarse en estudios *ex vivo* que utilizan componentes de matriz purificados y señales solubles, muchos de los cuales están disponibles comercialmente, de acuerdo con el protocolo de buenas prácticas de fabricación (GMP). Los biomateriales seleccionados para el injerto provocan preferiblemente las respuestas de crecimiento y diferenciación apropiadas requeridas por las células para un trasplante exitoso.

[0058] En cuanto al hígado, la química de la matriz asociada con las células madre hepáticas está presente en las glándulas peribiliares de los grandes conductos biliares intrahepáticos y en las placas ductales (hígados fetales y neonatales) que hacen la transición para convertirse en los canales de Hering (hígados pediátricos y adultos). Las etapas tardías del linaje de las células parenquimatosas hepáticas se encuentran en el espacio de Disse, el área ubicada entre el parénquima y el endotelio u otras formas de células mesenquimales.

[0059] Además de un cambio en la madurez celular dentro de las diferentes zonas del hígado, también se observa un cambio en la química de la matriz. La química de la matriz en las placas ductales o canales de Hering (y potencialmente las glándulas peribiliares intrahepáticas) es similar a la que se encuentra en los hígados fetales y consiste en colágenos de tipo III y V (sin colágeno de tipo I), hialuronanos, formas de laminina que se unen a integrina alfa6/beta4 (por ejemplo, laminina 5) y formas de proteoglicanos de condroitín sulfato (CS-PG) que tienen una sulfatación mínima.

[0060] Esta zona cambia a una química de matriz diferente en la región adyacente a los canales de Hering y asociada con hepatoblastos y consiste en colágenos de tipo IV, V y VI, hialuronanos, formas de laminina que se unen a la integrina alfa/beta1, CS-PG más sulfatado y proteoglicanos de heparán sulfato débilmente sulfatados (HS-PG).

[0061] El compartimento de la célula amplificadora de tránsito hace la transición a etapas de linaje aún más tardías, y con cada etapa sucesiva, la química de la matriz se vuelve más estable (por ejemplo, colágenos altamente estables), se renueva menos y contiene formas con mayor nivel de sulfatación de GAG y PG. Las células más maduras están asociadas con formas de heparina-PG (HP-PG), lo que significa que innumerables proteínas (por ejemplo, factores de crecimiento y hormonas, proteínas de coagulación) pueden unirse a la matriz y mantenerse estables allí mediante la unión a los patrones de sulfatación específicos y discretos en los GAG. Por lo tanto, la química de la matriz hace la transición desde su punto de inicio en el nicho de células madre que tiene una química de matriz lábil asociada con una alta renovación y una sulfatación mínima (y, por lo tanto, una unión mínima de señales de una manera estable cerca de las células) hasta químicas de matriz estables con cantidades crecientes de sulfatación (y, por lo tanto, niveles cada vez más altos de unión de señal cerca de las células).

[0062] Con respecto al páncreas, que se refiere a una realización de referencia descrita en el presente documento, las transiciones en la química de la matriz de células madre a células maduras dan lugar a distintas composiciones químicas asociadas con las células acinares frente a los islotes. Entre las distinciones conocidas se encuentran que los islotes son especialmente ricos en formas de proteoglicanos de heparán sulfato (glicanos y sindecanos), en nidógeno y en colágenos de red (por ejemplo, tipo IV, VI), mientras que las células acinares son ricas en formas de proteoglicanos de condroitín sulfato, fibronectinas y varios colágenos fibrilares. Además, la química de la matriz asociada con las células madre/progenitores pancreáticos está presente en las glándulas peribiliares del conducto hepatopancreático. Las matrices asociadas con las etapas tardías del linaje de las células parenquimatosas pancreáticas se encuentran en los conductos pancreáticos y las glándulas del conducto pancreático. Las matrices de etapas maduras incluyen las que están en contacto con el tejido acinar pancreático y las células de los islotes pancreáticos.

[0063] Por tanto, la presente invención toma en consideración que la química de las moléculas de la matriz cambia con las etapas de maduración, con la edad del huésped y con los estados patológicos. El injerto con los materiales apropiados debería optimizar el injerto de células trasplantadas en un tejido, evitar la dispersión de las células a sitios ectópicos, minimizar los problemas de embolización y mejorar la capacidad de las células para integrarse dentro del tejido lo más rápidamente posible. Además, los factores dentro del injerto también se pueden elegir para minimizar los problemas de inmunogenicidad.

[0064] En el caso de hígados humanos o de tejido del árbol biliar humano, las células pueden cultivarse en condiciones libres de suero. Las células madre hepáticas humanas o los hepatoblastos (hHpSC o hHB) se pueden injertar por sí mismos o en combinación con angioblastos/células endoteliales. Las células pueden suspenderse en HA tiolado y químicamente modificado (CMHA-S o Glycosil, Glycosan BioSystems, Salt Lake City, UT) y en KM (medio de Kubota) y cargarse en una de las jeringas de un juego de jeringas emparejadas. La otra jeringa se puede cargar con un reticulante, por ejemplo, poli(etilenglicol) diacrilato o PEGDA, preparado en KM. Las dos jeringas están acopladas mediante una aguja que se ensancha en dos conexiones de cierre luer. Por tanto, las células en el hidrogel y el reticulante pueden emerger a través de una aguja para permitir la reticulación rápida de CMHA-S en un gel tras la inyección.

[0065] La suspensión celular en CMHA-S y reticulante puede inyectarse directamente o injertarse en el tejido diana utilizando un bolsillo hecho de tejido (por ejemplo, epiplón) o de un material sintético (por ejemplo, seda de araña).

Alternativamente, las células pueden encapsularse en Glycosil sin el uso de un reticulante PEGDA permitiendo que la suspensión permanezca aireada durante la noche, lo que conduce a la reticulación del enlace disulfuro en un hidrogel viscoso blando. Además, pueden añadirse otros macromonómeros modificados con tiol, por ejemplo, gelatina-DTPH, heparina-DTPH, condroitín sulfato-DTPH, para dar una red covalente que imita la química de la matriz de nichos particulares *in vivo*. En otra manifestación, los polipéptidos que contienen residuos de cisteína o tiol se pueden acoplar al PEGDA antes de añadir el PEGDA al Glycosil, permitiendo que se incorporen señales polipeptídicas específicas en el hidrogel. Alternativamente, cualquier polipéptido, factor de crecimiento o componente de la matriz, como una isoforma de colágeno, laminina, vitronectina, fibronectina, etc., se puede agregar al Glycosil y la solución celular antes de la reticulación, lo que permite la captura pasiva de importantes componentes polipeptídicos en el hidrogel.

[0066] Hialuronanos: Los hialuronanos (HA) son miembros de una de las 6 grandes familias de glicosaminoglicanos (GAG) de carbohidratos, todos polímeros de un ácido urónico y un aminoazúcar [1-3]. Las otras familias comprenden los condroitín sulfatos (CS, [ácido glucurónico-galactosamina]_x), dermatán sulfatos (DS, [ácido glucurónico-galactosamina]_x más altamente sulfatado), heparán sulfatos (HS, [ácido glucurónico-glucosamina]_x), heparinas (HP, [ácido glucurónico-glucosamina]_x más altamente sulfatado) y queratán sulfatos (KS, [galactosa-N-acetilglucosamina]_x).

[0067] Los HA están compuestos por una unidad de disacárido de glucosamina y ácido glucurónico unidos por enlaces β1-4, β1-3. Biológicamente, el glicano polimérico se compone de repeticiones lineales de unos pocos cientos hasta 20 000 o más unidades de disacárido. Los HA tienen masas moleculares que suelen oscilar entre 100 000 Da en suero y hasta 2 000 000 en el líquido sinovial y hasta 8 000 000 en el cordón umbilical y el humor vítreo. Debido a su alta densidad de carga negativa, el HA atrae iones positivos, atrayendo el agua. Esta hidratación permite al HA soportar cargas muy compresivas. Los HA se encuentran en todos los tejidos y fluidos corporales, y son más abundantes en el tejido conectivo blando, y la capacidad natural de transporte de agua se presta a la especulación sobre otras funciones, incluidas las influencias de la forma y función de los tejidos. Se encuentra en la matriz extracelular, en la superficie celular y dentro de la célula.

[0068] Las formas nativas de la química de HA son diversas. La variable más común es la longitud de la cadena. Algunos son de alto peso molecular debido a que tienen largas cadenas de carbohidratos (p. ej., los que se encuentran en la cresta de las aves gallináceas y en los cordones umbilicales) y otros son de bajo peso molecular debido a que tienen cadenas cortas (p. ej., de cultivos bacterianos). La longitud de la cadena de HA juega un papel clave en las funciones biológicas producidas. Un HA de bajo peso molecular (por debajo de 3.5 x 10⁴ kDa) puede inducir la actividad de las citocinas que se asocia con la renovación de la matriz y se muestra que está relacionada con la inflamación en los tejidos. Un peso molecular alto (por encima de 2 X 10⁵ kDa) puede inhibir la proliferación celular. Se ha demostrado que los pequeños fragmentos de HA, entre 1 y 4 kDa, aumentan la angiogénesis.

[0069] Las formas nativas de HA se han modificado para introducir propiedades deseadas (por ejemplo, modificación de los HA para que tengan grupos tiol, lo que permite que el tiol se use para la unión de otros componentes de la matriz u hormonas o para nuevas formas de reticulación). Además, existen formas de entrecruzamiento que ocurren en la naturaleza (p. ej., reguladas por oxígeno) y otras que se han introducido artificialmente mediante el tratamiento de HA nativos y modificados con ciertos reactivos (p. ej., agentes alquilantes) o, como se señaló anteriormente, el establecimiento de HA modificados que los hacen permisivos a formas únicas de reticulación (p. ej., formación de puentes disulfuro en los HA modificados con tiol).

[0070] Según la invención, los HA modificados con tiol y las técnicas polimerizables *in situ* utilizadas para ellos son algunas de las formas preferidas. Estas técnicas implican la reticulación por disulfuro de HA carboximetilado tiolado, conocido como CMHA-S o Glycosil. Para estudios *in vivo*, puede usarse HA con peso molecular más bajo, por ejemplo, 70-250 kDa, ya que la reticulación, ya sea disulfuro o PEGDA, crea un hidrogel de tamaño molecular muy alto. Un enlazador reactivo con tiol, reticulante de diacrilato de polietilenglicol (PEGDA), es adecuado tanto para la encapsulación celular como para inyecciones *in vivo*. Este material combinado Glycosil-PEGDA se reticula a través de una reacción covalente y en cuestión de minutos es biocompatible y permite el crecimiento y la proliferación celulares.

[0071] El material de hidrogel, Glycosil, tiene en cuenta las propiedades del gel propicias para la ingeniería de tejidos de las células madre *in vivo*. Glycosil es parte de la tecnología de matriz extracelular semisintética (MEC) disponible en Glycosan Biosciences en Salt Lake City, UT (ahora una subdivisión de Biotime en Alameda, California). Una variedad de productos de las líneas de marcas registradas Extracel e HyStem están disponibles comercialmente. Estos materiales son biocompatibles, biodegradables y no inmunogénicos.

[0072] Además, Glycosil y Extralink se pueden combinar fácilmente con otros materiales de la MEC para aplicaciones de ingeniería de tejidos. El HA se puede obtener de muchas fuentes comerciales, con preferencia por la fermentación bacteriana utilizando cepas de *Streptomyces* (p. ej., Genzyme, LifeCore, NovaMatrix y otras) o el proceso de fermentación bacteriana utilizando *Bacillus subtilis* como huésped en un proceso ISO 9001: 2000 (exclusivo de Novozymes).

[0073] Las proporciones ideales de las poblaciones celulares deben replicar las encontradas *in vivo* y en suspensiones celulares del tejido. Una mezcla de células permite la maduración de las células progenitoras y/o el mantenimiento de los tipos de células adultas de manera concomitante con el desarrollo de la vascularización necesaria. De esta manera, se logra un microambiente compuesto que usa hialuronanos como base para un complejo que contiene múltiples componentes de la matriz y factores solubles y está diseñado para imitar nichos microambientales específicos compuestos por conjuntos específicos de señales paracrinias producidas por una célula epitelial y una célula mesenquimal en una etapa específica de linaje madurativo. Ver solicitud de patente EE. UU. N.º 61/332.441.

[0074] El microambiente de un nicho de células madre en el hígado consiste en las señales paracrinias entre las células madre hepáticas y los angioblastos. Se compone de hialuronanos, colágeno tipo III, formas específicas de laminina (p. ej., laminina 5), una forma única de proteoglicano de condroitín sulfato (CS-PG) que casi no tiene sulfatación y una composición soluble de señal/medio cercana o exactamente la misma que el «medio de Kubota», un medio desarrollado para células madre/progenitoras hepáticas. Estrictamente, no se requieren otros factores, aunque los efectos se pueden observar mediante la suplementación con factor de células madre, R-espondina, factor inhibidor de leucemia (LIF) y/o ciertas interleucinas (por ejemplo, IL6, IL11 y TGF-β1). La forma de nicho de células madre de CS-PG aún no está disponible

[0075] El microambiente de la célula amplificadora del tránsito en el hígado se encuentra morfológicamente entre el de los hepatoblastos y los precursores de células estrelladas hepáticas o los precursores de células endoteliales. Los componentes de este microambiente incluyen hialuronanos, colágeno tipo IV, formas específicas de lamininas que se unen a integrinas αβ1, CS-PG más sulfatadas, formas de proteoglicanos de heparán sulfato (HS-PG) y señales solubles que incluyen el factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), factor de crecimiento derivado de células estromales (SGF) y retinoides (por ejemplo, vitamina A).

Métodos de trasplante

[0076] Los injertos inyectables tienen la ventaja de que pueden llenar cualquier déficit de forma o espacio (por ejemplo, órganos o tejidos dañados). De acuerdo con este método, las células se cultivan conjuntamente y se administran en una suspensión celular embebida en biomateriales gelificables, que se solidifican *in situ* utilizando varios métodos de reticulación. La suspensión puede administrarse directamente a las paredes del conducto común hepatopancreático por endoscopia o laparoscopia o como un parche en forma de manguito alrededor del conducto y que contiene el hidrogel colocado contra la pared exterior del conducto. Pueden inmovilizarse en la pared suministrando un reticulante, PEGDA, que hará que la mezcla de hialuronano y matriz se gelifique. El procedimiento debe poder realizarse con una rapidez razonable y con una morbilidad mínima para los pacientes.

[0077] Inyección directa en la pared del conducto biliar. Las paredes fibromusculares del conducto común hepatopancreático están compuestas por capas de tejido muscular y conectivo que se adhieren y envuelven las estructuras epiteliales del conducto común hepatopancreático. Estas capas de tejido fibromuscular forman una funda que se extiende desde la apertura de la ampolla de Vater hasta la separación del colédoco y el conducto de Wirsung. Las estructuras separadas de tejidos fibromusculares continúan a lo largo de estas dos estructuras. Las paredes fibromusculares están embebidas en el tejido parenquimatoso de la cabeza del páncreas o en el tejido fibroadiposo, según las variaciones anatómicas y la edad del individuo.

[0078] Pegue el injerto sobre la superficie de la pared del conducto biliar. Alternativamente, el injerto de las células madre/progenitores mezclado con biomateriales apropiados y con señales solubles relevantes se puede colocar dentro de una cubierta (por ejemplo, seda de araña, epiplón) que se pega quirúrgicamente al conducto biliar o alrededor del conducto biliar (es decir, como un manguito que rodea el conducto). El injerto de células madre interactuará con las glándulas peribiliares extramurales unidas a la superficie de los conductos biliares. Por lo tanto, las células madre/progenitores injertados pueden incorporarse al conducto a través del exterior del mismo.

[0079] Tanto la cirugía laparoscópica como la administración endoscópica pueden utilizar un enfoque intraluminal. En resumen, se podría insertar un endoscopio por la boca y pasarlo a través del estómago hasta el duodeno. Usando un puerto lateral en el endoscopio, se puede entrar al conducto común hepatopancreático a través de la ampolla. El conducto común hepatopancreático se utilizaría para el sitio de administración de las células destinadas al páncreas. El endoscopio se podría mover a lo largo del conducto biliar para llegar a un sitio cerca del hígado para administrar las células dirigidas al hígado. Usando este enfoque, se pueden trasplantar las células como un injerto en la región periductal; la estrategia del injerto debería facilitar el injerto de las células. El procedimiento tendría que realizarse bajo sedación general.

[0080] En la cirugía laparoscópica, un paciente se somete a anestesia general y se realizan pequeñas incisiones (típicamente de menos de 1 cm) en la piel y la fascia para permitir la colocación de puertos e instrumentos laparoscópicos. Se introduce una cámara en la cavidad peritoneal para permitir el guiado visual y también se pueden introducir en el abdomen otros instrumentos, incluyendo un ecógrafo. Estas técnicas visuales proporcionan un medio para identificar el páncreas y sus características parenquimatosas, incluyendo el conducto pancreático.

Mediante ecografía u otra guía de imágenes, un cirujano dirige una aguja de pequeño calibre hacia la ubicación preferida del páncreas para la administración de las células. Este enfoque permite al cirujano identificar y controlar el sangrado, minimizar la administración o lesión involuntaria a los órganos circundantes y proporcionar un mecanismo para minimizar la morbilidad asociada con la intervención.

[0081] La inyección también se puede realizar, por ejemplo, usando una jeringa doble como se ha descrito anteriormente. En resumen, la mezcla de células, matriz y medio se carga en un lado de la jeringa con la aguja conectada a la otra jeringa que contiene el reticulante PEGDA. La mezcla puede inyectarse a través de una aguja de calibre 25 directamente en el conducto común hepatopancreático y reticularse instantáneamente para formar un hidrogel. El uso de CMHA-S con PEGDA a pH 7.4 permite tanto la encapsulación celular como la inyección *in vivo*, dado que la reacción de reticulación se produce durante un período de tiempo de 1-2 minutos.

[0082] Los materiales naturales como el quitosano, el alginato, el ácido hialurónico, la fibrina, la gelatina, así como muchos polímeros sintéticos pueden ser suficientes como biomateriales para inyecciones. Estos materiales a menudo se solidifican mediante métodos que incluyen gelificación térmica, fotorreticulación o reticulación química. La suspensión celular también puede complementarse con señales solubles o componentes de matriz específicos. Dado que estos injertos se pueden inyectar con relativa facilidad en un área diana, no existe (o es mínima) la necesidad de una cirugía invasiva, lo que reduce el coste, la incomodidad del paciente, el riesgo de infección y la formación de cicatrices. El CMHA también se puede utilizar como material inyectable para ingeniería de tejidos debido a su efecto duradero al tiempo que mantiene la biocompatibilidad. Los métodos de reticulación también mantienen la biocompatibilidad del material, y su presencia en áreas extensas de nichos regenerativos o de células madre/progenitores lo convierten en un material inyectable atractivo.

[0083] En algunas realizaciones, se puede diseñar un injerto para colocarlo directamente sobre una superficie de las paredes del conducto común hepatopancreático, en cuyo caso el injerto se mantendría en su lugar con una cubierta biocompatible y biodegradable («tiritita»). Las células administradas de este modo deberían dar lugar a descendientes que puedan migrar al páncreas para corregir la enfermedad o afección genética. Si existe dificultad para que ocurra la migración a través de la superficie del conducto biliar, entonces la superficie puede rasparse química o quirúrgicamente para permitir el acceso.

[0084] La invención se describirá ahora en particular con los siguientes ejemplos de referencia ilustrativos; sin embargo, no se pretende que el alcance de la presente invención esté limitado a las realizaciones de referencia siguientes, y no lo estará.

Ejemplo 1. Ejemplo de eficacia de la estrategia de injerto utilizando injertos de hialuronano

[0085] Se aislaron células progenitoras hepáticas de un ratón huésped C57/BL6 (4-5 semanas) según los protocolos descritos. Para los estudios de «injertos», se introdujo un indicador de GFP en las células progenitoras hepáticas. A continuación, las células se mezclaron con hidrogeles de hialuronano (HA) y el HA se reticuló antes de introducirlo en un ratón. Para la introducción/trasplante, los ratones se anestesiaron con ketamina (90-120 mg/kg) y xilacina (10 mg/kg) y se les abrió el abdomen. Las células, con o sin HA, se inyectaron lentamente en el hígado. El sitio de la incisión se cerró y los animales recibieron 0.1 mg/kg de buprenorfina cada 12 horas durante 48 horas. Después de 48 horas, los animales se sacrificaron y el tejido se extrajo, se fijó y se seccionó para histología.

[0086] Para determinar la localización celular en los modelos murinos, se infectaron células progenitoras hepáticas «de control» durante 4 horas a 37 °C con un vector adenoviral que expresa luciferasa a 50 POI. Se realizó cirugía de supervivencia como se ha descrito anteriormente, y las células (1-1.5E6) se inyectaron en el lóbulo hepático por vía vascular (arteria hepática o vena porta) o en el conducto común hepatopancreático mediante inyección directa o injerto. Justo antes de la obtención de imágenes, se inyectó luciferina a los ratones por vía subcutánea, produciendo una señal luminiscente causada por las células trasplantadas. Utilizando un generador de imágenes óptico IVIS Kinetix, se determinó la localización de las células dentro de los ratones. Se inyectaron células suspendidas en tampón con HA a los huéspedes experimentales.

[0087] A las 24 horas, se encontraron células «control» inyectadas sin injerto de HA tanto en el hígado como en el pulmón. Sin embargo, a las 72 horas, la mayoría de las células no pudieron localizarse y solo quedaron unas pocas células identificables en el hígado. Las células injertadas según la invención, por el contrario, se observaron como un grupo de células integradas con éxito en el hígado tanto a las 24 horas, y permanecieron presentes incluso después de dos semanas. También se observó que las células trasplantadas a través de este injerto de nicho de células madre se localizaban casi exclusivamente en tejido hepático y no se encontraron en otros tejidos mediante ensayos en muestras histológicas aleatorias.

Ejemplo 2. Células madre pancreáticas

[0088] Wang et al., Stem Cells. 2013; 31 (9): 1966-1979. Los linajes de maduración proximal (GPB) a distal (GCP) comienzan cerca del duodeno con células que expresan marcadores de pluripotencia (NANOG, OCT4, SOX2),

proliferación (Ki67), autorreplicación (SALL4) y compromiso hepatopancreático temprano (SOX9, SOX17, PDX1, LGR5), transición a células GCP sin expresión de pluripotencia o marcadores de autorreplicación, mantenimiento de genes pancreáticos (PDX1) y expresión de marcadores de maduración endocrina pancreática (NGN3, MUC6, insulina). Los linajes de eje radial comienzan en GPB cerca de las capas fibromusculares de los conductos con células madre y terminan en los lúmenes de los conductos con células desprovistas de rasgos de células madre y positivas para genes endocrinos pancreáticos.

[0089] Las células derivadas de los árboles biliares se comportan como células madre en cultivos bajo condiciones de expansión, plástico de cultivo y medio de Kubota sin suero, proliferando durante meses como células indiferenciadas, mientras que las células derivadas del páncreas se sometieron solo a 8-10 divisiones \sim y luego se diferenciaron parcialmente hacia un islote destino. Las células derivadas de los árboles biliares demostraron ser precursoras de los progenitores comprometidos del páncreas. Ambas podrían estar impulsadas por condiciones tridimensionales, componentes de matriz derivados de islotes y un medio sin suero, definido hormonalmente para un destino de islote (HDM-P), para formar esferoides con características ultraestructurales, electrofisiológicas y funcionales de los neoislotos, incluida la regulabilidad de la glucosa. La implantación de estos neoislotos en los cúmulos de grasa del epidídimo de ratones inmunodeprimidos, convertidos químicamente en diabéticos, dio como resultado la secreción de péptido C humano, regulable por glucosa y capaz de aliviar la hiperglucemia en los huéspedes. Las células madre derivadas del árbol biliar y sus conexiones con los progenitores comprometidos del páncreas constituyen un marco biológico para la organogénesis pancreática de por vida.

Ejemplo 3. Células madre en la vesícula biliar

[0090] Se obtuvieron vesículas biliares de donantes de órganos y se realizó cirugía laparoscópica por colelitiasis sintomáticas. Los tejidos o células aisladas se caracterizaron mediante inmunohistoquímica y citometría de flujo. Las células EpCAM+ (molécula de adhesión de células epiteliales) se inmunoseleccionaron mediante microperlas magnéticas y se colocaron sobre plástico en condiciones de autorreplicación y, posteriormente, se transfirieron a distintos medios libres de suero, definidos con hormonas, diseñados para la diferenciación hacia destinos adultos específicos. Los estudios *in vivo* se realizaron en un modelo experimental de cirrosis hepática.

[0091] Resultados: la vesícula biliar no tiene glándulas peribiliares, pero tiene en su lugar células madre/progenitores organizados en criptas mucosas. Estos pueden aislarse mediante selección inmune para EpCAM. Aproximadamente el 10 % de las células EpCAM+ *in situ* y de las células EpCAM+ inmunoseleccionadas coexpresaron múltiples genes de pluripotencia y diversos marcadores de células madre; otras células EpCAM+ calificadas como progenitoras. Las células EpCAM+ individuales demostraron expansión clonogénica *ex vivo* con mantenimiento de la pluripotencialidad en condiciones de autorreplicación. Las células EpCAM+ recién aisladas o cultivadas podrían diferenciarse en destinos adultos múltiples y distintos: cordones de hepatocitos secretores de albúmina, conductos ramificados de colangiocitos del receptor de secretina+ o neoislotos secretores de insulina/glucagón sensibles a la glucosa. Las células EpCAM+ trasplantadas *in vivo* en huéspedes inmunodeprimidos dieron lugar a hepatocitos productores de albúmina humana y a colangiocitos de citoqueratina7+ humanos que se producen en mayor número cuando se trasplantan en ratones cirróticos. Por tanto, las vesículas biliares humanas contienen células fácilmente aislables con propiedades fenotípicas y biológicas de células madre endodérmicas multipotentes.

Ejemplo 4. Suma neta de análisis que demuestran linajes madurativos *in situ*

[0092] Se evaluó la expresión de genes de pluripotencia, genes de células madre y genes de hígado o páncreas maduros en las células de las glándulas peribiliares en diferentes sitios dentro del árbol biliar o en la vesícula biliar. La expresión de estos genes formó un patrón indicativo de linajes de maduración en un eje radial y un eje de proximal a distal. Un resumen de esto se da en la tabla 2. Se encontró que las células dentro de las glándulas peribiliares más cercanas a la capa fibromuscular eran las más primitivas y tenían altos niveles de expresión de genes de pluripotencia (p. ej., SALL4, OCT4, SOX2, KLF4, NANOG), de rasgos de células madre endodérmicas (p. ej., SOX9, SOX17, PDX1, LGR5) y con una expresión mínima (si es que la hay) de marcadores de células maduras (albúmina, insulina, CFTR). Con la progresión hacia los lúmenes del conducto biliar, la expresión del gen de pluripotencia se desvaneció y hubo una adquisición gradual de marcadores para los destinos de las células maduras. Si las células estaban en las GPB cerca del páncreas, los marcadores maduros eran insulina y otras hormonas de los islotes o amilasa y otros marcadores de células acinares. Si las células estaban en las GPB cerca del hígado, los marcadores maduros eran albúmina, transferrina, genes P450 y otros marcadores de hepatocitos o CFTR, receptores de secretina y otros marcadores maduros de colangiocitos.

Tabla 2 Comparación de marcadores de células madre/progenitoras en hígado, árbol biliar y páncreas						
Ejemplo que demuestra linajes madurativos <i>in situ</i> dentro del árbol biliar						
Eje de proximal a distal de los linajes de maduración						
	HÍGADO					PÁNCREAS
Células	Hepatoblastos adyacentes a los canales de Hering	Células madre hepáticas en los canales de Hering	Subpoblaciones de células madre de árboles biliares en las glándulas peribiliares (GPB) ENREF 8 ENREF 8 ENREF 8 ENREF 8 [subpoblaciones de estas también se encuentran en la vesícula biliar, pero se encuentran en las criptas, no en las glándulas peribiliares)			Progenitores comprometidos pancreáticos en las glándulas del conducto pancreático (GCP)
Marcadores endodérmicos	SOX 9+	SOX 9+ SOX 17+ LGR5 +	SOX 9+, SOX 17+ LGR5 +	SOX 9+ SOX 17+ PDX1 +	2. SOX 9+, PDX1 + LGR5 +	SOX 9+, PDX1 +
Marcadores epiteliales	CK 8 y 18+, CK19 +, E-cadherina +					E-cadherina -, CK8, 18, 19+
CAM	integrina αβ1, ICAM-1, EpCAM	integrina α6β4, NCAM, EpCAM	NCAM, EpCAM	NCAM	NCAM, EpCAM	Integrinas EpCAM
	Integrinas aún no estudiadas					
Genes de pluripotencia	Negativo	Niveles moderados de OCT4, NANOG, KLF4, SALL4	Fuerte expresión de OCT4A, SOX2, NANOG, KLF4, SALL4			Negativo
Otros marcadores de células madre	CXCR4, CD133 débil	CXCR4, CD133, CD117 fuerte	CXCR4, CD133 fuerte			CXCR4, CD133, CD24
Proteínas Hedgehog	Indian y Sonic débiles	Indian y Sonic ³⁰ fuertes	Sonic e Indian Hedgehog+ fuertes			Sonic débil
Proteínas de la matriz	Laminina**, colágeno tipo IV	Laminina**, colágeno tipo III	Aún no estudiado			Los islotes fetales tienen colágeno IV, V, VI, nidógeno, elastina; las células acinares fetales tienen principalmente colágenos fibrilares, fibronectina
GAG/PG	HS-PG, incluyendo sindecanos y CS-PG	HA+, CD44+, CS-PG mínimamente sulfatados	HA+, CD44+; otros aún no probados			Los islotes fetales tienen sindecanos (HS-PG-1) y glipicanos; las células acinares fetales tienen

Tabla 2 Comparación de marcadores de células madre/progenitoras en hígado, árbol biliar y páncreas						
Ejemplo que demuestra linajes madurativos <i>in situ</i> dentro del árbol biliar						
Eje de proximal a distal de los linajes de maduración						
						principalmente CS-PG
Rasgos del hígado	Albúmina++, AFP+++, P450A7, Glucógeno	Albúmina ±, AFP-	Albúmina ±, AFP-	Ninguno	Ninguno	Ninguno
Rasgos pancreáticos	Ninguno	Ninguno	Ninguno		ISL1, PROX1, NeuroD, PAX4 NGN3, MUC6 ±	NGN3, MAFA, MUC6, Nkx6.1/NKx6.2 (Nkx6) y Ptf1a, GLUT2
MDR	MDRI-ABCG2 +	MDR-1 +, ABCG2 ++				Negativo
Rasgos de células mesenquimales	Negativo para CD31, CD34, CD45, CD90, CD146, CD105					
<p>**La laminina asociada con las células madre hepáticas se une a la integrina alfa6/beta4 (laminina-5); la asociada con los hepatoblastos se une a la integrina alfa/betal (laminina-111). Las células madre muy primitivas del árbol biliar que se encuentran dentro de los conductos biliares y cerca de la capa fibromuscular no expresan EpCAM o LGR5; esos marcadores ocurren en células que son intermediarias en el proceso de convertirse en células madre hepáticas o pancreáticas. GPB= glándulas peribiliares; GCP= glándulas del conducto pancreático; HA = hialuronanos; HS-PG= proteoglicanos de heparán sulfato; CS-PG= proteoglicanos de condroitín sulfato ; sindecanos = HS-PG que tienen proteínas centrales transmembrana; glipticanos= HS-PG enlazados a la membrana plasmática mediante enlaces de fosfolidil inositol (PI); MDRI= genes de resistencia a múltiples fármacos; ² estas células madre del árbol biliar son las más primitivas y se encuentran cerca de la capa fibromuscular dentro de los conductos biliares; dan lugar en el linaje de maduración del eje radial a las células EpCAM+. ³Genes de pluripotencia = OCT4, NANOG, KLF4, SOX2, SALL4. CD117 se encuentra en los canales de Hering y está presente en los angioblastos que están estrechamente unidos a las células madre epiteliales; se supone que se encuentra en las glándulas peribiliares en asociación con las diversas subpoblaciones de células madre. Hepatoblastos, tránsito de células amplificadoras, dando lugar a progenitores comprometidos hepatocíticos y biliares que <u>no</u> expresan SOX17, genes de pluripotencia, LGR5 u otros marcadores de células madre.</p>						

REIVINDICACIONES

- 5 1. Suspensión de células madre/progenitoras para su uso en el tratamiento de una disfunción o afección hepática, donde el tratamiento comprende: introducir la suspensión en o sobre una pared del árbol biliar en un sujeto que tiene la disfunción o afección hepática, donde una porción de las células introducidas se instala en o sobre al menos una parte del hígado como células hepáticas maduras *in vivo*, tratando así la disfunción o afección hepática, donde las células madre/progenitoras son células madre de árbol biliar o células madre hepáticas o progenitores comprometidos derivados de esas células madre,
- 10 y donde la suspensión se combina con uno o más biomateriales para formar un complejo de matriz, donde los biomateriales comprenden colágenos, moléculas de adhesión, proteoglicanos, hialuronanos, cadenas de glicosaminoglicanos, quitosano, alginato y polímeros sintéticos, biodegradables o biocompatibles o combinaciones de los mismos.
- 15 2. Suspensión de células madre/progenitoras para un uso según la reivindicación 1, donde la suspensión se combina con factores de crecimiento, células adicionales o combinaciones de los mismos.
- 20 3. Suspensión de células madre/progenitoras para un uso según la reivindicación 2, donde los factores de crecimiento pueden incluir uno o varios de los factores de crecimiento de fibroblastos (FGF), R-espondina, factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor de crecimiento de células endoteliales vasculares (VEGF), factor de crecimiento tipo insulina I (IGF-1), factor de crecimiento tipo insulina II (IGF-2), oncostatina-M, factor inhibidor de la leucemia (LIF), transferrina, insulina, glucocorticoides, hormonas de crecimiento, estrógenos, andrógenos, hormonas tiroideas, hormonas hipofisarias y combinaciones de los mismos.
- 25 4. Suspensión de células madre/progenitoras para un uso según las reivindicaciones 2 o 3, donde las células adicionales comprenden una o más poblaciones de células madre seleccionadas del grupo que consiste en células madre de árboles biliares, células madre hepáticas o pancreáticas, células madre comprometidas, angioblastos y precursores de endotelios y células estrelladas o combinaciones de las mismas.
- 30 5. Suspensión de células madre/progenitoras para un uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde las células se obtienen de una parte del árbol biliar del sujeto que no está enferma o no es disfuncional.
- 35 6. Suspensión de células madre/progenitoras para un uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde las células se obtienen del árbol biliar de un donante no autólogo.
- 40 7. Suspensión de células madre/progenitoras para un uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la suspensión se introduce mediante cirugía laparoscópica o mediante endoscopia.
8. Suspensión de células madre/progenitoras para un uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la suspensión de células se introduce mediante una inyección, un complejo de injerto con un recubrimiento biodegradable o una esponja.



SITIOS DE CONCENTRACIONES ELEVADAS
DE NICHOS DE CÉLULAS MADRE

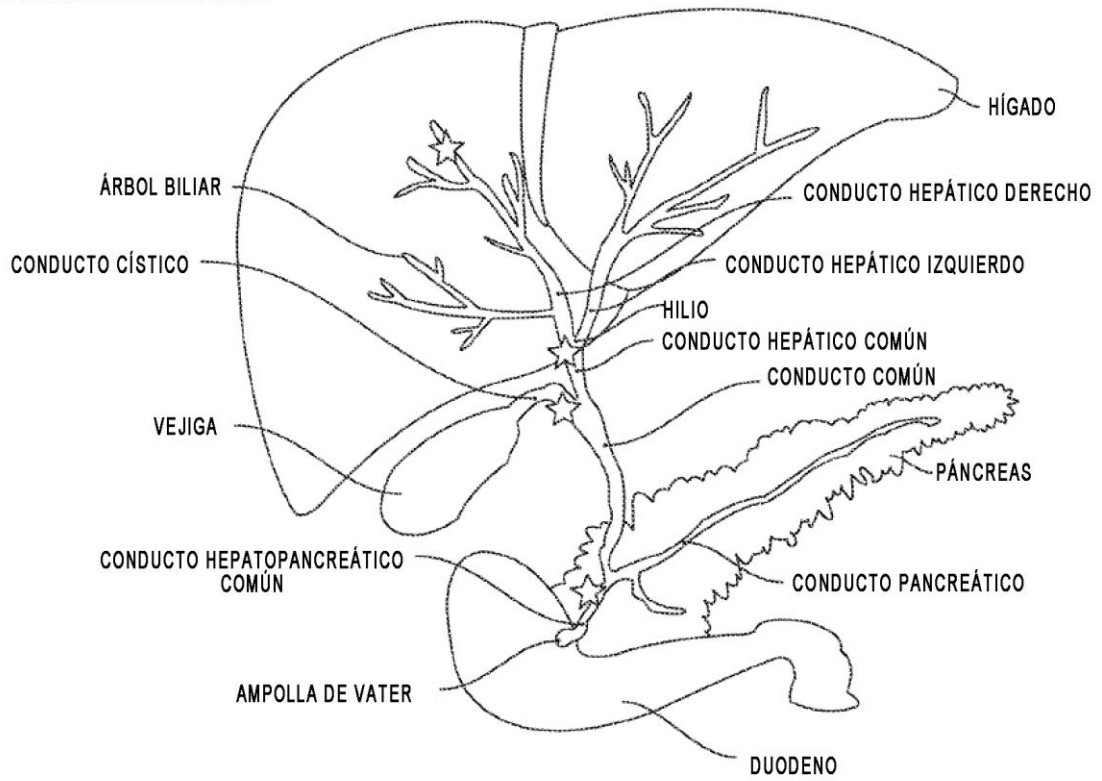


FIG. 1

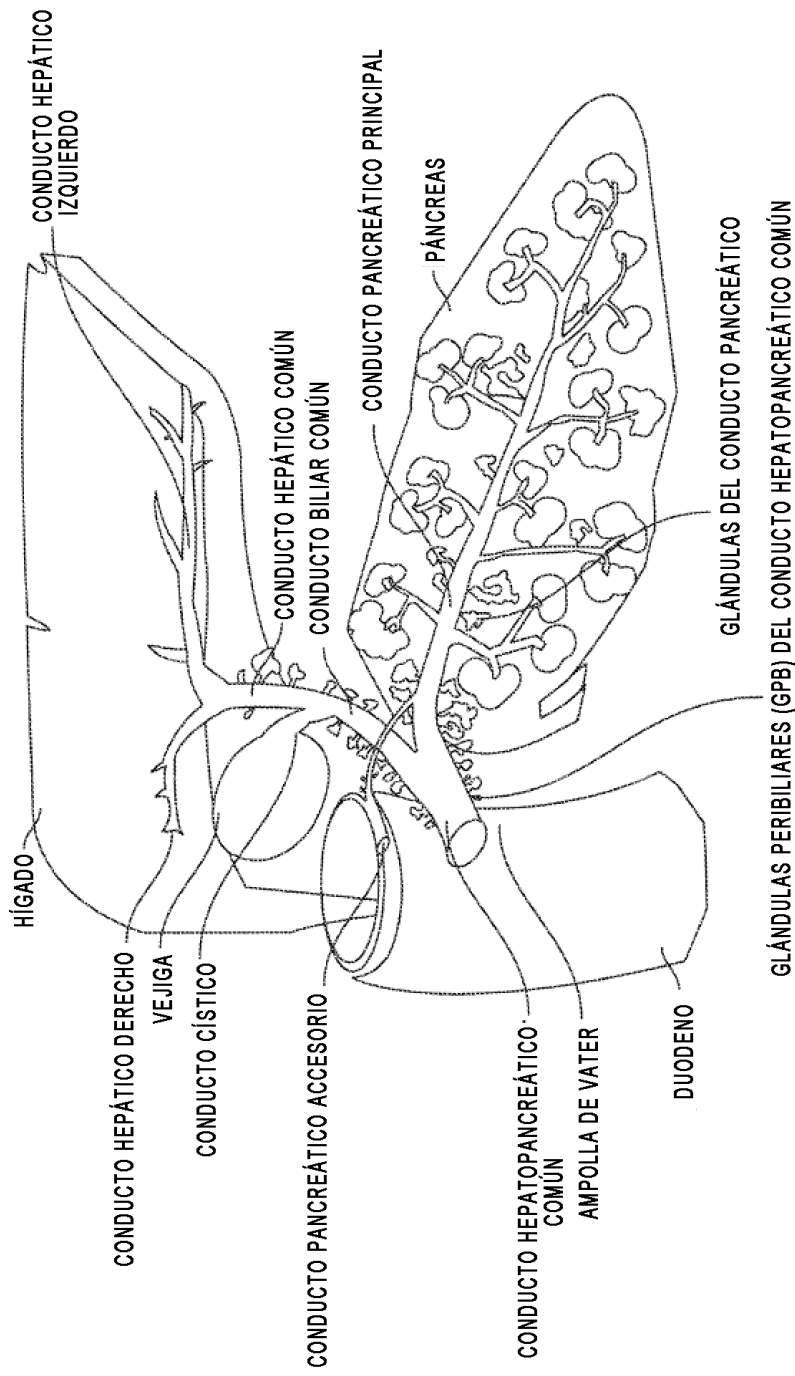


FIG. 2

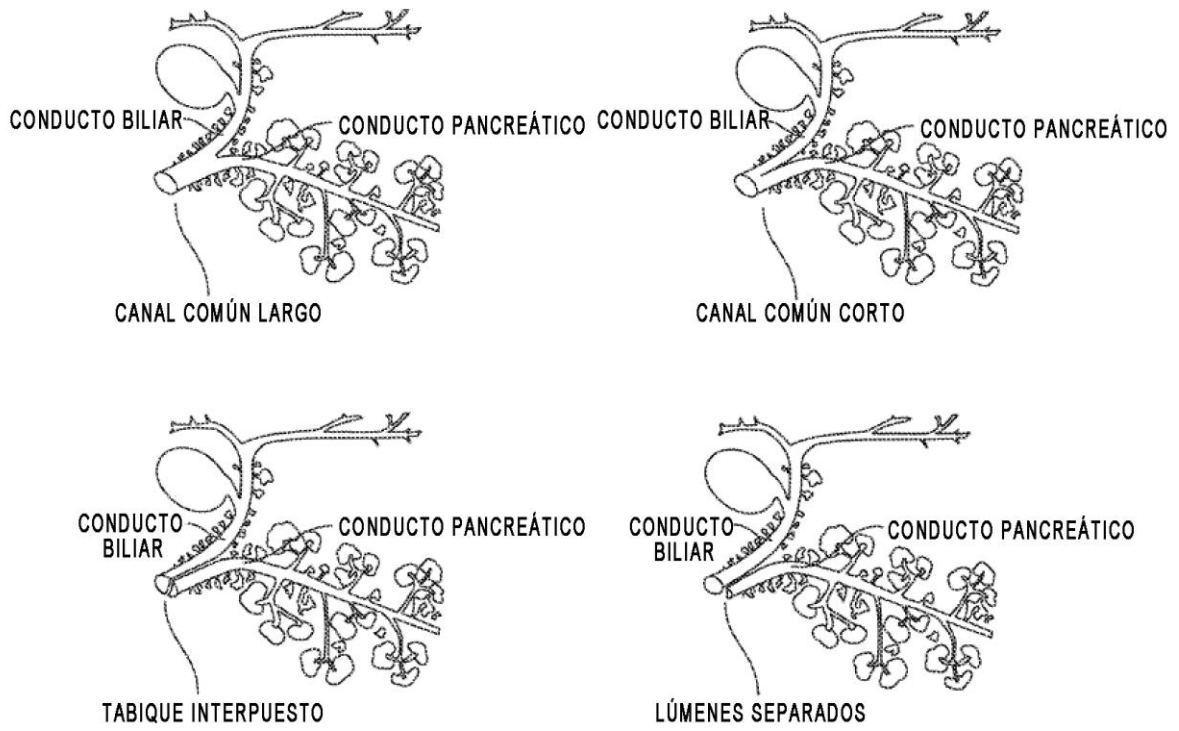


FIG. 3

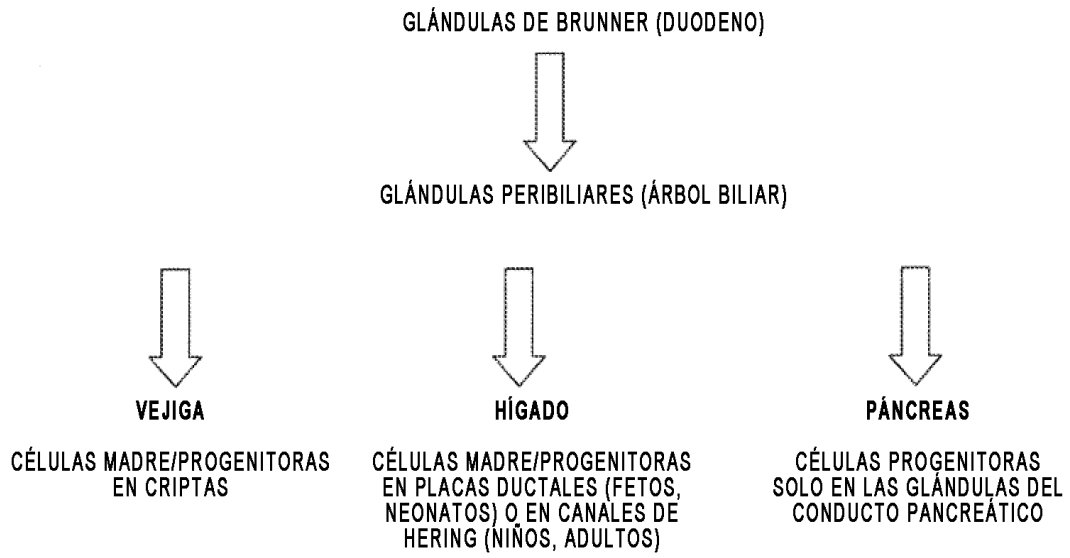
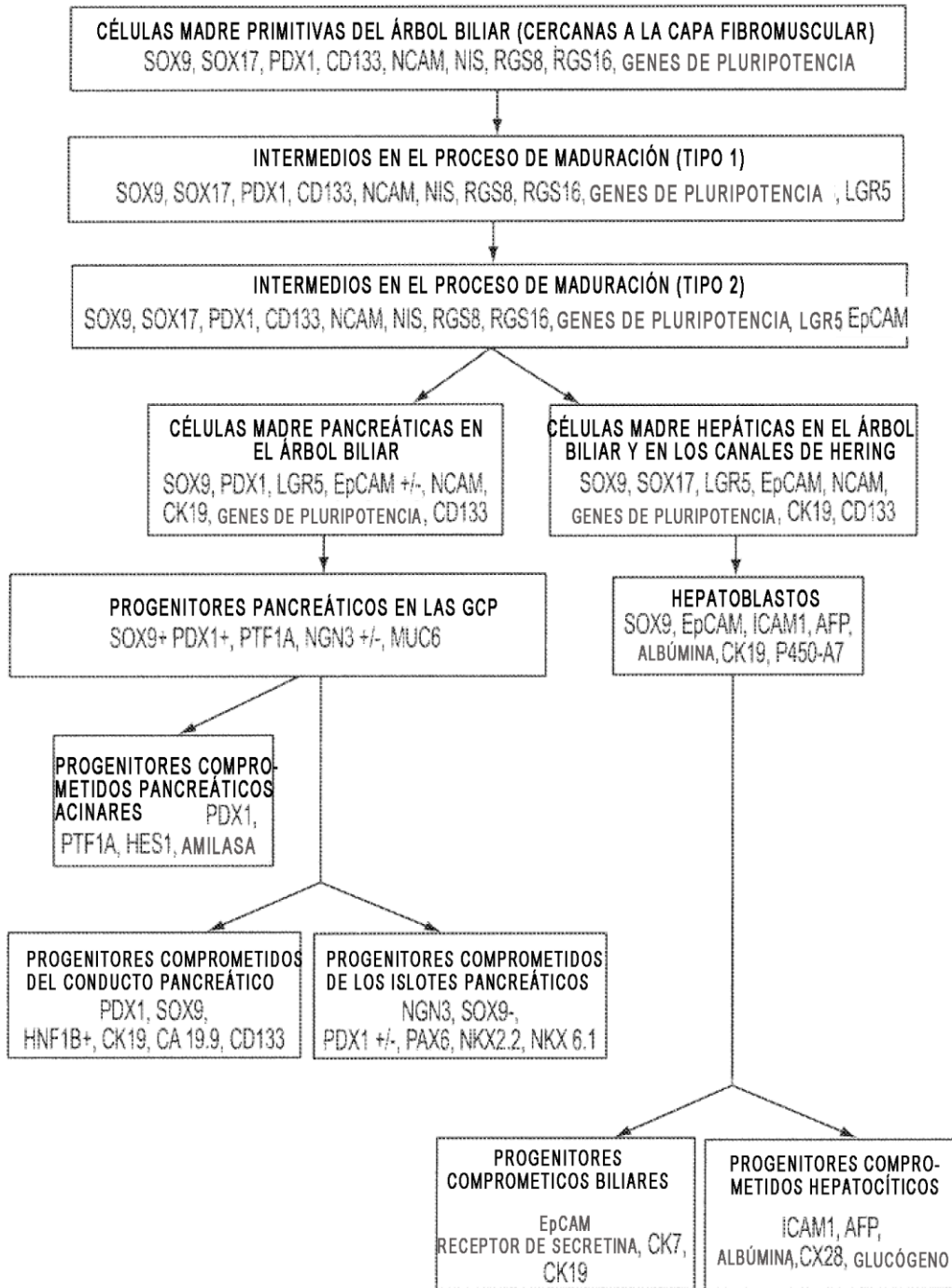


FIG. 4



GENES DE PLURIPOTENCIA: SOX2, OCT4, KLF4, NANOG, TROP-2, BMI-1, SALL4

LAS CÉLULAS EN TODOS LOS ESTADOS DE MADURACIÓN DEL LINAJE EXPRESAN LAS CITOQUERATINAS 8 Y 18

FIG. 5

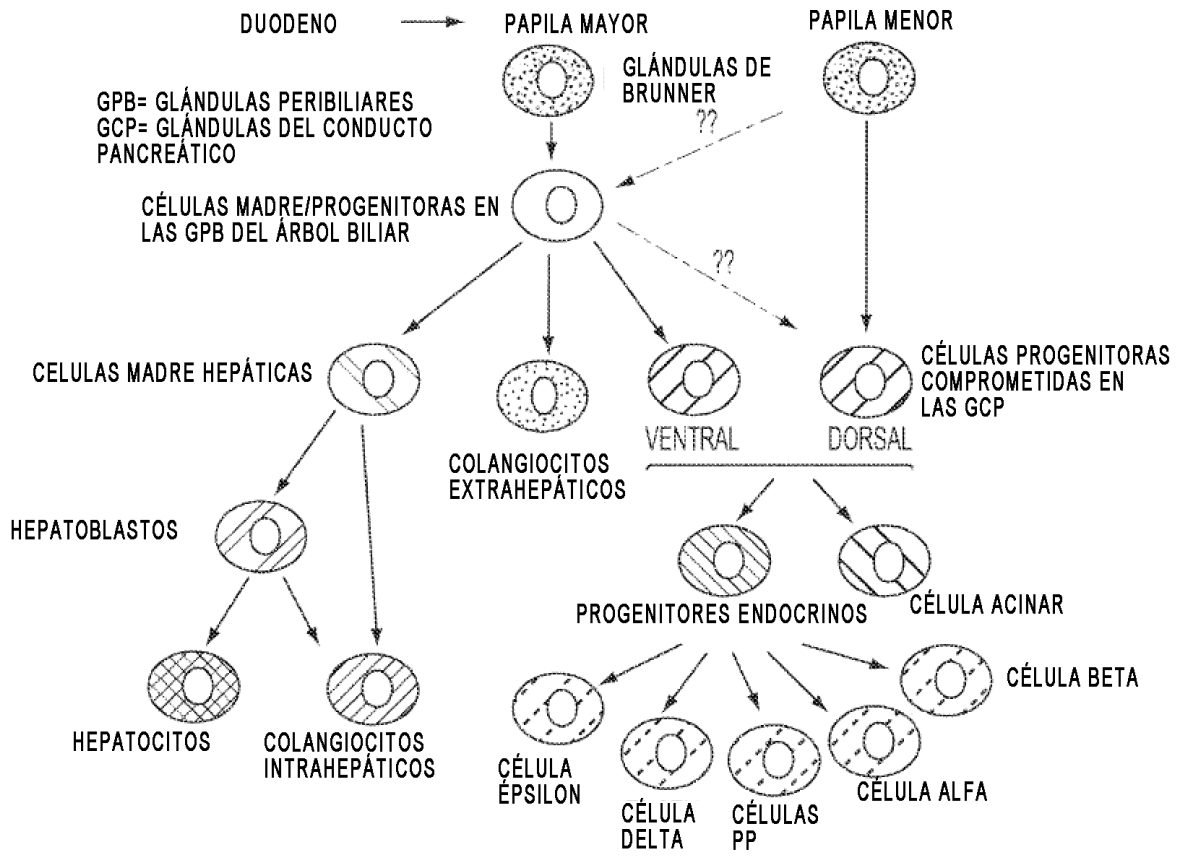


FIG. 6

MEDIO SIN SUERO DEFINIDO HORMONALMENTE (HDM)

○ **MEDIO DE KUBOTA (KM) PARA CÉLULAS MADRE Y PROGENITORES**

- ✘ BAJO EN CALCIO (<0,5 mM)
- ✘ SIN COBRE
- ✘ SELENIO, ZINC
- ✘ INSULINA, TRANSFERRINA/Fe
- ✘ HDL Y MEZCLA DE ÁCIDOS GRASOS LIBRES UNIDOS A ALBÚMINA PURIFICADA
- ✘ NICOTINAMIDA
- ✘ MEDIO BASAL RICO EN NUTRIENTES
- ✘ BAJO EN OXÍGENO (~2 %)

KUBOTA Y REID, 2000

○ **MEDIO DEFINIDO HORMONALMENTE (HDM) PARA CÉLULAS MADURAS**

- MEDIO DE KUBOTA SUPLEMENTADO CON
- ✘ MÁS CALCIO (~0,6 mM)
 - ✘ COBRE
 - ✘ T3, bFGF, HGF
 - ✘ DESTINO DE LOS HEPATOCITOS – EGF, GLUCAGÓN, GALACTOSA, ONCOSTATINA M, GLUCOCORTICOIDES
 - ✘ DESTINO DE LOS COLANGIOCITOS – VEGF, HGF, GLUCOCORTICOIDES
 - ✘ DESTINO DE LOS ISLOTES PANCREÁTICOS – CICLOPAMINA, EXENDINA (NO GLUCOCORTICOIDES)
 - ✘ MAYORES NIVELES DE OXÍGENO (~5 %)

WANG Y COL, HEPATOLOGY, 2010

FIG.7

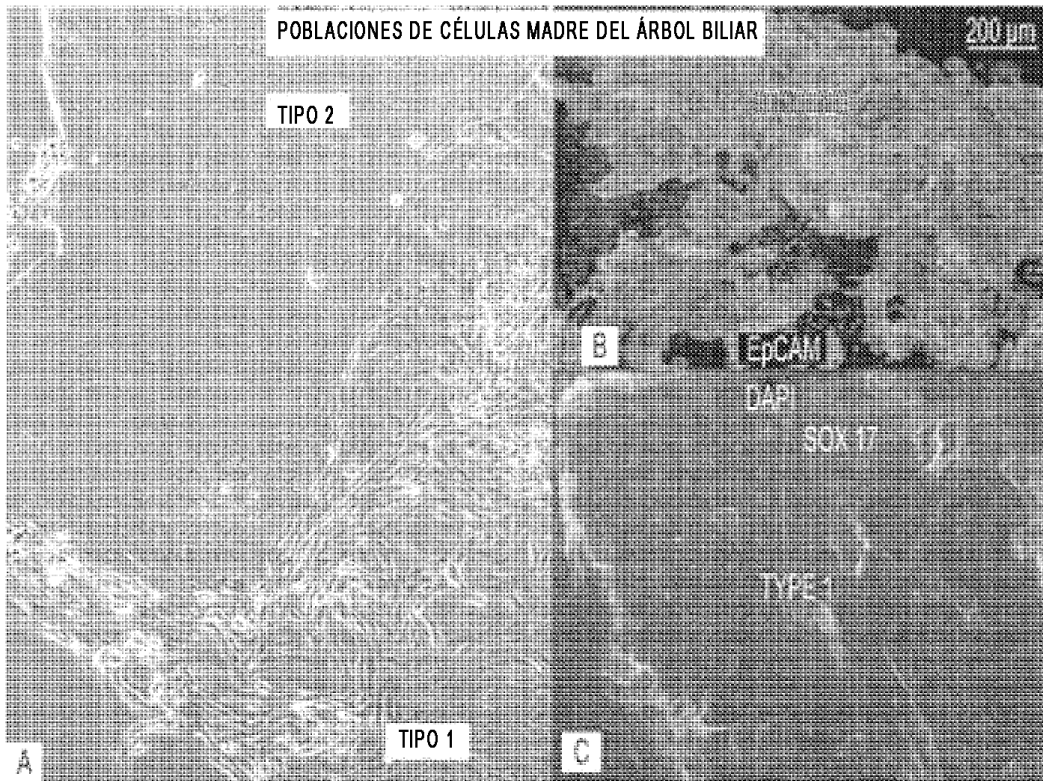


FIG. 8

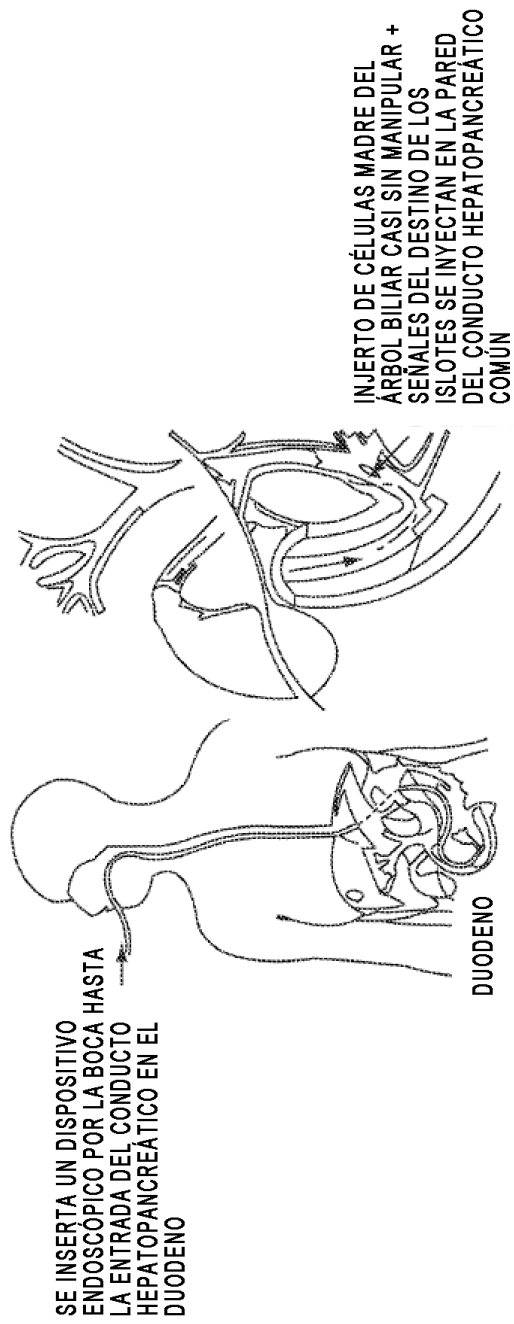
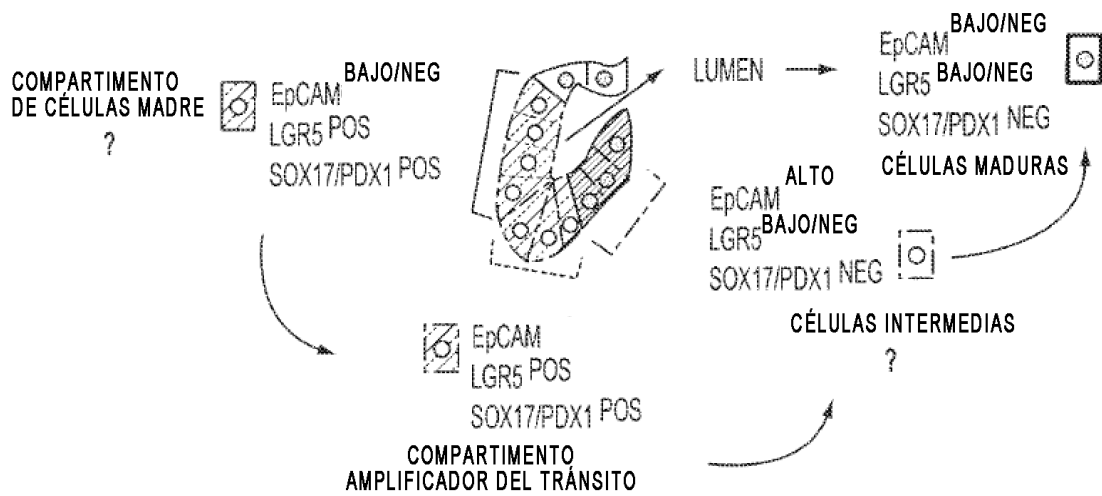
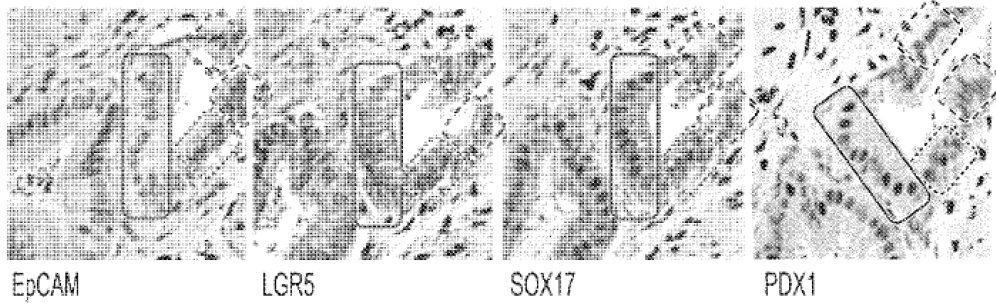


FIG. 9



? → AUMENTO EN VEJIGAS CON PATOLOGÍAS

FIG. 10