



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 364 878**

51 Int. Cl.:
C12N 5/074 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **05791447 .5**

96 Fecha de presentación : **24.08.2005**

97 Número de publicación de la solicitud: **1789540**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **30.05.2007**

54 Título: **Células madre de tipo blastómero totipotenciales no embrionarias y procedimientos de las mismas.**

30 Prioridad: **03.09.2004 US 606913 P**
08.09.2004 US 607624 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
15.09.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
15.09.2011

73 Titular/es: **MORAGA BIOTECHNOLOGY Inc.**
1061 Moraga Drive, Suite 100
Los Ángeles, California 90049, US

72 Inventor/es: **Young, Henry E. y**
Black, Jr., Asa Calvin

74 Agente: **Ungría López, Javier**

ES 2 364 878 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

Células madre de tipo blastómero totipotenciales no embrionarias y procedimientos de las mismas

- 5 Esta solicitud reivindica prioridad sobre nuestras solicitudes de patente provisional de EE.UU. relacionadas de números de serie 60/606.913, presentada el 3 de septiembre de 2204, y 60/607.624, presentada el 8 de septiembre de 2004.

Campo de la invención

- 10 El campo de la invención se refiere a células madre y reactivos para las mismas, y, es especialmente, en lo que se refiere a células madre no embrionarias totipotenciales.

Antecedentes de la invención

- 15 *Células madre*

- 20 Actualmente se piensa que las células de mamífero progresan desde los estadios de célula embrionaria a células completamente desarrolladas a través de una secuencia de células blastoméricas totipotenciales que se desarrollan en células epiblasticas pluripotenciales, que se desarrollan en células del linaje de la capa germinal, que dan lugar a células progenitoras multipotenciales que se convierten en células progenitoras tripotenciales, después bipotenciales, después unipotenciales y, por último, en los tipos de células diferenciadas.

- 25 Sorprendentemente, aunque la gran mayoría de las células progresa a través de dicha secuencia de desarrollo y diferenciación, unas pocas células se convierten en células precursoras de reserva que proporcionan un mantenimiento y reparación continuos del organismo. Las células precursoras de reserva conocidas localizadas en el individuo tras el nacimiento incluyen células madre de tipo epiblasto, células madre del linaje de la capa germinal (células madre del linaje de la capa germinal ectodérmica, células madre del linaje de la capa germinal u células madre del linaje de la capa germinal mesodérmica) y varias células progenitoras. En los últimos años, se ha prestado atención especial a las células en estadio temprano y, especialmente, a las células madre embrionarias.

- 30 Las células madre embrionarias (CME) son células no comprometidas que se aíslan de tejidos embrionarios. Por ejemplo, se han aislado CME del blastocisto, la masa celular interna y las crestas gonadales de embrión de ratón, conejo, rata, cerdo, oveja, primate y de ser humano (Evans y Kauffman, 1981; Iannaccone y col., 1994; Graves y Moreadith, 1993; Martin, 1981; Notarianni y col., 1991; Thomson, y col., 1995; Thomson, y col., 1998; Shambloott, y col., 1998). Cuando se inyectan en los embriones, las CME pueden dar lugar a todos los linajes somáticos, así como a gametos funcionales (es decir, espermatozoides). Normalmente, las CME se diferencian de forma espontánea en medio definido sin suero en ausencia de agentes que inhiban la diferenciación (p. ej., factor inhibidor de leucemia). Otras preparaciones conocidas de células madre embrionarias de tejido embriode, tejido posmórula, estadio de blastocisto y estadio pre-blastocisto se han descrito en la solicitud de patente de EE.UU. N° 2003/0175955, los documentos EP 1 176 189, WO 1997/020035 y WO 1995/016770, respectivamente. No obstante, dichas preparaciones celulares son pluripotenciales y/o se aísla de un embrión, lo que plantea una controversia ética. Las células madre embrionarias bovinas totipotenciales se han notificado en la patente de EE.UU. n° 6.107.543 y en la patente de EE.UU. n° 6.703.209 se han descrito células madre formadoras de la línea germinal unglada (posiblemente no totipotenciales)

- 45 En otros procedimientos también conocidos se han aislado células madre pluripotenciales de fuentes no embrionarias, incluida la matriz del cordón umbilical tal como se describe en la solicitud de patente de EE.UU. n° 2003/0161818 y de tejido gonadal posnatal, tal como se instruye en el documento 2002/031123. No obstante, aunque dichas células no requieren destrucción de un embrión y son, por tanto, de un potencial interés para las células madre humanas, no se ha demostrado que las células madre así aisladas sean totipotenciales.

- 50 Tras la diferenciación *in vitro*, todas o casi todas estas células expresan una amplia variedad de tipos celulares, incluidos gametos, así como células derivadas de los linajes de la capa germinal del ectodermo, el mesodermo y en endodermo. Por desgracia, cuando las células madre embrionarias no comprometidas conocidas actualmente se implantan en animales, normalmente se diferencian espontáneamente *in situ*, formando teratomas. Estos tumores contienen varios tipos de células y tejido derivados de los tres principales linajes de la capa germinal (Thomson y col., 1988). Por tanto, aunque las CME parecen tener potencial terapéutico en terapias de trasplante, su tendencia a diferenciarse de forma espontánea de un modo incontrolado limita su utilidad.

- 60 *Propagación de las células madre*

- El medio de crecimiento para el crecimiento en cultivo de la mayoría de las células madre normalmente está suplementado con suero animal y/o humano para optimizar y potenciar la viabilidad celular. Los constituyentes del suero incluyen agua, aminoácidos, glucosa, albúminas, inmunoglobulinas y uno o más agentes bioactivos. Potenciales agentes bioactivos presentes en el suero incluyen agentes que inducen la proliferación, agentes que

aceleran la expresión fenotípica, agentes que inducen la diferenciación, agentes que inhiben la proliferación, agentes que inhiben la expresión fenotípica y agentes que inhiben la diferenciación. Por desgracia, la(s) identidad(es), concentración(es) y posibles combinaciones de agentes bioactivos específicos contenidos en diferentes lotes de suero es(son) desconocidos. Uno o más de estos agentes desconocidos en suero han mostrado un impacto negativo sobre el aislamiento, cultivo, crioconservación y purificación de células madre de tipo blastómero de linaje no comprometido. De forma similar, cuando se emplearon capas de alimentación para las células madre, con frecuencia se produce contaminación de los cultivos de células madre con componentes específicos de la capa de alimentación, especialmente virus.

Como alternativa, para cultivos celulares generales se conocen medios sin suero y determinadas células madre pluripotenciales se han propagado en dicho medio con una pluralidad de factores de crecimiento, tal como se describe en los documentos US20050164380, US20030073234, US6617159, US6117675 o EP1298202.

Por tanto, aunque en la técnica se conocen numerosas composiciones y procedimientos para células madre, todos o casi todos sufren una o más desventajas. Por tanto, sigue existiendo la necesidad de mejores células madre, composiciones y reactivos para su producción, mantenimiento y diferenciación, y, especialmente, para células madre de tipo blastómero totipotenciales posnatales.

Resumen de la invención

La presente invención está dirigida a composiciones y procedimientos relacionados con células madre de tipo blastómero totipotenciales que expresan telomerasa y portan marcadores de superficie CEA-CAM-1⁺, SSEA-1⁻, SSEA-3⁻, SSEA-4⁻, y, opcionalmente CD10⁻ y CD66e⁺ (p. ej., cuando la célula procede de un ser humano).

En un aspecto de la materia sujeto de la invención, una célula madre aislada es, preferentemente, una célula madre de mamífero, posnatal, totipotencial que tiene los marcadores de superficie CD66e⁺, CEA-CAM-1⁺, CD10⁻, SSEA-1⁻, SSEA-3⁻ y SSEA-4⁻. Dichas células se diferencian de forma ventajosa en una célula placentaria o una célula germinal tras la estimulación con un medio de diferenciación y se sabe que sufren al menos 100, más normalmente al menos 200, y más normalmente al menos 300 duplicaciones al tiempo que mantienen la naturaleza totipotencial en medio sin suero en ausencia de inhibidores de la diferenciación. Por tanto, las células de acuerdo con la materia sujeto de la invención normalmente no se diferenciarán de forma espontánea en medio sin suero en ausencia de inhibidores de la diferenciación, permanecerán quiescentes y no formarán un tejido canceroso cuando se implantan en un animal.

Dichas células pueden además caracterizarse por la expresión de Oct-3/4, Nanog, Nanos, BMI-1, IDE1, IDE3, ABCG2, CXCR-4, y/o BCL-2, y la falta de expresión de CD1 a, CD2, CD3, CD4, CD5, CD7, COB, CD9, CD11 b, CD11 c, CD13, CD14, CD 15, CD16, CD18, CD19, CD20, CD22, CD23, CD24, CD25, CD31, CD33, CD34, CD36, CD38, CD41, CD42b, CD45, CD49d, CD55, CD56, CD57, CD59, CD61, CD62E, CD65, CD68, CD69, CD71, CD79, CD83, CD90, CD95, CD1 05, CD1 06, CD117, CD123, CD135, CD166, Glicoforina-A, MHC-I, HLA-DRII, FMC-7, Anexina-V, y/o LIN.

En otros aspectos adicionales contemplados, los inventores contemplan un procedimiento de aislar una célula madre en la que se recibe una pluralidad de células de un tejido de mamífero. A continuación, las células se cultivan más allá de la confluencia para obtener múltiples capas y se recogen. En otra etapa, las células recolectadas se congelan lentamente hasta una temperatura superior a -100°C durante al menos 12 horas y se descongelan después. En todavía una etapa más, las células madre de linaje de la capa germinal y las células madre de tipo epiblasto se extraen de las células descongeladas usando los marcadores de la superficie celular, para formar una suspensión celular de modo que la suspensión esté enriquecida en células madre con los marcadores de superficie CEA-CAM-1⁺, SSEA-1⁻, SSEA-3⁻, SSEA-4⁻, y, opcionalmente, CD66e⁺ y CD10⁻. Más preferentemente, el tejido de mamífero es tejido conjuntivo humano. Además, generalmente se prefiere que las células madre de linaje de la capa germinal se extraigan usando anticuerpos específicos de al menos uno de CD13 y CD90 y que las células madre de tipo epiblasto se extraigan usando anticuerpos específicos de al menos uno de CD10, SSEA-1, SSEA-3 y SSEA-4.

En otros aspectos contemplados, los inventores contemplan el procedimiento de regenerar tejido en un mamífero en el que se proporcionan las células madre contempladas. En otra etapa, las células madre se implantan en el mamífero. Cuando sea deseable, la célula madre se puede inducir *in vitro* para diferenciarla en una célula madre de tipo epiblasto antes de la etapa de implantación o se puede inducir *in vitro* para diferenciarla en una célula ectodérmica, una célula endodérmica o una célula mesodérmica, o se puede inducir *in vitro* para diferenciarla en células progenitoras multipotenciales, tripotenciales, bipotenciales o unipotenciales antes de la etapa de implantación. Normalmente, la implantación se realizará en un tejido que va a sufrir reparación.

Varios objetos, características, aspectos y ventajas de la presente invención se harán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada de realizaciones preferidas de la invención.

Breve descripción de las figuras

La Figura 1A es una representación esquemática de ejemplos de usos de células madre contempladas.

La Figura 1B es una representación esquemática de la distribución de las células madre en tejidos seleccionados.

La Figura 2A es una micrografía que representa una célula madre de tipo blastómero (CMTB), una célula madre de tipo epiblasto (CMTE) y una célula progenitora.

La Figura 2B es una micrografía que representa células madre de tipo blastómero (CMTB) durante una etapa del proceso de aislamiento.

La Figura 3 es una micrografía que representa células madre de tipo blastómero (CMTB) durante otra etapa del proceso de aislamiento.

La Figura 4 es una micrografía que representa células madre de tipo blastómero (CMTB) durante otra etapa del proceso de aislamiento.

La Figura 5 es una micrografía que representa células madre de tipo blastómero (CMTB) durante la etapa final del proceso de aislamiento.

Descripción detallada

Inesperadamente, los inventores han descubierto que las células totipotenciales se pueden obtener de un mamífero, y particularmente de un ser humano, en el que dichas células madre tienen una naturaleza de tipo blastómero y en el que las células madre se aíslan de una porción (p. ej., biopsia) del mamífero o ser humano sin matar al mamífero o al ser humano. Normalmente, dichas células madre de tipo blastómero se aíslan de tejido conjuntivo de un mamífero/humano posnatal (más normalmente un adulto) y de un tamaño menor de 1 μm en estado no fijado. Particularmente debe apreciarse que las células madre de acuerdo con la materia sujeto de la invención pueden dar lugar a progenie de la línea germinal, incluidas espermatogonias.

El término "posnatal", como se usa en el presente documento, se refiere a un estadio del desarrollo de un organismo después del nacimiento (que también puede incluir el nacimiento prematuro (es decir, al menos el 60% de la gestación). Más normalmente, las células madre posnatales de acuerdo con la materia sujeto de la invención se aíslan de un adulto, pero también se estima adecuado aislarlas en etapas previas (p. ej., etapas prepubescentes o lactantes). Además, el término "totipotencial", como se usa en el presente documento junto con una célula, se refiere a una célula pluripotencial que también tiene la capacidad de dar lugar a placentarias y/o gametos.

Sorprendentemente, las células madre de tipo blastómero (CMTB) derivadas de tejidos posnatales, en lugar de embrionarios, no están comprometidos a ningún linaje tisular y son de cariotipo normal. Normalmente, las células que se contemplan expresan Oct-3/4, Nanog, Nanos, BMI-1, IDE1, IDE3, ABCG2, CXCR-4, BCL-2, CEA-CAM-1 y/o el marcador de superficie celular CD66e. En contraste con ello, las CMTB normalmente no expresan antígenos embrionarios específicos del estadio SSEA-1, SSEA-3, o SSEA-4, y habitualmente no expresan los marcadores de superficie celular CD1 a, CD2, CD3, CD4, CD5, CD7, CD8, CD9, CD10, CD11 b, CD11 c, CD 13, CD 14, CD15, CD16, CD 18, CD 19, CD20, CD22, CD23, CD24, CD25, CD31, CD33, CD34, CD36, CD38, CD41, CD42b, CD45, CD49d, CD55, CD56, CD57, CD59, CD61, CD62E, CD65, CD68, CD69, CD71, CD79, CD83, CD90, CD95, CD105, CD106, CD117, CD123, CD135, CD166, Glicoforina-A, MHC-I, HLA-DRII, FMC-7, Anexina-V y/o LIN.

Especialmente debería apreciarse que las CMTB de acuerdo con la materia sujeto de la invención permanecen quiescentes en medio definido sin suero en ausencia de agentes inhibidores de la diferenciación (p. ej., factor inhibidor de la leucemia o factor anti-diferenciación) y cuando se implantan en animales no forman tejidos cancerosos. En contraste con ello, las CMTB implantadas permanecen quiescentes después de la implantación o se incorporan en todos los tejidos que van a sufrir reparación.

También, cabe observar que las CMTB presentadas en el presente documento también pueden estimularse *in vitro* para proliferar (más habitualmente en respuesta a uno o más factores de crecimiento). Sorprendentemente, cuando se estimulan, las células madre de tipo blastómero posnatales exhiben una autorenovación extendida siempre que permanezcan no comprometidas con un linaje. Además, las CMTB no se inhiben por contacto cuando llegan a confluir y demuestran actividad telomerasa.

Los inventores descubrieron además (véase los datos experimentales) que las CMTB posnatales tienen la capacidad de generar todos los tejidos del concepto, incluidas porciones embrionarias/fetales de la placenta, células germinales y todas las células somáticas del embrión/feto de los tres linajes de la capa germinal. Por ejemplo, una línea celular de CMTB y un clon de CMTB posnatal de rata se indujeron tras más de 300 duplicaciones para formar espermatogonias y células somáticas del embrión. Las células somáticas incluyeron células madre de tipo epiblasto pluripotenciales, células madre del linaje de la capa germinal, células progenitoras comprometidas a un linaje y células diferenciadas.

Tras una exposición prolongada a dexametasona, las células madre de tipo blastómero posnatales se diferenciaron en más de 50 tipos celulares pequeños. Los tipos celulares inducidos exhibieron marcadores de expresión morfológicos y fenotípicos característicos para espermatogonias, células madre de tipo epiblasto pluripotenciales,

- células madre de linaje de la capa germinal ectodérmica, células progenitoras epidérmicas, células epidérmicas, células progenitoras neuronales, neuronas dopaminérgicas, neuronas piramidales, otros tipos de neuronas, astrocitos, oligodendrocitos, células gliales radiales, células ganglionares, células madre del linaje de la capa germinal endodérmica, células del epitelio gastrointestinal, células progenitoras hepáticas, hepatocitos, células canaliculares biliares, células ovaladas, células progenitoras pancreáticas, células ductales pancreáticas, células alfa pancreáticas, células beta pancreáticas, células delta pancreáticas, islotes pancreáticos tridimensionales, células madre del linaje de la capa germinal mesodérmica, células progenitoras musculares, músculo esquelético, músculo liso, músculo cardíaco, células progenitoras adipogénicas, grasa blanca, grasa marrón, células progenitoras condrogénicas, cartilago hialino, cartilago articular, cartilago de la placa de crecimiento, cartilago elástico, fibrocartilago, células progenitoras fibrogénicas, tendones, ligamento, tejido cicatricial, dermis, células progenitoras osteogénicas, hueso esponjoso, hueso trabecular, hueso fibrorreticular, hueso lamelar, osteoblastos, osteocitos, osteoclastos, células progenitoras endoteliogénicas, células endoteliales, células progenitoras hematopoyéticas, eritrocitos, macrófagos, linfocitos B y linfocitos T.
- 15 Dicho proceso de compromiso de linaje unidireccional inducido necesita el uso de agentes de inducción generales o de aquéllos que hacen que la célula se diferencia en linajes específicos. Se ha contemplado que una vez que se ha inducido a las células madre de tipo blastómero a comprometerse a células madre de tipo epiblasto pluripotenciales tienen cuatro opciones. Las células madre pueden (a) sufrir apoptosis, (b) permanecer quiescentes, (c) proliferar o (d) diferenciarse en células madre de linaje de capa germinal ectodérmica, endodérmica y/o mesodérmica. De forma similar, una vez que se ha inducido a las células madre de tipo epiblasto pluripotenciales a comprometerse a formar células madre de linaje de capa germinal ectodérmica, endodérmica y/o mesodérmica, tienen cuatro opciones. Las células madre pueden (a) sufrir apoptosis, (b) permanecer quiescentes, (c) proliferar o (d) diferenciarse en células progenitoras comprometidas a un linaje características de linajes tisulares específicos. Una vez comprometidas, asumen las características de las células progenitoras específicas de linaje, que, de nuevo, pueden sufrir apoptosis, permanecer quiescentes, proliferar o progresar unidireccionalmente hacia su vía de diferenciación, bajo la influencia de agentes específicos. Como células progenitoras comprometidas, su capacidad para replicarse está limitada a aproximadamente 50-70 duplicaciones celulares (ser humano) u 8-10 duplicaciones celulares (roedores) antes de que se produzca la senescencia celular programada y la muerte celular.
- 30 En consecuencia, debe reconocerse que las células madre totipotenciales posnatales humanas se pueden obtener de un modo relativamente simple y expandirse sin diferenciación durante al menos 10 generaciones, más habitualmente durante al menos 50 generaciones, incluso más habitualmente durante al menos 100 generaciones, y, más habitualmente, durante al menos 200 generaciones. De hecho, experimentos previos realizados por los inventores han demostrado que las células de acuerdo con la materia sujeto de la invención pueden sufrir al menos 100, más habitualmente al menos 200, incluso más habitualmente al menos 300 duplicaciones, en un medio de propagación definido sin suero en ausencia de inhibidores de la diferenciación (véase más adelante). Por tanto, debe reconocerse que estas células no se diferencian de forma espontánea en medio de propagación definido sin suero en ausencia de inhibidores de la diferenciación. Una vez que se han obtenido cantidades suficientes de CMTB (con o sin expansión), se pueden implantar en un ser humano sin formación de teratoma y permanecerán quiescentes a menos que estén en presencia de tejido dañado, necrótico y/o inflamado que va a sufrir reparación. Como alternativa, las CMTB que se contemplan se pueden expandir in vitro y, después, someterse a etapas de diferenciación para generar de este modo células madre pluripotenciales (p. ej., células madre de tipo epiblasto), células madre de linaje de la capa germinal (p. ej., las que forman células ectodérmicas, células mesodérmicas y células endodérmicas) y/o células progenitoras (p. ej., multipotenciales, tripotenciales, bipotenciales y unipotenciales) en cantidades que, de otro modo, sería difícil, si no imposible, obtener. Es más, debería reconocerse que dichas células estarán disponibles para implantar en un donante con un equivalente autogénico o alogénico.

Experimentos

- 50 Las siguientes descripciones y protocolos se proporcionan para suministrar ejemplos que sirvan de guía a una persona para que prepare y uso varios aspectos de la materia sujeto de la invención que se presenta en el presente documento. No obstante, debe apreciarse que se pueden realizar numerosas modificaciones sin desviarse del espíritu de la presente divulgación. Otras contemplaciones, consideraciones y detalles experimentales se proporcionan en el documento WO 01/21767, las solicitudes de patente de EE.UU. n° 2003/0161817 y 55 2004/0033214, todos ellos incorporados por referencia en el presente documento.

Soluciones, medios y suministros

- 60 Solución de blanqueo: Hipoclorito sódico al 0,5% (Clorox sin diluir).
- Desinfectante: El desinfectante de elección es solución Amphyl: 0,5% (v/v) en agua desionizada. En una garrafa de 20 l, añadir 100 ml de Amphyl (n° de catálogo 21899-600, VWR International, Bristol, CT) y, después, añadir 20 l de agua desionizada. No obstante, se puede utilizar 70% de etanol u otros desinfectantes no dañinos para las células.
- 65 70% (v/v) Etanol: Diluir 95% de etanol hasta el 70% (v/v) con agua desionizada doble. En un frasco de medio de cristal de 500 ml, mezclar 368,4 ml de etanol al 95% con 131,6 ml de agua desionizada doble. Almacenar la solución

a temperatura ambiente

- 5 Hidróxido sódico 5M estéril: Pesar 20 g de gránulos de hidróxido sódico (nº de catálogo S318, Fisher Scientific, Pittsburgh, PA) y añadir a un frasco de medio de cristal. Muy lentamente, añadir 100 ml de agua desionizada doble a los gránulos de hidróxido sódico. Una vez que se ha disuelto el hidróxido sódico, esterilizar mediante filtración la solución a través de un filtro de vacío de 0,1 µm en la parte superior del frasco. Almacenar la solución a temperatura ambiente.
- 10 Ácido clorhídrico estéril 5 M: Medir 58,3 ml de agua destilada desionizada doble e introducir en un frasco de medio de cristal de 100 ml. Medir 41,7 ml de HCl 12M (nº de catálogo 5619-02, VWR, JT5619-2, Bristol, CT) y añadir lentamente al agua. Colocar la tapa sobre el frasco y agitar suavemente para mezclar los contenidos. Esterilizar mediante filtración la solución a través de un filtro de vacío de 0,1 µm en la parte superior del frasco. Almacenar la solución a temperatura ambiente.
- 15 Solución al 0,4% de azul tripán: Pesar 0,2 g de azul tripán (nº de catálogo 11618, Eastman Kodak Company, Rochester, NY) e introducir en un frasco de medio de cristal estéril de 100 ml. En condiciones estériles, usando una pipeta de 25 ml, añadir 50 ml de tampón de aclarado estéril (nº de catálogo MBCASB-REB-200-A001, Moraga Biotechnology Corp., Los Angeles, CA. Fax: 310-440-0437; Tel 310-440-0374) que contiene 1% (o 1 ml de 100X) de solución antibiótica-antimicótica (nº de catálogo 15240 104, GIBCO), a pH 7,4. Agitar suavemente el frasco para disolver el polvo de azul tripán. Esterilizar mediante filtración la solución de azul tripán a través de un filtro de vacío de 0,2 µm en la parte superior del frasco. Almacenar esta solución a temperatura ambiente.
- 20
- 25 Tampón de aclarado estéril con $\text{Ca}^{+2}/\text{Mg}^{+2}$, pH 7,4: En condiciones estériles, tomar un frasco fresco de 500 ml de tampón de lavado estéril con $\text{Ca}^{+2}/\text{Mg}^{+2}$ (nº de catálogo MBC-ASB-REB200-A001, Moraga Biotechnology Corp.), desechar 5 ml para blanquear y, después, añadir 5 ml de la solución antibiótica-antimicótica 100x (nº de catálogo 15240-104, GIBCO), para una concentración final de 1X. Invertir el frasco algunas veces para mezclar la solución y llevar el pH a 7,4 usando hidróxido sódico 5M estéril. Almacenar la solución a 4°C.
- 30 Tampón de liberación estéril sin $\text{Ca}^{+2}/\text{Mg}^{+2}$, pH 7,4: En condiciones estériles, tomar un frasco fresco de 500 ml de tampón de liberación estéril sin $\text{Ca}^{+2}/\text{Mg}^{+2}$ (nº de catálogo MBC-ASB-REB200-A002, Moraga Biotechnology Corp.), desechar 5 ml para blanquear y, después, añadir 5 ml de la solución antibiótica-antimicótica 100x (nº de catálogo 15240-104, GIBCO), para una concentración final de 1X. Invertir el frasco algunas veces para mezclar la solución y llevar el pH a 7,4 usando hidróxido sódico 5M estéril. Almacenar la solución a 4°C.
- 35 Tampón de aclarado estéril SFD-BLSC, $\text{Ca}^{+2}/\text{Mg}^{+2}$, pH 7,4: En condiciones estériles, tomar un frasco fresco de 500 ml de tampón de aclarado estéril definido sin suero (SFD)-BLSC con $\text{Ca}^{+2}/\text{Mg}^{+2}$ (nº de catálogo MBC-ASB-REB100-A001, Moraga Biotechnology Corp.), desechar 5 ml para blanquear y, después, añadir 5 ml de la solución antibiótica-antimicótica 100x (nº de catálogo 15240-104, GIBCO), para una concentración final de 1X. Invertir el frasco algunas veces para mezclar la solución y llevar el pH a 7,4 usando hidróxido sódico 5M estéril. Almacenar la solución a 4°C.
- 40
- 45 Tampón de liberación estéril SFD-BLSC sin $\text{Ca}^{+2}/\text{Mg}^{+2}$, pH 7,4: En condiciones estériles, tomar un frasco fresco de 500 ml de tampón de liberación estéril definido sin suero (SFD)-BLSC sin $\text{Ca}^{+2}/\text{Mg}^{+2}$ (nº de catálogo MBC-ASB-REB100-A002, Moraga Biotechnology Corp.), y desechar 5,0 ml para blanquear. Añadir al frasco de cristal 5 ml de la solución antibiótica-antimicótica 100x (nº de catálogo 15240-104, GIBCO) (concentración final de 1X). Agitar para mezclar los contenidos. Ajustar el pH de la solución a 7,4 con hidróxido sódico 5 M y/o ácido clorhídrico 5M. Almacenar esta solución a 4°C.
- 50 Solución de dexametasona pH 7,4: Esta debe prepararse en etanol absoluto (EtOH) porque no es soluble en agua ni en medio. Pesar 0,039 g de dexametasona (Dex, nº de catálogo 0-1756, Sigma) y añadir 10 ml de EtOH absoluto. Esto hará una solución madre $1 \times 10^{-2}\text{M}$. Almacenar esta solución a -20 °C. Esta es la solución más concentrada de Dex que se puede fabricar con solubilidad completa. Añadir 1 ml de la solución madre de Dex por encima de 9 ml de medio Opti-MEM I con Glutamax. Alicuotar 9 ml de esta solución como cantidades de 500 µl en crioviales de 2 ml y almacenar a -20°C. Etiquetar estos tubos como Dex $1 \times 10^{-6}\text{M}$. Tomar 1 ml restante de Dex $1 \times 10^{-6}\text{M}$ y añadirlo a 9 ml de medio Opti-MEM I con Glutamax. Alicuotar 9 ml y reservar 1 ml como antes. Etiquetar estos tubos como Dex $1 \times 10^{-7}\text{M}$. Tomar 1 ml restante de Dex $1 \times 10^{-7}\text{M}$ y añadirlo a 9 ml de medio Opti-MEM I con Glutamax. Alicuotar 9 ml y reservar 1 ml como antes. Etiquetar estos tubos como Dex $1 \times 10^{-8}\text{M}$. Tomar 1 ml restante de Dex $1 \times 10^{-8}\text{M}$ y añadirlo a 9 ml de medio Opti-MEM I con Glutamax. Alicuotar 9 ml y reservar 1 ml como antes. Etiquetar estos tubos como Dex $1 \times 10^{-9}\text{M}$. Tomar 1 ml restante de Dex $1 \times 10^{-9}\text{M}$ y añadirlo a 9 ml de medio Opti-MEM I con Glutamax. Alicuotar los 10 ml. Etiquetar estos tubos como Dex $1 \times 10^{-10}\text{M}$. Estos alícuotas llevarán 500 ml de medio a la concentración de Dex etiquetada en el tubo. Almacenar los crioviales a 20°C.
- 55
- 60
- 65 Solución de insulina pH 7,4: Pesar 100 mg de insulina (nº de catálogo 1-5500, Sigma) y añadir a un tubo de centrifuga de 15 ml. En condiciones estériles, añadir 5,0 ml de medio OptiMEM I con Glutamax al tubo de centrifuga. Invertir el tubo de centrifuga para disolver la insulina. Esterilizar mediante filtración dos veces usando un filtro de jeringuilla de 0,2 µm en un tubo de centrifuga de 15 ml primero y, después, a un tubo de centrifuga de 50 ml la

segunda vez. Medir el volumen usando una pipeta de 5 ml. Añadir suficiente medio Opti-MEM I con Glutamax para llevar el volumen hasta 15 ml. La concentración final será de aproximadamente 1 mg/500 µl. Alicuotar esta solución en crioviales de 1 ml, a 500 µl cada uno. Almacenar los crioviales a -20°C. Un alícuota llevará 500 ml de medio hasta la concentración final de 2 µg/ml de insulina.

5 Suplementos de medio estéril BLSC definido sin suero, pH 7,4: En condiciones estériles, extraer 7,975 ml del frasco de 500 ml de medio de cultivo tisular estéril de elección (p. ej., EMEM, RPMI, Opti-MEM o etc.) y desechar para blanquear. Añadir el alícuota de 7,975 ml de suplementos del medio SFD-BLSC (nº de catálogo, MBC-ASB-MED-100-A001, Moraga Biotechnology Corp.) y agitar suavemente el frasco para mezclar los contenidos. Extraer 5,0 ml de la solución y desechar para blanquear. Añadir 5 ml de la solución antibiótica-antimicótica. Agitar suavemente el frasco para mezclar los contenidos y llevar el pH a 7,4. Almacenar a 4°C.

10 Suplementos de medio estéril BLSC definido sin suero, pH 7,4: En condiciones estériles, extraer 5,0 ml del frasco de 500 ml de medio basal BSLC definido sin suero (nº de catálogo MBC-ASB-REB100-A002, Moraga Biotechnology Corp.), y desechar para blanquear. Añadir 5 ml de la solución antibiótica-antimicótica. Agitar suavemente el frasco para mezclar los contenidos y llevar el pH a 7,4. Almacenar a 4°C.

15 Suplemento de propagación, pH 7,4: En condiciones estériles, extraer 6,0 ml del frasco de 500 ml de medio suplementado con suplementos del medio BLSC definido sin suero (nº de catálogo MBC-ASB-MED-100-A001, Moraga Biotechnology Corp.) y desechar para blanquear. Añadir 1,0 ml del suplemento de propagación (nº de catálogo MBC-ASB-MED-100-A003, Moraga Biotechnology Corp.) y 5 ml de solución de antibiótico-antimicótico. Agitar suavemente el frasco para mezclar los contenidos y llevar el pH a 7,4. Almacenar a 4°C.

20 Medio de propagación BLSC definido sin suero, pH 7,4: En condiciones estériles, extraer 5,0 ml del frasco de 500 ml de medio de propagación BSLC definido sin suero (nº de catálogo MBC-ASB-MED-100-A006, Moraga Biotechnology Corp.) y desechar para blanquear. Añadir 5 ml de la solución antibiótica-antimicótica. Agitar suavemente el frasco para mezclar los contenidos y llevar el pH a 7,4. Almacenar a 4°C.

25 Medio de transporte BLSC definido sin suero, pH 7,4: En condiciones estériles, extraer 15,0 ml del frasco de 500 ml de medio de transporte BSLC definido sin suero (nº de catálogo MBC-ASB-MED-100-A004, Moraga Biotechnology Corp.) y desechar para blanquear. Añadir 15 ml de la solución antibiótica-antimicótica. Agitar suavemente el frasco para mezclar los contenidos y llevar el pH a 7,4. Almacenar a 4°C.

30 Medio de crioconservación BLSC definido sin suero, pH 7,4: En condiciones estériles, tomar un frasco fresco de 100 ml de medio de crioconservación BSLC definido sin suero a pH 7,4 (nº de catálogo MBC-ASB-MED-100-A005, Moraga Biotechnology Corp.) y desechar para blanquear. Extraer 1,0 ml de medio y desechar para blanquear. Añadir 1 ml de la solución antibiótica-antimicótica. Agitar suavemente el frasco para mezclar los contenidos y llevar el pH a 7,4. Almacenar a 4°C.

35 Medio de inducción general, pH 7,4: Medio de propagación BLSC definido sin suero, pH 7,4, que contiene dexametasona 10^{-8} M, 2 µg/ml de insulina. 5% de SS9 y 10% de SS12. En condiciones estériles, tomar un frasco fresco de 500 ml de medio de propagación SFD-BLSC (nº de catálogo MBC-ASB-MED-100-A006, Moraga Biotechnology Corp.), extraer 83 ml de medio e introducirlos en un frasco estéril de 100 ml. Añadir un alícuota de 500 µl de insulina, un alícuota de 500 µl de dexametasona, 5 ml de SS9 (nº de catálogo H7889, Sigma) y 10 ml de SS12 (nº de catálogo FB-01, Omega Scientific, Tarzana, CA). Agitar suavemente el frasco para mezclar las soluciones, llevar el pH a 7,4, y almacenar a 4°C.

40 Medio de inducción ectodérmica, pH 7,4: Medio de propagación BLSC definido sin suero, que contiene dexametasona 10^{-8} M, 2 µg/ml de insulina. 15% de SS12 a pH 7,4. En condiciones estériles, tomar un frasco fresco de 500 ml de medio de propagación BSLC definido sin suero, pH 7,4, extraer 83 ml de medio e introducirlos en un frasco estéril de 100 ml. Añadir un alícuota de 500 µl de insulina, un alícuota de 500 µl de dexametasona, 15 ml de SS12 (nº de catálogo FB-01, Omega Scientific, Tarzana, CA). Agitar suavemente el frasco para mezclar las soluciones y almacenar a 4°C. Medio de inducción mesodérmica, pH 7,4: Medio de propagación BLSC definido sin suero, que contiene dexametasona 10^{-8} M, 2 µg/ml de insulina y 10% de SS9 a pH 7,4. En condiciones estériles, tomar un frasco fresco de 500 ml de medio de propagación BSLC definido sin suero, pH 7,4, extraer 83 ml de medio e introducirlos en un frasco estéril de 100 ml. Añadir un alícuota de 500 µl de insulina, un alícuota de 500 µl de dexametasona, 10 ml de SS9 (nº de catálogo H7889, Sigma). Agitar suavemente el frasco para mezclar las soluciones y almacenar a 4°C.

50 Medio de inducción endodérmica, pH 7,2: Medio de propagación BLSC definido sin suero, que contiene dexametasona 10^{-8} M, 2 µg/ml de insulina. 15% de SS12 a pH 7,4. En condiciones estériles, tomar un frasco fresco de 500 ml de medio de propagación BSLC definido sin suero, pH 7,4, extraer 83 ml de medio e introducirlos en un frasco estéril de 100 ml. Añadir un alícuota de 500 µl de insulina, un alícuota de 500 µl de dexametasona, 10 ml de SS12 (nº de catálogo FB-01, Omega Scientific, Tarzana, CA). Llevar el pH a 7,2 con HCl 6M. Agitar suavemente el frasco para mezclar las soluciones y almacenar a 4°C.

Solución de liberación tisular-SFD, pH 7,4: Solución de liberación tisular-SFD (nº de catálogo MBC-ASB-MED-100-A003, Moraga Biotechnology Corp.), almacenar los tubos -20°C hasta que sean necesarios. Justo antes de usar, descongelar, extraer 1% de la solución y desechar para blanquear. Añadir 1% de la solución antibiótica-antimicótica y llevar el pH hasta 7,4.

Solución de activación/liberación celular-SFD, pH 7,4: En condiciones estériles, tomar un frasco fresco de 500 ml de solución de liberación/activación-SFD (nº de catálogo MBC-ASB-RED-100-A004, Moraga Biotechnology Corp.), extraer 5,0 ml de la solución y desechar para blanquear. Añadir 5 ml de la solución antibiótica-antimicótica. Agitar suavemente el frasco para mezclar los contenidos y llevar el pH a 7,4. Almacenar a 4°C.

Solución inhibidora de activación/liberación celular-SFD, pH 7,4: En condiciones estériles, tomar un frasco fresco de 500 ml de solución inhibidora de liberación/activación-SFD (nº de catálogo MBC-ASB-RED-1-A005, Moraga Biotechnology Corp.), extraer 5,0 ml de la solución y desechar para blanquear. Añadir 5 ml de la solución antibiótica-antimicótica. Agitar suavemente el frasco para mezclar los contenidos y llevar el pH a 7,4. Almacenar a 4°C.

Tampón SFD-BLSC-MACS, pH 7,2: En condiciones estériles, tomar un frasco fresco de 500 ml de tampón SFD-BLSC-MACS (nº de catálogo MBC-ASB-RED-1-A006, Moraga Biotechnology Corp.), extraer 5,0 ml de la solución y desechar para blanquear. Añadir 5 ml de la solución antibiótica-antimicótica. Agitar suavemente el frasco para mezclar los contenidos y llevar el pH a 7,2. Almacenar a 4°C.

Vasos de cultivo revestidos con células madre de adulto: Matraces de 72 cm² (nº de catálogo MBC-ASB-MSD-900-A006, Moraga Biotechnology Corp.), matraces de 72 cm² (nº de catálogo MBC-ASB-MSD-900-A007, Moraga Biotechnology Corp.), placas de 6 pocillos (nº de catálogo MBC-ASB-MSD-900-A008, Moraga Biotechnology Corp.), placas de 24 pocillos (nº de catálogo MBC-ASB-MSD-900-A009, Moraga Biotechnology Corp.), placas de 48 pocillos (nº de catálogo MBC-ASB-MSD-900-A010, Moraga Biotechnology Corp.), y placas de 96 pocillos (nº de catálogo MBC-ASB-MSD-900-A011, Moraga Biotechnology Corp.)

Procedimientos

Recolección de tejidos

Preferentemente, el tejido aislado comprende tejido conjuntivo como fuente de células madre de tipo blastómero totipotenciales. El tejido conjuntivo estar asociado con varios órganos y tejidos. En este caso, el tejido se obtuvo de la pata trasera de una rata. No obstante, debe reconocerse que el tejido puede proceder de cualquier otro mamífero y, especialmente, de un ser humano (p. ej., usando técnicas de biopsia muscular bien conocidas en la técnica).

Póngase guantes. Empape toallitas con la solución desinfectante. Limpie sus manos enguantadas con las toallitas que ha empapado con el desinfectante. Pese un animal (no humano) y calcule cuándo agente anestésico necesitará para anestesiarse al animal. Use el agente anestésico adecuado por 1 kg de peso corporal. Extraer la cantidad adecuada de agente anestésico en una jeringuilla estéril provista con una aguja de 0,45 mm. Desinfectar el punto de inyección con etanol al 70% (v/v) y dejar secar. Realizar una inyección intraperitoneal a través de la pared abdominal de la rata. Una vez que la rata está inconsciente, desinfectar las patas traseras y el abdomen con etanol al 70% (v/v) y dejar secar estas zonas por evaporación. Afeitar el pelo del abdomen y las patas traseras usando una máquina para animales OsterTM provista con una cuchilla nº 40. Desinfectar las regiones afeitadas usando un pedazo de algodón empapado en betadine. Dejar que la piel se seque por evaporación. Introducir una cuchilla estéril del nº 15 en un bisturí estéril del nº 3. Realizar una incisión desde el proceso xifoideo hasta la sínfisis púbica. Sacrificar al animal cortando el diafragma usando tijeras de disección (10,6 cm). Inmediatamente después del sacrificio, realizar dos incisiones usando una cuchilla de bisturí estéril del nº 5 fijada a un mango de bisturí del nº 3. Realizar una incisión a lo largo de la superficie interna y una incisión a lo largo de la superficie lateral del muslo y la pierna. Estas incisiones ayudarán a retirar la piel. Retirar la piel de cada pata trasera usando los fórceps tisulares y un bisturí. Cortar el tendón del cuádriceps femoral y los orígenes proximales de los músculos del muslo anterior con el bisturí. Usando los fórceps tisulares, separar los músculos del muslo anterior del fémur.

Colocar los músculos del muslo anterior relativamente intactos en un tubo de centrifuga de 50 ml que contiene 25 ml de medio de transforme BLSC definido sin suero (SFD) frío (4 °C), a pH 7,4. Retirar los músculos del muslo posterior usando un bisturí para cortar las fijaciones proximales y distales de estos músculos. Colocar los músculos del muslo posterior en otro tubo de centrifuga de 50 ml que contiene 25 ml de medio de transforme BLSC definido sin suero (SFD) frío (4°C), a pH 7,4. Introducir los tubos de centrifuga de 50 ml en hielo hasta su transporte. Repetir este procedimiento con la otra pata trasera. Transportar el tejido en hielo hasta el laboratorio de cultivo tisular. Almacenar el tejido en medio de transporte en el refrigerador a 4°C durante un máximo de cinco (5) días.

Aislamiento de las células del tejido conjuntivo

Póngase guantes. Empapar toallitas con la solución desinfectante. Limpiar las manos enguantadas con las toallitas que ha empapado con el desinfectante. Limpiar todas las superficies internas de la campana de bioseguridad de clase II con toallitas empapadas en desinfectante. Dejar que la campana se seque por evaporación. Limpiar la parte exterior de la bancada con toallitas que ha empapado con el desinfectante. Dejar que la bancada se seque por

evaporación. Limpiar las superficies exteriores de todos los suministros con toallitas empapadas en desinfectante antes de introducir los suministros en la campana de bioseguridad de clase II. Sacar del refrigerador los tubos de 50 ml que contienen el tejido en solución de transporte. Limpiar la parte exterior de los tubos de 50 ml con toallitas que ha empapado con el desinfectante. Introducir los tubos de 50 ml que contienen el tejido en la campana de bioseguridad de clase II.

Pipetear 10 ml de medio de transporte SDF-BLSC estéril fresco en cada una de cuatro placas de petri de cristal de 100 mm estériles (una placa por cada tubo de 50 ml de tejido). Usar los fórceps estériles para transferir cada grupo de tejidos musculares en una placa petri de cristal de 100 mm estéril distinta. Inspeccionar el tejido muscular usando un microscopio de disección. Usando el fórceps tisular y tijeras de disección, extraer u desechar los tendones, los principales vasos sanguíneos (tal como la arteria y la vena femoral, y la arteria femoral profunda) y los principales nervios (como el nervio ciático, el nervio tibial y el nervio fabular común). El tejido restante debería consistir en, predominantemente, miofibras musculares y cubiertas del tejido conjuntivo adherente (es decir, epimisio, perimisio y endomisio). También quedarán ramas nerviosas pequeñas y tejidos vasculares más pequeños. Usar las tijeras de disección para cortar el tejido muscular en piezas de 1 cm². Colocar las piezas de tejido muscular y los tejidos conjuntivos asociadas de un grupo muscular concreto (tal como el músculo del muslo anterior de la para inferior derecha) en una placa petri de cristal estéril de 60 mm que contiene 10 ml de medio de proliferación. Cuidadosamente, picar el tejido muscular usando las tijeras de disección estériles y fórceps estériles con punta muy fina. Continuar picando el tejido hasta que tenga la consistencia de la mermelada de naranja. Tomar alícuotas de aproximadamente 5 ml del tejido picado e introducirlos en tubos de centrifuga estériles de 50 ml.

Centrifugar los tubos de centrifuga de 50 ml que contienen el tejido picado a 2000 x g durante 5 minutos a temperatura ambiente. Desechar el sobrenadante introduciéndolo en la solución de blanqueo. Estimar el volumen de cada sedimento tisular. Resuspender los sedimentos tisulares colocando los tubos de centrifuga a través de un soporte para microtubos de 80 pocillos, 12-15 veces. Añadir 7 volúmenes del sedimento del medio de propagación BLSC definido sin suero y 2 volúmenes del sedimento de la solución de liberación tisular SFD a cada suspensión de tejido. Agitar en vórtex cada tubo de centrifuga. Cortar un cuadrado de parafilm y limpiar cada lado con toallitas infectadas en desinfectante. Doblar el parafilm por la mitad y estirarlo. Envolver la doble capa de parafilm alrededor de la interfaz de la tapa y el tubo de cada tubo de centrifuga de 50 ml y sellarlo. Introducir los tubos de centrifuga sellados de 50 ml en un contenedor ((Gladware™). Poner la tapa del contenedor (Gladware). Cortar una tira de 10 cuadrados sencillos de Parafilm y limpiar cada lado con toallitas infectadas en desinfectante. Doblar el parafilm por la mitad, estirarlo y envolverlo alrededor de la interfaz de la tapa (Gladware) y el contenedor para sellarlo. Colocar el contenedor (Gladware) sellado en un baño en agitación a 37°C y fijar la velocidad de agitación a baja-media. Dejar que la mezcla de tejido/enzima para agitar a 37°C hasta que se digiera el tejido. El tejido se ha digerido cuando no hay grumos de tejido visibles y el tejido esté líquido. Una vez que el tejido se ha digerido completamente, retirar el contenedor del baño de agua en agitación. Sacar los tubos del contenedor.

Centrifugar los tubos de centrifuga de 50 ml que contienen el tejido digerido a 2000 x g durante 5 minutos a temperatura ambiente. Desechar el sobrenadante introduciéndolo en la solución de blanqueo. Asegurarse de dejar una cantidad pequeña del sobrenadante, alrededor de un volumen igual del sedimento celular, en el tubo. Esto se puede conseguir usando uno de dos procedimientos. El primer procedimiento implica verter el sobrenadante en la solución de blanqueo. El segundo procedimiento implica aspirar el sobrenadante usando una pipeta de Pasteur fijada a un aspirador de vacío. Tomar precauciones para no romper el sedimento celular con la pipeta de Pasteur. Resuspender el sedimento celular en el sobrenadante residual colocando los tubos de centrifuga longitudinalmente a través de un soporte para microtubos de 80 pocillos. Repetir este procedimiento 12-15 veces. Reconstituir el sedimento celular en 20 ml de medio de proliferación.

Filtración de la suspensión celular a través de filtros Nitex

Fijar un aparato de filtro Nitex de 90 µm encima de un frasco de medio estéril de cristal de 100 ml. Pre-humidificar el filtro Nitex de 90 µm con medio de propagación BLSC definido sin suero (SFD). Para realizar esta etapa, introducir 10 ml del medio de propagación SFD-BLSC en el tubo de la jeringuilla de 50 ml. Dejar percolar el medio por gravedad a través del filtro para saturar la membrana. La membrana se ha saturado cuando unas gotas de medio aparecen en el frasco. Si las gotas no aparecen en el frasco, repetir el procedimiento de humidificación hasta que las gotas aparezcan en el frasco. Introducir la suspensión celular en el tubo de la jeringuilla de 50 cc y dejar que fluya por gravedad a través del filtro. Una vez que la suspensión celular ha atravesado completamente el filtro, lavar el aparato de filtro de 90 µm con 10 ml de medio de propagación SF-DBLSC fresco. Retirar el frasco de medio de 100 ml del aparato de filtro de 90 µm y tapar el frasco. Retirar el filtro Nitex de 90 µm de la unidad e introducirlo en un tubo de centrifuga de 50 ml que contiene 10 ml de medio de propagación SFD-BLSC. Agitar en vórtex el tubo de centrifuga a velocidad media 3 pulsos a aproximadamente 1 segundo cada uno para liberar las células. Introducir la suspensión celular en un matraz de 75 cm² revestido con células madre adultas. Etiquetar el matraz usando un rotulador indeleble. Sacudir el matraz de cultivo tisular de un lado a otro para dispersar la suspensión celular. Introducir el matraz en un incubador humidificado que usa un ambiente de 95% aire/5% dióxido de carbono y fijar a una temperatura de 37°C.

Fijar un aparato de filtro Nitex de 20 μm encima de un frasco de medio limpio estéril de cristal de 100 ml. Pre-humidificar el filtro Nitex con medio de propagación SFD-BLSC, como se ha descrito anteriormente. Tomar la suspensión celular que se ha filtrado a través del filtro de 90 μm e introducirlo en el tubo de la jeringuilla de 50 cc para el filtro Nitex de 20 μm . Dejar que la suspensión atraviese el filtro por gravedad. Lavar el aparato del filtro de 20 μm con 10 ml de medio de proliferación fresco. Retirar el frasco de medio de 100 ml del aparato de filtro de 20 μm y taparlo. Retirar el filtro de 20 μm de la unidad e introducirlo en un tubo de centrifuga de 50 ml que contiene 10 ml de medio de propagación SFD-BLSC. Agitar en vórtex el tubo de centrifuga a velocidad media 3 pulsos de 1 segundo cada uno para liberar las células. Introducir la suspensión celular en un matraz de 75 cm^2 revestido con células madre adultas. Etiquetar el matraz usando un rotulador indeleble. Sacudir el matraz de cultivo tisular de un lado a otro para dispersar la suspensión celular. Introducir el matraz en un incubador humidificado que usa un ambiente de 95% aire/5% dióxido de carbono y fijar a 37°C. Dividir la suspensión celular tamizada en 20 volúmenes iguales e introducirlos en tubos centrifuga estériles de 15 ml. Centrifugar la suspensión celular tamizada a 2000 x g durante 5 minutos a temperatura ambiente. Tras la centrifugación, desechar el sobrenadante de todos los tubos de centrifuga introduciéndolo en la solución de blanqueo. Asegurarse de dejar una cantidad pequeña del sobrenadante, alrededor de un volumen igual del sedimento celular. Resuspender los sedimentos celulares colocando los tubos de centrifuga a través de un soporte para microtubos de 80 pocillos. Repetir 12-15 veces. Usando una pipeta de 5ml y comenzando con 5 ml de medio de propagación SFD-BLSC, lavar y triturar cada tubo de centrifuga de 15 ml en secuencia. Combinar las suspensiones celulares. Introducir la suspensión celular combinada en un tubo de centrifuga de 15 ml. Usando una pipeta de 10 ml y comenzando con 5 ml de medio de proliferación, volver a lavar y triturar cada tubo de centrifuga de 15 ml en secuencia. Combinar los resultados de todos los lavados. Añadir los lavados a la suspensión celular en un tubo de 15 ml. Triturar suavemente la suspensión celular, 10-12 veces.

Recuento de células

Medir y registrar el volumen total de la suspensión celular combinada. Extraer 0,1 ml de la suspensión celular e introducirlo en un tubo de microcentrifuga de 1,7 ml. Añadir 0,1 ml de solución de azul tripán al 0,4% a los 0,1 ml de la suspensión celular y triturar 6-8 veces suavemente para mezclar. Extraer 100 μl de la mezcla azul tripán/célula, cargar el hemocitómetro e inspeccionar al microscopio óptico con el objetivo a 10 aumentos. Determinar el número de CMTB frente a no-BLSC mediante inclusión/exclusión con azul tripán. Las CMTB (tamaño < 1 μm) no excluyen el azul tripán y aparecen teñidas de color azul. En contraste con ello, las células madre de tipo epiblasto (de tamaño 6-8 μm), las células madre de linaje de capa germinal (de tamaño 10-20 μm), las células progenitoras (de tamaño variable, pero > 5 μm) y las células diferenciadas (de tamaño variable, pero > 5 μm) viables excluyen el colorante azul tripán y aparecen transparentes. Calcular el número total de células por ml de la suspensión celular contando el número total de células teñidas y no teñidas presentes en un volumen de la suspensión celular. Esto se consigue contando todas las células presentes en las nueve cuadrículas grandes del hemocitómetro. Las células muertas tienen color azul y un tamaño > 5 μm . A continuación, calcular el número total de células madre de tipo epiblasto, células madre de linaje de capa germinal, células progenitoras y células diferenciadas viables por ml de la suspensión celular contando el número total de células transparentes/refráciles presentes en un volumen de la suspensión celular. A continuación, calcular el número total de células muertas contando el número de células teñidas con azul tripán de tamaño similar a las células de aspecto transparente. Para calcular el número de CMTB, restar las células de tamaño mayor a 5 μm (células viables + células muertas) del número total de células usando la fórmula: [(número total de células) - (células viables > 5 μm + células muertas) = CMTB]. Calcular el número medio de células (CMTB y otros tipos de células combinadas) por cada cuadrícula grande. Calcular el número medio de CMTB y otros tipos de células combinadas por ml de suspensión celular. Determinar el número total de células.

Siembra de las células

Usar densidades celulares iniciales de 0,5 a 2,0 x 10⁶ células por 5 ml de medio de propagación SFD-BLSC para matraces de 25 cm^2 revestidos con células madre adultas y de 2,0 a 4,0 x 10⁶ células por 10 ml de medio e propagación SFD-BLSC para matraces de 75 cm^2 revestidos con células madre adultas. Para sembrar las células, determinar primero el volumen de la suspensión celular necesario para dar el número requerido de células para la siembra. Después, restar el volumen de la suspensión celular del volumen del matraz (5 ml para matraces de 25 cm^2 y 10 ml para matraces de 75 cm^2) usando la fórmula: [(volumen del matraz - volumen de la suspensión celular) = volumen residual]. Pre-humidificar la superficie del matraz para dispersar la tensión superficial con el volumen residual de medio. Sacudir el matraz de atrás hacia adelante y de un lado a otro para cubrir completamente la superficie del matraz. Añadir al matraz el volumen de suspensión celular. Distribuir de forma uniforme las células a través de la superficie del matraz sacudiendo el matraz de atrás hacia adelante y de un lado a otro. Etiquetar los matraces usando un rotulador indeleble. Introducir el(los) matraz(ces) en un incubador humidificado que usa un ambiente de 95% aire/5% dióxido de carbono y fijar a una temperatura de 37°C.

Cultivo de CMTB en suspensión

Después de la siembra inicial, observar estas células a diario hasta después del primer paso y cuidarlas adecuadamente en función de las observaciones visuales de los cultivos. Por ejemplo, las células madre de tipo epiblasto, las células madre de linaje de capa germinal y las células progenitoras se fijarán a la superficie del matraz

recubierta con células madre adultas en 18-24 horas después de la siembra; en contraste con ello, las células madre de tipo blastómero permanecerán en suspensión. Por tanto, en el medio de siembra inicial después de la fijación habrá muchos tipos de células flotando, células madre de tipo blastómero, células dañadas, células lisadas, residuos celulares, enzimas intracelulares, orgánulos intracelulares etc. Los residuos celulares deben ser retirados del medio de cultivo para asegurar la posterior viabilidad de las células madre de tipo blastómero.

Dejar las células madre de tipo blastómero, las células madre de linaje de capa germinal y las células progenitoras un mínimo de 18-24 horas para que se fijen a la superficie del matraz. Póngase guantes. Empapar toallitas con la solución desinfectante. Limpiar las manos enguantadas con las toallitas que ha empapado con el desinfectante. Limpiar todas las superficies internas de la campana de bioseguridad de clase II con toallitas empapadas en desinfectante. Dejar que las superficies se sequen por evaporación. Limpiar la parte exterior de la bancada con toallitas que ha empapado con el desinfectante. Dejar que las superficies se sequen por evaporación. Limpiar las superficies exteriores de todos los suministros con toallitas empapadas en desinfectante antes de introducir los suministros en la campana de bioseguridad de clase II. Veinticuatro horas después de la siembra de células se retira el medio original y se introduce en tubos de centrifuga de polipropileno de 15 ml. Esto se puede conseguir vertiendo medio en los tubos o pipeteando medio en los tubos. Los tubos se centrifugan a 2000 g durante 5 minutos para sedimentar las CMTB. Los residuos celulares, las enzimas intracelulares, los orgánulos intracelulares etc. permanecen en suspensión. Verter el sobrenadante en la solución de blanqueo. Asegurarse de dejar una cantidad pequeña del sobrenadante, alrededor de un volumen igual del sedimento celular. Lavar el sedimento celular dos veces adicionales para eliminar los residuos celulares. Esto se consigue resuspendiendo el sedimento celular colocando los tubos de centrifuga a través de un soporte para microtubos de 80 pocillos. Repetir 12-15 veces. Añadir suficiente volumen de medio de propagación SFD-BLSC para llevar el volumen del tubo hasta 14 ml. Los tubos se centrifugan a 2000 g durante 5 minutos para sedimentar las CMTB. Verter el sobrenadante en la solución de blanqueo. Asegurarse de dejar una cantidad pequeña del sobrenadante, alrededor de un volumen igual del sedimento celular. Repetir el procedimiento.

Contar las CMTB como anteriormente, para determinar las densidades de inoculación para el crecimiento celular. Usar densidades celulares de inoculación iniciales de $0,5 \times 10^6$ células por 5 ml de medio de propagación SFD-BLSC para matraces de 25 cm^2 revestidos con células madre adultas y de $1,0 \times 10^6$ células por 10 ml de medio e propagación SFD-BLSC para matraces de 75 cm^2 revestidos con células madre adultas.

Alimentar el cultivo con medio de propagación SFD-BLSC y devolverlo al incubador. Añadir medio a los matraces cada 24-48 horas, en función del porcentaje de células dentro del (los) matraz(ces). [Por ejemplo, cuando el porcentaje aproximado de las células en los matraces es inferior al 50%, alimentar el(los) cultivo(s) con 5 ml (por matraz de 25 cm^2) o 10 ml (por matraz de 75 cm^2) de medio. Cuando el porcentaje aproximado de las células en los matraces es de 60-70 %, alimentar el(los) cultivo(s) con 10-15 ml (por matraz de 25 cm^2) o 20-30 ml (por matraz de 75 cm^2) de medio. Una vez que el porcentaje aproximado de las células en el matraz es superior al 75%, recolectar las células del matraz y dividir en nuevos matraces con una densidad de inoculación de partida de $0,5 \times 10^6$ células por 5 ml de medio de propagación SFD-BLSC para los matraces de 25 cm^2 o de $1,0 \times 10^6$ por 10 ml de de medio de propagación SFD-BLSC para los matraces de 75 cm^2 .

Recolección de las células del matraz

Las células madre totipotenciales crecen en suspensión en medio de propagación SFD-BLSC. Por tanto, continúan proliferando siempre que se mantengan con medio de proliferación, por ejemplo medio de propagación SFD-BLSC. Una vez que el porcentaje aproximado de las células en el matraz es superior al 75%, recolectar las células del matraz. Póngase guantes. Empapar toallitas con la solución desinfectante. Limpie las manos enguantadas con las toallitas que ha empapado con el desinfectante. Limpiar todas las superficies internas de la campana de bioseguridad de clase II con toallitas empapadas en la solución desinfectante. Dejarlas que se sequen por evaporación. Limpiar la parte exterior de la bancada con toallitas que ha empapado con la solución desinfectante. Dejar que la bancada se seque por evaporación. Limpiar las superficies exteriores de todos los suministros con toallitas empapadas en la solución desinfectante antes de introducir los suministros en la campana de bioseguridad de clase II.

Preparar tubos de centrifuga estériles de polipropileno de 15 ml limpiando el exterior con agente desinfectante e introduciéndolos en una campana de bioseguridad de clase II estéril. En condiciones estériles, extraer 14 ml de la suspensión celular del matraz de cultivo tisular e introducirlos en cada tubo. Esto se puede conseguir vertiendo o pipeteando la suspensión celular del matraz a los tubos. Centrifugar los tubos de centrifuga estériles de polipropileno de 15 ml a 2000 x g durante 5 minutos a temperatura ambiente. Tras la centrifugación, desechar el sobrenadante de todos los tubos de centrifuga introduciéndolo en la solución de blanqueo. Asegurarse de dejar una cantidad pequeña del sobrenadante, alrededor de un volumen igual del sedimento celular. Resuspender el sedimento celular colocando los tubos de centrifuga a través de un soporte para microtubos de 80 pocillos. Repetir este procedimiento 12-15 veces.

Usar una pipeta de 5 ml para lavar y triturar cada tubo de centrifuga de 15 ml en secuencia. Usar 1-5 ml del medio de propagación SFD-BLSC en este procedimiento. El volumen que se va a usar dependerá del volumen de la

suspensión celular que se vaya a resuspender. Introducir la suspensión celular combinada en un tubo de centrifuga de 15 ml. Contar las células como se ha indicado con anterioridad.

- 5 Dividir las células en matraces nuevos o crioconservar las células. Inocular cultivos nuevos con una densidad de partida de $0,5 \times 10^6$ células por 5 ml de medio de propagación SFD-BLSC para matraces de 25 cm^2 revestidos con células madre adultas y de $1,0 \times 10^6$ células por 10 ml de medio de propagación SFD-BLSC para matraces de 75 cm^2 revestidos con células madre adultas. Procesar los cultivos tal como se ha descrito anteriormente para la propagación.

10 *Liberación de las células adherentes*

- Las células madre de tipo epiblastos, las células madre de linaje de la capa germinal, las células progenitores y las células diferenciadas se adhieren a matraces revestidos con gelatina. Si algunos o todos estos tipos celulares se usan para ensayos de caracterización posteriores, o se usan de otro modo, se deben retirar de sus respectivos matraces de propagación revestidos con células madre adultas. Esto se consigue del siguiente modo.

- 20 En condiciones estériles, añadir 2 ml de solución inhibidora de liberación/activación celular SFD, pH 7,4, a un tubo de centrifuga de 15 ml. Repetir esta etapa para cada matraz de células que se liberen con la solución de liberación/activación de células SFD. Desechar el medio del matraz de cultivo introduciéndolo en la solución de blanqueo. Lavar el matraz de cultivo con tampón de aclarado estéril con $\text{Ca}^{+2}/\text{Mg}^{+2}$, pH 7,4: 13 ml para el matraz de 25 cm^2 y 35 ml para el matraz del 75 cm^2 . Esperar un mínimo de 5 minutos y, después, desechar la solución de lavado introduciéndola en la solución de blanqueo. Repetir este procedimiento de lavado una vez más.

- 25 Lavar el matraz de cultivo con tampón de aclarado estéril sin $\text{Ca}^{+2}/\text{Mg}^{+2}$, pH 7,4: 10 ml para el matraz de 25 cm^2 y 25 ml para el matraz del 75 cm^2 . Esperar un mínimo de 5 minutos y desechar la solución de lavado introduciéndola en la solución de blanqueo. Añadir 4 ml de la solución de liberación/activación celular SFD, pH 7,4, al matraz para liberar las células de la superficie del matraz. Las células se sacarán en 2-3 minutos. Sacudir suavemente el matraz de cultivo tisular de un lado a otro para potenciar el proceso de liberación. Una vez que las células se han liberado de la superficie del matraz. Usar una pipeta de 5 ml para triturar las células en suspensión. Lavar la superficie del matraz con la suspensión celular. Extraer la suspensión celular del matraz e introducirla en un tubo de 15 ml que contiene el suero termoinactivado. Inspeccionar visualmente los matraces para asegurar que las células se han liberado de la superficie del matraz. Lavar los matraces 2 ml de medio de propagación SFD-BLSC para asegurar que más del 99% de las células se han liberado de la superficie del matraz. Añadir las soluciones de lavado a tubos de centrifuga de 15 ml que contienen la solución inhibidora de liberación/activación celular SFD. Cargar el tubo de centrifuga de 15 ml que contiene la suspensión celular, tripsina y la solución de liberación/activación celular SFD hasta la marca de 14 ml con medio de propagación SFD-BLSC. Invertir suavemente el tubo dos veces para mezclar los contenidos. Centrifugar el tubo a $2000 \times g$ durante 5 minutos a temperatura ambiente. Tras la centrifugación, desechar el sobrenadante de todos los tubos de centrifuga introduciéndolo en la solución de blanqueo. Asegurarse de dejar una cantidad pequeña del sobrenadante, alrededor de un volumen igual del sedimento celular.
- 40 Resuspender el sedimento celular colocando los tubos de centrifuga a través de un soporte para microtubos de 80 pocillos. Repetir este procedimiento 12-15 veces.

- 45 Usar una pipeta de 5 ml para lavar y triturar cada tubo de centrifuga de 15 ml en secuencia. Usar 1-5 ml del medio de propagación SFD-BLSC en este procedimiento. El volumen que se va a usar dependerá del volumen de la suspensión celular que se vaya a resuspender. Introducir la suspensión celular combinada en un tubo de centrifuga de 15 ml. Contar las células como se ha indicado con anterioridad.

Crioconservación de células madre totipotenciales

- 50 Las células madre de tipo blastómero totipotenciales adultas se deben crioconservar mediante congelación lenta y almacenamiento a una temperatura de -50°C a -100°C . Empapar toallitas con la solución desinfectante. Limpiar las manos enguantadas con las toallitas que ha empapado con la solución desinfectante. Limpiar todas las superficies internas de una campana de bioseguridad de clase II con toallitas empapadas en la solución desinfectante. Dejarlas que se sequen por evaporación. Limpiar la parte exterior de la bancada con toallitas que ha empapado con la solución desinfectante. Dejar que la bancada se seque por evaporación. Limpiar las superficies exteriores de todos los suministros con toallitas empapadas en la solución desinfectante antes de introducir los suministros en la campana de bioseguridad de clase II.

- 60 Determinar el número de criviales que se van a usar en base al recuento celular. El intervalo óptimo de densidad celular final para la crioconservación es de $1-2 \times 10^6$ células por ml; por tanto, las células se diluirán a $2-4 \times 10^6$ células por ml para la crioconservación. Etiquetar los criviales. Limpiar la parte exterior de los viales con toallitas que ha empapado con la solución desinfectante. Introducir los criviales en un soporte para microtubos de 80 pocillos. Pipetear 0,5 ml de la suspensión celular en cada crivial. Añadir 0,5 ml de medio de crioconservación SFD-BLSC a cada tubo. Apretar las tapas de los criviales. Invertir suavemente los criviales dos veces para mezclar los contenidos. Introducir suavemente los criviales en una cámara de congelación que contiene 100% de alcohol isopropílico. Introducir la cámara de congelación en un congelador de -50°C a -100°C . Dejar que se congelen y

almacenar durante un mínimo de 12 horas antes de descongelar y sembrar las células.

Descongelación las células congeladas para siembra

- 5 Póngase guantes. Empapar toallitas con la solución desinfectante. Limpiar las manos enguantadas con las toallitas que ha empapado con la solución desinfectante. Limpiar todas las superficies internas de una campana de bioseguridad de clase II con toallitas empapadas en la solución desinfectante. Dejar que las superficies se sequen por evaporación. Limpiar la parte exterior de la bancada con toallitas que ha empapado con la solución desinfectante. Dejar que las superficies se sequen por evaporación. Limpiar las superficies exteriores de todos los suministros con toallitas empapadas en la solución desinfectante antes de introducir los suministros en la campana de bioseguridad de clase II. Determinar el número de crioviales de las células congeladas que se van a usar en base a la composición de los constituyentes celulares y del recuento celular. Usar un tubo de centrifuga de 15 ml por criovial.
- 10
- 15 Pipetear 13 ml de medio de propagación SFD-BLSC a temperatura ambiente en cada tubo de centrifuga de 15 ml. Sacar los crioviales del congelador. Ultradescongelar la suspensión celular congelada en los crioviales. Esto se puede conseguir mediante numerosos procedimientos, incluida la introducción de crioviales en un baño de agua a temperatura ambiente hasta que se descongelan o introducir el criovial en una mano enguantada y dejar que el calor corporal descongele la suspensión celular. (En cualquiera de los procedimientos, no dejar que la temperatura de la suspensión celular se eleve por encima de la temperatura ambiente.) Retirar suavemente la suspensión celular descongelada usando una pipeta de 1 ml. Añadir la suspensión celular, gota a gota, a un tubo de 15 ml que contiene 13 ml de medio de propagación SFD-BLSC. Apretar la tapa de rosca. Invertir suavemente el tubo dos veces para mezclar los contenidos. Centrifugar el tubo a 2000 x g durante 5 minutos a temperatura ambiente. Tras la centrifugación, desechar el sobrenadante de todos los tubos de centrifuga introduciéndolo en la solución de blanqueo. Asegurarse de dejar una cantidad pequeña del sobrenadante, alrededor de un volumen igual del sedimento celular. Resuspender el sedimento celular colocando los tubos de centrifuga a través de un soporte para microtubos de 80 pocillos. Repetir este procedimiento 12-15 veces.
- 20
- 25 Usando una pipeta de 5ml y comenzando con 2 ml de medio de propagación SFD-BLSC, lavar y triturar cada tubo de centrifuga de 15 ml en secuencia, y combinar las suspensiones celulares. Introducir la suspensión celular combinada en un tubo de centrifuga de 15 ml. Contar las células, sembrar y cultivar como se ha indicado con anterioridad.
- 30

Segregación de las células madre de tipo blastómero totipotenciales usando epítomos de superficie celular

- 35 Extracción de células madre de linaje de capa germinal: Las células madre adultas se pueden segregar en base a sus perfiles únicos de epítomos de superficie celular. Se pueden usar al menos tres técnicas diferentes, es decir citometría de flujo, clasificación con perlas magnéticas y "panning". La descripción específica siguiente es representativa de la clasificación con perlas magnéticas.
- 40 Póngase guantes. Empapar toallitas con la solución desinfectante. Limpiar las manos enguantadas con las toallitas que ha empapado con la solución desinfectante. Limpiar todas las superficies internas de una campana de bioseguridad de clase II con toallitas empapadas en la solución desinfectante. Dejar que las superficies se sequen por evaporación. Limpiar la parte exterior de la bancada con toallitas que ha empapado con la solución desinfectante. Dejar que la bancada se seque por evaporación. Limpiar las superficies exteriores de todos los suministros con toallitas empapadas en la solución desinfectante antes de introducir los suministros en la campana de bioseguridad de clase II. Limpiar la superficie de la gradilla de Miltenyi y los imanes con toallitas empapadas en la solución desinfectante antes de introducir los suministros de Miltenyi en una campana de bioseguridad de clase II.
- 45
- 50 Recolectar las células como se ha descrito con anterioridad. Reconstituir las células usando tampón de SFD-BLSC-MACS. Contar las células y dividir las células en alícuotas de 2×10^6 células por ml en tubos de centrifuga de 15 ml. Usando una técnica estéril, añadir 1 pg por ml de CD13 y 1 µg por ml de CD90 para cada alícuota de 2×10^6 células. Agitar en vórtex (Vortex Mixer™) tres veces usando pulsos de 1 segundo de duración con un parámetro de 6. Incubar las alícuotas celulares durante 60 minutos a temperatura ambiente.
- 55
- 60 Lavar las células cuidadosamente añadiendo 10-20x el volumen de tampón SFD-BLSC-MACS (1^{er} lavado). Triturar la suspensión celular 12-15 veces. Centrifugar el(los) tubo(s) a 2000 x g durante 5 minutos a temperatura ambiente. Tras la centrifugación, desechar el sobrenadante de todos los tubos de centrifuga introduciéndolo en la solución de blanqueo. Asegurarse de dejar una cantidad pequeña del sobrenadante, alrededor de un volumen igual del sedimento celular.
- Resuspender el sedimento celular colocando el tubo de centrifuga a través de un soporte para microtubos de 80 pocillos. Repetir este procedimiento 12-15 veces. Lavar las células cuidadosamente añadiendo 10-20x el volumen de tampón SFD-BLSC-MACS (2^o lavado). Triturar la suspensión celular 12-15 veces. Centrifugar el(los) tubo(s) a 2000 x g durante 5 minutos a temperatura ambiente. Tras la centrifugación, desechar el sobrenadante de todos los tubos de centrifuga introduciéndolo en la solución de blanqueo. Asegurarse de dejar una cantidad pequeña del
- 65

sobrenadante, alrededor de un volumen igual del sedimento celular. Resuspender el sedimento celular colocando el tubo de centrifuga a través de un soporte para microtubos de 80 pocillos. Repetir este procedimiento 12-15 veces. Lavar las células cuidadosamente añadiendo 10-20x el volumen de tampón SFD-BLSC-MACS (3^{er} lavado). Triturar la suspensión celular 12-15 veces. Centrifugar el(los) tubo(s) a 2000 x g durante 5 minutos a temperatura ambiente.

Tras la centrifugación, desechar el sobrenadante de todos los tubos de centrifuga introduciéndolo en la solución de blanqueo. Asegurar que se dejan aproximadamente 200 µl del sobrenadante. Resuspender el sedimento celular colocando el tubo de centrifuga a través de un soporte para microtubos de 80 pocillos. Repetir este procedimiento 12-15 veces.

Añadir 2 gotas del anticuerpo secundario del kit Vector ABC (IgG-biotina anti-ratón, n° de catálogo PK4002, Vector Laboratories, Burlingame, CA). Agitar en vórtex tres veces usando pulsos de 1 segundo de duración con un parámetro de 6. Incubar los alícuotas celulares durante 20 minutos a temperatura ambiente. Lavar las células cuidadosamente añadiendo 10-20x el volumen de tampón SFD-BLSC-MACS (1^{er} lavado). Triturar la suspensión celular 12-15 veces. Centrifugar el(los) tubo(s) a 2000 x g durante 5 minutos a temperatura ambiente. Tras la centrifugación, desechar el sobrenadante de todos los tubos de centrifuga introduciéndolo en la solución de blanqueo. Asegurarse de dejar una cantidad pequeña del sobrenadante, alrededor de un volumen igual del sedimento celular. Resuspender el sedimento celular colocando el tubo de centrifuga a través de un soporte para microtubos de 80 pocillos. Repetir este procedimiento 12-15 veces. Lavar las células cuidadosamente añadiendo 10-20x el volumen de tampón SFD-BLSC-MACS (2^o lavado). Triturar la suspensión celular 12-15 veces. Centrifugar el(los) tubo(s) a 2000 x g durante 5 minutos a temperatura ambiente.

Tras la centrifugación, desechar el sobrenadante de todos los tubos de centrifuga introduciéndolo en la solución de blanqueo. Asegurarse de dejar una cantidad pequeña del sobrenadante, alrededor de un volumen igual del sedimento celular. Resuspender el sedimento celular colocando el tubo de centrifuga a través de un soporte para microtubos de 80 pocillos. Repetir este procedimiento 12-15 veces. Lavar las células cuidadosamente añadiendo 10-20x el volumen de tampón SFD-BLSC-MACS (3^{er} lavado). Triturar la suspensión celular 12-15 veces. Centrifugar el(los) tubo(s) a 2000 x g durante 5 minutos a temperatura ambiente. Tras la centrifugación, desechar el sobrenadante de todos los tubos de centrifuga introduciéndolo en la solución de blanqueo. Asegurar que se dejan aproximadamente 200 µl del sobrenadante de tampón SFD-BLSC-MACS por 10⁷ células totales. Para menos células, usar el mismo volumen de tampón. Resuspender el sedimento celular colocando el tubo de centrifuga a través de un soporte para microtubos de 80 pocillos. Repetir este procedimiento 12-15 veces. Añadir 20 µl de micropartículas anti-biotina MACS (n° de catálogo 130-090-485, Miltenyi Biotec Inc., Auburn, CA) por 10⁷ células totales. Para menos células, usar el mismo volumen. Agitar el vórtex tres veces, usando pulsos de 1 segundo de duración con un parámetro de 6. Incubar durante 15 minutos a de 6°C a 12°C. Repetir las etapas de lavado anteriores y, después, resuspender el sedimento celular en 500 µl de tampón SFD-BLSC-MACS por 10⁸ células totales. Para menos células, usar el mismo volumen.

Escoger una columna de separación de Miltenyi (n° de catálogo 130-042-201, Miltenyi Biotec Inc.) para hasta 2 x 10⁸ células totales. Introducir la columna en el campo magnético. Preparar la columna lavándola con 500 µl de tampón SFD-BLSC-MACS. Recolectar el pase a través del volumen en un tubo y desecharlo introduciéndolo en la solución de blanqueo. Aplicar la suspensión celular que contiene hasta 10⁸ células por 500 µl de tampón SFD-BLSC-MACS en la columna (el volumen máximo de la columna es 1000 µl). Dejar que las células negativas la atraviesen. Recolectar el pase a través del volumen en un tubo y guardarlo la fracción negativa. Aclarar tres veces con 500 µl de tampón de SFD-BLSC-MACS. Añadir los volúmenes de aclarado a la fracción negativa. Retirar la columna del campo magnético.

Colocar la columna sobre un tubo de recolección adecuado. Pipetear 1 ml de tampón SFD-BLSC-MACS sobre la columna. Retirar la fracción positiva empujando firmemente el tampón SFD-BLSC-MACS a través de la columna usando el émbolo suministrado con la columna. Recolectar este volumen en un tubo como la fracción positiva. Repetir este último procedimiento añadiendo 1 ml de tampón SFD-BLSC-MACS a la columna y empujándolo a través con el émbolo. Centrifugar las células y contra las fracciones positiva y negativa por separado. La fracción de la columna positiva contiene las células madre de linaje de capa germinal. La fracción de la columna negativa contiene las células madre de tipo epiblasto pluripotenciales y las células madre de tipo blastómero totipotenciales. Centrifugar los tubos que contienen las fracciones de la columna negativa a 2000 x g durante 5 minutos a temperatura ambiente. Tras la centrifugación, desechar el sobrenadante de todos los tubos de centrifuga introduciéndolo en la solución de blanqueo. Asegurarse de dejar una cantidad pequeña del sobrenadante, alrededor de un volumen igual del sedimento celular.

Resuspender el sedimento celular colocando el tubo de centrifuga a través de un soporte para microtubos de 80 pocillos. Repetir este procedimiento 12-15 veces. Reconstituir las células en medio de proliferación. Contar, sembrar y cultivar las células.

Extracción de células madre de tipo epiblasto pluripotenciales: Póngase guantes. Empapar toallitas con la solución desinfectante. Limpiar las manos enguantadas con las toallitas que ha empapado con la solución desinfectante. Limpiar todas las superficies internas de una campana de bioseguridad de clase II con toallitas empapadas en la

solución desinfectante. Dejar que las superficies se sequen por evaporación. Limpiar la parte exterior de la bancada con toallitas que ha empapado con la solución desinfectante. Dejar que la bancada se seque por evaporación. Limpiar las superficies exteriores de todos los suministros con toallitas empapadas en la solución desinfectante antes de introducir los suministros en la campana de bioseguridad de clase II. Limpiar la superficie de la gradilla de Miltenyi y los imanes con toallitas empapadas en la solución desinfectante antes de introducir los suministros de Miltenyi en una campana de bioseguridad de clase II.

Recolectar las células como se ha descrito con anterioridad. Reconstituir las células usando tampón de SFD-BLSC-MACS. Contar las células y dividir las células en alícuotas de 2×10^6 células por ml en tubos de centrifuga de 15 ml. Usando una técnica estéril, añadir 1 μg por ml de CD10, 50 μg por ml de SSEA-1, 50 μg por ml de SSEA-3 y 50 μg por ml de SSE-4 por cada alícuota de 2×10^6 células. Agitar en vórtex tres veces usando pulsos de 1 segundo de duración con un parámetro de 6. Incubar los alícuotas celulares durante 60 minutos a temperatura ambiente.

Lavar las células cuidadosamente añadiendo 10-20x el volumen de tampón SFD-BLSC-MACS (1^{er} lavado). Triturar la suspensión celular 12-15 veces. Centrifugar el(los) tubo(s) a 2000 x g durante 5 minutos a temperatura ambiente. Tras la centrifugación, desechar el sobrenadante de todos los tubos de centrifuga introduciéndolo en la solución de blanqueo. Asegurarse de dejar una cantidad pequeña del sobrenadante, alrededor de un volumen igual del sedimento celular.

Resuspender el sedimento celular colocando el tubo de centrifuga a través de un soporte para microtubos de 80 pocillos. Repetir este procedimiento 12-15 veces. Lavar las células cuidadosamente añadiendo 10-20x el volumen de tampón SFD-BLSC-MACS (2^o lavado). Triturar la suspensión celular 12-15 veces. Centrifugar el(los) tubo(s) a 2000 x g durante 5 minutos a temperatura ambiente. Tras la centrifugación, desechar el sobrenadante de todos los tubos de centrifuga introduciéndolo en la solución de blanqueo. Asegurarse de dejar una cantidad pequeña del sobrenadante, alrededor de un volumen igual del sedimento celular. Resuspender el sedimento celular colocando el tubo de centrifuga a través de un soporte para microtubos de 80 pocillos. Repetir este procedimiento 12-15 veces. Lavar las células cuidadosamente añadiendo 10-20x el volumen de tampón SFD-BLSC-MACS (3^{er} lavado). Triturar la suspensión celular 12-15 veces. Centrifugar el(los) tubo(s) a 2000 x g durante 5 minutos a temperatura ambiente. Tras la centrifugación, desechar el sobrenadante de todos los tubos de centrifuga introduciéndolo en la solución de blanqueo. Asegurar que se dejan aproximadamente 200 μl del sobrenadante. Resuspender el sedimento celular colocando el tubo de centrifuga a través de un soporte para microtubos de 80 pocillos. Repetir este procedimiento 12-15 veces.

Añadir 2 gotas del anticuerpo secundario del kit Vector ABC (IgG-biotina anti-ratón, n° de catálogo PK4002, Vector Laboratories, Burlingame, CA). Agitar en vórtex tres veces usando pulsos de 1 segundo de duración con un parámetro de 6. Incubar los alícuotas celulares durante 20 minutos a temperatura ambiente. Lavar las células cuidadosamente añadiendo 10-20x el volumen de tampón SFD-BLSC-MACS (1^{er} lavado). Triturar la suspensión celular 12-15 veces. Centrifugar el(los) tubo(s) a 2000 x g durante 5 minutos a temperatura ambiente. Tras la centrifugación, desechar el sobrenadante de todos los tubos de centrifuga introduciéndolo en la solución de blanqueo. Asegurarse de dejar una cantidad pequeña del sobrenadante, alrededor de un volumen igual del sedimento celular. Resuspender el sedimento celular colocando el tubo de centrifuga a través de un soporte para microtubos de 80 pocillos. Repetir este procedimiento 12-15 veces. Lavar las células cuidadosamente añadiendo 10-20x el volumen de tampón SFD-BLSC-MACS (2^o lavado). Triturar la suspensión celular 12-15 veces. Centrifugar el(los) tubo(s) a 2000 x g durante 5 minutos a temperatura ambiente.

Tras la centrifugación, desechar el sobrenadante de todos los tubos de centrifuga introduciéndolo en la solución de blanqueo. Asegurarse de dejar una cantidad pequeña del sobrenadante, alrededor de un volumen igual del sedimento celular. Resuspender el sedimento celular colocando el tubo de centrifuga a través de un soporte para microtubos de 80 pocillos. Repetir este procedimiento 12-15 veces. Lavar las células cuidadosamente añadiendo 10-20x el volumen de tampón SFD-BLSC-MACS (3^{er} lavado). Triturar la suspensión celular 12-15 veces. Centrifugar el(los) tubo(s) a 2000 x g durante 5 minutos a temperatura ambiente. Tras la centrifugación, desechar el sobrenadante de todos los tubos de centrifuga introduciéndolo en la solución de blanqueo. Asegurar que se dejan aproximadamente 200 μl del sobrenadante de tampón SFD-BLSC-MACS por 10^7 células totales. Para menos células, usar el mismo volumen de tampón. Resuspender el sedimento celular colocando el tubo de centrifuga a través de un soporte para microtubos de 80 pocillos. Repetir este procedimiento 12-15 veces. Añadir 20 μl de micropartículas anti-biotina MACS (n° de catálogo 130-090-485, Miltenyi Biotec Inc.) por 10^7 células totales. Para menos células, usar el mismo volumen. Agitar en vórtex tres veces usando pulsos de 1 segundo de duración con un parámetro de 6.

Incubar durante 15 minutos a de 6°C a 12°C. Repetir las etapas de lavado anteriores y, después, resuspender el sedimento celular en 500 μl de tampón SFD-BLSC-MACS por 10^8 células totales. Para menos células, usar el mismo volumen.

Escoger una columna de separación de Miltenyi (n° de catálogo 130-042-201, Miltenyi Biotec Inc.) para hasta 2×10^8 células totales. Introducir la columna en el campo magnético. Preparar la columna lavándola con 500 μl de tampón

SFD-BLSC-MACS.

Recolectar el pase a través del volumen en un tubo y desecharlo introduciéndolo en la solución de blanqueo. Aplicar la suspensión celular que contiene hasta 10^8 células por 500 μ l de tampón SFD-BLSC-MACS en la columna (el volumen máximo de la columna es 1000 μ l). Dejar que las células negativas la atraviesen. Recolectar el pase a través del volumen en un tubo y guardarlo la fracción negativa. Aclarar tres veces con 500 μ l de tampón de SFD-BLSC-MACS. Añadir los volúmenes de aclarado a la fracción negativa. Retirar la columna del campo magnético.

Colocar la columna sobre un tubo de recolección adecuado. Pipetear 1 ml de tampón SFD-BLSC-MACS sobre la columna. Retirar la fracción positiva empujando firmemente el tampón SFD-BLSC-MACS a través de la columna usando el émbolo suministrado con la columna. Recolectar este volumen en un tubo como la fracción positiva. Repetir este último procedimiento añadiendo 1 ml de tampón SFD-BLSC-MACS a la columna y empujándolo a través con el émbolo. Centrifugar las células y contra las fracciones positiva y negativa por separado. La fracción de la columna positiva contiene las células madre de tipo epiblasto pluripotencial. La fracción de la columna negativa contiene las células madre de tipo blastómero totipotencial.

Centrifugar el(los) tubo(s) de la fracción negativa a 2000 x g durante 5 minutos a temperatura ambiente. Tras la centrifugación, desechar el sobrenadante de todos los tubos de centrifuga introduciéndolo en la solución de blanqueo. Asegurarse de dejar una cantidad pequeña del sobrenadante, alrededor de un volumen igual del sedimento celular. Resuspender el sedimento celular colocando el tubo de centrifuga a través de un soporte para microtubos de 80 pocillos. Repetir este procedimiento 12-15 veces. Reconstituir las células usando medio de propagación SFD-BLSC. Contar, sembrar y cultivar las células en cultivos de suspensión. En numerosos cultivos por separado, las CMTB obtenidas se pudieron cultivar durante más de 100, más habitualmente más de 200 y más habitualmente más de 300 duplicaciones sin pérdida del cariotipo normal al tiempo que conservan la naturaleza totipotencial. Sorprendentemente, en experimentos adicionales, las CMTB se cultivaron de forma continua sin diferenciación espontánea en medio definido sin suero y en ausencia de inhibidores de la diferenciación.

Análisis clonogénico repetitivo de células sencillas: Estudios de clonación previos (Young y col., 1993, 1998b, 2001 a, 2004b) revelaron que se podrían realizar análisis repetitivos clonogénicos de células sencillas si se cultivaron células individuales en medio previamente acondicionado mediante células de proliferación elevada de la misma línea parental. La Tabla 1 que figura a continuación representa ejemplos de marcadores de superficie de las células por separado:

Tabla 1

-/-	UNIDO	ELUYENTE
Tamaño (en siembra)	Pequeño	Muy pequeño
Marcador:		
CEA-CAM-1	-	+
SSEA-1	+	-
SSEA-3	+	-
SSEA-4	+	-
CD66e	-	+
CD10	+	-
Ectodérmico	+	+
Mesodérmico	+	+
Endodérmico	+	+
Gametos	-	+
Identificación	CMTE	CMTB

Análisis adicionales de moléculas de interés encontradas (además de la telomerasa) en las CMTB fueron CD66e, y CEA-CAM-1, y, en varios casos, Oct-3/4, Nanong, Nanos, BMI-1, IDE1, IDE3, ABCG2, CXCR-4, y BCL-2, mientras que los marcadores de superficie celular SSEA-1, SSEA-3, SSEA-4, CD1 a, C02, CD3, CD4, CD5, CD7, COB, CD9, CD10, CD11 b, CD11 c, CD13, CD14, CD15, CD16, CD18, CD19, CD20, CD22, CD23, CD24, CD25, CD31, CD33, CD34, CD36, CD38, CD41, CD42b, CD45, CD49d, CD55, CD56, CD57, CD59, CD61, CD62E, CD65, CD68, CD69, CD71, CD79, CD83, CD90, CD95, CD105, CD106, CD117, CD123, CD135, CD166, Glicoforina-A, MHC-I, HLA-DRII, FMC7, Anexina-V y LIN estaban notablemente ausentes. Por tanto, las células madre totipotenciales posnatales aisladas que tienen marcadores de superficie CEA-CAM-1⁺, CD66e⁺, CD10⁺, SSEA-1⁺, SSEA-3⁺ y SSEA-4⁺ se obtuvieron de un modo relativamente sencillo. Por supuesto, debería reconocerse que las células obtenidas de este

modo se pueden aislar de otros numerosos mamíferos, incluidos rata, ratón, ganado y ser humano.

Clonación

Póngase guantes. Empapar toallitas con la solución desinfectante. Limpiar las manos enguantadas con las toallitas que ha empapado con la solución desinfectante. Limpiar todas las superficies internas de una campana de bioseguridad de clase II con toallitas empapadas en la solución desinfectante. Dejar que las superficies se sequen por evaporación. Limpiar la parte exterior de la bancada con toallitas que ha empapado con la solución desinfectante. Dejar que la bancada se seque por evaporación. Limpiar las superficies exteriores de todos los suministros con toallitas empapadas en la solución desinfectante antes de introducir los suministros en la campana de bioseguridad de clase II.

Extraer las células de los cultivos de suspensión y procesar para el recuento celular como se ha descrito anteriormente. Diluir las células hasta la densidad clonal: 1 célula por 5 μ l de medio de clonación. Usando un aparato de pipeteo de 10 μ l y una punta de pipeta de 10 μ l, introducir la célula con 5 μ l de medio en el centro de cada pocillo de la placa de 96 pocillos revestidos con células madre adultas (nº de catálogo MBC-ASB-MSD-900A011, Moraga Biotechnology Corp.). Añadir 50 μ l del medio de clonación (nº de catálogo MBC-ASB-MED-100-A008, Moraga Biotechnology Corp.) a cada pocillo. Esperar seis horas y, después, contar el número de células en cada pocillo. Para los pocillos que no tienen células o dos o más células, retirar el medio. Incubar los pocillos sin células o dos o más células con 100 μ l de etanol al 70% durante 10 minutos. Sustituir el alcohol con 200 μ l de solución de azida sódica al 5% (v/v) en tampón de aclarado estéril. Comprobar los pocillos cada tres días para determinar el crecimiento celular. Cuando las células en proliferación alcanzan aproximadamente el 50% de las células suspendidas en medio, añadir 100 μ l de medio de clonación. Cuando las células en proliferación alcanzan aproximadamente el 70% de las células suspendidas en medio, añadir 100 μ l de medio de clonación. Cuando las células en proliferación alcanzan aproximadamente el 90% de la confluencia, retirar las células de los pocillos pipeteando la suspensión celular. Añadir la suspensión celular *in toto* a placas de 24 pocillos revestidas con células madre adultas y alimentarlas con 0,5 ml de medio de clonación. Cuando las células en proliferación alcanzan aproximadamente el 50% de las células suspendidas en medio, añadir 0,5 ml del medio de clonación. Cuando las células alcanzan aproximadamente el 70% de las células suspendidas en medio, añadir 1,0 ml del medio de clonación. Cuando las células alcanzan aproximadamente el 90% de la confluencia, retirar las células de los pocillos pipeteando la suspensión celular. Añadir la suspensión celular *in toto* a placas de 6 pocillos revestidas con células madre adultas y alimentarlas con 1,0 ml de medio de clonación. Cuando las células en proliferación alcanzan aproximadamente el 50% de las células suspendidas en medio, añadir 1,0 ml del medio de clonación. Cuando aproximadamente el 70% de las células suspendidas en medio, añadir 2,0 ml del medio de clonación. Cuando las células alcanzan aproximadamente el 90% de la confluencia, retirar las células de los pocillos pipeteando la suspensión celular. Añadir la suspensión celular *in toto* en un matraz de 25 cm² revestido con células madre. Añadir medio de propagación SFD-BLSC a los matraces cada 24-48 horas, en función del porcentaje de células dentro del (los) matraz(es). [Por ejemplo, cuando el porcentaje aproximado de las células en los matraces es inferior al 50%, alimentar el(los) cultivo(s) con 5 ml por matraz de 25 cm² del medio de propagación SFD-BLSC. Cuando el porcentaje aproximado de las células en los matraces es 60 -70%, alimentar el(los) cultivo(s) con 10-15 ml por matraz de 25 cm² del medio de propagación SFD-BLSC. Una vez que el porcentaje aproximado de las células en el matraz es superior al 75%, recolectar las células del matraz y dividir en nuevos matraces con una densidad de inoculación de partida de 0,5 x 10⁶ células por 5 ml de medio de propagación SFD-BLSC para los matraces de 25 cm² revestidos con gelatina o de 1,0 x 10⁶ por 10 ml de medio de propagación SFD-BLSC para los matraces de 75 cm² revestidos con gelatina.

Inducción del linaje de células madre de tipo blastómero

Fenotipos inducidos: Las células madre de tipo blastómero adultas se pueden inducir el linajes posteriores, por ejemplo células germinales y tejidos placentarios, células madre de tipo epiblasto, células madre de linaje de capa germinal ectodérmica, células madre de linaje de capa germinal mesodérmica y células madre de linaje de capa germinal endodérmica usando medios de inducción generales y/o específicos. La descripción específica siguiente es representativa de ejemplos de estrategias de inducción.

Póngase guantes. Empapar toallitas con la solución desinfectante. Limpiar las manos enguantadas con las toallitas que ha empapado con la solución desinfectante. Limpiar todas las superficies internas de una campana de bioseguridad de clase II con toallitas empapadas en la solución desinfectante. Dejar que las superficies se sequen por evaporación. Limpiar la parte exterior de la bancada con toallitas que ha empapado con la solución desinfectante. Dejar que la bancada se seque por evaporación. Limpiar las superficies exteriores de todos los suministros con toallitas empapadas en la solución desinfectante antes de introducir los suministros en la campana de bioseguridad de clase II.

Retirar las células de los cultivos en suspensión. Preparar tubos de centrifuga estériles de polipropileno de 15 ml limpiando el exterior con agente desinfectante e introduciéndolos en una campana de bioseguridad de clase II estéril. En condiciones estériles, extraer 14 ml de la suspensión celular del matraz de cultivo tisular e introducirlos en cada tubo. Esto se puede conseguir vertiendo o pipeteando la suspensión celular del matraz a los tubos. Centrifugar

los tubos estériles de polipropileno de 15 ml a 2000 x g durante 5 minutos a temperatura ambiente. Tras la centrifugación, desechar el sobrenadante de todos los tubos de centrifuga introduciéndolo en la solución de blanqueo. Asegurarse de dejar una cantidad pequeña del sobrenadante, alrededor de un volumen igual del sedimento celular. Resuspender el sedimento celular colocando los tubos de centrifuga a través de un soporte para microtubos de 80 pocillos. Repetir este procedimiento 1215 veces.

Usar una pipeta de 5 ml para lavar y triturar cada tubo de centrifuga de 15 ml en secuencia. Añadir 1-5 ml del medio de inducción general, pH 7,4 (nº de catálogo MBC-ASB-IMDG-100-A001, Moraga Biotechnology Corp.) en este procedimiento. El volumen que se va a usar dependerá del volumen de la suspensión celular que se vaya a resuspender. Introducir la suspensión celular combinada en un tubo de 15 ml. Contar las células como se ha indicado con anterioridad.

Reconstituir las células a 5×10^3 células por ml en medio de inducción general y un alícuota de 200 µl de la suspensión celular en cada pocillo de una placa de cultivo de 96 pocillos revestida con células madre adultas (nº de catálogo MBC-ASB-MSD-900-A011, Moraga Biotechnology Corp.). La concentración celular final será de 10^3 células por pocillo. Introducir la(s) placa(s) en un incubador humidificado que usa un ambiente de 95% aire/5% de dióxido de carbono y fijar a 37°C. Después de una incubación de 48 horas, se retira el medio, las células se aclaran dos veces con 150 µl de tampón de aclarado BLSC definido sin suero, $\text{Ca}^{+2}/\text{Mg}^{+2}$, pH 7.4 (nº de catálogo MBC-ASB-REC-100-A001, Moraga Biotechnology Corp.), la solución de aclarado se retira y se sustituye con el medio de inducción adecuado (véase más adelante) dependiendo de las células de interés- Se alimentan los cultivos en días alternos con intercambio de medio de cultivo, es decir se aspiran 150 µl de medio gastado de cada pocillo y a cada pocillo se añaden 150 µl del medio de inducción fresco adecuado. Después del intercambio de medios, los cultivos se devuelven al ambiente a 37°C humidificado de 95% aire/5% de CO_2 para cultivo adicional.

Medios de inducción: Los siguientes medios de inducción generales y específicos se usan para engendrar células germinales y tejidos placentarios, células madre de tipo epiblasto, células madre de linaje de capa germinal ectodérmica, células madre de linaje de capa germinal mesodérmica y células madre de linaje de capa germinal endodérmica. Los medios de inducción generales, Ph 7,4 (nº de catálogo MBC-ASB-IMDG-100-A001, Moraga Biotechnology Corp.) inducirá de forma inespecífica los tipos celulares mencionados con anterioridad, por ejemplo células germinales y tejidos placentarios, células madre de tipo epiblasto, células madre de linaje de capa germinal ectodérmica, células madre de linaje de capa germinal mesodérmica y células madre de linaje de capa germinal endodérmica, con los respectivos marcadores de expresión fenotípica indicativos de tipos celulares específicos que aparecen dentro de las células de 7-70 días después de la siembra. Los medios de inducción ectodérmicos, pH 7,4 (nº de catálogo MBC-ASB-IMIDE-1 00-A002, Moraga Biotechnology Corp.) engendrarán células del linaje ectodérmico, por ejemplo células asociadas con las neuronas y células asociadas con la epidermis, con los respectivos marcadores de expresión fenotípica indicativos de tipos celulares específicos que aparecen dentro de las células de 14-56 días después de la siembra. Los medios de inducción mesodérmicos, pH 7,4 (nº de catálogo MBC-ASB-IMDM100-A003, Moraga Biotechnology Corp.) engendrarán células del linaje mesodérmico, por ejemplo células musculares, grasa, cartílago, óseas, tejido conjuntivo, dermis, células sanguíneas, células endoteliales etc., con los respectivos marcadores de expresión fenotípica indicativos de tipos celulares específicos que aparecen dentro de las células de 7-70 días después de la siembra. Los medios de inducción endodérmicos, pH 7,2 (nº de catálogo MBC-ASB-IMDN100-A004, Moraga Biotechnology Corp.) engendrarán células del linaje endodérmico, por ejemplo células epiteliales gastrointestinales, hepatocitos, células pancreáticas etc., con los respectivos marcadores de expresión fenotípica indicativos de tipos celulares específicos que aparecen dentro de las células de 7-70 días después de la siembra.

Por tanto, se han divulgado realizaciones y aplicaciones específicas de las células madre de tipo blastómero totipotenciales no embrionarias. No obstante, será evidente para los expertos en la técnica que son posibles muchas más modificaciones además de las ya descritas. Además, al interpretar la memoria descriptiva y las reivindicaciones, todos los términos se interpretarán del modo más amplio posible coherente con el contexto. En particular, los términos "comprende" y "que comprende" se interpretarán como que hacen referencia a elementos, componentes o etapas de un modo no exclusivo, que indica que los elementos, componentes o etapas a los que se ha hecho referencia pueden estar presentes, o usarse, o combinarse con otros elementos, componentes o etapas a los que no se ha hecho referencia expresa. Además, cuando una definición o uso de un término en una referencia es inconsistente o contrario a la definición de dicho término proporcionada en el presente documento, se aplica la definición de dicho término proporcionada en el presente documento y no se aplica la definición de dicho término en la referencia.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una célula madre de tipo blastómero (CMTB) posnatal aislada de rata que tiene un tamaño inferior a 1 μm , que expresa un marcador de superficie CEA-CAM-1, y no expresa marcadores de superficie SSEA-1, SSEA-3 y SSEA-4 y positiva para azul tripán.
2. La célula madre de la reivindicación 1, en la que la célula madre es una célula de mamífero que tiene el marcador de superficie CD66e y no CD10.
- 10 3. La célula madre de la reivindicación 1, en la que la célula tiene potencia para diferenciarse en una célula placentaria o una célula germinal, tras estimulación con un medio de inducción.
4. La célula madre de la reivindicación 1, en la que la célula tiene potencia para diferenciarse en una célula madre de tipo epiblasto, tras estimulación con un medio de inducción.
- 15 5. La célula madre de la reivindicación 1, en la que la célula tiene potencia para diferenciarse en una célula madre de linaje de capa germinal ectodérmica tras estimulación con un medio de inducción específico ectodérmico.
- 20 6. La célula madre de la reivindicación 1, en la que la célula tiene potencia para diferenciarse en una célula madre de linaje de capa germinal mesodérmica tras estimulación con un medio de inducción específico mesodérmico.
7. La célula madre de la reivindicación 1, en la que la célula tiene potencia para diferenciarse en una célula madre de linaje de capa germinal endodérmica tras estimulación con un medio de inducción específico endodérmico.
- 25 8. La célula madre de la reivindicación 1, en la que la célula sufre al menos 100 duplicaciones al tiempo que conserva su naturaleza totipotencial en un medio de propagación definido sin suero en ausencia de inhibidores de la diferenciación.
- 30 9. La célula madre de la reivindicación 1, en la que la célula sufre al menos 300 duplicaciones al tiempo que conserva su naturaleza totipotencial en un medio de propagación definido sin suero en ausencia de inhibidores de la diferenciación.
10. La célula madre de la reivindicación 1, en la que la célula no se diferencia de forma espontánea en medio de propagación definido sin suero en ausencia de inhibidores de la diferenciación.
- 35 11. La célula madre de la reivindicación 1, en la que la célula permanece quiescente cuando se implanta en un animal y no forma un tejido canceroso.
- 40 12. La célula madre de la reivindicación 1, en la que la célula se diferencia en un animal que tiene daños tisulares y no forma un tejido canceroso.
- 45 13. La célula madre de la reivindicación 1, en la que la célula expresa al menos uno de telomerasa Oct-3/4, Nanog, Nanos, MI-1, DE1, IDE3, ABCG2, CXCR-4, y BCL-2, y en la que la célula no expresa al menos uno de CD1 a, CD2, CD3, D4, CD5, CD7, CDB, CD9, CD11 b, CD11 c, CD13, CD14, CD15, CD16, CD18, CD19, CD20, CD22, CD23, CD24, D25, CD31, CD33, CD34, CD36, CD38, CD41, CD42b, CD45, CD49d, CD55, CD56, CD57, CD59, CD61, CD62E, D65, CD68, CD69, CD71, CD79, CD83, CD90, CD95, CD105, CD106, CD117, CD123, CD135, D166, Glicoforina-A, MHC-I, HLA-DRII, FMC-7, Anexina-V y LIN.
- 50 14. La célula madre de la reivindicación 1, en la que la célula expresa CEA-CAM-1, y telomerasa, y en la que la célula no expresa MHC-1.
- 55 15. Un procedimiento de aislar una célula madre de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende:
 - (i) recibir una pluralidad de células de un tejido de rata;
 - (ii) cultivar las células más allá de la confluencia para obtener múltiples capas confluyentes y recolectar las células cultivadas;
 - (iii) congelación lenta de la pluralidad de células hasta una temperatura superior a -100°C durante al menos 12 horas y descongelar después.
 - (iv) retirar las células madre de linaje de la capa germinal y las células madre de tipo epiblasto de las células descongeladas usando los marcadores de la superficie celular, para formar una suspensión celular de modo que la suspensión esté enriquecida en células madre con los marcadores de superficie CEA-CAM-1⁺, SSEA-1⁻, SSEA-3⁻ y SSEA-4⁻.
- 60 16. El procedimiento de la reivindicación 15, en el que el tejido de rata es tejido conjuntivo y en el que las células madre tienen los marcadores de superficie CD66e⁺ y CD10⁻.
- 65 17. El procedimiento de la reivindicación 15, en el que las células madre de linaje de la capa germinal se retiran

usando anticuerpos específicos de al menos uno de CD13 y CD90.

18. El procedimiento de la reivindicación 15, en el que las células madre de tipo epiblasto se retiran usando anticuerpos específicos de al menos uno de CD10, SSEA-1, SSEA-3 y SSEA4.

5 19. El procedimiento de la reivindicación 15, en el que las células descongeladas se cultivan para aumentar el número de células antes de la etapa de retirar las células madre de linaje de capa germinal y las células madre de tipo epiblasto.

10 20. El procedimiento de la reivindicación 15, que además comprende una etapa de clonar las células madre que tienen marcadores de superficie CEACAM¹⁺, CD66e⁺, CD10⁻, SSEA-1⁻, SSEA-3⁻ y SSEA-4⁻, para obtener, de este modo, poblaciones monoclonales de las células madre de acuerdo con la reivindicación 1.

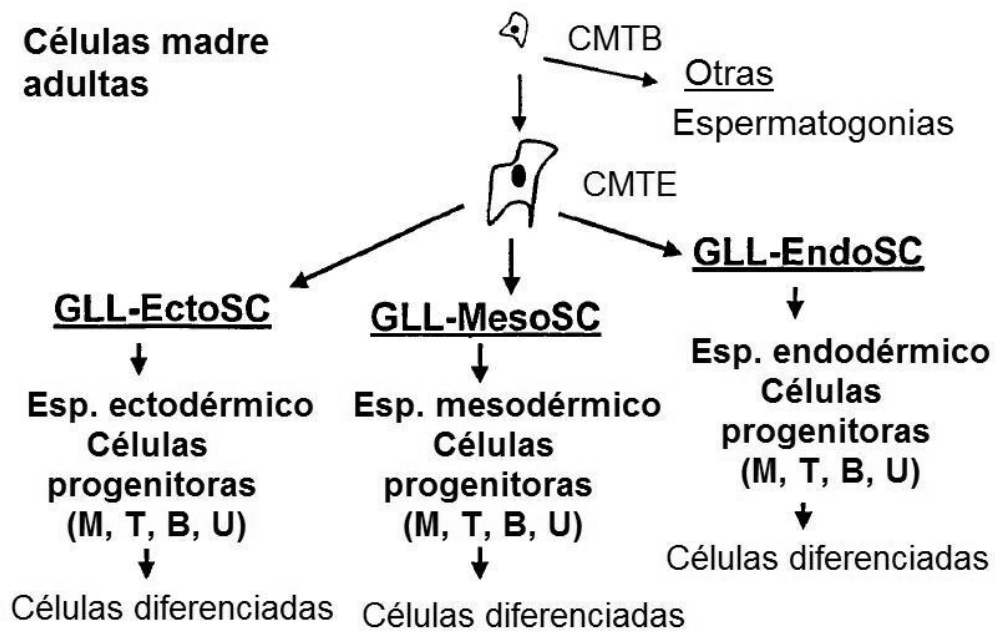


Figura 1A

Distribución de las células precursoras mediante aislamiento

Músculo esquelético	Dérmicas
Tejidos conjuntivos	Tejidos conjuntivos
Células progenitoras ~ 90%	
Miogénicas ~ 50%	Fibrogénicas ~ 50%
-----	-----
Genic: Fibro, Adipo, Condro, osteo Angio, Hemato, ~ 40% Neuro, Hepato, Etc.	Genic: Miog, Adipo Condro, osteo Angio, Hemato, ~ 40% Neuro, Hepato, Etc.
-----	-----
Células madre ~ 10%	
CMLCG ~ 9%	CMLCG ~ 9%
CMTE ~ 0,9%	CMTE ~ 0,9%
CMTB ~ 0,1%	CMTB ~ 0,1%

Figura 1B

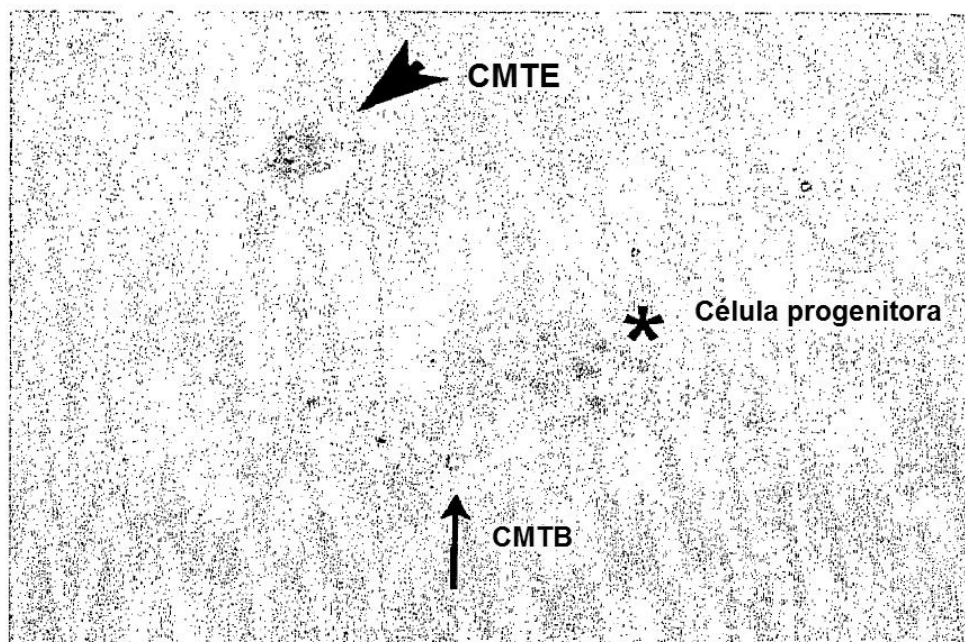


Figura 2A

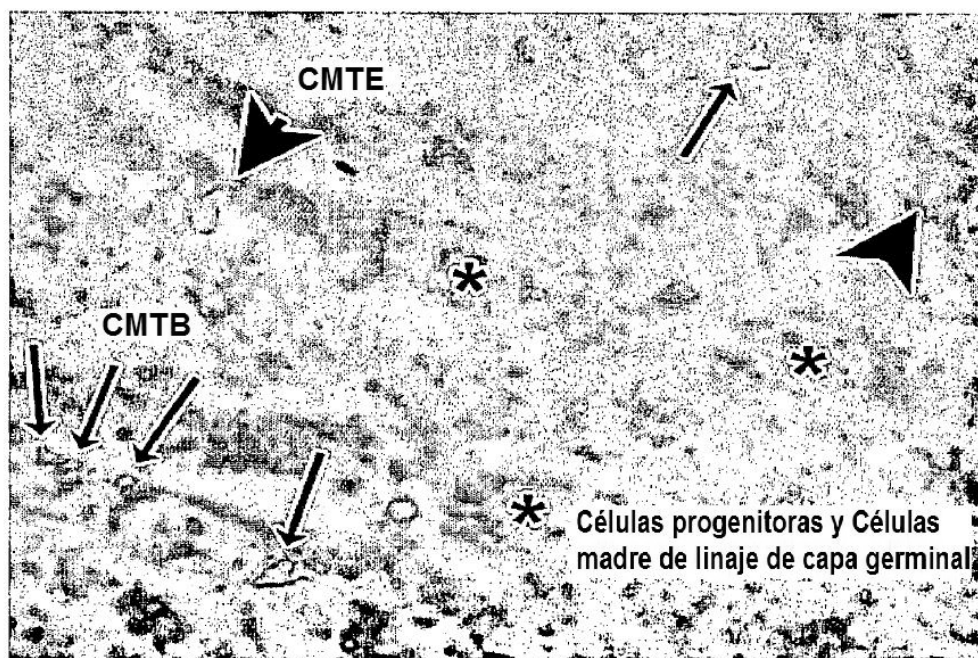


Figura 2B

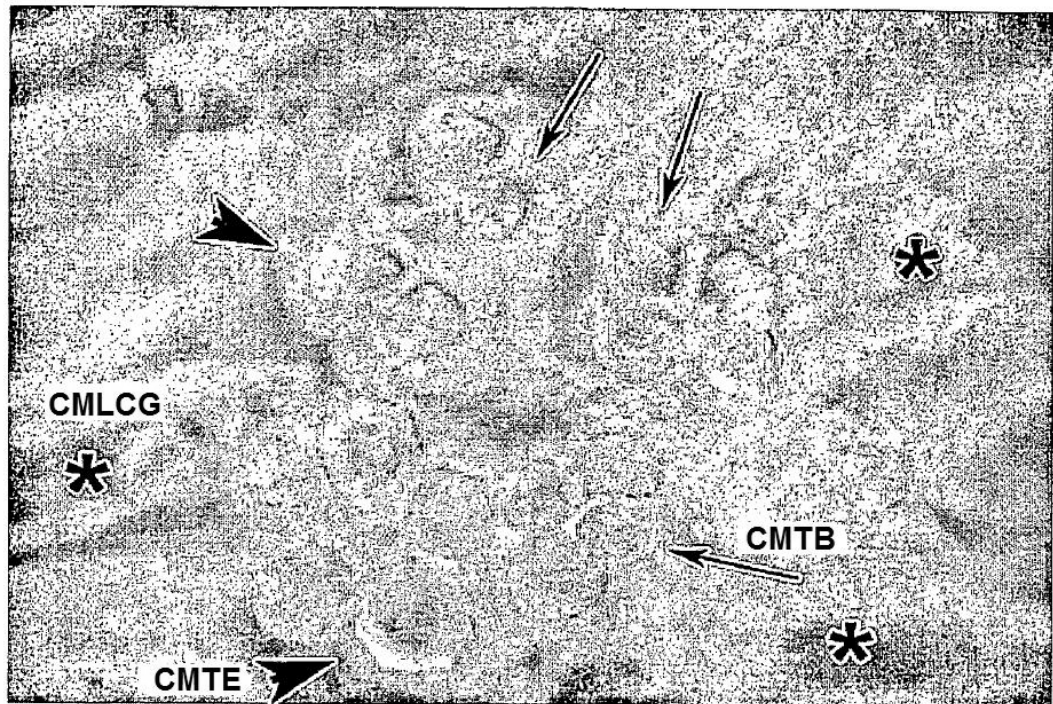


Figura 3

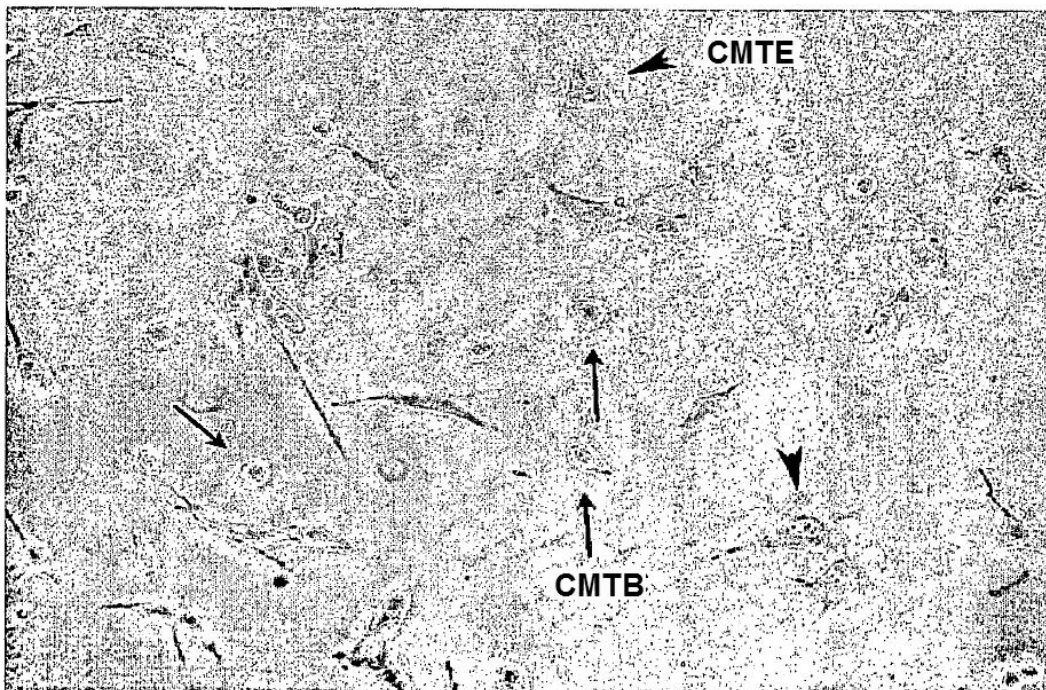


Figura 4

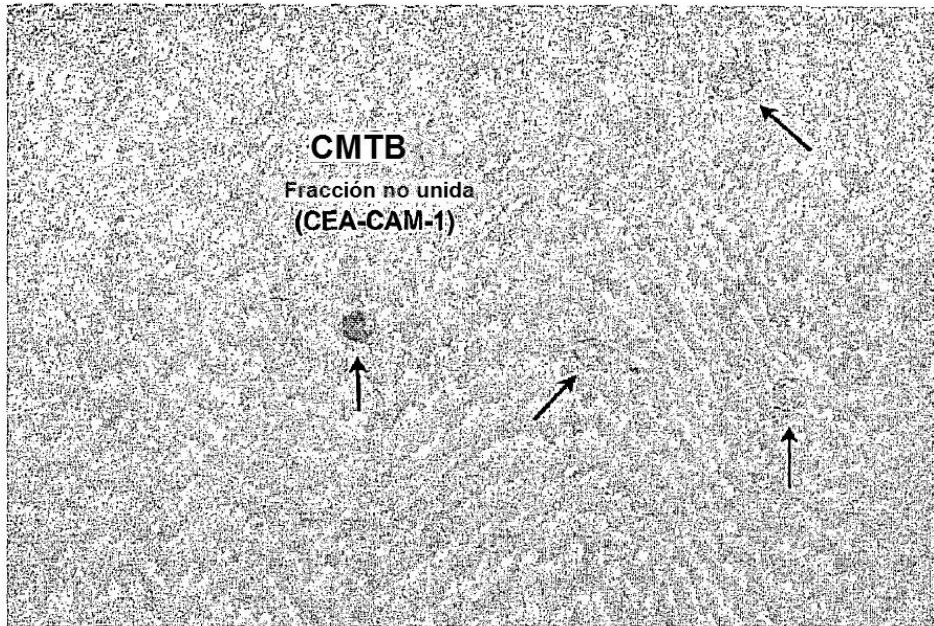


Figura 5