

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 655 433**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/02 (2006.01)

C12N 5/071 (2010.01)

G01N 33/483 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **12.11.2013 PCT/IB2013/060076**

87 Fecha y número de publicación internacional: **15.05.2014 WO14072960**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.11.2013 E 13853979 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.11.2017 EP 2917361**

54 Título: **Un procedimiento para identificar y aislar células madre pluripotentes utilizando fluorescencia azul endógena**

30 Prioridad:

12.11.2012 IN 4743CH2012

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

20.02.2018

73 Titular/es:

**NATIONAL CENTRE FOR BIOLOGICAL
SCIENCES (100.0%)
Tata Institute of Fundamental Research GKV
Campus Bellary Road
Bangalore, Karnataka 560 065, IN**

72 Inventor/es:

**PANICKER, MITRADAS M.;
MENON, RADHIKA;
THANGASELVAM, MUTHUSAMY y
MUKHERJEE, ODITY**

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 655 433 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

Un procedimiento para identificar y aislar células madre pluripotentes utilizando fluorescencia azul endógena

5 Campo técnico

La presente divulgación se refiere a la identificación y aislamiento de células madre pluripotentes, utilizando emisión de fluorescencia azul endógena de cuerpos lipídicos. Las células pluripotentes incluyen células madre embrionarias humanas (HuES), células madre pluripotentes inducidas humanas (HiPSC), células madre de mamíferos, así como células madre pluripotentes de epiblastos de ratón (mEpiSC). El procedimiento actual es un procedimiento sin etiquetas para identificar y aislar células madre pluripotentes cebadas de células de diferenciación/diferenciadas en un cultivo utilizando la propiedad de la fluorescencia azul endógena emitida por cuerpos lipídicos intracelulares, que sirven como marcadores endógenos libres de marca específicos de células madre pluripotentes humanas (embrionarias e inducidas) y células madre pluripotentes de epiblastos de ratón. La presente divulgación proporciona un procedimiento para validar la presencia de células madre pluripotentes llevando a cabo la conversión de células somáticas humanas en células madre pluripotentes inducidas; y también células madre embrionarias de ratón y células somáticas a células madre pluripotentes de epiblastos de ratón (mEpiSC). La presente divulgación también se refiere al uso de cuerpos lipídicos como un marcador endógeno para células madre pluripotentes específicas de "epiblastos" en humanos y ratones.

20 Antecedentes y técnica anterior de la divulgación

Los procedimientos actuales para aislar/identificar células madre pluripotentes embrionarias e inducidas vivas o para monitorizar el proceso de reprogramación de células somáticas, utilizan anticuerpos contra marcadores de superficie, por ejemplo, SSEA-4, SSEA-3, Tra-160, Tra-181 o tienen células genéticamente modificadas para informar la expresión de genes de pluripotencia, como Oct-4 o Sox-2. El uso de anticuerpos está sujeto a variabilidad y/o la modificación genética tiene problemas de seguridad inherentes obvios si estas células se van a utilizar en terapia más adelante. Otros procedimientos han utilizado la morfología de la colonia o la relación núcleo a citoplasma, aunque este procedimiento no es definitivo, es decir, solo es sugerente. Por ejemplo, la morfología de la colonia no aborda el aislamiento de células individuales y tiene un fuerte componente subjetivo. Por el contrario, estos procedimientos se utilizan para aislar las células diferenciadas de las células pluripotentes iniciadoras de teratoma. Un impulso importante de las células iPS y ES humanas será generar tipos de células diferenciadas específicas a partir de células pluripotentes. Dado que estas conversiones rara vez se completan, sería importante eliminar las células pluripotentes dentro de la población diferenciada de células. Las células pluripotentes, si están presentes, se pueden diferenciar a células que no son deseadas o a células formadoras de tumores, es decir, teratomas, que pueden interferir en el uso terapéutico y además aumentar la posibilidad de tumores malignos y benignos. La fluorescencia azul endógena se puede utilizar para aislar células pluripotentes no diferenciadas de las células diferenciadas.

Un informe reciente utilizó mediciones de tiempo de vida de fluorescencia (FLIM) de fluoróforos endógenos para discriminar entre células madre embrionarias humanas pluripotentes y diferenciadoras utilizando un microscopio multifotón diseñado a medida, mediciones de vida útil de fluorescencia junto con análisis fasorial. Informaron que la fluorescencia en la región azul que emana de las células pluripotentes surgió a partir de dos entidades: NADH y LDAG (gránulos asociados a gotículas de lípidos). LDAG son agregados de cuerpos lipídicos, que son una mezcla de lípidos neutros contenidos por una monocapa de fosfolípidos y también pueden estar asociados con algunas proteínas. La composición de lípidos y proteínas presentes en estos cuerpos puede variar dentro de las células y también entre las células. También afirman que la relación de los niveles de fluorescencia de NADH a la fluorescencia que emana de los denominados agregados de lípidos) dentro de estas células se utiliza para identificar células madre embrionarias humanas pluripotentes. El documento utilizó una fuente de excitación de múltiples fotones para medir los tiempos de vida de la fluorescencia, sometió las intensidades medidas al análisis fasorial para determinar el tiempo de vida de la fluorescencia individual. Se estableció que estos se trazaron como un diagrama de fasores para identificar las fuentes y características de la fluorescencia emitida y estimar la diferenciación de la población de células pluripotentes. El procedimiento utilizó un microscopio FLIM diseñado a medida junto con un análisis fasorial. El documento también enfatiza en múltiples lugares que la relación relativa de la fluorescencia de LDAG a la fluorescencia de NADH se utiliza para determinar el estado indiferenciado. El informe tampoco demostró aislamiento/separación de células humanas pluripotentes de sus contrapartes diferenciadoras. El procedimiento anterior tampoco se ha aplicado a células madre pluripotentes inducidas humanas, células madre embrionarias de ratón o células madre de epiblastos de ratón (mEpiSCs). El documento también establece que la fluorescencia observada en la LDAG emanaba de la reacción de los peróxidos lipídicos con las proteínas. Los peróxidos lipídicos son entidades químicas múltiples que se generan por la oxidación de lípidos dentro de los cuerpos lipídicos por especies de oxígeno reactivo (ROS), dependiendo del tipo de moléculas de lípidos que están presentes. En particular, los lípidos que son insaturados son más propensos a la oxidación. El documento (Chiari et al.) No identificó ni aisló ningún lípido específico o su producto de oxidación, pero especuló que era así. También afirmó que las células ES humanas tienen valores altos de ROS en comparación con otras células y, por lo tanto, estos cuerpos (LDAG) son fluorescentes en células madre embrionarias humanas. Sin embargo, hay varias otras literaturas que indican que los valores de ROS en las células madre embrionarias son más bajos que en las células diferenciadas.

El documento de la técnica anterior como se mencionó anteriormente utilizaba un microscopio FLIM diseñado a medida, no fácilmente disponible, costoso y técnicamente desafiante (por ejemplo, requiere un láser de femtosegundos para la excitación y requiere medición y separación de tiempos de vida de fluorescencia individuales) y no presta a la clasificación FACS. Esta técnica no es adecuada para un alto rendimiento y no se puede comparar favorablemente con la clasificación por FACS. El informe tampoco demostró el aislamiento físico de las células madre pluripotentes y el cultivo posterior de estas células o examinó células madre pluripotentes inducidas o células madre de tipo epiblasto. Las imágenes proporcionadas por el microscopio FLIM no permiten una fácil disección mecánica debido a su baja resolución. El procedimiento también depende de la vida de fluorescencia de los fluoróforos que se ven afectados por el entorno molecular en el que residen los fluoróforos y puede mostrar una variación sustancial y depende en gran medida del contexto. Por ejemplo, una tesis de maestría del mismo laboratorio había informado anteriormente el análisis FLIM de células madre embrionarias humanas y se le dio una interpretación/identificación diferente a la fluorescencia observada. El documento tampoco informa la ausencia de cuerpos lipídicos y la fluorescencia asociada en células ES de ratón, no reporta ningún experimento con células pluripotentes inducidas por humanos, y tampoco asocia los cuerpos lipídicos fluorescentes azules endógenos con el estado de células madre de tipo epiblasto.

La presente divulgación supera los inconvenientes de la técnica anterior al describir un procedimiento que mide solo la intensidad de la fluorescencia azul endógena (es decir, la autofluorescencia) utilizando microscopios de epifluorescencia de campo ancho estándar para identificar células madre pluripotentes. Además, muestra que la clasificación de células activadas por fluorescencia convencional (FACS) se utiliza para aislar células pluripotentes a partir de la diferenciación de las células basándose en la intensidad de la fluorescencia azul. En otras palabras, no requiere la medición de tiempos de vida de fluorescencia y su análisis o la necesidad de medir la relación de fluorescencia LDAG y fluorescencia NADH para identificar y aislar células pluripotentes. La presente divulgación también se presta, por lo tanto, fácilmente a una identificación y aislamiento de alto rendimiento, por ejemplo, FACS, y la posterior propagación de células madre pluripotentes humanas a diferencia del procedimiento FLIM. El presente procedimiento también demuestra adicionalmente su aplicación en el aislamiento de células madre pluripotentes humanas únicas (es decir, FACS depende de la dispersión en células individuales) y la posterior propagación, que ha sido una seria limitación en la técnica anterior. Este procedimiento también evita la variabilidad asociada con el etiquetado de anticuerpos o la modificación genética.

El procedimiento descrito en la presente divulgación, además de examinar lo anterior, es robusto, se puede aplicar fácil y directamente con el equipo estándar disponible en la mayoría de los laboratorios y no requiere experiencia o capacitación específica o instrumentos muy sofisticados. Por lo tanto, la presente divulgación supera todos los inconvenientes que se enfrentan actualmente en la técnica anterior y mejora el campo de la tecnología actual.

Declaración de la presente divulgación

De acuerdo con lo anterior, la presente divulgación se refiere a un procedimiento para identificar células madre pluripotentes en un cultivo y opcionalmente aislar la célula madre pluripotente del cultivo, dicho procedimiento comprende los actos de: a) someter el cultivo a excitación a una longitud de onda que varía de aproximadamente 275 nm a aproximadamente 410 nm para obtener la emisión de fluorescencia azul endógena del cuerpo lipídico presente dentro de la célula madre pluripotente; y b) medir la intensidad de la emisión para identificar la célula madre pluripotente en el cultivo; c) opcionalmente clasificar el cultivo para aislar la célula madre pluripotente del cultivo.

Breve descripción de las figuras acompañantes

Para que la divulgación pueda entenderse fácilmente y ponerse en práctica, se hará referencia ahora a realizaciones de ejemplo ilustradas con referencia a las figuras adjuntas. Las figuras junto con una descripción detallada a continuación se incorporan y forman parte de la memoria descriptiva, y sirven para ilustrar adicionalmente las realizaciones y explicar diversos principios y ventajas, de acuerdo con la presente divulgación en la que:

BF - Campo brillante; HPSC: célula madre pluripotente humana; HuES: célula madre embrionaria humana; HiPSC: célula madre pluripotente inducida por humanos; NFF: Fibroblastos de prepucio neonatal; mEpiSC: célula madre parecida al epiblasto del ratón; NFF iPSC: célula madre pluripotente inducida por fibroblastos de prepucio neonatal; ADF: fibroblastos dérmicos adultos; ADF iPSC: célula madre pluripotente inducida por fibroblastos dérmicos adultos; LCL: estirpe celular linfoblastoide; LCL iPSC: célula madre linfoblastoide inducida por célula madre pluripotente;

La figura 1 muestra que las células madre pluripotentes humanas tienen cuerpos lipídicos citoplasmáticos que tienen una fluorescencia azul característica.

(a) Se observó fluorescencia azul (excitación - 325-375 nm y emisión - 460-500 nm) en todas las colonias HuES e HiPS (NFF iPS, ADF iPS, LCL iPS) cultivadas en medios típicos y condiciones de cultivo, (b) Imágenes representativas de gran aumento de células HuES7 que muestran fluorescencia azul confinada a cuerpos esféricos citoplasmáticos (panel superior izquierdo); estos cuerpos esféricos fluorescentes a menudo muestran una distribución polarizada dentro de las células (flechas rojas - panel superior derecho), se tiñen con el marcador específico del cuerpo lipídico BODIPY®493/503 (panel central) y no se colocan con el tinte específico de mitocondrias TMRM (panel inferior) Imagen confocal (panel superior izquierdo) se adquirió a la excitación - 405 nm y emisión - 420-490 nm. BF - Campo

brillante; NFF: fibroblastos de prepucio neonatal ADF: fibroblastos dérmicos adultos; LCL: estirpe celular linfoblastoidea; TMRM: éster metílico de tetrametilrodamina.

La figura 2 muestra que los cuerpos lipídicos fluorescentes azules solo están presentes en HPSC, no están presentes en células somáticas humanas y se excluyen de otros organelos citoplásmicos (ER, Golgi y peroxisomas).

(a) Cultivos de HPSC (HuES7, NFF iPSC, ADF iPSC y LCL iPSC) muestran numerosos cuerpos lipídicos (tinción O Oil Red positivo), (b) Cuerpos lipídicos positivos O Oil Red en fibroblastos de embrión de ratón (MEF) y neonato humano (NFF) no exhiben fluorescencia azul y no son tan prominentes como en HPSC. (c) Las células madre mesenquimales (MSC) derivadas de la médula ósea humana y la placenta no muestran fluorescencia azul, (d) La fluorescencia azul es significativamente más alta en los cultivos de HPSC en comparación con las células somáticas. Las intensidades de fluorescencia medias están en unidades arbitrarias (n=3, colonias múltiples de tres cultivos independientes para cada tipo de célula), (e) las neuronas derivadas de HuES7 no muestran fluorescencia azul, (f) los cuerpos de lípidos fluorescentes azules presentes en HuES7 no se colocan con retículo endoplasmático, (ER - panel superior), aparato de Golgi (panel medio) o peroxisomas (panel inferior). El nivel de significancia *** es <0.001.

La figura 3 muestra que la fluorescencia azul asociada al cuerpo lipídico es un marcador de pluripotencia y ayuda en el fácil aislamiento y la propagación de células individuales de alto rendimiento de HPSC.

(a) La fluorescencia azul asociada al cuerpo lipídico se coexpresa con marcadores de pluripotencia (OCT4, SOX2 y NANOG) en células HuES7 no diferenciadas. Las regiones de diferenciación identificadas por morfología (marcadas con línea punteada roja) muestran ausencia de marcadores de pluripotencia y fluorescencia azul asociados al cuerpo lipídico, (b) Diagramas de dispersión de intensidades de fluorescencia medias de fluorescencia azul frente a fluorescencia de marcador de pluripotencia (positiva) correlación, (c) análisis FACS muestra coexpresión de fluorescencia azul con marcadores OCT4 y SSEA-4, (d) diagramas de dispersión FACS típicos e histogramas de HPSC no diferenciadas muestran una población azul alta más grande mientras que los cultivos diferenciadores muestran lo inverso, (e) Recuentos de células de poblaciones de células azules altas y bajas de cultivos no diferenciados y diferenciadores, (f) Colonias típicas de células clasificadas de alto azul, azul bajo y no clasificadas, (g) Recuentos de colonias de alto azul, bajo azul y no clasificadas a partir de cultivos no diferenciados y diferenciados, (h) Las células de "bajo azul" son viables, tienen mitocondrias activas y no tienen morfología HuESC característica, (i) Aislamiento y propagación de HuESC a partir de cultivos de HuES altamente diferenciados obtenidos mediante el cultivo de células de una población azul "alta". Q1 = cuadrante superior izquierdo, Q2 = cuadrante superior derecho, Q3 = cuadrante inferior izquierdo, Q4 = cuadrante inferior derecho.

La Figura 4 muestra que las células somáticas humanas adquieren cuerpos lipídicos fluorescentes muy temprano en la reprogramación. (a, b) Los fibroblastos neonatales (NFF) y las células linfoblastoides (LCL) muestran una apariencia muy temprana de cuerpos lipídicos fluorescentes azules (D(n) - días después de transfección y colocación en placas). La capa de fondo del alimentador MEF permanece no fluorescente. (c, d) Los perfiles fluorescentes azules FACS de células madre pluripotentes inducidas humanas (HiPSC (NFF iPSC y LCL iPSC) son similares y coinciden estrechamente con los de las células madre embrionarias humanas (HuES7) (véase figura 2c) y difieren sustancialmente de los de su precursor somático. Tenga en cuenta que las escalas horizontales en los diagramas de perfil y dispersión inferior son más pequeños.

La Figura 5 muestra una línea de tiempo de reprogramación y aparición de fluorescencia azul en células somáticas humanas.

(a) Se siguió un grupo típico de células que mostraron morfología aplanada y fluorescencia azul después de la electroporación desde el día 8 (D8) hasta el día 23 (D23) y la colonia resultante se tiñó con marcadores de pluripotencia (SSEA4 y OCT4). (b) Los grupos de células con cuerpos lipídicos fluorescentes azules en D8 también muestran expresión de SSEA4. El panel de la derecha muestra la coexpresión de cuerpos lipídicos fluorescentes azules, OCT4 y SSEA4 en un HiPSC reprogramado.

La figura 6 muestra que los cuerpos lipídicos fluorescentes azules marcan las células madre pluripotentes "cebadas" o "epiblastadas".

(a, b) Imágenes representativas de contraste de fase y fluorescencia (aumento pequeño y alto) de ES de ratón (mES-D3) y ES humana (HuES7). Las células mES-D3 tienen una fluorescencia azul mucho más baja en comparación con HuES7. (c) imágenes de BODIPY®493/503 y de alta magnificación de fluorescencia azul de mES-D3 y HuES7. Las células ES de ratón muestran cuerpos lipídicos ocasionales (flechas blancas) que no son fluorescentes a diferencia de las células HuES, (d) La débil fluorescencia azul observada en las células mES colocaliza con el colorante específico de mitocondrias - TMRM (R2 = 0,93). (e) Los perfiles FACS típicos de las células ES de ratón y humanas muestran que la célula mES tiene niveles de fluorescencia unimodal más bajos, mientras que las células HuES tienen una distribución bimodal. (f, h - panel superior) Las células HuES7 cultivadas en medios HuES típicos tienen cuerpos lipídicos fluorescentes azules. (g, i - panel superior) Las células ME de ratón cultivadas en medios de mES típicos tienen muy pocos cuerpos lipídicos. La tenue fluorescencia azul observada en las células mES emana de las mitocondrias (véase figura 4d) (f, h - panel inferior) Las células HuES7 cultivadas en medios que promueven la conversión al estado

“indiferenciado” muestran una disminución sustancial en el número de cuerpos lipídicos (Oil Red positivo) con una disminución correspondiente en la fluorescencia azul. (g, i - panel inferior) Las células ES-D3 de ratón cultivadas en medios que promueven la conversión al estado “cebado” o “similar a epiblasto” muestran un aumento sustancial en el número de cuerpos lipídicos (rojo-aceite positivo), que tienen fluorescencia azul. Q1 = cuadrante superior izquierdo, Q2 = cuadrante superior derecho, Q3 = cuadrante inferior izquierdo, Q4 = cuadrante inferior derecho.

La figura 7 muestra la caracterización in vitro de células madre pluripotentes humanas (“cebadas”) a “indiferenciadas” y de ratón (indiferenciadas) a “cebadas”.

(a, b) Las imágenes representativas (gran aumento) de HuES7 (“cebado”) y mESD3 (“indiferenciado”) cultivadas en medios típicos (TM) y medios de conversión (CM) muestran diferencias en la morfología (imagen de fase) y el número de cuerpos lipídicos fluorescentes azules e intensidad de fluorescencia OCT4 (panel superior y medio). Estas células permanecen viables y pluripotentes en los medios de conversión, expresan OCT4 y son negativas para la tinción de yoduro de propidio (PI). (c, d) El perfil FACS de HuES7 en los medios de conversión muestra que ha aumentado el número de células azules altas que han disminuido y el número de células azules bajas. Se observa el efecto opuesto, células mES cultivadas en medios de conversión. Q1 = cuadrante superior izquierdo, Q2 = cuadrante superior derecho, Q3 = cuadrante inferior izquierdo, Q4 = cuadrante inferior derecho.

La Figura 8 muestra que los cuerpos lipídicos fluorescentes azules están ausentes en la masa celular interna (ICM) del blastocito de ratón, y están presentes en muchas células epiblastos de ratón y también en células similares a mEpiSC.

(a) Los cuerpos lipídicos fluorescentes están ausentes en la masa celular interna (ICM) del embrión de ratón DPC 3.5, (b - panel superior). El embrión de ratón DPC 6.5 muestra altos niveles de fluorescencia azul distribuidos diferencialmente. El gran aumento de la región del epiblasto muestra numerosos puntos azules fluorescentes. (b - panel inferior) Los puntos azules de fluorescencia en la región del epiblasto se tiñen con BODIPY®493/503. (c) Las células madre de epiblastos de ratón (mEpiSC) cultivadas a partir de embrión de ratón (DPC 6.5) en medio mEpiSC (K15F5) y pasadas secuencialmente (p1, p2 y p3) retienen cuerpos lipídicos positivos de BODIPY®493/503 fluorescentes azules. El panel inferior muestra las células de un cultivo p3 a gran aumento y la colocación de la fluorescencia azul con BODIPY®493/503. (d) Gráficos de dispersión de las intensidades medias de fluorescencia BODIPY®493/503 frente a las intensidades de fluorescencia azules medias en el embrión de ratón posterior a la implantación (DPC 6.5) y en las células similares a mEpiSC muestran una alta correlación positiva. BF - Campo brillante

La Figura 9 muestra que las células ES de ratón no toman retinol de los medios y los secuestran en cuerpos lipídicos.

Las células ES de ratón cultivadas en KOSR al 20% con o sin retinol adicional no muestran ningún aumento en la fluorescencia azul y no muestran ningún aumento significativo en el número de cuerpos lipídicos a diferencia de las células HuES7 (véase figura 10e, g).

La figura 10 muestra que la fluorescencia azul en los cuerpos lipídicos surge de los retinoides obtenidos de los sueros o los componentes séricos de reemplazo.

(a) Los cuerpos lipídicos aislados de células HuES7 utilizando centrifugación en gradiente de sacarosa retienen la fluorescencia azul, (b) Cloroformo: los extractos de metanol de los cuerpos lipídicos fluorescentes y el palmitato de retinilo tienen espectros de fluorescencia idénticos. Los rastros de fluorescencia de muestras individuales se normalizaron a sus valores máximos de emisión, (c) C18 HPLC inversa del cloroformo: extracto de metanol y estándares de retinilo muestran que el pico principal del extracto y palmitato de retinilo tienen tiempos de retención idénticos, (d) análisis por HPLC de fase inversa de cloroformo: extracto de metanol de FBS y medios de grado ES comercialmente libres de suero muestran la presencia de retinol. (e) Los cuerpos lipídicos en células cultivadas en medios celulares HuES típicos suplementados con palmitato de retinilo muestran un aumento dependiente de la dosis en fluorescencia azul, (f) células HuES7 cultivadas en medio ES humano típico con suero de 5 fuentes diferentes que reemplazan KOSR tienen cuerpos lipídicos fluorescentes azules, (g) HPSC cultivadas en medios E8 químicamente definidos (carece de retinol) muestran una fuerte disminución en cuerpos lipídicos (flechas rojas) y fluorescencia azul con el tiempo, y recuperan cuerpos lipídicos fluorescentes azules en 48 horas cuando E8 se complementa con retinol. Nivel de significancia *** es <0.001

Descripción detallada de la divulgación

La presente divulgación se refiere a un procedimiento para identificar células madre pluripotentes en un cultivo y opcionalmente aislar la célula madre pluripotente del cultivo, dicho procedimiento comprende los actos de:

a) someter el cultivo a excitación a una longitud de onda que varía de aproximadamente 275 nm a aproximadamente 410 nm para obtener la emisión de fluorescencia azul endógena del cuerpo lipídico presente dentro de la célula madre pluripotente; y

b) medir la intensidad de la emisión para identificar la célula madre pluripotente en el cultivo;

c) opcionalmente clasificar el cultivo para aislar la célula madre pluripotente del cultivo.

En una realización de la presente divulgación, el cultivo comprende células seleccionadas de un grupo que comprende células madre no diferenciadas, células madre de diferenciación, células madre diferenciadas, células que tienen o se sospecha que tienen células madre pluripotentes y combinación de las mismas.

En otra realización de la presente divulgación, la excitación es de fuente de fotón único o fuente de multifotones.

En otra realización más de la presente divulgación, la intensidad de la emisión de fluorescencia azul endógena está en una longitud de onda que varía de aproximadamente 410 nm a aproximadamente 550 nm.

En otra realización más de la presente divulgación, la emisión de fluorescencia azul endógena se detecta utilizando la técnica seleccionada de un grupo que comprende microscopía de fluorescencia, microscopía de epifluorescencia, microscopía dual, microscopía multifotónica y una combinación de las mismas.

En otra realización más de la presente divulgación, la célula madre pluripotente se selecciona de un grupo que comprende células madre embrionarias humanas (HuESC), células madre pluripotentes inducidas humanas (HiPSC), célula madre pluripotente de epiblastos de ratón (mEpiSC), células madre de mamíferos y combinación de las mismas.

En otra realización más de la presente divulgación, la célula madre pluripotente inducida por humanos (HiPSC) se selecciona de un grupo que comprende células madre pluripotentes inducidas por linfoblastos humanos (LCL iPSC), célula madre pluripotente inducida por fibroblastos de prepucios de neonatales humanos (NFF iPSC), células madre pluripotentes inducidas por fibroblastos de dermis de adultos (ADF iPSC) y una combinación de las mismas.

En otra realización más de la presente divulgación, la clasificación se lleva a cabo mediante la técnica de clasificación de células activadas por fluorescencia.

En otra realización más de la presente divulgación, la fluorescencia azul surge de los retinoides dentro de los cuerpos lipídicos de las células madre pluripotentes.

En aún otra realización de la presente divulgación, dicho procedimiento se emplea para la propagación de alto rendimiento de células madre pluripotentes humanas.

En aún otra realización de la presente divulgación, las células madre pluripotentes son indiferenciadas o cebadas o ambas.

En otra realización más de la presente divulgación, las células madre pluripotentes preparadas son células pluripotentes tipo epiblastos.

La presente divulgación se refiere a un procedimiento para identificar y aislar células madre pluripotentes humanas utilizando fluorescencia endógena que emana de cuerpos lipídicos presentes dentro de las células madre pluripotentes. La propiedad de la fluorescencia es una propiedad inherente de solo tales cuerpos lipídicos que están presentes en las células madre pluripotentes; y no todos los cuerpos lipídicos tienen la propiedad de autofluorescencia. Por lo tanto, los cuerpos lipídicos de la presente divulgación tienen naturaleza específica de fase y célula.

En una realización de la presente divulgación, se observa que las células madre embrionarias humanas (HuESC) y las células madre pluripotentes inducidas humanas (HiPSC) contienen cuerpos lipídicos esféricos que emiten fluorescencia azul endógena y sirven como marcador endógeno libre de etiqueta para el estado pluripotente [Figuras 1, 2, 3]. La figura 1 muestra que las células madre pluripotentes humanas tienen cuerpos lipídicos citoplásmicos que tienen una fluorescencia azul característica. Las imágenes de fase se muestran arriba y sus imágenes de fluorescencia correspondientes se muestran abajo en dicha figura. En estas figuras, LCL es una estirpe de células linfoblastoides, NFF es fibroblastos de prepucio neonatal, ADF es fibroblastos dérmicos de adulto y MEF es fibroblastos de embriones de ratón, que son todas células somáticas que carecen de fluorescencia azul endógena.

En otra realización de la presente divulgación, cuando las células madre embrionarias humanas y las células madre pluripotentes inducidas humanas se diferencian espontáneamente o se diferencian se hacen para diferenciación, no se observan cuerpos lipídicos con fluorescencia azul endógena cuando se excitan utilizando una sola fuente de excitación de fotones en la longitud de onda que varían de aproximadamente 275 nm a aproximadamente 410 nm, preferiblemente alrededor de 325 nm a 375 nm, cerca o en la región UV [Figura 3], o una fuente de multifotones en una longitud de onda apropiada, suficiente para excitar el fluoróforo presente dentro de la célula madre pluripotente.

La presente divulgación permite monitorizar, identificar y aislar células madre pluripotentes humanas (embrionarias e inducidas) y células madre pluripotentes tipo epiblastos de ratón utilizando fluorescencia azul endógena de cuerpos lipídicos intracelulares que emanan de compuestos "retinoides" o "similares a retinoides" presentes en estos cuerpos lipídicos.

En una realización de la presente divulgación, la fluorescencia azul surge del secuestro de retinoides, principalmente ésteres de retinilo dentro de los cuerpos lipídicos de células madre pluripotentes humanas.

En otra realización de la presente divulgación, suplementar los medios de cultivo con retinol o palmitato de retinilo provoca un aumento dependiente de la dosis en la fluorescencia azul dentro de los cuerpos lipídicos de las células madre embrionarias humanas que indica captación de retinoides del medio de cultivo y su secuestro dentro de los cuerpos lipídicos.

En aún otra realización de la presente divulgación, los cuerpos lipídicos que secuestran retinoides marcan el estado "tipo epiblasto" in vivo e in vitro y sirven como un marcador útil para distinguir entre células madre pluripotentes "indiferenciadas" y "cebadas".

En otra realización más, el procedimiento descrito en la presente divulgación está libre de etiquetas, es decir, utiliza solo las intensidades de fluorescencia endógena azul asociadas con los cuerpos lipídicos y no utiliza la relación de intensidades de fluorescencia NADH con las intensidades de fluorescencia LDAG como indicador de células madre pluripotentes diferenciadas o no diferenciadas.

De acuerdo con el procedimiento de la presente divulgación, la identificación de células madre pluripotentes se realiza cuando el fluoróforo endógeno de las células madre pluripotentes se somete a excitación con la fuente de luz/longitud de onda apropiada, y emite fluorescencia azul endógena. La excitación de las células madre pluripotentes se realiza utilizando una única fuente de excitación de fotones a una longitud de onda que varía de aproximadamente 275 nm a aproximadamente 410 nm, preferiblemente alrededor de 350 nm o una fuente de multifotones a la longitud de onda apropiada, suficiente para excitar el fluoróforo presente dentro de la célula madre pluripotente.

En otra realización, en la presente divulgación, se utiliza láser UV con filtros apropiados en FACS y se utiliza una lámpara de haluro metálico o una fuente de luz, que incluye láseres, que genera luz UV junto con filtros apropiados en el microscopio de epifluorescencia. La excitación en las células madre pluripotentes es de alrededor de 325 nm a 375 nm y la emisión se observa alrededor de 410 nm a 500 nm como una fluorescencia azul de 410 nm a 500 nm de los cuerpos lipídicos presentes en ellos. Para Microscope y el ejemplo de filtros utilizados sería - La excitación es a 325 nm - 375 nm; 426 nm - 446nm, el Dicroico utilizado - 460dc xru; y la emisión es de alrededor de 460 nm -500nm. Para FACS en un ejemplo, la excitación es de alrededor de 375 nm, cerca de UV, detector Trigon para fluorescencia azul y se recoge a aproximadamente 450/50nm filtro de paso de banda. La técnica actual no implica tinción y es un procedimiento sin marcador.

En otra realización más de la presente divulgación, se monitoriza la fluorescencia azul endógena utilizando un microscopio de fluorescencia estándar con filtros apropiados, lo que permite tanto la identificación como el aislamiento mecánico de células pluripotentes humanas. En un ejemplo, el microscopio utilizado es un Nikon Eclipse TE 2000. Los filtros utilizados para observar la fluorescencia azul endógena en un ejemplo fueron de Chroma (Excitación - 325-375; 426 - 446nm, dicroico - 460dc xru, Emisión - 460 - 500 nm). Los objetivos utilizados variaron desde aproximadamente 10X hasta aproximadamente 60X [Figuras 1 a 10].

En aún otra realización de la presente divulgación, se observan dos distribuciones solapadas pero distintas de fluorescencia azul endógena cuando los cultivos de células pluripotentes principalmente humanas se clasifican en una máquina FACS como se detalla (clasificador de células BD FACS Aria, láser - 375nm cerca de UV, detector Trigon para fluorescencia azul y recogida a 450/50nm filtro de paso de banda (canal DAPI); voltaje PMT ajustado a 350V para fluorescencia azul). La distribución con mayor fluorescencia azul endógena contiene más células pluripotentes, es decir, las células que caen dentro del perfil de fluorescencia azul superior también dan lugar a un mayor número de colonias de células madre pluripotentes en las placas [Figuras 3 y 6].

En aún otra realización de la presente divulgación, las células con mayor fluorescencia endógena azul se separan fácil y confiablemente de la población no pluripotente como células individuales utilizando la fluorescencia azul endógena (Figura 3).

La presente técnica se utiliza con un microscopio y filtros de fluorescencia estándar; y también pueden utilizar clasificadores celulares activados por fluorescencia estándar que son capaces de visualizar la fluorescencia con un filtro de paso de banda de 450/50nm (por ejemplo, el canal DAPI) para identificar, cuantificar y aislar células madre humanas pluripotentes, tanto embrionarias como inducidas. Con FACS, se utiliza para clasificar las células pluripotentes y con los microscopios de fluorescencia se pueden diseccionar mecánicamente las áreas que contienen células madre pluripotentes de células diferenciadas mediante la monitorización de la fluorescencia azul endógena. La presente divulgación describe un procedimiento que se presta fácilmente a una identificación de alto rendimiento, aislamiento y propagación de células madre pluripotentes humanas a diferencia del procedimiento FLIM.

En una realización, la clasificación y propagación repetidas de células madre pluripotentes humanas no altera sus perfiles de distribución de fluorescencia azul lo que indica que las células clasificadas continúan comportándose como HPSC regulares y aquellas con fluorescencia azul alta retienen la pluripotencia.

- En otra realización, las células somáticas no tienen cuerpos lipídicos esféricos que emitan esta fluorescencia endógena, pero sí cuando se convierten en el estado pluripotente. Inicialmente, Yamanaka y sus colaboradores demostraron que los factores de transcripción como Oct4, Sox2, Nanog, Klf, C-Myc, N-Myc, Lin28 pueden convertir células somáticas, cuando se expresan en las combinaciones y niveles correctos para generar colonias de células madre pluripotentes inducidas. Estos factores se expresan transfectando o infectando células somáticas con plásmidos, virus o transcripciones R A que codifican estas proteínas. Las proteínas también se pueden transferir directamente a las células utilizando péptidos que penetran en la célula. También se han identificado pequeñas moléculas químicas que permiten la expresión endógena de estas proteínas. En la expresión sostenida de estos factores de transcripción exógenos y en los medios apropiados que incluirían los factores de crecimiento apropiados, las células somáticas comenzaron a convertirse en células madre pluripotentes. Los genes endógenos que codifican OCT-4, Klf4, Nanog, SOX-2 en las células somáticas también comienzan a expresarse y las células se vuelven células madre pluripotentes. La presencia continua de los factores de transcripción exógenos ya no es esencial. En la mayoría de estas condiciones, solo un pequeño porcentaje de células experimenta conversión a pluripotencia. A medida que las células somáticas se reprograman, aparecen cuerpos lipídicos con fluorescencia azul endógena incluso antes de que se formen las colonias típicas de iPSC [Figuras 4 y 5]. La Figura 4 muestra que las células somáticas humanas adquieren cuerpos lipídicos fluorescentes muy temprano en la reprogramación. La figura 4 captura el contraste de fase combinado y las imágenes de fluorescencia azul de un NFF y LCL transfectaron los plásmidos episómicos que codifican OCT4 humano, SOX2, L-Myc, Klf4, Lin-28 y p53-shRNA (Addgene plasmid nos: 27076, 27078, 27080) obtenido del Laboratorio Yamanaka a través de Addgene, EE. UU. y utilizado según el procedimiento de Okita et al. 2011. que se siguen durante varios días hasta la formación de colonias iPS. Los factores de Yamanaka son factores de transcripción de proteínas, tales como Oct-4, Sox-2, Klf4, L-Myc, que cuando se expresan juntos en células somáticas, los convierten en células madre pluripotentes, es decir, colonias iPSC. En la figura, D es días en cultivo después de la transfección.
- En otra realización, la fluorescencia azul endógena junto con los cuerpos lipídicos son características del estado del epiblasto de las células madre pluripotentes humanas. Las células ES de ratón que se consideran se encuentran están en el estado "indiferenciado" no tienen ningún cuerpo lipídico con fluorescencia azul endógena. Se observan niveles bajos de fluorescencia endógena azul en células ES de ratón que emanan de sus mitocondrias [Figura 6].
- En aún otra realización, las células pluripotentes humanas, cuando se cultivan en condiciones de cultivo que se sabe que las hacen más parecidas a ES de ratón, es decir, el estado más "indiferenciado", muestran una disminución en el número de cuerpos lipídicos con fluorescencia azul endógena y células ES de ratón cuando crecen en condiciones que favorecerían el estado del epiblasto (mEpiSC) muestran un mayor número de cuerpos lipídicos más grandes y estos cuerpos adquieren fluorescencia azul [Figura 6].
- La presente divulgación permite monitorizar, identificar y aislar células madre pluripotentes humanas (embrionarias e inducidas) utilizando una fluorescencia azul endógena a partir de cuerpos lipídicos intracelulares. La fluorescencia azul endógena también se utiliza para seguir la reprogramación y también para distinguir células madre pluripotentes y células diferenciadas entre sí. Además, los cuerpos lipídicos también ayudan a identificar las células madre en el estado "cebado" o epiblasto desde el estado más primitivo o el estado "indiferenciado" [Figuras 1 a 10].
- En otra realización de la presente divulgación, la fluorescencia azul endógena se retiene dentro de los cuerpos lipídicos incluso en células fijadas con paraformaldehído [Figuras 2 y 3].
- En otra realización más de la presente divulgación, los resultados experimentales se confirman mediante la realización de diversas pruebas tales como la presencia de marcadores pluripotentes específicos, por ejemplo, Oct-4, Sox2 y Nanog y su asociación con la tinción con aceite rojo y la posterior expansión de la población de células clasificadas. La tinción con aceite rojo se lleva a cabo para confirmar que los cuerpos esféricos que emiten fluorescencia azul endógena son en realidad cuerpos lipídicos.
- En una realización de la presente divulgación, las células pluripotentes representan la presencia de diversos marcadores pluripotentes tales como Oct-4, Sox2, Klf4, C-Myc, Lin28, SSEA-4, SSEA-3, fosfatasa alcalina, Tra-1-60, Tra-1-81 -etc. Los niveles de proteínas Oct-4, Sox2 y marcadores (células madre) Nanog pluripotencia se determinan por inmunofluorescencia, que muestran una correlación positiva con los niveles de fluorescencia endógena azul. En las colonias de células madre pluripotentes humanas que se diferencian espontáneamente, es decir las áreas que por morfología se ven diferenciadas no muestran fluorescencia azul endógena y las células en estas áreas tampoco expresan o tienen niveles muy bajos de Oct-4 en sus núcleos [Figura 3]. Los cultivos de células madre pluripotentes diferenciadas cuando se clasifican, muestran un mayor número de células con fluorescencia azul endógena inferior [Figura 3].
- La presente divulgación se refiere a la identificación y aislamiento de células madre pluripotentes inducidas humanas a partir de sus contrapartidas diferenciadoras; y células madre pluripotentes de ratón y humanas en estados embrionarios y epiblastos. La técnica es libre de etiquetas, es adecuada para la identificación de alto rendimiento, disección mecánica fácil, aislamiento y propagación posterior. El procedimiento emplea un microscopio de fluorescencia estándar y una máquina FACS y no implica ningún equipo costoso. La presente divulgación no emplea FLIM y gráficos de fasores para identificar y separar la fluorescencia de NADH y LDAG. Adicionalmente, la presente invención no menciona que la

presencia de fluorescencia en cuerpos lipídicos en células madre pluripotentes se debe a especies de oxígeno reactivas.

El procedimiento descrito en la presente divulgación es robusto, se aplica de manera fácil y directa con el equipo estándar disponible en la mayoría de los laboratorios y no requiere conocimientos específicos o capacitación o instrumentos muy sofisticados.

El procedimiento descrito en la presente divulgación se utiliza para demostrar que la fluorescencia azul endógena es perceptible muy temprano en el proceso de conversión de células somáticas humanas a células iPS y por lo tanto sirve como un marcador temprano de reprogramación y ayuda a controlar el proceso de conversión a pluripotencia. En la técnica anterior, la eficacia de la reprogramación podría estimarse solo visualizando la aparición de colonias por morfología y aparición de marcadores como Oct-4-GFP utilizando células de partida genéticamente modificadas, por lo tanto, la presente divulgación supera dicho inconveniente.

Recíprocamente, se utiliza para seguir el proceso de diferenciación y eliminar las células madre pluripotentes formadoras de teratoma, por ejemplo, antes del trasplante in vivo de las células diferenciadas. Las células madre pluripotentes pueden formar teratomas en el trasplante. Los teratomas, que son tumores, generalmente son benignos, pero tienen el potencial de generar tumores malignos y también otros tipos de células diferenciadas de las tres capas germinales. Estas células también interferirían con el funcionamiento de las células trasplantadas. En la técnica anterior, la eliminación de células pluripotentes de la población diferenciada requeriría el uso de anticuerpos o la modificación genética de las células y, por lo tanto, esta divulgación supera dicho inconveniente. En una realización, las estirpes celulares ES de ratón (ES D3 y ES R1) se obtienen de American Type Culture Collection (ATCC), en el que ES D3 se derive de la cepa 129S2/SvPas de blastocisto de ratón y tiene la ATCC No: CRL-1934.

Para referencia:

la fuente de ES R1 es del Dr. Andras Nagy, del Instituto de Investigación de Lunenfeld-Tanenbaum Research Institute Mount Sinai Hospital Joseph & Wolf Lebovic Health Complex 600 University Avenue Toronto Ontario. ES R1 se establece a partir de blastocitos de 3,5 días producidos cruzando dos subcepas 129 de ratón (129Sl/SvImJ y 129Xl/Svj) y tiene el ATCC No. SCRC- 1011. La célula madre embrionaria humana HuES7 se obtiene del Dr. Doug Melton, Universidad de Harvard, EE. UU. Esta línea se generó a través de la colaboración de Boston IVF con la Universidad de Harvard y el Centro Médico Howard Hughes, y está disponible a través del Dr. Doug Melton. La fuente de estas células y detalles están disponibles en "Derivation of embryonic stem cell lines from human blastocysts". Autores - Cowan CA, Klimanskaya I, McMahon J, Atienza J, Witmyer J, Zucker JP, Wang S, Morton CC, McMahon AP, Powers D, Melton DA. Diario - N. Engl. J. Med. 2004 25 de marzo; 350 (13): 1353 - 6. Epub 2004 3 de marzo.

Fuente de LCL, ADF y NFF: Clínica Geriátrica, Instituto Nacional de Salud Mental y Neurociencias (NIMHANS).

En una realización de la presente divulgación, la tecnología de la presente solicitud se elabora adicionalmente con la ayuda de los siguientes ejemplos. Sin embargo, los ejemplos no deben interpretarse que limitan el alcance de la divulgación.

EJEMPLOS:

Materiales e instrumentación

Cultivo de células madre pluripotentes humanas y de ratón

La estirpe de células madre embrionarias humanas (HuES7) y estirpes de células madre pluripotentes inducidas humanas (LCL iPSC, NFFs iPSC y ADF iPSC) se mantienen como colonias no diferenciadas en capas de alimentación de fibroblastos de embriones de ratón mitóticamente inactivados (MEF) en medio de cultivo HuES típico (KO-DMEM (Invitrogen, EE. UU.), aproximadamente 100 μ M 2-Mercaptoetanol (Sigma-Aldrich, EE. UU.), aproximadamente 20% de reemplazo sérico modificado (KOSR - Invitrogen, EE. UU.), aproximadamente 10 nM de aminoácidos no esenciales, aproximadamente 100 mM de L-glutamina y aproximadamente 5 ng/ml de factor de crecimiento de fibroblastos humanos recombinantes (bFGF) (Peprotech, Israel) a aproximadamente 5% de CO₂ y aproximadamente 37°C. Se cultivan células madre embrionarias de ratón (mES) R1 y D3 en medio de cultivo mES típico en MEF mitotizados inactivados (KO-DMEM, aproximadamente 15% de KOSR, aproximadamente 10 nM de aminoácido no esencial, aproximadamente 200 mM de L-glutamina y 106 unidades/ml de factor inhibidor de leucemia (LIF) (Chemicon, EE. UU.) a aproximadamente 5% de CO₂ aproximadamente 37°C. Los cambios en los medios son en días alternos a menos que se indique lo contrario. Las colonias se pasan por disociación enzimática con Accutase (Invitrogen, EE. UU.) o se disocian mecánicamente y se transfieren a MEF fresco cuando confluyen al 70-80%. Las estirpes iPSC humanas se generan en el laboratorio mediante electroporación (Neon, Invitrogen, EE. UU.) de fibroblastos de células somáticas (LCL o adultos humanos (ADF) o de prepucio neonatal (NFF)) con plásmidos episómicos que codifican OCT4 humano, SOX2, I-Myc, Klf, Lin-28 y p53-shRNA obtenidos de Addgene, EE. UU. De acuerdo con el procedimiento de Okita, K. et al. (Un procedimiento más eficiente para generar células iPS humanas sin integración. Nature methods 8, 409-12 (2011)).

Microscopía y análisis de imagen

Todas las imágenes de epifluorescencia no confocal se obtienen con un microscopio Nikon Eclipse TE2000-E-PFS (Japón) con una cámara EM-CCD Photomecix Cascade II 512 (Roper Scientific, EE. UU.) y un software Image Pro-Plus AMS (Media Cybernetics, EE. UU.). Los objetivos de Nikon utilizados son 60 X/NA1.4 inmersiones en aceite y 10X/NA 0.3 para todos los experimentos. La fluorescencia se visualiza utilizando filtros de paso de banda (Chroma Technology, EE. UU.). Los filtros utilizados son azules (Exciter - 350nm/50, Dichoric - 400 nm de paso largo, Emitter - 460nm/50), Verde (Exciter - 500nm/20, Dichoric - 535nm/30, Emitter - 515 long pass) y Rojo (Exciter - 450nm/30, Dichoric - 620nm/0, Emitter - 570 long pass). Las imágenes confocales se adquieren utilizando un Zeiss LSM 510 Metaconfocal configurado con un objetivo 63X y un láser 405 (excitación - 405nm, emisión - aproximadamente 420 nm a aproximadamente 490nm). Todas las imágenes se procesan utilizando el software ImageJ 1.47. Para la representación cualitativa de las imágenes, las imágenes de escala de grises de 16 bits se importan en ImageJ, se restan los antecedentes y se ajustan automáticamente. Los archivos procesados se guardan como imágenes RGB y las figuras finales se construyen utilizando Adobe Photoshop CS3 utilizando pseudo colores apropiados. Para el análisis cuantitativo y la representación de imágenes para comparación directa, por ejemplo, entre las células ES de ratón y las células ES humanas, todas las imágenes presentadas tienen la misma escala de intensidad limitada por el valor máximo ajustado de la imagen de la célula HuES. El diagrama de dispersión y los análisis de ajuste lineal de la expresión del marcador de pluripotencia (OCT4, SOX2 y Nanog) y la fluorescencia azul se realizan con los valores de intensidad de fluorescencia de píxeles individuales utilizando la aplicación "perfil de trazado" de ImageJ.

Inmunocitoquímica

Las células se cultivan en MEFS en platos cubreobjetos. Las células se fijaron en aproximadamente 4% de paraformaldehído en HBSS con Ca^{2+} y Mg^{2+} (Invitrogen, EE. UU.), se enjuagaron y permeabilizaron con aproximadamente 0.1% de Triton en PBS y se incubaron con solución bloqueante (aproximadamente 0.3% de BSA, IxPBS y aproximadamente 4% de suero de cabra normal) a temperatura ambiente durante una hora. Se utilizan los siguientes anticuerpos primarios: anticuerpo anti-OCT4 (cat. No. CIO sc5279) de Santa Cruz Biotechnology, Inc. (EE. UU.) A 1:100; anticuerpo anti-SOX2 (cat. No. 561469) de BD Pharmingen (EE.UU.) a 1:1000 y Anti-Nanog (cat. No. 60609) de BD Pharmingen (EE.UU.) a 1:1000. Los anticuerpos secundarios se diluyen 1:500 en suero de cabra normal al 4% en 1XHBSS y se incuban durante la noche a 4°C, seguidos de lavados con temperatura ambiente de tres horas y una incubación a temperatura ambiente de una hora. Los anticuerpos secundarios son Alexafluor-488 anti-ratón de cabra (cat. No. A-11001) y Goat anti-mouse Alexafluor-568 (cat. A-11004) de Life Technologies, USA. La tinción mitocondrial TMRM (cat. No. M 1406) de Sigma-Aldrich (EE.UU.) se utiliza a 75 nM. Las células se tiñen mediante incubación de 20 minutos en medio de cultivo en CO_2 al 5% y a 37°C.

Colocalización de fluorescencia azul en organelos y compartimentos celulares

Las construcciones utilizadas para colocalizar fluorescencia azul con compartimentos subcelulares y organelos son (RFP-KDEL) para marcar Golgi, RFP-SKL para marcar peroxisomas y RFP-GalT para marcar el retículo endoplásmico. Las células HuES7 se cultivan sin alimentación y se recolectan el día del experimento (0.1×10^6 células/transfección). Todas las transfecciones se realizan con el sistema de transfección Neon (Invitrogen, EE. UU.) utilizando puntas de 10 μl . Las imágenes de fluorescencia de las células se obtienen después de 48 horas utilizando los filtros apropiados (ver arriba) y se analizan.

Espectrofotometría y Espectrofluorimetría

Los espectros de absorbancia y fluorescencia de extractos cloroformo:metanol de cuerpos lipídicos, suero (FBS) y reemplazo sérico (KOSR) se obtienen a temperatura ambiente utilizando un espectrofluorímetro FluoroMax-3 (Horiba Scientific, Japón) o un espectrofotómetro Cary-300 UV-Vis (Agilent Technologies, EE. UU.) Contra un blanco de cloroformo en una cubeta de cuarzo. Los extractos de cloroformo:metanol se obtienen de muestras de suero o KOSR se extraen con un volumen igual de mezcla de cloroformo:metanol (1:1) agitando en vórtice durante 1 minuto y luego se centrifugan (3000xg) durante 10 minutos. Se elimina el cloroformo más pesado: la acción de metanol, se seca en un CentriVapand disuelto en 1 ml de cloroformo y se analiza.

Ejemplo 1:

El presente ejemplo muestra medios utilizados para propagar células madre pluripotentes humanas y de ratón; medios utilizados para convertir células pluripotentes humanas en un estado primitivo similar a células madre embrionarias de ratón; y células ES normales de ratón a un estado de tipo epiblasto (como células HuES).

- Medio estándar de células madre embrionarias humanas (HuESM): medio estándar para el cultivo de células ES humanas:

DMEM modificado (por ejemplo: Gibco de Life Technologies, cat No. 10829018) con aproximadamente 20% de reemplazo de suero modificado (por ejemplo: Gibco de Life Technologies, cat. No. 10828-028), sobre 0.1 mM beta-mercaptoetanol (Por ejemplo : Gibco, cat. No. 21985-023), aproximadamente 1% de Penicilina-Estreptomicina 100X (por

ejemplo: Gibco de Life Technologies, cat. No. 15140-122), aproximadamente 1% de 100X aminoácidos no esenciales (Por ejemplo: Gibco de Life Technologies, cat. No. 1140-050), aproximadamente 1% de GlutaMAX 100X (por ejemplo: Gibco de Life Technologies, cat. No. 35050-061), aproximadamente 5 ng/ml de crecimiento básico de fibroblastos Factor - bFGF (Por ejemplo: Peprotech, cat No. 100-18B).

5

• Medios de conversión de células madre embrionarias humanas (HuCM) - Medio de conversión -

Medio que favorece el crecimiento del estado más primitivo de células ES de ratón:

10 DMEM modificado, con aproximadamente 15% de suero fetal bovino (por ejemplo: GIBCO, cat. No. 10270-106), aproximadamente 0.1 mM beta-mercaptoetanol, aproximadamente 1% de penicilina-estreptomina 100X, aproximadamente 1% de aminoácidos no esenciales, sobre 1 mM GlutaMAX, aproximadamente 1 ng/ml LIF humano (por ejemplo: ProSpec, cat No. CYT 644), aproximadamente 10 ng/ml de interleucina-6 (por ejemplo: Sigma, cat No. I1395), aproximadamente 3 μ M GSK-3 α/β inhibidor BIO (por ejemplo: Sigma B 1686), aproximadamente 1 μ M de MAPK inhibidor PD98059 (por ejemplo: Sigma P215).

15

Medio estándar de células madre embrionarias de ratón (MESM) - medio estándar para cultivo de células ES de ratón:

20 DMEM modificado con aproximadamente 15% de suero fetal bovino, 0.1 Mm de beta-mercaptoetanol, aproximadamente 1% de penicilina-estreptomina 100X, aproximadamente 1% de aminoácidos no esenciales 100X, aproximadamente 1% de GlutaMAX 100X y aproximadamente 1000 unidades de ratón LIF (Por ejemplo: Millipore, ESGRO LIF).

20

• Medios de conversión de células madre embrionarias de ratón (MCM) - Medio de conversión - Medios utilizados para convertir células ES de ratón normales en un estado tipo epiblasto (como las células HuES):

25

DMEM modificado con aproximadamente 20% de Suero modificado - KOSR (Por ejemplo: Gibco de Life Technologies, cat. No. 10828-028), sobre 0.1 mM beta-mercaptoetanol, aproximadamente 1% de Penicilina-Estreptomina 100X, aproximadamente 1% de Aminoácidos no esenciales 100X, aproximadamente 1% de GlutaMAX 100X, aproximadamente 5mM de ditionito sódico añadido fresco (Por ejemplo: Sigma), Factor de crecimiento fibroblástico básico 10 ng/ml bFGF y aproximadamente 1 ng/ml de Activina (Por ejemplo: catálogo de Peprotech No. 120-14).

30

Ejemplo de referencia 2: perfil FACS de células pluripotentes

35 El presente ejemplo proporciona un procedimiento para identificar y aislar células madre pluripotentes humanas de células diferenciadas.

Los cultivos de células madre pluripotentes humanas se disocian en células individuales y se clasifican utilizando una máquina FACS basada en valores de fluorescencia azul endógena.

40 1. Los cultivos de células madre pluripotentes humanas (células HuES7 y HiPS) cultivadas en medio de células madre embrionarias humanas estándar y en fibroblastos embrionarios de ratón (MEF) mitóticamente inactivados como una capa alimentadora, se lavan una vez con aproximadamente tampón PBS 1X. Alternativamente, las células madre pluripotentes se pueden cultivar como cultivos sin alimentador.

45 Los MEFS son fibroblastos embrionarios de ratón mitóticamente inactivados y se utilizan como sustrato no divisor para hacer crecer las células HuES o iPS. Se puede evitar en algunos casos y las células se pueden cultivar en subcepas alternativas.

50 2. Las células se someten a disociación por medios mecánicos o enzimáticos. En el procedimiento enzimático, aproximadamente 300 μ l de accutasa (ESGRO Complete Accutase de Millipore, Cat No. SF006) o Detachin u otra solución de desprendimiento de células/otro reactivo de disociación celular enzimática tal como 300 μ l de Tryp-LE (Invitrogen, EE. UU.) y se añaden por área superficial de 10 cm². Las células se mantienen a aproximadamente 37 grados Celsius durante aproximadamente 5 a 7 minutos, hasta que las colonias comienzan a disociarse.

55 3. Se agrega 2 ml de medio HuES estándar (KO-DMEM, 100 μ M 2-Mercaptoetanol, 0.5% de FBS, 10 nM de aminoácidos no esenciales, L-glutamina 100 mM y 5 ng/ml de factor de crecimiento de fibroblastos humanos recombinantes (bFGF)) por cada 300 μ l de accutasa y el cultivo se tritura para obtener una suspensión de células individuales. La mayoría de los MEFS permanecen unidos entre sí y están presentes como una estructura fibrosa que se elimina fácilmente físicamente (por ejemplo, utilizando un filtro de células – 40 μ m). Alternativamente, 5 minutos de adhesión selectiva en placas de cultivo de tejido fresco permiten la eliminación de la mayoría de los MEF.

60

4. Las colonias se disecan mecánicamente utilizando una jeringa o StemProEZPassage Roller (Invitrogen) y luego se Trituran para obtener células individuales. Esto se hace si se quiere evitar la disociación enzimática.

65 5. Las células se sedimentan, aproximadamente 200 g durante aproximadamente 5 minutos a una temperatura que varía de aproximadamente 4°C a aproximadamente 37°C, preferiblemente de aproximadamente 15°C a

aproximadamente 30°C, más preferiblemente a una temperatura de aproximadamente 22°C. El sedimento celular se resuspende en medio de clasificación (igual que el medio HuES estándar, excepto que aproximadamente 20% de KOSR se reemplaza por aproximadamente 0.5% FBS) en tubos FACS y se mantiene en hielo.

5 6. Se agrega aproximadamente 1 µg/µl de yoduro de propidio a la suspensión celular y se incuba durante aproximadamente 2 minutos a una temperatura que varía de aproximadamente 4°C a aproximadamente 37°C, preferiblemente de aproximadamente 15°C a aproximadamente 30°C, más preferiblemente a temperatura de aproximadamente 22°C antes de clasificar para identificar y separar las células muertas.

10 Las células se clasifican utilizando un clasificador de células Aria BD FACS, láser cerca de UV de 375 nm, detector de Trigon para fluorescencia azul y se recogen a un filtro de paso de banda de 450/50 nm (canal DAPI); Voltaje PMT ajustado a 350 V para fluorescencia azul; presión de flujo de la vaina (20 pci); celda de flujo (100 µm). Luego, el clasificador se calibra adecuadamente para parámetros estándar tales como escalado de área, retardo de láser y retardo de caída, etc.

15 7. El análisis de clasificación se inicia para definir la activación adecuada para obtener células vivas y para determinar la distribución de la fluorescencia azul en la población celular.

20 Los perfiles típicos de las células madre pluripotentes humanas (HuES-7 y HiPSC) muestran dos picos distintos que son característicos del cultivo. Los promedios de los dos picos difieren por lo menos en un orden de magnitud y la población con los niveles de fluorescencia más altos (a la derecha en la Figura 3c) se designa como “Azul Alto” y la población con los niveles de fluorescencia más bajos (uno en la izquierda en la Figura 3c) se designa como “Azul Bajo”. La distribución debajo de cada pico define la calidad y cantidad de las células. Las observaciones de la presente divulgación indican que las células de colonias con buena morfología y que tienen pocos o ningún parche de células diferenciadoras caen principalmente dentro de la población de “Azul Alto”. Por el contrario, las colonias que exhiben diferenciación consisten en células que caen principalmente en la población de “azul bajo”.

30 La Figura 3 muestra que la fluorescencia azul asociada al cuerpo de lípidos es un marcador de pluripotencia y facilita el aislamiento y la propagación de células HPSC de alto rendimiento. (a) La fluorescencia azul asociada al cuerpo lipídico se coexpresa con marcadores de pluripotencia (OCT4, SOX2 y NANOG) en células HuES7 no diferenciadas. Las regiones de diferenciación identificadas por morfología (marcadas con línea punteada roja) muestran ausencia de marcadores de pluripotencia y fluorescencia azul asociados al cuerpo lipídico, (b) Diagramas de dispersión de intensidades de fluorescencia medias de fluorescencia azul frente a fluorescencia de marcador de pluripotencia (medido al marcar ROI de tamaño igual) muestra correlación positiva, (c) análisis FACS muestra coexpresión de fluorescencia azul con marcadores OCT4 y SSEA4, (d) diagramas de dispersión FACS típicos e histogramas de HPSC no diferenciadas muestran una población azul alta más grande mientras que los cultivos diferenciadores muestran lo contrario, (e) recuentos de células de poblaciones de células azules bajas y azules altas de cultivos no diferenciados y diferenciados, (f) Colonias típicas de células clasificadas de alto azul, azul bajo y sin clasificar, (g) Recuentos de colonias de células azules altas, azules bajas y sin clasificar de cultivos no diferenciados y de diferenciación. (h) Las células “azul bajas” son viables, tienen mitocondrias activas y no tienen la morfología HuESC característica, (i) Aislamiento y propagación de HuESC a partir de cultivos de HuES altamente diferenciados obtenidos mediante el cultivo de células de una población azul “alta”.

45 Las células clasificadas se recogen a temperatura que varía de aproximadamente 4°C a aproximadamente 37°C, preferiblemente de aproximadamente 15°C a aproximadamente 30°C, más preferiblemente a temperatura de aproximadamente 22°C, en tubos de recogida que contienen medio ES humano estándar y se propagan en condiciones normalmente utilizadas.

50 Para determinar el estado pluripotente de la población “Azul alto” y “Azul bajo”, se plaquean cantidades iguales de células de estas poblaciones en MEFs inactivados en medio ES humano estándar. Se coloca un número igual de células separadas con yoduro de propidio para determinar la ventaja de la clasificación. Los MEFS son células que no se dividen y que se utilizan como una superficie sobre la cual crecen bien las células pluripotentes, y se denominan MEF inactivados.

55 Todas las células que habían pasado por el clasificador se sedimentan (para eliminar el fluido de la vaina) y se colocan en placas sobre MEFs inactivados frescos en medio estándar HuES.

Todas las células cultivadas en placas se evalúan para la formación de colonias y los números de colonias se determinan después del día 7.

60 Ejemplo 3: Uso de fluorescencia azul para clasificación y enriquecimiento de células madre pluripotentes humanas (HPSC)

65 Dado que las células individuales dentro de una colonia de HPSC muestran niveles distintos pero variables de fluorescencia azul, se examina su relación con la pluripotencia y su utilidad para aislar las células no diferenciadas de las células de diferenciación por FACS.

Al clasificar las células utilizando fluorescencia azul (canal DAPI), las HPSC se resuelven en dos poblaciones distintas. Las intensidades de fluorescencia pico de las dos poblaciones diferían en 10 veces y se etiquetan como “azul alto” y “azul bajo” (Fig. 3d). Además, se observa que la proporción relativa de células con alta fluorescencia azul en las dos poblaciones caracteriza la “naturaleza pluripotente” de HPSC. Los cultivos con colonias en gran parte no diferenciadas se caracterizan por un perfil más bajo para la población “azul bajo” y un perfil más alto para la población “azul alto”, mientras que los cultivos con colonias más diferenciadas tienen el perfil inverso (Fig. 3d). Además, los cultivos con colonias de diferenciación tienen un mayor número de células dentro del pico “azul bajo” en comparación con los cultivos no diferenciadas (Fig. 3e). La observación anterior se amplía colocando el mismo número de células (n=30,000) de “azul alto”; “azul bajo” y una población “no clasificada” en MEF condicionado en medios típicos. La población de células “azul alto” siempre da lugar a un mayor número de colonias con la morfología típica similar a HuES en comparación con las poblaciones sin clasificar y “azul bajo” (Fig. 3f, g). Las células sin clasificar también funcionan mejor que las células “bajas azules” en términos de la morfología de la colonia y el número de colonias (Fig. 3f, g). Para descartar la posibilidad de muerte celular masiva después de la clasificación en la población “azul bajo” como la razón de la disminución del número de colonias, las células de bajo contenido de azul de yoduro de propidio se clasifican y se obtienen imágenes después de 4 días. La mayoría de las células adquieren una morfología aplanada y teñidas positivas para mitocondrias activas (Mitotracker FM rojo intenso) y tienen núcleos no fragmentados (Hoechst) (Fig. 3h), lo que sugiere que las células con células fluorescentes “bajas azules” permanecen vivas y representan la fracción “diferenciadora” de células en cultivos de HPSC. La clasificación/propagación repetida de colonias de HPSC (por FACS) no altera el perfil de fluorescencia azul sugiriendo que las células clasificadas continúan comportándose como HPSC regulares con alguna cantidad de diferenciación siempre presente (representada por células dentro del pico “azul bajo”).

En general, no se sabe que los cultivos de HPSC con grandes porcentajes de células de diferenciación sobrevivan múltiples pasajes. Con el fin de determinar si tales cultivos pueden ser rescatados utilizando fluorescencia azul, los cultivos de HuES diferenciadores se clasifican y las células con fluorescencia azul alta se colocan en placas en los alimentadores MEF. Las colonias pluripotentes típicas con bordes discretos y morfología uniforme se obtienen el día 7 (Fig. 3i).

Estos resultados indican que: (a) los niveles de fluorescencia azul asociada al cuerpo de lípidos se correlacionan positivamente con la pluripotencia y la autorrenovación, (b) la clasificación de fluorescencia azul facilita la propagación de células individuales de alto rendimiento y (c) las células con fluorescencia azul baja son las células diferenciadas.

Este procedimiento, por lo tanto, presenta ventajas significativas sobre los protocolos existentes de aislamiento y propagación de células madre pluripotentes humanas, incluidas las células individuales.

Ejemplo 4: desaparición de la fluorescencia endógena con diferenciación

El presente ejemplo muestra un procedimiento para inducir células madre pluripotentes humanas para que se diferencien a fin de observar que los cultivos de células madre pluripotentes humanas diferenciadas muestran disminución o ausencia de autofluorescencia azul.

Las células madre pluripotentes embrionarias (HuES7)/inducidas humanas (inducidas a partir de estirpes celulares somáticas LCL, ADF, NFF) se cultivan en una capa alimentadora de fibroblastos embrionarios de ratón en medio estándar HuES (con aproximadamente 5 ng/ml de bFGF), en plástico de cultivo de tejido regular.

Para inducir la diferenciación, las colonias de células madre pluripotentes humanas se cultivan en medio HuES estándar en ausencia de bFGF. Dentro de aproximadamente 2-3 días, se ven estructuras diferenciadas en medio de las colonias. Se toman imágenes de colonias cultivadas con bFGF y aquellas cultivadas en ausencia de bFGF. (Contraste de fase y fluorescencia azul)

Las imágenes tomadas muestran la clara disminución/desaparición de los cuerpos lipídicos en las células diferenciadas con una disminución concomitante en la autofluorescencia azul (Figura 3).

Ejemplo 5: Células somáticas humanas adquieren cuerpos lipídicos fluorescentes azules muy temprano durante reprogramación

Los cuerpos lipídicos con fluorescencia azul están presentes en las colonias humanas ES y HiPSC (células madre pluripotentes inducidas humanas) (Fig. 1b y Fig. 4a) mientras que en las células somáticas humanas son mucho menos y no fluorescentes. Por lo tanto, se controla la aparición de cuerpos lipídicos fluorescentes en células somáticas que se reprograman para que se vuelvan pluripotentes. Las células de diferentes tejidos somáticos, es decir, fibroblastos de prepucio neonatal humano (NFF) y estirpes de células linfoblastoides adultas transformadas con EBV (LCL) se reprograman utilizando el procedimiento de Okita et al. (2011). Tan pronto como 7-10 días después de la transfección, los grupos de células comienzan a exhibir fluorescencia azul mientras que la capa MEF circundante y las células somáticas no lo hacen. Mayor aumento muestra que la fluorescencia se asocia con cuerpos esféricos en el citoplasma. Además, se observa que estos grupos de células se expanden y dan lugar a colonias de HiPSC y también retienen la fluorescencia azul como se observa en HPSC estables. El momento de aparición de los cuerpos lipídicos fluorescentes

varía con el tipo de tejidos somáticos. Los cuerpos fluorescentes azules son visibles alrededor de 7-10 días después de la transfección, generalmente en el caso de los fibroblastos neonatales, mientras que en el caso de los LCL, la fluorescencia aparece alrededor del día 10-12 (Fig. 4). Las células que tienen cuerpos lipídicos fluorescentes también expresan SSEA-4 (Fig. 5), un marcador de reprogramación temprana establecido. Los perfiles de distribución de fluorescencia azul de las HiPSC recién formadas son similares a los de las estirpes de HuES estables y son siempre más altos (aproximadamente 10 veces) que sus precursores somáticos. Los niveles más bajos de fluorescencia azul observados como un único pico de FACS en células somáticas pueden surgir a partir de NAD (P) H y otros fluoróforos intrínsecos. Estos resultados indican que la fluorescencia “azul” asociada con los cuerpos lipídicos sirve como un marcador de reprogramación y puede ayudar en la identificación de células reprogramadas “potenciales”.

Ejemplo 6: fluorescencia azul en las células madre embrionarias del ratón tiene origen mitocondrial

Las células madre embrionarias de ratón muestran bajos niveles de autofluorescencia azul. El presente ejemplo muestra un procedimiento para mostrar la localización de la autofluorescencia azul a las mitocondrias en células madre embrionarias de ratón, empleando un colorante rojo fluorescente que tiñe las mitocondrias en células vivas.

1. Se cultivan células de ratón ES D3 en la capa de alimentación de MEF en medio estándar de ratón ES con aproximadamente 15% de suero bovino fetal y LIF de ratón, en plástico de cultivo tisular regular.

2. Se colocan colonias de ES de ratón en placas con cubreobjetos con MEF para permitir imágenes de gran aumento (60X).

3. Se añaden aproximadamente 100 nM de MitoTracker Red (Invitrogen) al medio y se incuban a aproximadamente 37 grados durante aproximadamente 45 minutos a aproximadamente 1 hora. MitoTracker Red (Mito-Red) es un colorante fluorescente rojo que tiñe las mitocondrias en células vivas.

4. Después de aproximadamente 1 hora, se lava el medio con MitoTracker Red y se toman imágenes de las colonias en medio fresco.

Se obtienen imágenes de fluorescencia de auto fluorescencia azul y fluorescencia roja del tinte y se observa colocalización. Esto indica que la autofluorescencia azul en las células ES de ratón proviene de las mitocondrias (Figura 6).

Ejemplo 7: Células embrionarias humanas para conversión del estado tipo célula embrionaria de ratón

El presente ejemplo explica un procedimiento para cultivar células madre embrionarias humanas HuES7 en medio de conversión de células madre embrionarias humanas (HuCM), para convertirlas a un estado más primitivo/indiferenciado, que muestra una disminución significativa en el número de cuerpos de lípidos fluorescentes azules (Figura 6).

1. Las células madre pluripotentes embrionarias/inducidas humanas se cultivan en una capa alimentadora de fibroblastos embrionarios de ratón en medio estándar HuES (con aproximadamente 5 ng/ml de bFGF), en un plástico de cultivo tisular regular.

2. Las colonias de células madre pluripotentes humanas se colocan en placas sobre cubreobjetos en los MEF para permitir imágenes de gran aumento (60X).

3. El medio utilizado para convertir se modificó ligeramente a partir de un protocolo anterior (Hanna, J. et al. Human embryonic stem cells with biological and epigenetic characteristics similar to those of mouse ESCs. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 107, 9222-7 (2010)) al - (a) sustituir DMEM/F12 con KO-DMEM y (b) sustituir el inhibidor de GSK3P de molécula pequeña - CHIR99021 con otro inhibidor de GSK3P - BIO (Sigma-Aldrich, EE.UU. cat. No. B1686). Los medios se cambian diariamente y se monitorizan la morfología de la colonia, la desaparición de los cuerpos lipídicos y el cambio en la fluorescencia correspondiente. Las colonias crecen en el medio de conversión durante aproximadamente 7-10 días. Las células ES humanas que crecen en monocapas como colonias circulares planas con cuerpos lipídicos internos visibles que exhiben fluorescencia azul muestran una disminución en los cuerpos lipídicos que desaparecen completamente en aproximadamente 7 a 10 días en cultivo.

Ejemplo 8: célula madre embrionaria del ratón para mouse epiblastos de ratón (tipo célula madre embrionaria humana) conversión de estado

El presente ejemplo muestra un procedimiento para convertir células madre embrionarias de ratón en células de tipo epiblastos de ratón que muestran un aumento significativo en el número de cuerpos lipídicos que emiten fluorescencia azul (Figura 6).

1. Convertir células mES a un estado EpiSC, es decir, estado “indiferenciado” a “cebado”, las células mESR1 y D3 se cultivan en medio ES humano típico con 2000 unidades/ml de LIF (Millipore, EE.UU., cat. No ESG1107) y 10 ng/ml de bFGF en platos de cubreobjetos de vidrio recubiertos con gelatina al 0.1%.

2. Los cubreobjetos de vidrio se lavan con etanol al 100%, se esterilizan con UV durante 3 horas y se recubren con 0,1% de gelatina (300 Bloom) (Sigma-Aldrich, EE. UU., Cat. No. G3500) en 1XPBS.

5 3. Las condiciones hipóxicas se inducen añadiendo 1.5 mM de ditionito sódico (Sigma-Aldrich, EE. UU., Cat. No. 157953) al medio que se reemplaza diariamente.

4. Las células se controlan estrechamente para detectar cambios en la morfología y en la aparición de cuerpos lipídicos junto con las características de fluorescencia asociadas.

10

Ejemplo 9: Cuerpos lipídicos fluorescentes azules se asocian con el estado “cebado” o “tipo epiblasto”

15 Para determinar si los cuerpos lipídicos fluorescentes están específicamente asociados con el estado “cebado”, se examinan las células ES de ratón. Entre las muchas diferencias entre las células madre pluripotentes humanas y de ratón, se cree que las células de ratón representan un estado “indiferenciado” mientras que las células humanas representan una etapa de desarrollo ligeramente posterior llamada estado “cebado” o “epiblasto”. Las colonias de ESC de ratón cultivadas en medio de células KOSR ES al 20% muestran una fluorescencia azul muy débil en comparación con las colonias de HPSC (Fig. 6). Las imágenes de mayor aumento de las células mES teñidas con BODIPY[®] 493/503 muestran muy pocos cuerpos lipídicos, casi siempre alrededor de los bordes de las colonias, y además, estos no son fluorescentes en azul (Fig. 6). El análisis de los compartimentos subcelulares de las células mES muestra que la fluorescencia azul tenue endógena en las células mES se localiza conjuntamente con las mitocondrias, se tiñen con TMRM (un colorante específico de mitocondrias) (Fig. 6d) ($R^2=0.93$). Esto es diferente de las células pluripotentes humanas en las que se excluye la fluorescencia azul alta de las mitocondrias y está presente en los cuerpos lipídicos (Fig. 1). La clasificación de células ES de ratón presenta una sola población con menor fluorescencia azul que las células madre pluripotentes humanas. Estos resultados sugieren que las fuentes de fluorescencia azul observadas en los mESC y HPSC son diferentes y que los cuerpos lipídicos fluorescentes azules pueden estar asociados con el estado “cebado” o “tipo epiblasto”.

30 Por lo tanto, esta asociación se explora desplazando las células madre pluripotentes del estado “cebado” al estado “indiferenciado” y viceversa. Las células HuES se cultivan en medios que promueven su conversión al estado “indiferenciado”. Dentro de las 48 horas, las células HuES muestran una disminución significativa en la fluorescencia azul junto con la correspondiente disminución en el número de cuerpos lipídicos (Fig. 6 f, h). De forma similar, las células mES se cultivan en medios que desencadenan su conversión al estado “cebado” y las células comienzan a adquirir cuerpos lipídicos fluorescentes (Fig. 6g, i) que refuerzan la asociación del estado tipo epiblasto con cuerpos lipídicos fluorescentes azules. Las células cultivadas en medios de “conversión” continúan expresando OCT4 y no se tiñen con yoduro de propidio (PI) confirmando su estado pluripotente y su viabilidad (Fig. 7a, b - panel central e inferior). Los HPSC y los mESC cultivados en sus respectivos medios “típicos” así como en sus medios de “conversión” también se someten a análisis FACS. El análisis muestra que hay cambios significativos en la intensidad de la fluorescencia azul media y el perfil en ambas estirpes celulares en las direcciones esperadas. Estos resultados muestran claramente que la fluorescencia azul asociada al cuerpo lipídico podría estar unida al estado celular específico, es decir, las células tipo epiblastos.

45 Ejemplo 10: Los cuerpos lipídicos fluorescentes azules están ausentes en la masa de células interiores del ratón, marcando muchas células de epiblastos de ratón y también están presentes en células madre tipo epiblasto de ratón.

50 Determinar si los cuerpos lipídicos fluorescentes azules también están presentes in vivo y marcar las células “cebadas” o “tipo epiblasto”. Las hembras gestantes programadas - cepa CF1 se obtienen de NCBS Animal Facility y los embriones de ratón se disecan en DPC (Días después del coito) 6.5, una etapa de desarrollo a partir de la cual se derivan las células madre de epiblastos de ratón (mEpiSCs). La región del epiblasto del embrión muestra fluorescencia azul punteada que también se tiñe con BODIPY[®] 493/503 (Fig. 8). Estos resultados sugieren que los cuerpos lipídicos fluorescentes azules observados tanto en HPSC como en epiblastos de ratón son similares y pueden ser característicos de las células madre pluripotentes “cebadas” o “tipo epiblasto”.

55 Para determinar si los cuerpos lipídicos fluorescentes azules también están presentes in vivo y específicamente marcan las células “cebadas” o “tipo epiblasto”, los embriones de ratón se examinan en DPC 3.5 para evaluar la masa celular interna del ratón (ICM) y DPC 6.5. una etapa de desarrollo a partir de la cual se derivan las células madre de epiblastos de ratón (mEpiSCs). Las imágenes confocales de embriones DPC 3.5 muestran muy pocos cuerpos lipídicos teñidos con BODIPY[®] 493/503, y estos no son fluorescentes en la región azul y no se localizan en la región ICM del embrión (Fig. 8). Por otro lado, el embrión DPC 6.5 presenta una fluorescencia azul intensa en general. La región del epiblasto distal del embrión DPC 6.5 que da lugar a EpiSC muestra puntos fluorescentes azules que también se tiñen con BODIPY[®] 493/503 (Fig. 8). Estos resultados sugieren que los cuerpos lipídicos fluorescentes azules pueden ser un marcador para el estado del epiblasto y estos se observan tanto en HPSC como en el epiblasto del ratón, y pueden ser característicos del estado pluripotente “cebado” o “tipo epiblasto”.

65 Tinción de cuerpos lipídicos en embriones de ratón (E6.5) y generación de EpiSC de ratón

Los embriones posteriores a la implantación (E6.5) se aíslan de ratones CF1 utilizando el procedimiento descrito por Shea, K. y Geijsen, N. Disección de embriones de ratón de 6,5 dpc. Journal of visualized experiments: JoVE 160 (2007). doi: 10.3791/160. Los embriones se muestran como se describió anteriormente para la fluorescencia azul utilizando un microscopio Nikon Eclipse TE2000-E-PFS. Los embriones también se tiñen con BODIPY® 493/503 como se describió anteriormente para identificar cuerpos lipídicos y determinar su nivel de colocación con la fluorescencia azul.

Las células EpiSC de ratón se derivan de embriones E6.5. El cono ectoplacentario se separa de los embriones y los cilindros de huevo individuales se trituran suavemente (utilizando una micropipeta de 20 µl) dando como resultado pequeños grupos y se colocan en MEF inactivados mitóticamente en medios mEpiSC (medio HuES medio suplementado con KOSR al 15% y SFB al 5% con 10 ng/ml bFGF y sin LIF). Las colonias aplanadas se observan entre 24-48 horas. Las colonias se disecan mecánicamente en pequeños trozos y se propagan una vez cada 3-4 días en las mismas condiciones de cultivo. Se observan y evalúan la morfología de la colonia y la presencia de fluorescencia azul asociada al cuerpo de lípidos en cada pasaje.

Las células de los embriones de ratón (E6.5) en medios específicos de EpiSC (KOSR al 15% y FBS al 5% con bFGF) se cultivan y las colonias “tipo epiblasto” que resultan retienen los cuerpos lipídicos fluorescentes (Fig. 8). Estos resultados sugieren que los cuerpos lipídicos fluorescentes son una característica del estado “tipo epiblasto” de las células madre pluripotentes y las diferencia de las células en el estado “indiferenciado”.

Ejemplo 11: retención de autofluorescencia en colonias fijas paraformaldehidas

El presente ejemplo muestra un procedimiento para mostrar la retención de fluorescencia azul endógena dentro de los cuerpos lipídicos incluso en células fijadas con paraformaldehído.

1. Se cultivan células madre pluripotentes embrionarias/inducidas humanas en una capa alimentadora de fibroblastos embrionarios de ratón en medio estándar HuES (con aproximadamente 5 ng/ml de bFGF), en un plástico de cultivo tisular regular.

2. Se toman imágenes de las colonias antes de la adición de paraformaldehído (PFA) al 4% para autofluorescencia azul utilizando un microscopio de fluorescencia estándar (especificaciones mencionadas anteriormente).

3. Se agrega PFA al 4% a estas colonias y se obtienen imágenes para la autofluorescencia azul después de la fijación. Se observa autofluorescencia azul antes y después de la fijación del 4% de PFA (Figura 3).

Ejemplo 12: inmunofluorescencia con anticuerpo OCT-4

Las colonias de células madre pluripotentes humanas (HPSC) a menudo muestran signos de diferenciación, que son llamativamente aparentes como una morfología alterada, notada principalmente en la periferia y ocasionalmente en su centro. Los marcadores de pluripotencia como Oct-4, Sox2, Nanog se utilizan rutinariamente para determinar el estado de diferenciación de las HPSC, pero requieren que las células se fijen e inmunotiefen o se diseñen para informar su expresión.

Oct-4, Sox2, Nanog son marcadores bien establecidos y controladores de la pluripotencia. Los niveles de fluorescencia endógena azul se correlacionan con la expresión Oct-4, Sox2 y Nanog y el ejemplo actual describe un procedimiento para determinar los niveles de las proteínas Oct-4, Sox2 y Nanog en células madre pluripotentes por inmunofluorescencia, sin tener que modificar genéticamente las células, para mostrar la correlación positiva con los niveles de fluorescencia azul.

1. Las células madre pluripotentes embrionarias/inducidas humanas se cultivan en una capa alimentadora de fibroblastos embrionarios de ratón en medio estándar HuES con aproximadamente 5 ng/ml de factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF), en un plástico de cultivo tisular regular.

2. Las colonias de células madre pluripotentes humanas se colocan en placas sobre cubreobjetos en los MEF para permitir imágenes de gran aumento (60X). Antes de la tinción, estas células se lavan tres veces con aproximadamente HBSS 1X con Ca^{2+} y Mg^{2+} .

3. Se agrega aproximadamente 4% de paraformaldehído (PFA) a las colonias y se mantiene a una temperatura que varía de aproximadamente 4°C a aproximadamente 28°C durante aproximadamente 20 minutos para fijar las células.

4. La PFA se elimina y las colonias se lavan con tampón de enjuague (HBSS con aproximadamente 0.1% de Tween-20) dos veces durante aproximadamente 10 minutos cada una.

5. Se agrega tampón de permeabilización (HBSS con aproximadamente 0.1% de Triton) durante aproximadamente 10 minutos.

6. Luego, las colonias se lavan con tampón de enjuague nuevamente, dos veces durante aproximadamente 10 minutos cada una.

7. El bloqueo se realiza con aproximadamente 4% de suero de cabra normal (NGS) durante aproximadamente 30 minutos.

8. El anticuerpo primario (anti ratón Oct 3/4 de Santa Cruz, Cat No. (C-10): sc-5279) a una dilución de 1 en 300, diluido en 1 x HBSS y las colonias se mantienen a aproximadamente 4 grados durante la noche.

9. Después de una noche (alrededor de 12 a 16 horas) de incubación, las colonias se lavan con tampón de enjuague tres veces, aproximadamente 10 minutos cada una.

10. Se añade anticuerpo secundario (tinte Alexa Fluor 488 de cabra anti-ratón de Invitrogen) a una dilución de 1 en 500 (diluida en 1X HBSS) durante aproximadamente una hora.

11. Después de una hora, el anticuerpo secundario se lava con tampón de enjuague (tres veces, 10 minutos cada vez).

12. Las colonias tienen una imagen para autofluorescencia azul y el Oct-4, tinción Sox2 o Nanog utilizando el microscopio invertido Nikon TE Eclipse (10 aumentos y 60 aumentos).

13. Las imágenes resultantes se analizan utilizando el software ImageJ y se comparan los valores de fluorescencia en áreas 30 discretas.

Se observa que las colonias de células madre pluripotentes que se diferencian espontáneamente, no muestran autofluorescencia azul y las células en estas áreas no expresan o tienen niveles muy bajos de Oct-4, Sox2 y Nanog en sus núcleos (Figura 3).

El examen de cultivos de HPSC muestra que las células que tienen tinción positiva para marcadores de pluripotencia también expresan fluorescencia azul a niveles similares (Fig. 3). En áreas dentro de las colonias, donde las células se ven diferenciadas, los cuerpos lipídicos fluorescentes habían desaparecido o habían disminuido con una correspondiente ausencia/disminución en los niveles de fluorescencia de los niveles de OCT4, SOX2 y NANOG. Los valores medios de intensidad de fluorescencia de las células que expresan fluorescencia azul y marcadores de pluripotencia dan como resultado un ajuste lineal ajustado: OCT4 (R^2 (coeficiente de correlación) = 0,9) SOX2 (R^2 = 0.9) y NANOG (R^2 = 0.83) (Fig. 3b). Se demuestra adicionalmente por análisis FACS que las células con fluorescencia azul siempre coexpresan los antígenos SSEA-4 y TRA-1-60 (marcadores de pluripotencia superficial) (Fig. 3). Estos resultados sugieren que en HPSC los marcadores de fluorescencia azul y pluripotencia están estrechamente correlacionados y, por lo tanto, los cuerpos lipídicos fluorescentes azules sirven como marcador interno de la pluripotencia.

Ejemplo 13: Protocolo de tinción roja de aceite

El presente ejemplo proporciona un procedimiento para realizar tinción con aceite rojo para confirmar que los cuerpos que emiten auto fluorescencia azul son en realidad cuerpos lipídicos.

1. Las células madre pluripotentes embrionarias/inducidas humanas se cultivan en una capa alimentadora de Fibroblastos Embrionarios de Ratón (MEF) en medio HuES estándar con aproximadamente 5 ng/ml de factor de crecimiento de fibroblastos básico (FCFb), en un plástico de cultivo tisular regular.

2. Las colonias de células madre pluripotentes humanas se colocan en placas sobre cubreobjetos en MEF para permitir imágenes tanto de gran aumento (60X) como de bajo aumento (4X). Antes de la tinción, estas células se lavan con aproximadamente PBS 1X.

3. Se agrega aproximadamente 1 ml de aproximadamente 10% de formalina y las células se incuban durante aproximadamente 30 a 60 minutos a un intervalo de temperatura de 4°C - 37°C.

4. La solución madre Oil Red O se prepara disolviendo aproximadamente 300 mg de Oil Red O (Catálogo n° 25 09755, de Sigma) en aproximadamente 100 ml de isopropanol al 99% aproximadamente. Esta solución madre se almacena a una temperatura que oscila entre aproximadamente 21°C y aproximadamente 28°C.

5. Para fabricar el material de trabajo, 3 partes de la solución madre de Oil Red O se mezclan con 2 partes de agua destilada y se dejan sentar a una temperatura que oscila entre aproximadamente 21°C y aproximadamente 28°C. por unos 10 minutos. (Esta reserva de trabajo solo es estable durante 2 horas).

6. La solución de trabajo se filtra a través de un papel de filtro Whatman antes de su uso.

7. La formalina se elimina después y las colonias se enjuagan con aproximadamente 2 ml de agua estéril.

8. Se agrega aproximadamente 1 ml de aproximadamente 60% de isopropanol a cada placa y se mantiene durante aproximadamente 5 minutos.
- 5 9. Se elimina el isopropanol y se agrega lentamente la solución de reserva de trabajo Oil Red O filtrada y la placa se mantiene en el agitador durante aproximadamente 5 minutos.
10. Las colonias se lavan con agua tres veces antes de la obtención de imágenes.
- 10 Las imágenes se hacen bajo un campo brillante o fluorescencia. (Excitación - 530-560 nm, Dichroic 570 Long Pass, Emisión: 590-650nm). Para tefir con BODIPY® 493/503 (Invitrogen, EE. UU.) (Cat. No. D-3922) una reserva del colorante a 1 mg/ml en metanol se diluye a 1 mg/ml en medio de cultivo y las células se incuban durante 15 minutos y se lavan tres veces con PBS 1X y luego se obtienen imágenes (Excitación - 500 nm/20, Dicroico 535nm/30, Emisión 515 Pase largo).
- 15 Se observa que los cuerpos citoplásmicos fluorescentes en las células madre pluripotentes humanas no se localizan con marcadores ER, Golgi o mitocondriales, pero se tiñen con rojo aceite, que los identifica como cuerpos lipídicos (Figura 2).
- 20 La figura 2 muestra la fluorescencia azul endógena en células madre pluripotentes humanas que está puntuada y localizada en cuerpos lipídicos. (a) Cultivos de HPSC (HuES7, NFF_iPSC, ADF_iPSC y LCL iPSC) muestran numerosos cuerpos lipídicos (tinción con Oil Red O positivo), (b) Los cuerpos lipídicos positivos de Oil Red O en fibroblastos neonatales humanos (NFF) y embrionarios de ratón (MEF) no muestran fluorescencia azul y no son tan prominentes como en los HPSC. (c) Las células madre mesenquimales (MSC) derivadas de la médula ósea humana y la placenta no muestran fluorescencia azul, (d) La fluorescencia azul es significativamente más alta en los cultivos de HPSC en comparación con las células somáticas. Las intensidades medias de fluorescencia están en unidades arbitrarias (n=3, colonias múltiples de tres cultivos independientes para cada tipo de célula), (e) las neuronas derivadas de HuES7 no muestran fluorescencia azul, (f) los cuerpos lipídicos fluorescentes azules presentes en HuES7 no se colocan con el retículo endoplasmático, (ER - panel superior), aparato de Golgi (panel central) o peroxisomas (panel inferior).
- 25
- 30

Ejemplo 14: fluorescencia azul en ésteres de retinilo secuenciados en cuerpos lipídicos citoplásmicos

- 35 Para determinar la fuente de la fluorescencia azul, los cuerpos lipídicos se aíslan por primera vez a partir de células madre embrionarias humanas mediante centrifugación diferencial en gradiente de sacarosa.

Aislamiento y caracterización de cuerpos lipídicos de células madre HuES7

- 40 Los cuerpos lipídicos se aíslan utilizando un procedimiento de ultracentrifugación en gradiente de densidad como se detalla a continuación, las colonias 300 se raspan y se vuelven a suspender en 2 ml de solución de sacarosa 2M en tampón Tris-1mM EDTA pH 7.4. La suspensión celular se agita en vórtice cuatro veces durante 30 segundos cada una con incubaciones de 2 minutos en hielo entre cada vórtice. La suspensión de células se pasa cuatro veces a través de una aguja de 26G. 2 ml de sacarosa 0.27 M y 0.135 M en tampón Tris-EDTA se colocan en capas secuencialmente sobre la suspensión de células en tubos de ultracentrifuga transparentes (Beckman (EE. UU.), Parte No. 344060) y se
- 45 centrifugan a 1,50,000xg en un rotor Beckman SW 40 Ti para 1 hora y permite desacelerar sin frenar. La capa superior que contiene los cuerpos lipídicos se recoge y almacena a -20°C hasta su uso.

- 50 Los cuerpos lipídicos aislados permanecen fluorescentes (Figura 10) y la fluorescencia se divide en la fase orgánica en la extracción con cloroformo: metanol (3:1). Esto indica que el fluoróforo presente en los cuerpos lipídicos es hidrófobo y es poco probable que sea una molécula cargada. Se encontró que el extracto de cloroformo:metanol tiene características de absorbancia y fluorescencia, es decir, perfiles de excitación y emisión muy similares a la vitamina A (retinol o ésteres de retinilo tales como retinilpalmitato o retiniloleato). Los espectros de fluorescencia del cloroformo: extracto de metanol y retinilpalmitato son idénticos (Figura 10). Los componentes del extracto de cloroformo: metanol se resuelven a continuación mediante HPLC de fase inversa y se comparan con los estándares de compuestos retinoides
- 55 (retinilpalmitato, retinol y acetato de retinilo).

HPLC de fase inversa e identificación de éster de Retinilo

- 60 Los cuerpos lipídicos aislados se extraen con una cantidad igual de 1:1 (mezcla de cloroformo: metanol) agitando en vórtice a temperatura ambiente durante 1 minuto seguido de centrifugación instantánea. La fase orgánica más pesada se recoge y se seca en una consola CentriVap (Labconco, EE. UU.). El extracto seco de CHCl₃: MeOH se disuelve en 50 µl de acetonitrilo y se separa en una columna de HPLC de fase inversa C-18 (columna Zorbax -C-18, tecnologías Agilent). La temperatura del horno se mantiene a 40°C. La fase solvente/móvil es 1:1:1:1 (etanol: metanol: acetonitrilo: isopropanol). Los estándares utilizados son Palmitato de Retinilo (Cat. No. R3375), acetato de retinilo (Cat. No. R7882)
- 65 y Retinol (Cat. No. R7632) de Sigma-Aldrich, EE.UU. Se utilizan 800 ng de palmitato de retinilo y 200 ng cada uno de acetato de retinilo y retinol por inyección.

El tiempo de retención del pico primario/principal del cloroformo: extracto de metanol coincide con el del estándar de palmitato de retinilo a los 18.65 minutos y es sustancialmente diferente de retinol y acetato de retinilo (6.65 y 7.33 minutos respectivamente) (Figura 10). Esto indica que la fluorescencia que emana de los cuerpos lipídicos proviene en gran medida de ésteres de retinilo tales como palmitato de retinilo o un retinoide muy similar a este, tal como oleato de retinilo. Una razón plausible para el secuestro de vitamina A por cuerpos lipídicos en HPSC puede ser para el almacenamiento y posterior uso como ácido retinoico para la diferenciación. El almacenamiento de retinoides como ésteres en cuerpos lipídicos evitará la oxidación y la conversión a ácido retinoico, una poderosa señal de diferenciación para las células madre pluripotentes.

Ejemplo 15: aumento de la fluorescencia azul con la adición de retinol o éster de retinilo a medios de cultivo

Las células animales no pueden sintetizar la vitamina A, pero la adquieren a partir de los carotenoides presentes en las plantas y a través de la cadena alimentaria. Para las células en cultivo, la vitamina A está disponible a partir del suero en los medios en gran parte como retinol. El retinol es captado por las células y convertido a los ésteres de retinilo como el palmitato y el oleato, o se oxida a la retina y al ácido retinoico. La presencia de retinol se examina en un medio HuES típico que contiene un reemplazo de suero modificado (KOSR) o suero certificado de células ES. Los medios y las muestras de suero se extraen con cloroformo: metanol y se resuelven mediante HPLC de fase inversa. KOSR y los extractos de suero son fluorescentes y contienen retinol con tiempos de retención que coinciden con el estándar de retinol a los 6.65 minutos.

Para determinar si HPSC puede tomar ésteres de retinilo directamente del medio y para probar que la fluorescencia azul se correlaciona directamente con los niveles de éster de retinilo, las células se cultivan en células alimentadoras MEF en medios típicos que contienen KOSR al 20% y suplementado con palmitato de retinilo en diversas concentraciones (2- 10 μ M). Después de 24 horas, se observa un aumento saturable dependiente de la dosis en la intensidad de fluorescencia azul media en los cuerpos lipídicos (Figura 10). El aumento en las intensidades de fluorescencia también se limita a los cuerpos lipídicos. Se observa que las células madre embrionarias de ratón prácticamente no muestran aumento en la fluorescencia asociada a los retinoides incluso después de 48 horas en los medios con retinol (Figura 9). Esto demuestra que la suplementación de los medios de cultivo con retinol o palmitato de retinilo provoca un aumento dependiente de la dosis en la fluorescencia azul en las HPSC que emanan de los cuerpos lipídicos, lo que indica captación de retinoides del medio de cultivo y su secuestro dentro de los cuerpos lipídicos.

Ejemplo 16: Secuestro de vitamina A suministrada exógenamente en cuerpos lipídicos únicos a células madre pluripotentes en el estado "cebado" o "tipo epiblastos"

Los HPSC rutinariamente cultivados en medios típicos (DMEM modificado, KOSR al 20% con bFGF) tienen cuerpos de lípidos fluorescentes azules. Dado que tanto las células madre pluripotentes humanas como las de ratón se cultivan rutinariamente en medios que contienen vitamina A (retinol), la presencia de cuerpos lipídicos fluorescentes en HPSC "cebadas" pero no en células madre embrionarias de ratón "diferenciadas" sugiere que las células "diferenciadas" no absorben el retinol, pero las células "cebadas" sí lo hacen. Esto también es fuertemente sugerido por la aparición de cuerpos lipídicos que son fluorescentes en células madre de tipo epiblastos de ratón y la disminución de cuerpos lipídicos fluorescentes en células pluripotentes humanas "diferenciadas".

Además de esto, se examinaron cultivos de células HuES en medios Essential 8 (E8) (Invitrogen, EE. UU.), Un medio libre de suero químicamente definido disponible recientemente para cultivos de HPSC que no contienen vitamina A. Las células HuES cultivadas en los medios E8 muestran una disminución rápida en los cuerpos lipídicos junto con fluorescencia asociada en 24 horas, y los cuerpos lipídicos están completamente ausentes en 72 horas (Figura 10). Posteriormente, la adición de retinol (10 μ M) a estos cultivos da como resultado la reaparición de cuerpos lipídicos fluorescentes (Figura 10). Junto con los resultados previamente descritos, esto sugiere que las células madre pluripotentes "cebadas" pueden captar retinoides, y que el retinol puede inducir cuerpos lipídicos que secuestran ésteres de retinilo. Una posible razón podría ser la expresión diferencial de las proteínas implicadas en la captación y el metabolismo de retinoides entre los dos estados/tipos de células.

La Tabla 1 muestra la expresión diferencial de proteína implicada en la captación y metabolismo de retinoides entre células madre embrionarias humanas y células madre embrionarias de ratón.

SÍMBOLO	NOMBRE GÉNICO	HuES7 (U133A; <i>Enver et al., 2005</i>)	mES (GSM87830_MoE S.C5)
		http://amazonia.transcriptome.eu/	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/
CRABP1	proteína 1 de unión de ácido retinoico celular	819.6	378

CRABP2	proteína 2 de unión de ácido retinoico celular	1506.1	0
RARA	Receptor de ácido retinoico, alfa	87	86
RARG	Receptor de ácido retinoico, gamma	152.6	131
RARRE S2	Respondedor de ácido retinoico (tazarotenoinducido) 2	632.2	0
RBP1	Proteína 1 de unión de retinol, celular	315.3	5
RBP7	Proteína 7 de unión de retinol, celular	55.7*	94
RETSAT	Saturasa retinol (toda la - transretinol 13,14-reductasa)	184.5	0
RXRA	Receptor X retinoide, alfa	323	66
STRAG	Todo transretinol 13,14-reductasa)	251.3	0
RALDH	Deshidrogenasa retinal	13.5	2
SOCS3	Supresor de señalización 3 de citoquina	65	95
LRAT	Acetiltransferasa de retinol de lecitina	20.8	0

Por lo tanto, estos cuerpos lipídicos que secuestran retinoides marcan el estado “epiblasto” in vivo e in vitro y pueden servir como un marcador útil para distinguir entre células madre pluripotentes “cebadas” e “indiferenciado”. En otras palabras, los cuerpos lipídicos que contienen éster de retinilo sirven como marcador para células madre pluripotentes “cebadas” o “tipo epiblasto”.

Ventajas y aplicaciones:

La presente divulgación describe un procedimiento que se presta fácilmente a la propagación de alto rendimiento de células madre pluripotentes humanas que emplean FACS que implica obtener células individuales, clasificar y propagar las células individuales. El presente procedimiento también demuestra la clasificación y propagación de células pluripotentes humanas únicas.

- La variabilidad que a menudo se asocia con el etiquetado de anticuerpos también se evita.

- Los niveles de la autofluorescencia endógena se cuantifican fácilmente.

- Al ser un marcador endógeno robusto, proporciona una plataforma muy estable y cuantificable.

- El presente procedimiento se utiliza para identificar y aislar células madre pluripotentes humanas de sus contrapartes diferenciadas de manera rápida y eficiente sin modificar las células de ninguna manera, ya que utiliza fluorescencia endógena. Por lo tanto, no requiere etiquetado externo.

- Se utiliza igualmente para cultivos de pequeña escala y de gran escala. Se presta para obtener poblaciones celulares homogéneas.

- Dado que la fluorescencia aparece muy temprano en el proceso de reprogramación (día 10 en caso de reprogramación de células linfoblastoides humanas y día 7 en caso de células de fibroblastos neonatales humanos) y también se retiene una vez que se forman las colonias iPS, se puede utilizar para rastrear la eficiencia de conversión por ejemplo se utiliza para controlar/cuantificar/o evaluar la eficacia de la conversión de diversos tipos de células somáticas hacia la

pluripotencia en diferentes condiciones experimentales. Por ejemplo, sirve en ensayos de alto rendimiento para identificar/definir condiciones de reprogramación tales como los constituyentes de los medios o analizar los procesos bioquímicos involucrados.

- 5 • También se utiliza para eliminar las células madre pluripotentes que forman teratomas pluripotentes, es decir, células madre pluripotentes de las células diferenciadas/de diferenciación antes del trasplante.
- Se presta a ensayos de alto rendimiento para monitorear la diferenciación/pérdida de pluripotencia y analizar los procesos bioquímicos involucrados.
- 10 • Se utiliza para aislar células pluripotentes de ratón que son células pluripotentes tipo epiblasto y también se utiliza para obtener células pluripotentes humanas que son más “indiferenciadas” como las células ES de ratón.
- 15 • Para aislar y propagar las células madre del epiblasto del ratón y el estado más “indiferenciado” de las células ES humanas e iPS.
- Ordenar las células con niveles más altos de fluorescencia azul y propagarlas repetidamente, particularmente las células iPS humanas. Esto da como resultado células iPS que están más cerca en el fenotipo de las células ES humanas y poseen un patrón de expresión génica asociado a pluripotencia más uniforme más allá de sus antepasados somáticos.
- 20 • Además, si durante el proceso de rediferenciación, las células azules se aíslan muy temprano durante la reprogramación, el tiempo de reprogramación puede acortarse y, por lo tanto, se reducen el trabajo y los gastos involucrados.
- 25 • El procedimiento de identificación está acoplado al FACS de doble fotón/multifotón u otra tecnología que no utiliza luz de longitud de onda ultravioleta o UV para la identificación y aislamiento de células madre pluripotentes.

REIVINDICACIONES

1. Un método para identificar una célula madre pluripotente en un cultivo y opcionalmente aislar la célula madre pluripotente del cultivo, comprendiendo dicho método los actos de:
5 a) someter el cultivo a excitación a una longitud de onda que varía de aproximadamente 275 nm a aproximadamente 410 nm para obtener la emisión de fluorescencia azul endógena del cuerpo lipídico presente dentro de la célula madre pluripotente; y
10 (b) medir la intensidad de la emisión para identificar las células madre pluripotentes en el cultivo;
c) opcionalmente clasificar el cultivo para aislar la célula madre pluripotente del cultivo.
2. El método como se reivindica en la reivindicación 1, en el que el cultivo comprende células seleccionadas de un grupo que comprende células madre no diferenciadas, células madre de diferenciación, células madre diferenciadas, células que tienen o se sospecha que tienen células madre pluripotentes y combinación de las mismas.
15
3. El método como se reivindica en la reivindicación 1, en el que la excitación es de una fuente única de fotones o múltiples fuentes de fotones.
20
4. El método como se reivindica en la reivindicación 1, en el que la intensidad de la emisión de fluorescencia azul endógena está en una longitud de onda que varía de aproximadamente 410 nm a aproximadamente 550 nm.
5. El método como se reivindica en la reivindicación 4, en el que la emisión de fluorescencia azul endógena se detecta utilizando una técnica seleccionada de un grupo que consiste en microscopía de fluorescencia, microscopía de epifluorescencia, microscopía dual, microscopía multifotónica y combinación de las mismas.
25
6. El método como se reivindica en la reivindicación 1, en el que la célula madre pluripotente se selecciona de un grupo que comprende células madre embrionarias humanas (HuESC), células madre pluripotentes inducidas humanas (HiPSC), células madre pluripotentes de epiblastos de ratón (mEpiSC), células madre de mamífero, y combinación de las mismas.
30
7. El método como se reivindica en la reivindicación 6, en el que la célula madre pluripotente inducida humana (hiPSC) se selecciona de un grupo que comprende de células madre pluripotentes inducidas por linfoblastos humanos (LCL iPSC), células madre pluripotentes inducidas por fibroblastos de prepucio neonatal humano (NFF iPSC), células madre pluripotentes inducidas por fibroblastos dérmicos adultos (ADF iPSC) y combinación de las mismas.
35
8. El método como se reivindica en la reivindicación 1, en el que la clasificación se lleva a cabo por la técnica de Clasificación Celular Activada por Fluorescencia.
40
9. El método como se reivindica en la reivindicación 1, en el que la fluorescencia azul surge de retinoides dentro de los cuerpos lipídicos de células madre pluripotentes.
10. El método como se reivindica en la reivindicación 1, en el que dicho método se emplea para propagación de alto rendimiento de células madre pluripotentes humanas.
45

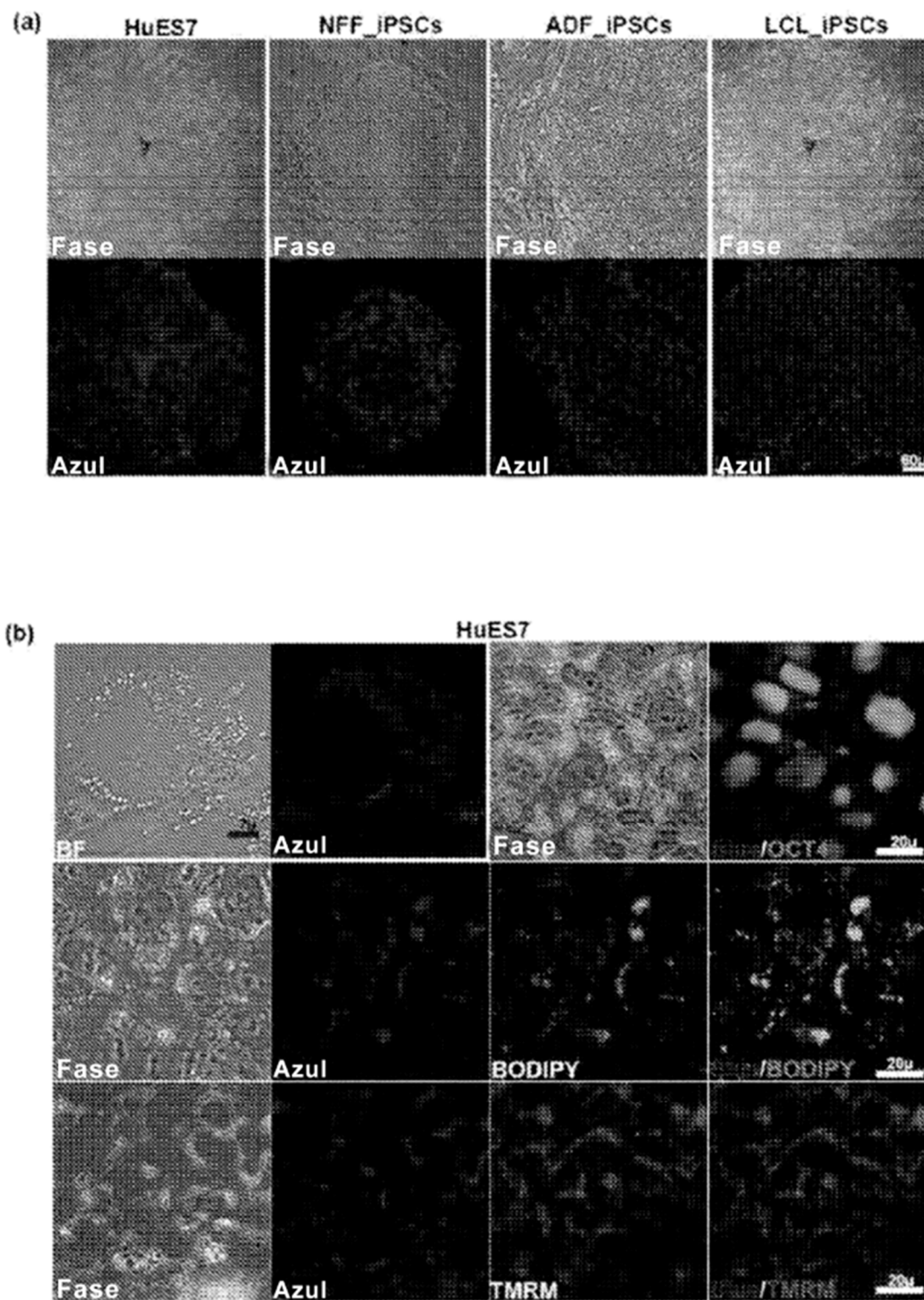


Figura 1

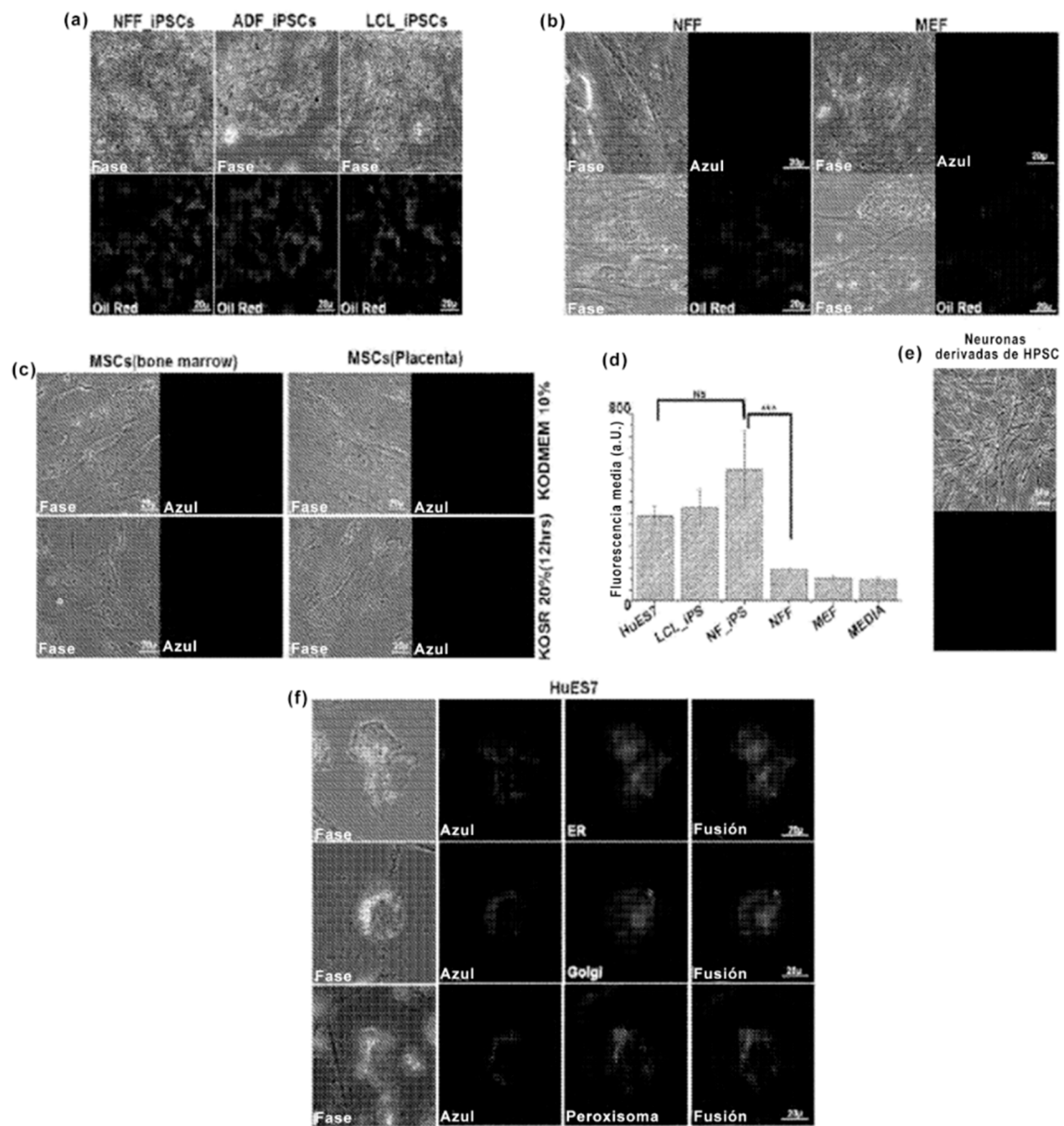


Figura 2

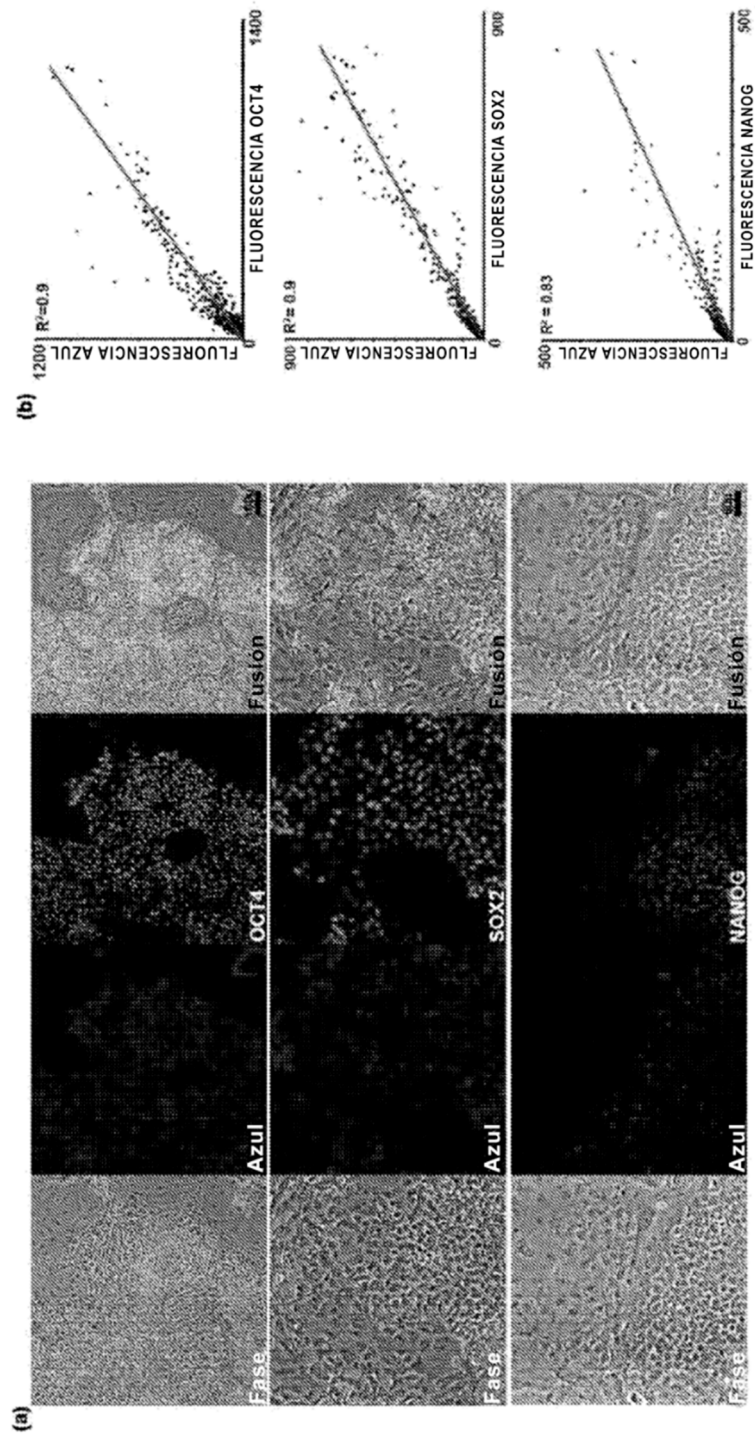
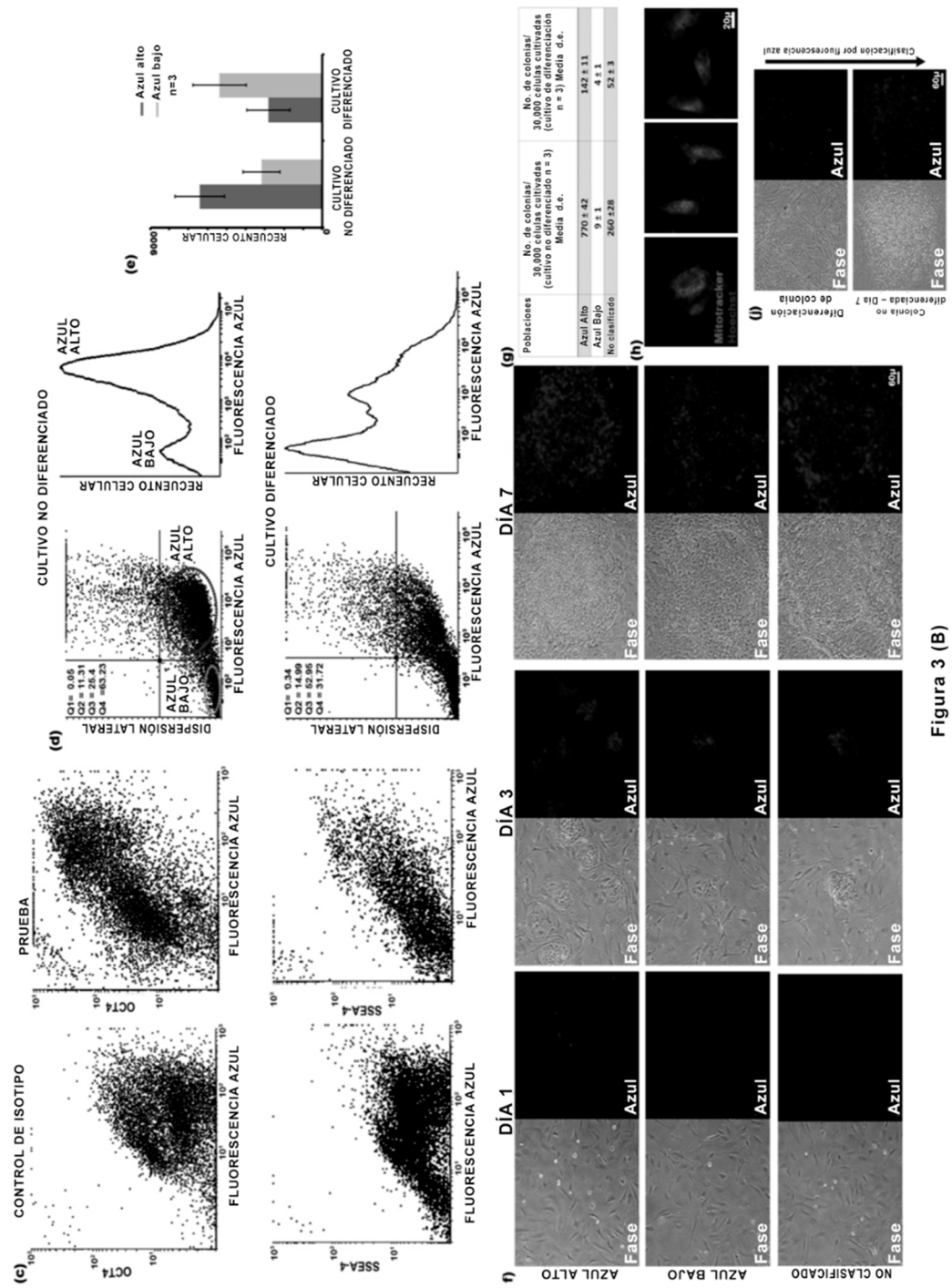


Figura 3 (A)



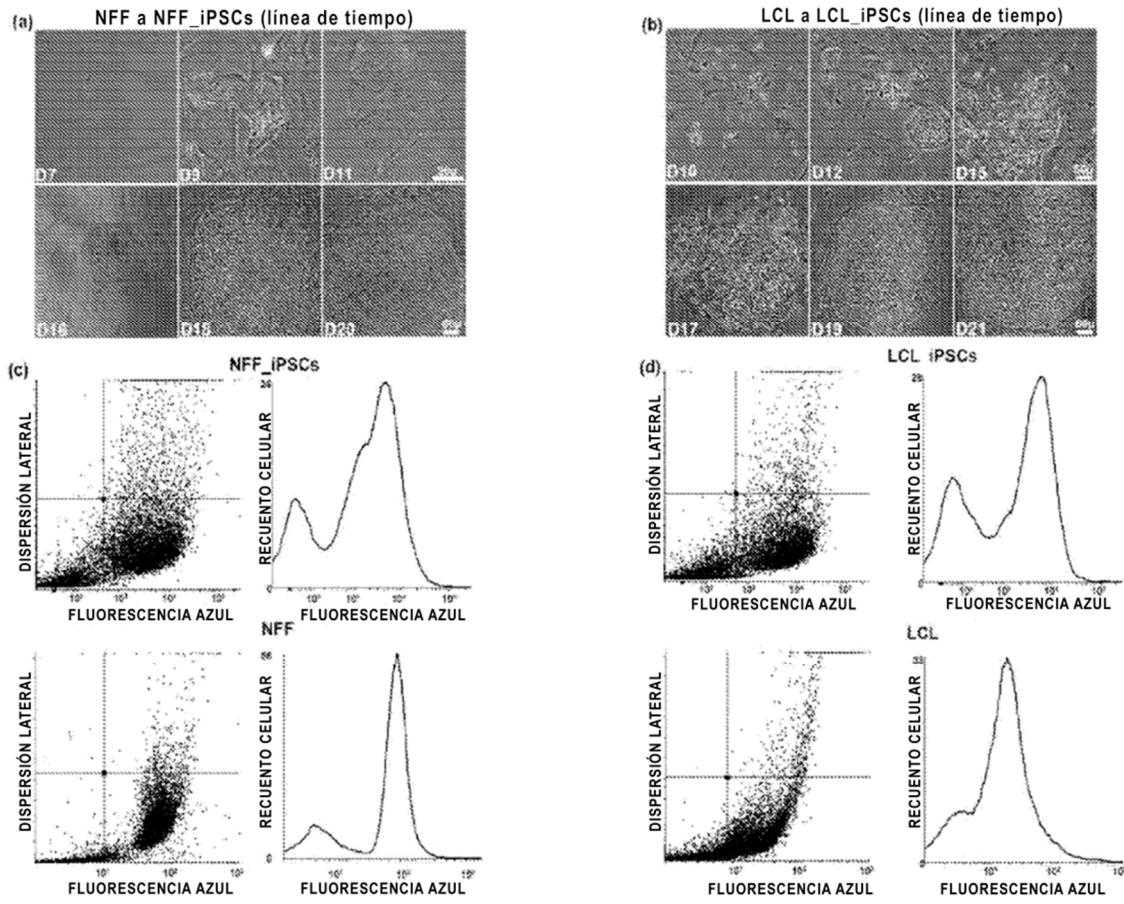


Figura 4

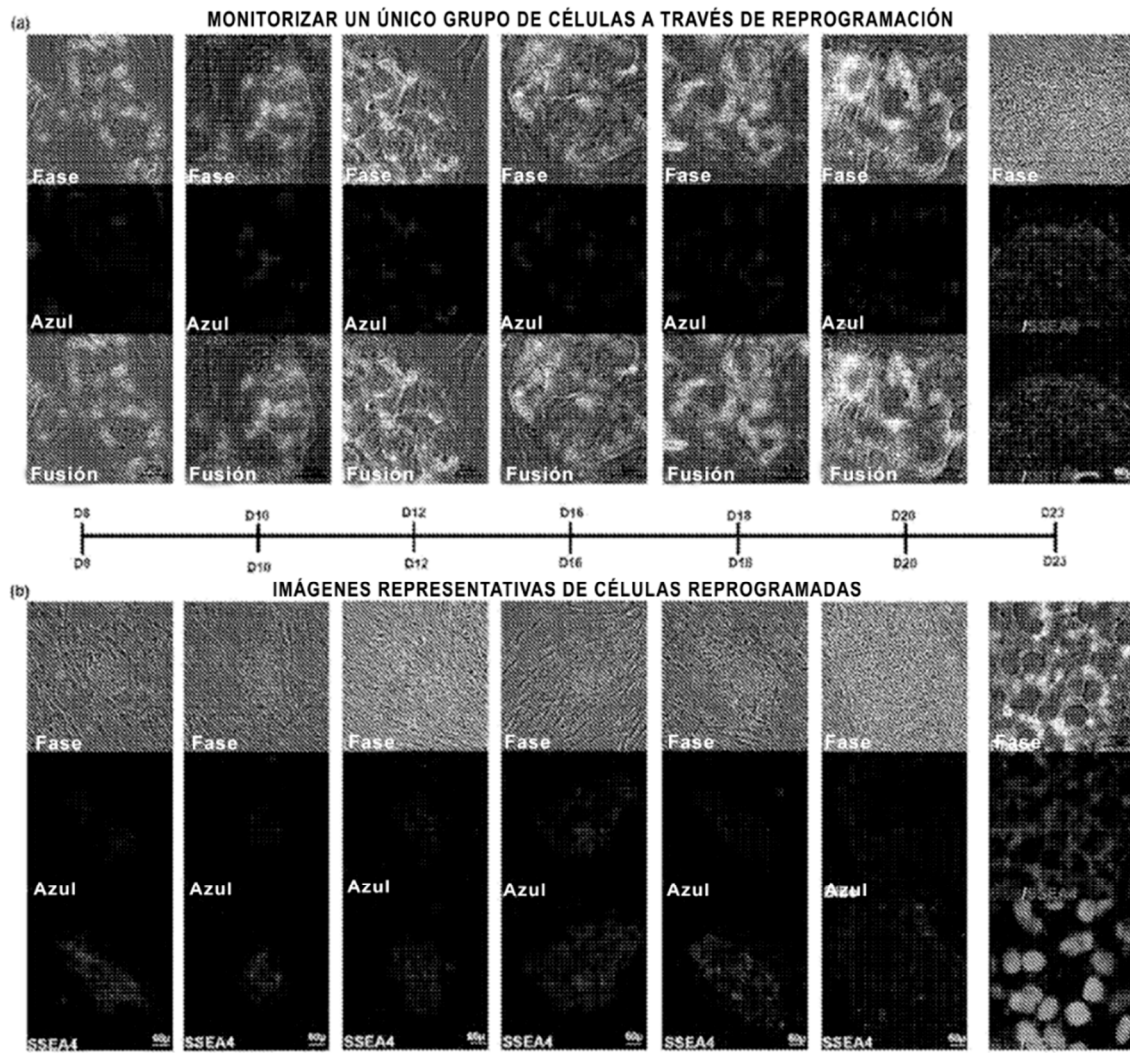


Figura 5

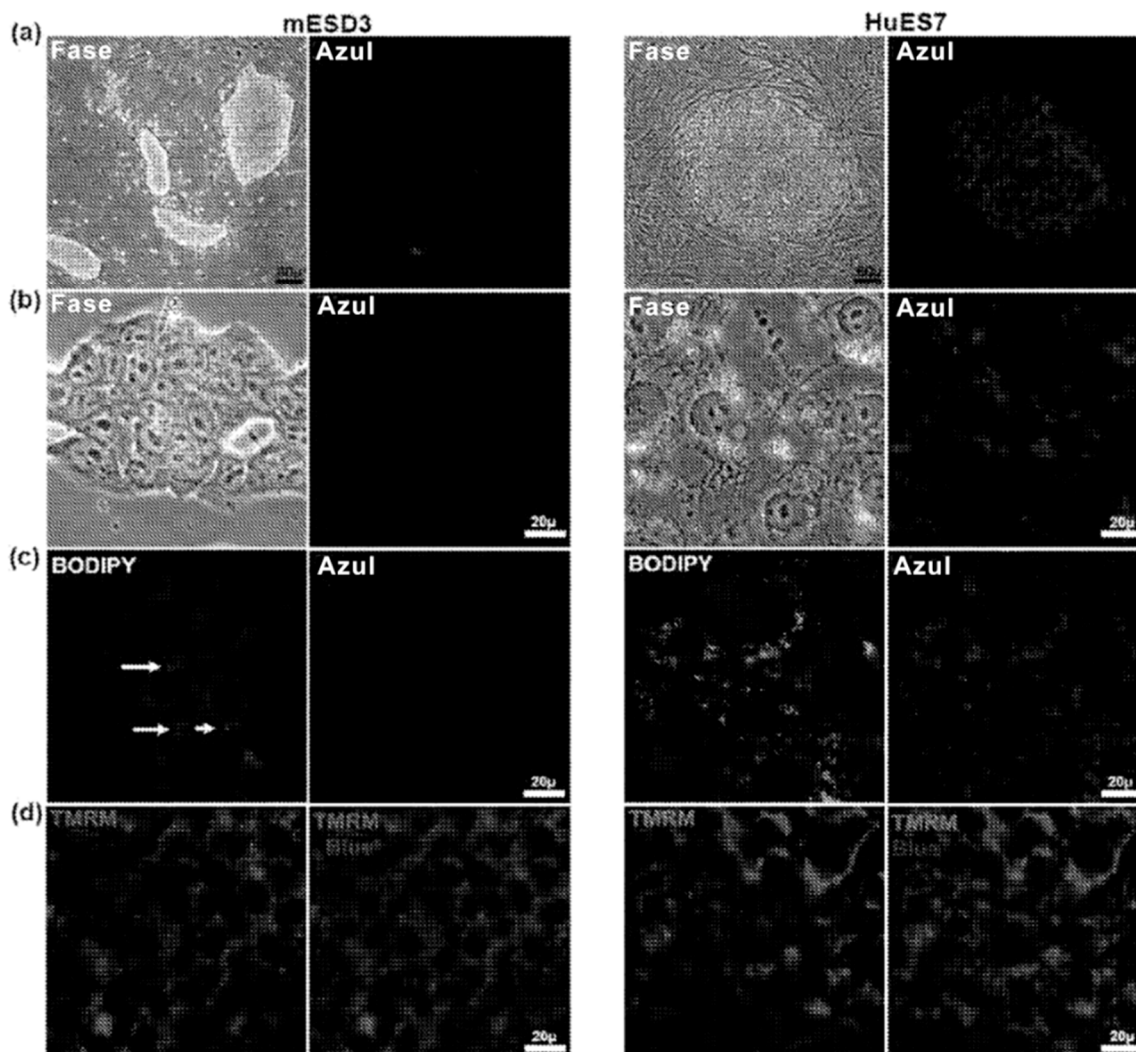


Figura 6 (A)

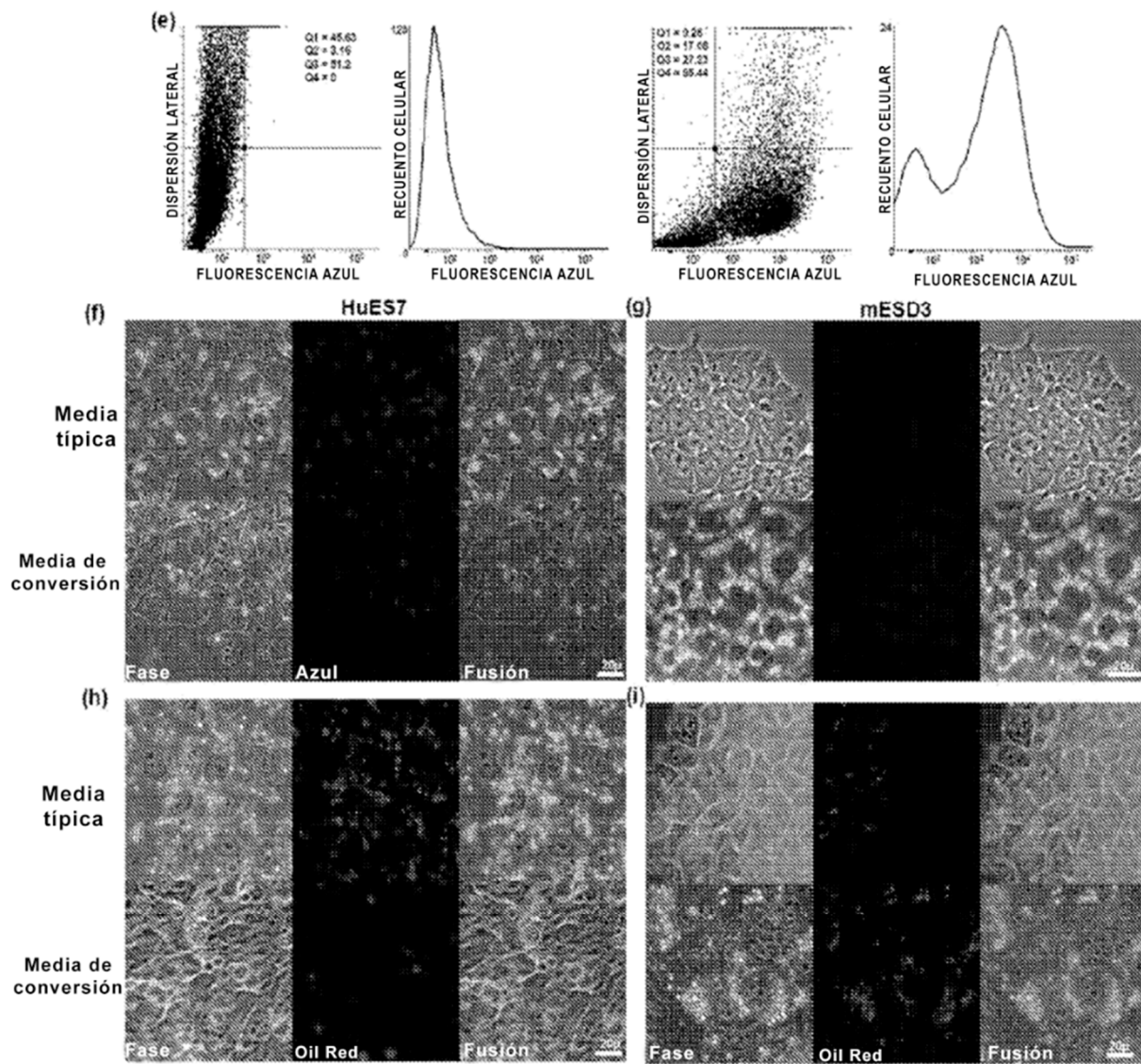


Figura 6 (B)

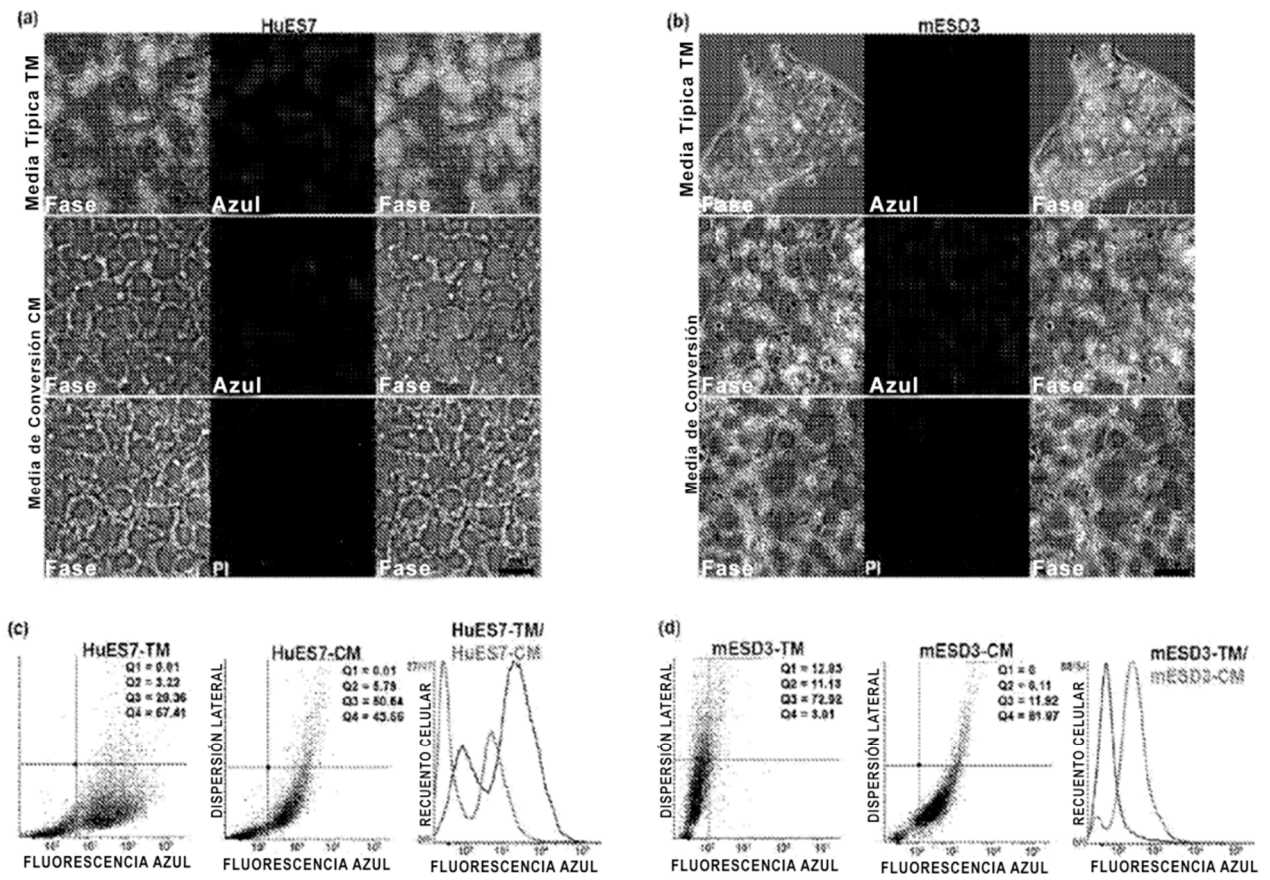
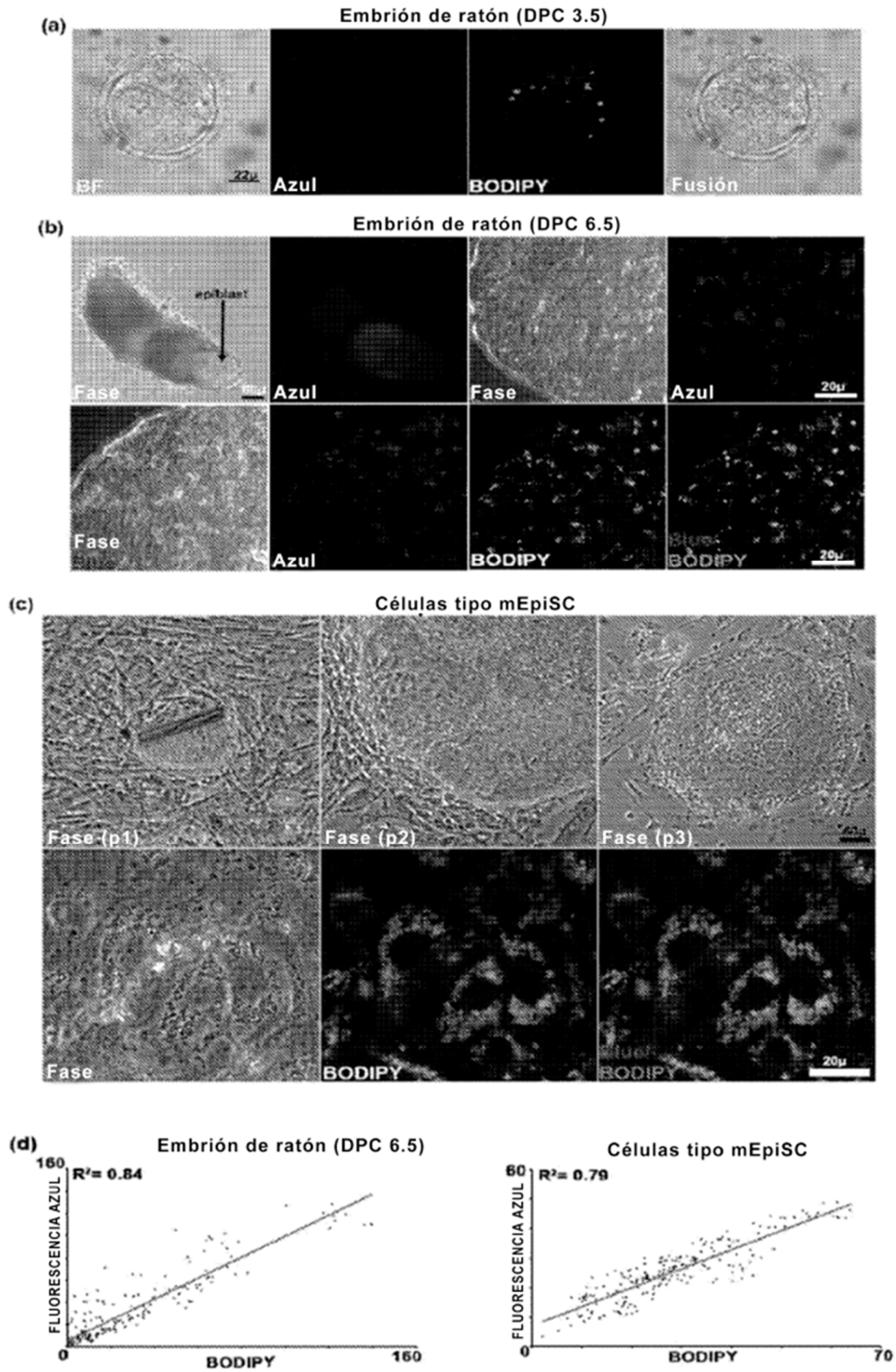


Figura 7



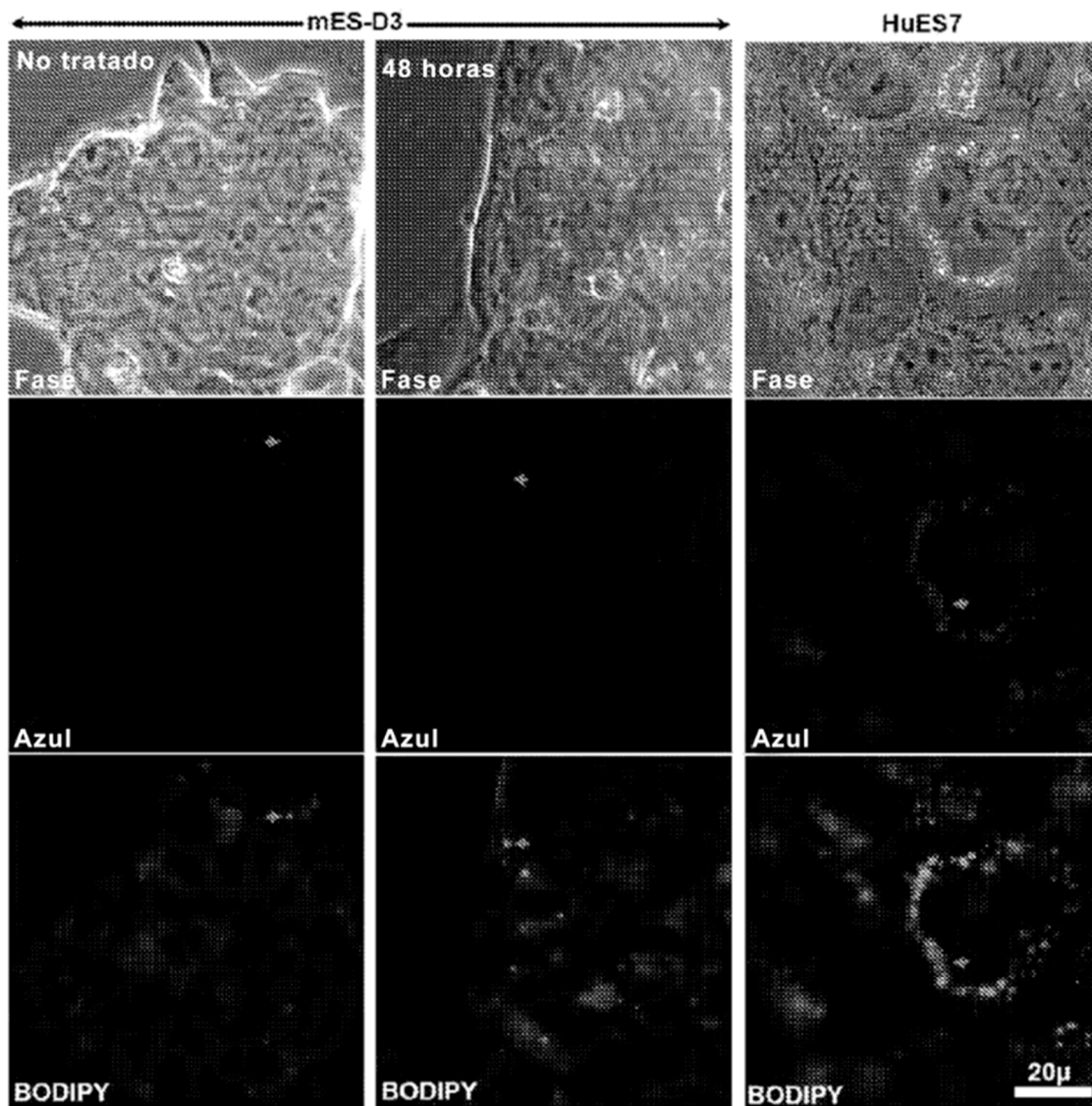


Figura 9

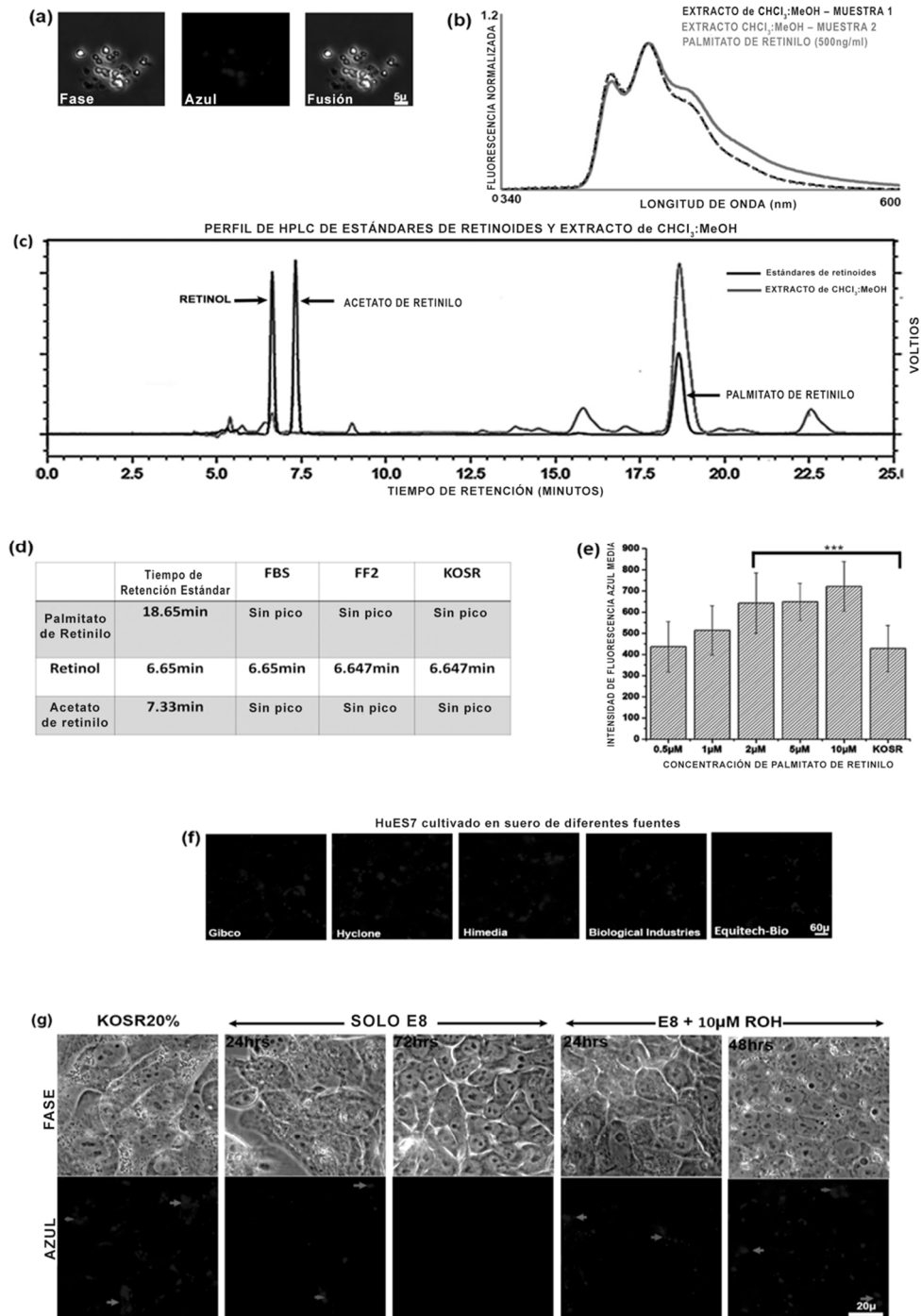


Figura 10