

MÉTODOS PARA CULTIVAR CÉLULAS, PREPARACIÓN DE UN HIDROLIZADO A PARTIR DE CÉLULAS Y SUS APLICACIONES

RESUMEN

Un método para generar un hidrolizado celular mediante un cultivo celular *in vitro* incluye las siguientes etapas: lisar una célula mediante el uso de sonicación para liberar proteínas en la célula; digerir las proteínas mediante el uso de proteasa para producir péptidos cortos que tengan un tamaño molecular inferior a 500 daltons (Da); finalizar la etapa de digestión mediante el calentamiento de la proteasa hasta una temperatura predeterminada durante un periodo de tiempo predeterminado o mediante la disolución de la proteasa hasta una concentración predeterminada, y llevar a cabo una filtración esterilizada de la mezcla obtenida en la etapa de finalización de la digestión a través de un filtro de membrana. El hidrolizado celular generado puede utilizarse en varios productos, incluyendo, entre otros, productos para el cuidado de la piel, el cuidado de las heridas, cosméticos, productos alimentarios, suplementos, fármacos y otras aplicaciones médicas.

CAMPO TÉCNICO

Las modalidades que se analizan en la presente divulgación se refieren generalmente a métodos para el cultivo de células y la preparación de un hidrolizado a partir de células. Las modalidades descritas en la presente divulgación también se refieren generalmente a las aplicaciones del hidrolizado a partir de células cultivadas.

ANTECEDENTES

La carne animal es rica en proteínas, y suministra todos los aminoácidos necesarios para producir la proteína utilizada con el fin de ayudar a las funciones del cuerpo. La carne para el consumo se obtiene tradicionalmente de animales o peces que se crían en granjas. Sin embargo, la agricultura y la acuicultura para la producción de carne animal requieren una gran cantidad de energía y recursos, y tienen una alta huella de carbono. La carne producida por la agricultura o la acuicultura puede representar un riesgo para la salud pública, ya que los procesos de producción pueden exponer la carne a enfermedades, contaminantes y toxinas. Una serie de preocupaciones, como el crecimiento de la población, el aumento de la demanda de carne, las preocupaciones ambientales, la escasez de tierras y recursos hídricos, la pérdida de biodiversidad y la percepción negativa asociada con el sacrificio de animales, han llevado a los científicos a desarrollar técnicas para producir carne mediante procesos alternativos.

La producción de carne *in vitro* es el proceso mediante el cual el tejido muscular o el tejido orgánico de los animales se cultiva en laboratorios utilizando técnicas de cultivo celular para obtener carne y productos cárnicos. Como se utiliza en el presente documento, el término “carne y productos cárnicos *in vitro*” incluye productos de proteína animal, así como productos no cárnicos que incluyen formas solubles y formas

sólidas. Si bien todavía se encuentran en una etapa temprana de desarrollo, la carne y los productos cárnicos *in vitro* pueden ofrecer una serie de ventajas sobre los productos cárnicos tradicionales, por ejemplo, ventajas para la salud y el medio ambiente, así como beneficios para el bienestar animal. Es una tecnología emergente de próxima generación que funciona como parte de un campo más amplio de la agricultura celular o de la producción de productos agrícolas a partir de cultivos celulares.

Las células para la producción de carne *in vitro* pueden ser células (por ejemplo, células musculares, células somáticas, células madre, etc.) extraídas de biopsias animales, que luego se pueden cultivar por separado en medios de cultivo en un biorreactor u otro tipo de entorno estéril. Las células pueden crecer en una forma semisólida o sólida que imita un órgano animal al unirse a un andamiaje tridimensional comestible que se coloca en el biorreactor. Las células iniciadoras pueden ser células primarias obtenidas directamente de los tejidos del animal o líneas celulares continuas. Si se cultivan en las condiciones adecuadas en medios de cultivo apropiados, las células primarias crecerán y proliferarán, pero solo un número finito de veces que está relacionado con la longitud del telómero al final del ADN de la célula. Las líneas celulares continuas, por otro lado, se pueden cultivar *in vitro* durante un período prolongado. La investigación en biología celular ha establecido procedimientos sobre cómo convertir las células primarias en líneas celulares inmortales continuas. Las células primarias se pueden transformar en líneas celulares continuas utilizando oncogenes virales, tratamientos químicos o sobreexpresión de la telomerasa transcriptasa inversa para evitar que los telómeros se acorten.

Los medios de cultivo pueden contener componentes necesarios para la proliferación celular, como aminoácidos, sales, vitaminas, factores de crecimiento y sistemas tamponantes para controlar el pH. Los métodos actuales agregan suero fetal bovino (FBS, por sus siglas en inglés) a los medios antes de su uso, ya que proporciona macromoléculas vitales, factores de crecimiento y moléculas inmunitarias. Sin embargo, el FBS se deriva de terneros no nacidos y, por lo tanto, es incompatible con el objetivo de estar libre de productos animales. El crecimiento de las células en un medio libre de componentes animales es un factor importante considerado por los científicos involucrados en la investigación de producción de carne *in vitro*. Algunos factores de crecimiento pueden derivarse de fuentes humanas.

La producción actual de carne *in vitro* abarca la mayoría de los tipos de carne básicos, como carne de res, de cerdo y de aves de corral a base de células. Sin embargo, estos tipos de carnes tienen una organización tisular compleja que involucra múltiples tipos celulares que son difíciles y costosos de producir utilizando las técnicas actuales de tecnología biomédica. También hay una falta de métodos no-GM para aumentar el nivel de proteína y el rendimiento de biomasa en la carne producida por técnicas de cultivo celular. Además, como se explicó anteriormente, las tecnologías de cultivo celular actuales pueden depender de componentes animales (por ejemplo, de FBS) como una fuente de nutrientes, así como factores de crecimiento costosos de grado no alimentario.

Además de utilizarse para el consumo humano, la carne se utiliza a menudo para producir materias primas derivadas de animales para el cuidado de la piel, cosméticos y productos para el cuidado de heridas. Por ejemplo, los productos para el cuidado de la piel, cosméticos y para el cuidado de heridas a menudo incorporan factores de crecimiento, citocinas y proteínas de la matriz extracelular (ECM, por sus siglas en inglés) que estimulan la reparación y regeneración del tejido cutáneo. Pueden incluir derivados del ácido hialurónico para hidratar la piel y disminuir las arrugas; antioxidantes para la protección contra el estrés oxidativo asociado al envejecimiento. Los ingredientes activos se derivan principalmente de animales y plantas silvestres. Sin embargo, la creación de materias primas derivadas de animales y plantas silvestres tiene los siguientes inconvenientes.

En primer lugar, requiere un suministro constante de fuentes animales y vegetales. El aumento de la demanda de productos animales provoca que más animales sufran y sean sacrificados en granjas y mataderos. El aumento en términos de criar ganado también puede suponer una carga adicional para el medio ambiente o el ecosistema. Además, también se pueden propiciar problemas de abuso y trato animal.

En segundo lugar, sólo se extraen las proteínas requeridas, y el resto de otras proteínas funcionales producidas por los animales o plantas silvestres se pierden. Por lo general, las materias primas derivadas se crean extrayendo ciertas proteínas requeridas/de interés a partir de animales o plantas silvestres. El resto de las otras proteínas o nutrientes no se recolecta en el proceso de extracción. Sin embargo, también puede resultar deseable incluir esas cantidades traza de las proteínas funcionales en las materias primas derivadas porque dichas proteínas funcionales podrían mejorar el resultado para un fin determinado. Por ejemplo, el valor nutricional total en las naranjas puede ser más benéfico para un ser humano para un determinado fin en comparación con únicamente la vitamina C extraída de la naranja. Además, criar animales o cultivar plantas únicamente para obtener algunas partes utilizables para generar materias primas derivadas es altamente ineficiente.

En tercer lugar, implica el uso de productos químicos nocivos. Por ejemplo, la extracción de colágeno de la piel de pescado implica una serie de pasos que incluyen las etapas de mezclar las pieles de pescado con soluciones alcalinas y ácidas. Esto supone una carga adicional para el medio ambiente o el ecosistema. Además, puede contribuir a posibles riesgos laborales. Las materias primas derivadas también pueden contener productos químicos residuales nocivos.

En cuarto lugar, existen preocupaciones en términos de seguridad debido a la presencia de contaminantes ambientales (metales pesados, antibióticos, microplásticos, herbicidas, fungicidas, insecticidas), agentes adventicios (bacterias, virus, hongos, agentes de encefalopatía espongiforme transmisible) y alérgenos en los animales y plantas silvestres.

En quinto lugar, existen dificultades para controlar el perfil molecular y determinar la consistencia de las materias primas de origen animal (por ejemplo, suero animal) y vegetal (por ejemplo, extractos vegetales e hidrolizados vegetales). Cada lote de materias primas derivadas de animales o vegetales se produce a partir de diferentes lotes de animales y plantas, que pueden diferir significativamente debido a las variaciones de temperatura, del tiempo de extracción, del tipo de pienso y de fertilizantes, de la presencia de plagas y parásitos, etc. Algunas moléculas en un determinado lote pueden desencadenar una reacción alérgica en algunos individuos.

En sexto lugar, si las materias primas de origen animal y vegetal se obtienen a partir de animales y plantas silvestres, es muy difícil rastrear su origen.

Alternativamente, se pueden crear materias primas derivadas mediante el uso de organismos recombinantes. Sin embargo, este método implica el uso de organismos modificados genéticamente, que podrían ser perjudiciales para el medio ambiente cuando dichos organismos se liberan accidentalmente. Además, solo se puede producir una (1) proteína por línea de producción. Este método resulta ineficiente para múltiples proteínas derivadas de materias primas. Además, la proteína producida por los organismos recombinantes debe aislarse y purificarse adicionalmente. El aislamiento y la purificación normalmente implican múltiples etapas que conducen a un aumento en el costo de producción. Asimismo, puede haber variaciones en el plegamiento de la proteína producida por este método. Algunas funciones pueden perderse en algunas variaciones.

De manera alternativa, el medio consumido también puede ser una fuente de proteínas funcionales. Sin embargo, al igual que los métodos anteriores, presenta varios inconvenientes. En primer lugar, requiere un suministro constante de fuentes animales y vegetales. Estas desventajas se expusieron anteriormente y, por lo tanto, no se repiten aquí. En segundo lugar, existen preocupaciones en términos de contaminación debido a la presencia de contaminantes ambientales (metales pesados, antibióticos, microplásticos, herbicidas, fungicidas, insecticidas), agentes adventicios (bacterias, virus, hongos, agentes de encefalopatía espongiforme transmisible) y alérgenos en las fuentes de animales y plantas silvestres. En tercer lugar, los metabolitos no deseados y los desechos en el medio consumido pueden afectar la pureza del producto final. Otras medidas adicionales de purificación producirían un aumento de los costos de producción.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

Las modalidades de la presente divulgación aplican métodos para la producción de carne *in vitro* para consumo humano que proporcionan una solución a los desafíos anteriores.

Un objetivo de la presente invención es proporcionar un método alternativo para obtener materias primas derivadas de animales y materias primas derivadas de plantas bajo un proceso controlado. Las materias primas derivadas de conformidad con la presente invención están libres de contaminantes

ambientales, agentes adventicios y alérgenos. También ayudan a limitar el sufrimiento animal y el sacrificio asociado con la producción de materias derivadas de animales.

El hidrolizado celular a menudo se extrae de las materias primas derivadas y se aplica como un ingrediente activo en el cuidado de la piel, el cuidado de heridas, cosméticos o productos alimenticios. El hidrolizado celular incluye, entre otros, ácido hialurónico. De conformidad con lo anteriormente expuesto, un objetivo adicional de la presente invención es proporcionar un proceso más eficiente y respetuoso con el medio ambiente en la elaboración de diversos productos que incluyen, entre otros, productos para el cuidado de la piel, para el cuidado de heridas, cosméticos, productos alimenticios, suplementos, fármacos y otras aplicaciones medicinales. También proporciona una mayor consistencia entre lotes y una mayor trazabilidad de los productos.

También es un objetivo de la presente invención generar un valor adicional para los consumidores o fabricantes en diversas industrias/productos, que incluyen, de modo no limitativo, el cuidado de la piel, el cuidado de heridas, cosméticos, productos alimenticios, suplementos, fármacos y otras aplicaciones medicinales, ya que la invención soluciona simultáneamente todos los inconvenientes presentes en el método convencional de producción de materias primas derivadas (es decir, mediante la extracción de animales/plantas silvestres, organismos de ADN recombinante y de medio consumido). La presente invención proporciona los siguientes beneficios:

(1) no depende de fuentes animales y/o vegetales;

(2) no depende de organismos modificados genéticamente;

(3) la extracción de todas las proteínas funcionales producidas naturalmente por las células del sujeto;

(4) pureza (sin residuos en el producto);

(5) prohibición del uso de productos químicos nocivos;

(6) proceso en cadena simple, reduciendo así el costo; y

(7) de carácter multifuncional, en lugar de un solo uso/función/acción.

Los beneficios de la presente invención dan como resultado la creación de nuevos valores que satisfacen las necesidades de los consumidores. La invención proporciona el ingrediente activo de varios productos o de los productos propiamente (incluyendo, entre otros, productos para el cuidado de la piel, para el cuidado de heridas, cosméticos, productos alimenticios, suplementos, fármacos y otras aplicaciones medicinales) con las siguientes características:

(1) etiqueta con información clara no engañosa, gracias a la alta pureza y la inexistencia de residuos o productos químicos nocivos en las materias primas derivadas;

(2) sostenibilidad, gracias a la poca o escasa dependencia de fuentes animales y/o vegetales;

(3) síntesis no química, gracias al uso de biomateriales;

5 (4) carácter multifuncional, gracias a su perfil molecular completo con todas las proteínas funcionales producidas naturalmente por las células del sujeto;

(5) respaldada por principios científicos y resultados de ensayos.

De conformidad con una modalidad de la presente divulgación, un método para la producción de carne mediante cultivo celular *in vitro* incluye aislar el tejido de una fuente animal o vegetal y hacer una
10 suspensión celular. El método incluye además el cultivo de las células en un andamiaje de grado alimentario en un medio de cultivo en el que las células crecen en una estructura sólida o semisólida que emula a un órgano animal. Adicionalmente, el método incluye además el aumento de la expresión de una proteína en las células en crecimiento mediante la alteración del nivel de uno o más micro ARN que regulan la expresión de la proteína.

15 De conformidad con otra modalidad de la presente divulgación, un método para la producción de carne mediante cultivo celular *in vitro* incluye aislar el tejido de una fuente vegetal o animal y hacer una suspensión celular, y cultivar las células en un andamiaje de grado alimentario en un medio de cultivo en el que las células crezcan en una estructura sólida o semisólida que emula a un órgano animal. El método incluye
20 además el cocultivo de las células con células diseñadas por bioingeniería que secretan nutrientes, factores de crecimiento y citocinas que favorecen el crecimiento de las células.

De conformidad con otra modalidad de la presente divulgación, un método para generar el hidrolizado celular mediante cultivo celular *in vitro* incluye las etapas de (i) lisar una célula mediante el uso de sonicación para liberar proteínas en la célula; (ii) digerir las proteínas mediante el uso de proteasa para producir péptidos cortos que tienen un tamaño molecular menor a 500 daltons (Da); (iii) terminar la etapa de
25 digestión ya sea por calentamiento de la proteasa a 95 grados Celsius durante 15 minutos o diluyendo la proteasa 100 veces usando PBS; y (iv) la filtración esterilizada de la mezcla obtenida en la etapa de terminación de digestión a través de un filtro de membrana.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

30 La divulgación podrá comprenderse de mejor manera si se consulta la descripción detallada, en combinación con las figuras adjuntas. Los componentes de las figuras no están necesariamente a escala, sino que se hace énfasis en la ilustración de los principios de la divulgación.

La Figura 1 es un diagrama de flujo de un método para la producción de carne mediante cultivo celular *in vitro*, de conformidad con algunas modalidades de la presente divulgación.

La Figura 2 es una representación esquemática de un método para la mejora postranscripcional de la expresión de proteínas, de conformidad con algunas modalidades de la presente divulgación.

La Figura 3 es una representación esquemática de un método para la mejora postranscripcional de la expresión de colágeno de tipo 1, alfa 1 (COL1A1), de conformidad con algunas modalidades de la presente divulgación.

La Figura 4 es una representación esquemática de un método para la mejora postranscripcional de la expresión de colágeno de tipo 1, alfa 2 (COL1A2), de conformidad con algunas modalidades de la presente divulgación.

La Figura 5 es una vista transversal esquemática o conceptual de un biorreactor utilizado para la producción de carne *in vitro* que tiene un soporte de fase sólida, de conformidad con algunas modalidades de la presente divulgación.

La Figura 6 es una vista transversal esquemática o conceptual de un biorreactor similar al de la Figura 5, pero que tiene un soporte de fase sólida, de conformidad con algunas modalidades de la presente divulgación.

La Figura 7 es un diagrama de flujo de un método para generar un hidrolizado celular a partir de un cultivo celular *in vitro*, de conformidad con algunas modalidades de la presente divulgación.

La Figura 8 es un diagrama de flujo de un método para evaluar el efecto que tiene un hidrolizado celular en células cutáneas humanas, de conformidad con algunas modalidades de la presente divulgación.

La Figura 9 es una gráfica que representa la expresión de laminina de las células cutáneas una vez que han sido expuestas al hidrolizado.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Producción de carne *in vitro*

En referencia a las figuras, específicamente a la Figura 1, se muestra un método (10) para la producción de carne *in vitro*. Como se utiliza en el presente documento, el términos "producción de carne *in vitro*" se refiere a un proceso de producción de carne basado en células o a un proceso agrícola basado en

células en el que los tejidos de animales y/o vegetales se cultivan en laboratorios utilizando técnicas de cultivo celular para producir carne y productos cárnicos. En un bloque (12), se aísla el tejido animal o vegetal. En algunas modalidades, el tejido se deriva de peces óseos de la clase *Osteichthyes*, incluyendo peces de agua salada como un mero, una lubina o una corvina amarilla. En otras modalidades, se pueden aislar otros tipos de tejidos animales, como tejido vacuno. En algunas modalidades, el bloque (12) puede implicar la recolección de tejido orgánico, por ejemplo, de la vejiga natatoria de un pez y hacer una suspensión celular. Aunque la siguiente descripción describe principalmente tejidos derivados de peces, cabe mencionar que los conceptos pueden aplicarse a tejidos derivados de otros tipos de fuentes animales y/o vegetales para proporcionar otros tipos de productos cárnicos y/o de proteínas animales *in vitro*, así como productos vegetales y/o proteínas sucedáneos de la carne.

Muchas de las células aisladas son células adultas y es posible hacer que proliferen continuamente utilizando varios métodos conocidos en investigación médica (bloque (14)). Por ejemplo, se pueden utilizar genes específicos, tales como factores Yamanaka, para reprogramar las células adultas en células madre, tales como células madre pluripotentes inducidas (iPSC). Alternativamente, las células adultas aisladas pueden transformarse en líneas celulares continuas mediante la sobreexpresión de la telomerasa transcriptasa inversa. En otras modalidades, se pueden aislar otros tipos de células, como células madre adultas y células madre embrionarias. En este sentido, cabe mencionar que los métodos de la presente divulgación incluyen todas las fuentes de líneas celulares.

En un siguiente bloque (16), las células se cultivan en una estructura sólida o semisólida que emula a un órgano animal, como el órgano de un pez, adhiriéndose a un andamiaje biocompatible de grado alimentario en una cámara o contenedor estéril, como un biorreactor. La cámara o contenedor estéril puede tener una temperatura controlada y puede tener entradas y salidas para introducir y eliminar sustancias, como productos químicos, nutrientes y células. El andamiaje biocompatible de grado alimentario pasa a formar parte del producto comestible final, y está hecho de materiales de origen vegetal o fúngico como, por ejemplo, la agarosa, el alginato, el quitosano, micelios y el glucomanano de konjac. El alginato es un biopolímero derivado naturalmente de algas pardas y es biocompatible. Además, el quitosano vegetal de los hongos tiene propiedades antibacterianas. En algunas modalidades, el bloque (16) se lleva a cabo en ausencia de antibióticos o compuestos antimicrobianos en el contenedor estéril. El bloque (18) consiste en suministrar el medio de cultivo al biorreactor para favorecer la supervivencia y el crecimiento celular. El medio de cultivo puede ser una solución tamponada que contenga componentes como, entre otros, sales inorgánicas (por ejemplo, cloruro de calcio (CaCl_2), cloruro de potasio (KCl), cloruro de sodio (NaCl), bicarbonato de sodio (NaHCO_3), dihidrogenofosfato de sodio (NaH_2PO_4), sulfato de magnesio (MgSO_4), etc.), aminoácidos, vitaminas (por ejemplo, tiamina, riboflavina, ácido fólico, etc.) y otros componentes como glucosa, β -mercaptoetanol, ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) y piruvato de sodio. Ejemplos no limitativos de medios de cultivo incluyen, entre otros, el medio L-15 de Leibovitz, el Medio Esencial Mínimo de Eagle (MEM), el

Medio 199, el Medio Eagle Modificado de Dulbecco (DMEM), la Mezcla de Nutrientes F12 de Ham, la Mezcla de Nutrientes F10 de Ham, el Medio 5A de MacCoy, el Medio Eagle Modificado de Glasgow (GMEM), el Medio de Dulbecco Modificado de Iscove y el medio RPMI 1640.

Si se utilizan tejidos o células vegetales, el medio de cultivo puede contener componentes necesarios para la proliferación de las células vegetales, como aminoácidos, sales, vitaminas, factores de crecimiento, hidratos de carbono, nitratos y sistemas de tamponamiento para controlar el pH. El medio de cultivo puede ser el medio Murashige y Skoog (MS), el medio Linsmaier y Skoog (LS), el medio Gamborg (B5), el medio Nitsch y Nitsch (NN) y el medio White.

De conformidad con un bloque (20), se introducen factores de crecimiento y citocinas de grado alimentario en el medio de cultivo del biorreactor para favorecer el crecimiento y la proliferación celular. Los factores de crecimiento y las citocinas pueden incluir, pero no se limitan a, el factor de crecimiento de la insulina 1 (IGF-1), la insulina, la interleucina 6 (IL-6), el receptor de la interleucina 6 (IL-6R), la interleucina 11 (IL-11), el factor de crecimiento de los fibroblastos (FGF), el factor de crecimiento epidérmico (EGF) y la transferrina. El bloque (20) puede incluir el cocultivo de células diseñadas por bioingeniería con las células aisladas en ausencia de suero fetal bovino (FBS). Las células diseñadas por bioingeniería están diseñadas para segregar los factores de crecimiento y las citocinas mencionadas, y suministrar estas biomoléculas a las células aisladas según sea necesario para su crecimiento y proliferación. Como se utiliza en el presente documento, el término células “diseñadas por bioingeniería” no es equivalente al de células modificadas genéticamente. Las células diseñadas por bioingeniería tienen un gen específico que sobreexpresa una o más proteínas específicas. Las células diseñadas por bioingeniería pueden ser células de peces u otros tipos de células animales, tales como células vacunas. Las células diseñadas por bioingeniería no están presentes en el producto cárnico final. Como ejemplos no limitativos, las células de peces diseñadas por bioingeniería pueden ser cocultivadas con células de peces aisladas, o las células vacunas diseñadas por bioingeniería pueden ser cocultivadas con células vacunas aisladas. El método de cocultivo de la presente divulgación elimina la necesidad de suero fetal bovino (FBS) de origen animal en el medio de cultivo. Además, el método de cocultivo proporciona un suministro continuo de factores de crecimiento y citocinas específicas de grado alimentario a las células en crecimiento *in situ*, así como simplifica y reduce los costos del proceso de producción. Sin embargo, en otras modalidades puede utilizarse FBS u otro suero para suministrar factores de crecimiento, citocinas y otros nutrientes para favorecer el crecimiento celular durante el bloque (16).

De manera adicional, de conformidad con un bloque (22), la expresión de proteínas en las células se incrementa, con el fin de aumentar el rendimiento de biomasa en el producto cárnico resultante. Como se utiliza en el presente documento, el término “rendimiento de biomasa” se refiere a la cantidad de material digerible (por ejemplo, de proteínas) en el producto cárnico resultante que está disponible para la producción de energía tras el consumo.

Específicamente, el bloque (22) implica aumentar la expresión de proteínas mediante la alteración de los niveles de micro ARN en las células, y la manipulación de las células se lleva a cabo antes del cultivo. Los micro ARN son secuencias cortas endógenas de ARN monocatenario no codificante que intervienen en la regulación de la expresión génica postranscripcional. El bloque (22) implica el aumento de la cantidad de micro ARNs sobreexpresores que incrementan la expresión de la proteína mediante la estimulación de la traducción del ARN mensajero (ARNm), y/o la disminución de la cantidad de micro ARNs subreguladores que disminuyen la expresión de la proteína mediante la supresión de la traducción del ARNm. Los niveles de micro ARN pueden incrementarse o reducirse introduciendo micro ARN, análogos de micro ARN o inhibidores de micro ARN en las células. Los análogos de micro ARN tienen la misma función que los micro ARN, pero pueden ser más estables y eficaces en la modulación de la expresión de proteínas. En algunas modalidades, se puede utilizar la electroporación para introducir en las células vectores episomales que contengan instrucciones para expresar micro ARN específicos. Alternativamente o en combinación con este método, se puede utilizar un virus adenoasociado como un vehículo que contenga instrucciones episomales para expresar micro ARN específicos. La disminución de la cantidad de los micro ARN subreguladores diana puede lograrse mediante la introducción de inhibidores de los micro ARN diana en las células mediante transfección. Cabe señalar aquí que los métodos para aumentar la expresión de proteínas o el rendimiento de biomasa de conformidad con la presente divulgación se llevan a cabo sin modificar el genoma de las células.

Regresando a la Figura 2, se representa de forma esquemática un método para la mejora postranscripcional de la expresión de proteínas en las líneas celulares. Uno o más micro ARN (miRNAs) sobreexpresores pueden ser potenciados para aumentar la traducción del ARNm y la producción de proteínas seleccionadas. De manera alternativa o en combinación con este método, uno o más miARN subreguladores pueden ser bloqueados con inhibidores (anti-miARN) para aumentar la traducción del ARNm y la producción de proteínas seleccionadas.

La vejiga natatoria de los peces incluye principalmente fibroblastos y la proteína colágeno.

El colágeno tipo 1 (colágeno I) es una proteína dominante en la vejiga natatoria de los peces, y el aumento de la expresión del colágeno I en las células cultivadas de la vejiga natatoria de los peces puede incrementar el rendimiento de la biomasa. El colágeno I en las células de la vejiga natatoria de los peces incluye el colágeno tipo 1, alfa 1 (COL1 A1) y el colágeno tipo 1, alfa 2 (COL1 A2). La expresión de COL1 A1 y COL1 A2 aumenta mediante la sobreexpresión del miARN 21 (miR-21), de modo que el aumento de los niveles de miR-21 aumenta la producción de COL1A1 y COL1A2 en células de la vejiga natatoria de los peces.

Además, la expresión de COL1A1 y COL1A2 disminuye al subregular el miRNA 29a (miR-29a), de manera que la disminución de los niveles de miR-29a o el bloqueo de la acción de miR-29a aumenta la producción de COL1A1 y COL1A2 en las células de la vejiga natatoria de los peces. Las Figuras 3-4

muestran el aumento de la producción de COL1A1 (Figura 3) y COL1A2 (Figura 4) mediante el aumento de los niveles de miR-21 y el bloqueo de la acción de miR-29a con el uso de inhibidores (anti-miR 29a). El aumento de la producción de COL1A1 y COL1A2 da como resultado un mayor rendimiento de biomasa en el producto cárnico resultante. Se pueden aplicar estrategias similares para aumentar los niveles de proteínas específicas en otros tipos de células animales.

En referencia a la Figura 5, se muestra un biorreactor (30) ilustrativo utilizado para cultivar las células aisladas. Las células se adhieren y crecen en un soporte de fase sólida (32) proporcionado por un andamiaje de grado alimentario (34) que se mantiene en una cámara estéril (36) en el biorreactor (30). El andamiaje (34) puede dictar la forma del producto cárnico. El andamiaje de grado alimentario (34) está hecho de materiales a base de plantas u hongos como, entre otros, agarosa, alginato, quitosano, micelios y glucomanano de konjac. El soporte de fase sólida (32) puede ser poroso para que las células puedan adherirse y crecer en las superficies interiores del soporte (32). El medio de cultivo que suministra nutrientes a las células se introduce en el biorreactor (30) a través de una entrada (38), y se vacía del biorreactor (30) a través de una salida (40).

La Figura 6 muestra un biorreactor (50) similar al biorreactor (30) de la Figura 5, pero además incluye una segunda fase sólida (52) separada del soporte de fase sólida (32) por una malla fina (54). La segunda fase sólida (52) puede contener o sustentar las células diseñadas por bioingeniería que secretan nutrientes, factores de crecimiento y citocinas para las células que crecen en el soporte de fase sólida (32) *in situ*, y puede separar físicamente las células diseñadas por bioingeniería de las células que se encuentran en el soporte de fase sólida (32). La segunda fase sólida (52) está hecha de materiales a base de plantas, similares al soporte de fase sólida (32). La malla (54) es permeable a nutrientes, factores de crecimiento y citocinas, pero es impermeable a las células. El biorreactor (50) de la Figura 6 permite el cocultivo de las células diseñadas por bioingeniería con las células en crecimiento. En algunas modalidades, los biorreactores (30) y (50) de las Figuras 5 y 6 pueden disponerse en paralelo. En otras modalidades, varios de los biorreactores (30), varios de los biorreactores (50) o mezclas de los biorreactores (30) y (50) pueden disponerse en serie para incrementar el proceso. El biorreactor (30) se puede utilizar principalmente para la producción de biomasa, mientras que el biorreactor (50) se puede utilizar para proporcionar nutrientes, factores de crecimiento y citocinas a las células en crecimiento.

El método de producción de carne *in vitro* de la presente divulgación proporciona productos cárnicos con una organización tisular simple de un tipo de células. El producto cárnico con un tipo de células es más fácil de obtener, desarrollar y comercializar en comparación con otras carnes cultivadas que tienen múltiples tipos de células. Las modalidades alternativas de la presente divulgación proporcionan productos cárnicos con múltiples tipos de células. Además, el Solicitante ha descubierto una estrategia para aumentar la producción de biomasa o de proteína mediante la alteración de los niveles de micro ARN o la actividad en las células en crecimiento. En un ejemplo, dos micro ARN fundamentales (miR-21 y miR-29a) tienen como objetivo

aumentar los niveles de la proteína dominante (colágeno I) que se encuentra en las células de la vejiga natatoria de los peces. Hasta donde sabe el Solicitante, la alteración de los niveles o la actividad de micro ARN para lograr un mayor rendimiento de proteínas o de biomasa en los productos cárnicos cultivados no ha sido utilizada por otros en el campo del desarrollo de la carne cultivada. El enfoque en los micro ARN para aumentar la producción de proteínas puede causar menos estrés a las células que los métodos “*knock-in*” o “*knock-out*” conocidos. Las células diseñadas por bioingeniería se cocultivan con las células animales en crecimiento para suministrar a las células de peces en crecimiento factores de crecimiento y citocinas de grado alimentario para el crecimiento y la proliferación celular *in situ*, reduciendo o eliminando la necesidad de aplicar FBS de origen animal en el medio de cultivo. La técnica de cocultivo simplifica el proceso de producción y reduce los costos de producción.

Además, los nutrientes del producto cárnico cultivado se pueden personalizar para generar un producto alimenticio más saludable. Por ejemplo, el producto cárnico cultivado se puede personalizar de acuerdo con las recomendaciones dietéticas de un médico nutricionista a partir de una prueba genómica personal. Los nutrientes saludables como el colesterol de alta densidad, los ácidos grasos poliinsaturados y los ácidos grasos monoinsaturados en el producto cárnico se pueden enriquecer cultivando las células bajo condiciones específicas. Alternativamente, o en combinación con este método, los nutrientes que se sabe que son perjudiciales para la salud, como el colesterol de baja densidad y los ácidos grasos saturados, se pueden reducir mediante el cultivo de las células en condiciones específicas. Los micronutrientes, como las vitaminas y los minerales, también pueden mejorarse. La personalización de los nutrientes de los productos cárnicos cultivados puede lograrse de varias maneras, por ejemplo, de manera no limitativa: 1) al adaptar los nutrientes suministrados a las células en crecimiento durante el cultivo celular, y/o 2) al controlar las proporciones de los andamiajes en capas con diferentes células.

La producción del producto alimentario cultivado se lleva a cabo bajo un proceso limpio, estéril y altamente controlado. Por lo tanto, se minimiza la degradación no deseada de los nutrientes en el producto alimentario por microorganismos como bacterias u hongos. También se minimiza la producción de sabores y olores indeseables a partir de la descomposición de los nutrientes por parte de los microorganismos.

Esta propiedad de los alimentos cultivados permite nuevos usos en la cocina y ayuda a crear recetas novedosas. Una de estas aplicaciones de los alimentos cultivados es el buche de pescado cultivado derivado de las vejigas natatorias de los peces. El buche de pescado tradicional tiene un sabor y un olor a pescado indeseables debido a la degradación de amina por las bacterias en el proceso de producción. Esta propiedad indeseable limita el ingrediente alimentario a platos salados que se sirven calientes o tibios. El buche de pescado cultivado a partir de la tecnología de cultivo celular no tiene un sabor y un olor a pescado indeseables. Además de los platos calientes y salados, el buche de pescado cultivado puede utilizarse en platos dulces, como postre o en un formato listo para comer servido a temperatura ambiente o refrigerado.

Generación del hidrolizado celular mediante cultivo celular *in vitro*

Los productos obtenidos a través de la producción de carne *in vitro* de la presente invención se pueden utilizar para producir materias primas derivadas de animales o materias primas derivadas de plantas. Además de utilizarse para el consumo humano de dichas materias primas derivadas, estas se pueden utilizar en diversos productos que incluyen, entre otros, productos para el cuidado de la piel, para el cuidado de heridas, en cosméticos, productos alimenticios, suplementos, fármacos y otras aplicaciones medicinales. Las materias primas derivadas de animales y/o las materias primas derivadas de plantas de los productos obtenidos a partir de la producción de carne *in vitro* de la presente invención ofrecen muchos beneficios en comparación con aquellos obtenidos a partir de animales o plantas silvestres.

En primer lugar, dado que las células se cultivan bajo condiciones libres de contaminantes y de enfermedades, el medio de cultivo no contiene contaminantes ambientales (metales pesados, antibióticos, microplásticos, herbicidas, fungicidas, insecticidas) o agentes adventicios (bacterias, virus, hongos o agentes de encefalopatía espongiforme transmisible). Como resultado, las materias primas derivadas de animales o las materias primas derivadas de plantas obtenidas también estarán libres de contaminantes y enfermedades.

En segundo lugar, se puede utilizar un medio libre de componentes animales y químicamente delimitado para reducir la posibilidad de que el usuario sufra una reacción alérgica. Esto se logra sustituyendo el suero animal y los factores de crecimiento derivados de animales (por ejemplo, la insulina bovina) en el medio por factores de crecimiento recombinantes. No se requiere un extracto vegetal o hidrolizado en un medio químicamente delimitado.

En tercer lugar, la consistencia entre cada lote de materias primas derivadas de animales o materias primas derivadas de plantas puede mejorarse significativamente. Esto se debe a que el perfil nutricional (carbohidratos, aminoácidos, vitaminas, minerales) del medio basal es conocido y consistente, además de que puede depurarse aún más utilizando un medio químicamente delimitado, es decir, un medio con concentraciones conocidas de todos los nutrientes y factores de crecimiento.

En cuarto lugar, se mejora la trazabilidad. Dado que se conoce la cadena de suministro para cada componente del medio de cultivo, todo elemento podría rastrearse fácilmente hasta su origen.

En quinto lugar, se reduce el sufrimiento y el sacrificio de los animales. La ejecución del proceso de producción no requiere un suministro continuo de tejidos de animales silvestres. Inicialmente, las células iniciadoras se purifican a partir de una pequeña muestra de tejido animal y se desarrollan en una línea celular, que se puede conservar criogénicamente y propagar indefinidamente en un medio de cultivo. Esto limita el sufrimiento y el sacrificio de los animales.

En sexto lugar, se reduce el desperdicio y se mejora la eficiencia. Los nutrientes en el medio se suministran directamente a las células para el crecimiento celular. Cada célula cultivada se usa para producir el hidrolizado celular. No existe desperdicio de energía y nutrientes para el crecimiento de partes no utilizadas de animales, plantas o para procesos biológicos como el apareamiento y la locomoción de animales.

5 Además, la presente invención crea valores para los consumidores o fabricantes de diversas industrias o productos, que incluyen, entre otros, productos para el cuidado de la piel, cuidado de heridas, cosméticos, productos alimenticios, suplementos, fármacos y otras aplicaciones medicinales, ya que la invención soluciona todos los inconvenientes identificados en los métodos convencionales, como se menciona en la sección de antecedentes. La presente invención proporciona los siguientes beneficios:

10 En primer lugar, no depende de una alimentación continua de las fuentes animales. Por ejemplo, para producir más crema a base de colágeno mediante el método convencional, se necesitan más porciones del cuerpo de los animales, lo que puede suponer más sufrimiento o sacrificio de los mismos. En la presente invención, las células iniciadoras (no limitadas a células madre, células musculares, fibroblastos o adipocitos) se purifican a partir de una pequeña muestra de tejido animal y se constituyen en una línea celular.

15 La línea celular se puede preservar criogénicamente y almacenar en nitrógeno líquido. Cuando sea necesario, la línea celular puede descongelarse y propagarse indefinidamente bajo condiciones de cultivo celular para producir ingredientes activos (por ejemplo, factores de crecimiento o moléculas de la MEC). Por lo tanto, la totalidad del proceso es autosostenible y reduce el sufrimiento/sacrificio de los animales.

20 En segundo lugar, no existe dependencia de la fuente animal. En la presente invención, las células iniciadoras (no limitadas a células madre, células musculares, fibroblastos o adipocitos) se purifican a partir de una pequeña muestra de tejido animal y se constituyen en una línea celular. La línea celular no se modifica genéticamente.

25 En tercer lugar, las materias primas derivadas de la presente invención son multifuncionales, ya que incluyen grandes cantidades traza de proteínas funcionales, además de la proteína diana principal.

30 Esta cantidad traza de proteínas funcionales puede ser esencial para muchas funciones celulares. Un producto creado a partir de materias primas derivadas con un perfil proteico funcional más cercano a una porción animal/vegetal silvestre extraída, generalmente proporciona un mejor rendimiento que un producto obtenido a partir de materias primas derivadas con un perfil proteico funcional menos completo. Aunque se pueden añadir proteínas funcionales a las materias primas derivadas mediante reemplazos externos, es difícil reponer varias proteínas funcionales. Además, los costos se incrementan con un mayor número de reemplazos.

En cuarto lugar, las proteínas funcionales obtenidas mediante la presente invención no contienen residuos, ya que el ingrediente en el medio de cultivo está bien controlado.

En quinto lugar, la materia prima derivada obtenida mediante la presente invención no contiene productos químicos nocivos, ya que las proteínas funcionales no se extraen utilizando productos químicos nocivos. El ingrediente del medio de cultivo está bien controlado.

5 En sexto lugar, las proteínas funcionales obtenidas mediante la presente invención no contienen residuos ni sustancias químicas nocivas, por lo que no es necesario aislarlas y purificarlas adicionalmente. Por lo tanto, se pueden reducir los costos de producción.

10 Los beneficios de la presente invención permiten crear nuevos valores que satisfacen las necesidades de los consumidores. La invención proporciona el ingrediente activo de varios productos o de los productos propiamente (que incluyen, entre otros, productos para el cuidado de la piel, cuidado de heridas, cosméticos, productos alimenticios, suplementos, medicamentos y otras aplicaciones medicinales) con las siguientes características:

(1) etiqueta con información clara no engañosa, gracias a la alta pureza y la inexistencia de residuos o productos químicos nocivos en las materias primas derivadas;

(2) sostenibilidad, gracias a la poca o escasa dependencia de fuentes animales y/o vegetales;

15 (3) síntesis no química, gracias al uso de biomateriales;

(4) carácter multifuncional, gracias a su perfil molecular completo con todas las proteínas funcionales producidas naturalmente por las células del sujeto;

(5) respaldada por principios científicos y resultados de ensayos.

20 En referencia a las figuras, específicamente a la Figura 7, se ilustra un método para producir un hidrolizado celular a partir de un cultivo celular *in vitro*. En la etapa de crecimiento celular (100), en primer lugar se cultivan las células bajo condiciones controladas usando un medio de cultivo que está parcialmente definido (es decir, un medio basal definido complementado con FBS/hidrolizados vegetales/lisado plaquetario humano) o un medio químicamente definido (es decir, un medio que tiene concentraciones definidas de todos los nutrientes y factores de crecimiento) que no contiene componentes animales o vegetales.

25 En algunas modalidades, las células se siembran con un valor de 4×10^4 células/cm² en medio de crecimiento (DMEM/F12 + FBS al 10%) y se mantienen dentro de una incubadora humidificada (34 °C; CO₂5%, aire 95%). En algunas modalidades, las células se cultivan usando el método de producción de carne *in vitro* (10) de la presente invención. En otras modalidades, se puede utilizar al menos una línea celular en la etapa de crecimiento celular (100). En algunas modalidades, las líneas celulares incluyen células madre, 30 células musculares, fibroblastos y adipocitos. En una modalidad específica, se utilizan células cultivadas de vejiga natatoria de peces en la etapa de crecimiento celular (100).

Una vez que la confluencia celular alcanza al menos el 90%, comienza la etapa de separación (102).

En la etapa de separación (102), las células se separan de su superficie adherida usando tripsina/EDTA o cualquier otra proteasa recombinante (por ejemplo, colagenasa IV recombinante o TrypLe Express). En algunas modalidades, al alcanzar el 90% de confluencia, se retira el medio de crecimiento. Las células se lavan una vez mediante PBS y se separan mediante tratamiento con tripsina/EDTA dentro de la incubadora de CO₂. Cuando las células se han desprendido, se detiene la actividad de la tripsina añadiendo un medio de crecimiento. La suspensión celular se recolecta en tubos de 50 ml.

La mezcla obtenida en la etapa de separación (102) se centrifuga a continuación a 400 x g durante 5 minutos en la etapa de centrifugación (104). El sobrenadante se elimina. El sedimento celular se vuelve a suspender en medio basal (por ejemplo, DMEM/F12). La suspensión celular restante se transfiere a un tubo de 50 ml previamente pesado. Las células se centrifugan a 400 x g durante 5 minutos. A continuación, se retira el sobrenadante. El tubo se vuelve a pesar. Se registra el número de células y la masa del sedimento celular. En algunas modalidades adicionales, la concentración celular se determina mediante el uso de un contador de células automatizado Countess II y una porción de las células se siembra para producir el siguiente lote de hidrolizados celulares.

Una vez que se lleven a cabo las centrifugaciones, se obtiene el sedimento celular, que se puede almacenar a -80 °C.

En la etapa de resuspensión (106), el sedimento celular se suspende en PBS. En algunas modalidades, el sedimento celular se suspende en 1 ml de PBS.

En la etapa de lisis (108), las células de la etapa (106) se lisan mediante sonicación. En algunas modalidades, las células se lisan mediante sonicación de la suspensión celular usando un Sonificador Digital Branson S450D (amplitud= 25%; 15s ON, 15s OFF, total= 10 ciclos). El tubo se conserva en hielo (es decir, con sonicación a aproximadamente cero grados Celsius).

Después de la lisis celular por sonicación, la fracción soluble se aísla de los desechos celulares. Las proteínas en la fracción soluble se digieren enzimáticamente en péptidos funcionales cortos en la etapa de digestión (110). La proteasa seleccionada se añade a la fracción soluble a 37 °C durante 1-2 horas. En algunas modalidades, la proteasa es la proteinasa K. Se prefieren los péptidos cortos (es decir, que tienen un tamaño molecular inferior a 500 daltons (Da)), ya que las moléculas que tienen un tamaño molecular superior a 500 daltons (Da) no penetran eficazmente a través de la epidermis más externa y son absorbidas por las capas cutáneas subyacentes. En algunas modalidades, se agrega una cantidad apropiada de proteasa a la suspensión celular para descomponer las proteínas celulares en péptidos más pequeños. Se lleva a cabo

la digestión durante 1-2 horas y se mantiene el tubo dentro de un baño de agua a 37 °C. El tubo se agita cada 10 minutos.

Después de la etapa de digestión (110), la mezcla de la etapa de digestión (110) se centrifuga a 20000 x g durante 30 minutos en la segunda etapa de centrifugación (112). En algunas modalidades, el contenido se transfiere a tubos de microcentrífuga de 1.5 ml. Los sobrenadantes de los tubos de microcentrífuga se combinan en un tubo de 50 ml. Se evita agitar los sedimentos en los tubos de microcentrífuga.

En la etapa de terminación (114), el sobrenadante se calienta a 95 °C durante 15 minutos para detener la actividad de digestión enzimática. Alternativamente, se añade PBS al sobrenadante para detener la actividad de digestión enzimática a través de la dilución. En algunas modalidades, la dilución debe realizarse 100 veces.

En la etapa de filtración (116), el hidrolizado en la mezcla de la etapa de terminación (114) se filtra de forma esterilizada a través de un filtro de membrana PVDF de 0.2 µm.

En la etapa final (118), el hidrolizado obtenido de la etapa de filtración (116) se puede aplicar como un agente tópico en productos para el cuidado de la piel, cosméticos y productos para el cuidado de heridas. El hidrolizado también puede utilizarse como ingrediente activo en varios productos, incluyendo, de manera no limitativa, productos para el cuidado de la piel, cuidado de heridas, cosméticos, productos alimenticios, suplementos, fármacos y otras aplicaciones medicinales. Si el hidrolizado no se utiliza inmediatamente, en algunas modalidades se almacena a una temperatura de -20 grados Celsius.

El hidrolizado de células cultivadas es rico en nutrientes, contiene múltiples factores proteicos que estimulan la reparación y regeneración de células cutáneas y tiene un tamaño molecular menor a 500 daltons (Da). El hidrolizado de la presente invención puede producir y tener un efecto en las capas profundas de la piel (dermis, hipodermis) ya que el hidrolizado de la presente invención es lo suficientemente pequeño como para pasar a través del estrato córneo y también mantiene los dominios proteicos fundamentales de los factores de crecimiento y citocinas para desencadenar sus actividades funcionales.

La eficacia del hidrolizado se evalúa adicionalmente en células cutáneas humanas.

En referencia a las figuras, específicamente a la Fig. 8, se describe un método para evaluar el efecto del hidrolizado celular en células cutáneas humanas.

En la etapa de sembrado (200), las células humanas se siembran en un medio de crecimiento completo. En algunas modalidades, para este fin se puede utilizar la línea celular de queratinocitos humanos (células HaCaT) o la línea celular de fibroblastos de prepucio humano (células BJ). Las células se sembraron

en placas de 24 pocillos/96 pocillos en medio completo (por ejemplo, DMEM/F12 + FBS al 10%) de modo que puedan alcanzar una confluencia de 80-90% al día siguiente.

5 Al menos un día después de la etapa de sembrado (200), se añade el hidrolizado celular a las células humanas en la etapa de adición de hidrolizado (202). Dicha etapa (202) se lleva a cabo cuando las células humanas alcanzan al menos 80% de confluencia. Preferentemente, esta etapa (202) se lleva a cabo cuando las células humanas alcanzan al menos un 90% de confluencia. En algunas modalidades, el hidrolizado celular se diluye hasta la concentración o concentraciones deseadas en un rango de 0.1 % a 10%, preferentemente de 1% utilizando un medio completo o un medio libre de suero (por ejemplo, DMEM/F12). En aun algunas modalidades, el medio anteriormente utilizado en los pocillos se reemplaza con un medio de control (es decir, un control del vehículo) o un medio que contiene el hidrolizado celular diluido.

Después de la etapa (202), las células se regresan a la incubadora humidificada durante 6-24 horas en la etapa de incubación. En algunas modalidades, las células se regresan a la incubadora humidificada (37 °C; CO₂ 5%, aire 95%) durante 6-24 horas, preferentemente durante 18 horas.

15 A continuación, se recolectan los ARN totales de las células para analizar la expresión del gen diana utilizando RT-PCR. Alternativamente, la proliferación celular después del tratamiento con hidrolizados se puede evaluar mediante el ensayo de proliferación celular CyQUANT (de Thermofisher Scientific).

Evaluación de la expresión del gen diana

Las siguientes etapas se llevan a cabo para evaluar la expresión del gen diana de las células cutáneas.

20 En la etapa de extracción de ARN total (206) se llevan a cabo las siguientes subetapas:

1. Entre 6 y 24 horas después de la transfección, extraer todo el ARN de la monocapa celular mediante el uso del kit PureLink ARN Mini (Thermofisher Scientific) de conformidad con las instrucciones del fabricante.

2. Retirar el medio del pocillo. Lavar las células una vez con PBS y retirar el PBS.

25 3. Añadir al pocillo 300 µl de tampón de lisis que contiene 1% de 2-mercaptoetanol. Lisar las células pipeteando hacia arriba y hacia abajo 10 veces.

4. Transferir el lisado a un tubo de microcentrifuga limpio de 1.5 ml. Agitar el tubo durante 1 minuto a máxima velocidad.

5. Centrifugar el tubo a 2600 x g durante 5 minutos, recolectar el sobrenadante y transferirlo a un tubo de microcentrífuga limpio de 1.5 ml.

6. Añadir 1 volumen de etanol al 70% a cada volumen de lisado celular. Agitar la mezcla y transferirla a un cartucho de centrifugado (con un tubo de recolección).

5 7. Centrifugar a 12 000 x g durante 15 segundos a temperatura ambiente. Desechar el flujo de paso. Volver a insertar el cartucho de centrifugado en el mismo tubo de recolección.

8. Añadir 350 µl de tampón de lavado I al cartucho de centrifugado. Centrifugar a 12 000 x g durante 15 segundos a temperatura ambiente. Desechar el flujo de paso y el tubo de recolección. Colocar el cartucho de centrifugado en un nuevo tubo de recolección.

10 9. Eliminar la contaminación del ADN genómico mediante el tratamiento con DNasa en la columna usando Dnasa Purelink. Preparar la mezcla de DNasa como se muestra en la Tabla 1 a continuación. Añadir 80 µl de la mezcla de DNasa a la membrana de la columna e incubar a temperatura ambiente durante 15 minutos.

TABLA 1

15	Componentes	Volumen por muestra
	Tampón de reacción de DNasa I	8 µl
	DNasa Purelink reconstituida (3U/µl)	10 µl
	Agua libre de RNasa	62 µl
20	Total	80 µl

a 12 000 x g durante 15 segundos a temperatura ambiente. Desechar el flujo de paso y el tubo de recolección. Colocar el cartucho de centrifugado en un nuevo tubo de recolección.

25 11. Preparar el tampón de lavado II por adelantado añadiendo 60 ml de etanol 100% de grado biológico molecular por 15 ml de tampón de lavado II. Añadir 500 µl de tampón de lavado II que contiene etanol al cartucho de centrifugado.

12. Centrifugar a 12 000 x g durante 15 segundos a temperatura ambiente. Desechar el flujo de paso. Volver a insertar el cartucho de centrifugado en el mismo tubo de recolección.

13. Repetir las subetapas 9-10 una vez.

14. Centrifugar a 12 000 x g durante 2 minutos a temperatura ambiente para secar la membrana con el ARN adherido. Desechar el tubo de recolección y colocar el cartucho de centrifugado en un tubo de recuperación.

5 15. Añadir 30 µl de agua libre de RNasa al centro de la membrana del cartucho de centrifugado. Esperar durante 2 minutos Centrifugar a 12 000 x g durante 2 minutos a temperatura ambiente para recolectar el eluido de ARN.

10 16. Cuantificar la concentración de ARN con Nanodrop 2000. Si el ARN purificado es de buena calidad, debe tener proporciones de A260/A280 y A260/A230 de >1.8. Además, debe tener un número de integridad de ARN (RIN, por sus siglas en inglés) de >=7 (RIN=10 para ARN intacto) cuando se evalúa mediante un bioanalizador Agilent 2100 (Agilent).

17. Mantener el ARN en hielo hasta proceder a la síntesis de ADNc de primera cadena.

Al finalizar la etapa (206), se lleva a cabo la etapa de síntesis de ADNc de primera cadena (208), que incluye las siguientes subetapas:

15 1. Sintetizar ADNc de primera cadena a partir del ARN total utilizando la enzima MMLVRT (RNasa H-) (Excell Bio) de manera similar a la descrita en el protocolo del fabricante.

2. Para cada reacción de transcripción inversa, mezclar el ARN total, el cebador oligo (dT)₂₀ y agua libre de RNasa en un tubo de PCR en hielo como se muestra en la Tabla 2.

TABLA 2

20

Componentes	Volumen por reacción (µl)
ARN total	Hasta 2 µg
Cebador oligo (dT) ₂₀ 50 µM	1 µl
Agua libre de RNasa	Llenar hasta 10 µl

25

3. (Opcional) Preparar una reacción adicional de una de las muestras para que sirva como un control sin RT. Esto se puede utilizar para evaluar la contaminación del ADN genómico después de la PCR cuantitativa en tiempo real.

5 4. Calentar la mezcla de reacción a 70 °C durante 10 minutos. Al mismo tiempo, configurar la mezcla maestra de RT y la mezcla de control sin RT, como se muestra en la Tabla 3. Recuerde preparar al menos 1 reacción adicional de la mezcla maestra de RT para compensar errores de pipeteo.

TABLA 3

Componentes		Mezcla maestra RT (por reacción)	Mezcla de control sin RT
5	Tampón de reacción 5x M-MuLV	4 µl	4 µl
	0.1M DTT (10x)	2 µl	2 µl
	dNTP (10 mM)	1 µl	1 µl
	RNasaOut (40U/µl)	0.5 µl	0.5 µl
	MMLVRT (RNasa H-) (200U/µl)	1 µl	0 µl
10	Agua libre de RNasa	1.5 µl	2.5 µl
		Total = 10 µl	Total = 10 µl

5. Después de 10 minutos de calentamiento, enfriar el tubo de reacción de la muestra en hielo durante 2 minutos. Recolectar el contenido del tubo en la parte inferior del tubo mediante una agitación rápida con una centrifugadora de escritorio.

6. Agregar 10 µl de la mezcla maestra de RT a cada muestra y agregar 10 µl de mezcla de control sin RT al control sin RT.

7. Incubar los tubos de reacción a 50 °C durante 1 hora para la transcripción inversa. Inactivar la enzima MMLVRT (RNasa H-) incubando el tubo de reacción a 70 °C durante 15 minutos y el posterior enfriamiento de los tubos de reacción en hielo.

8. Diluir las muestras de ADNc añadiendo 180 µl de agua MQ en autoclave (dilución 10x). Almacenar las muestras de ADNc diluido a -20 °C.

Por último, se lleva cabo la etapa de RT-PCR (210). Ésta incluye las siguientes subetapas:

1. Cuantificar la expresión relativa del gen diana entre muestras mediante PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR) utilizando el sistema Roche LightCycler 480 (Roche Diagnostics). Preparar la mezcla maestra de reacción de PCR con reactivos de la mezcla PowerUp SYBr Green Mastermix (ThermoFisher Scientific) y cebadores específicos para el gen de interés. Los componentes de la mezcla se muestran en la Tabla 4.

TABLA 4

Componentes	Volumen por reacción (µl)
PowerUp SYBr Green Mastermix	10 µl
Cebador frontal (8 µM)	1 µl
Cebador inverso (8 µM)	1 µl
	Total= 12 µl

La Tabla 5 muestra ejemplos de genes a evaluar:

TABLA 5

Gen de interés	Secuencia del cebador	Amplicón
<i>Colágeno Tipo I α1</i> (<i>Col1a1</i>)	F: 5'-ACTGGTGAGACCTGCGTGTA-3' R: 5'-ATCCATCGGTCATGCTCTCG-3'	118 bp
<i>Colágeno Tipo I α2</i> (<i>Col1a2</i>)	F: 5'-CATGGATGAGGAGACTGGCA-3' R: 5'-TGCCCTCAGCAACAAGTTCA-3'	80 bp
<i>Inhibidor tisular de metaloproteinasa 1</i> (Timp-1)	F: 5'-ATCCATCCCCTGCAAAGTGC-3' R: 5'-TGGAAGCCCTTTTCAGAGCC-3'	81 bp
<i>Sirtuina 1</i> (Sirt1)	F: 5'-CCAGCTAGGACCATTACTGCC-3' R: 5'-ACTGCATTCTTTAGTGTAGCCAA-3'	107 bp
<i>Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa</i> (Gapdh)	F: 5'-TCAAGAAGGTGGTGAAGCAGG-3' R: 5'-CGTCAAAGGTGGAGGAGTGG-3'	117 bp
<i>Factor de elongación de la traducción eucariota 1 α1</i>	F: 5'-CCACTGGAAGCAGGAATGAGT-3' R: 5'-TGGTGCTCAAGCCACAGTTG-3'	100 bp

2. Realizar diluciones en serie 5 veces (diluciones en serie 5¹ a 5⁵) de una muestra de ADNc de referencia mediante la adición de 5 µl a 20 µl de agua MQ esterilizada en autoclave. Habrá seis estándares

(diluciones 5^0 , 5^1 , 5^2 , 5^3 , 5^4 , 5^5) para determinar la curva estándar en el ciclo de qPCR. La muestra de ADNc de referencia puede ser una muestra de ADNc de 20 μ l sin diluir.

3. Registrar lo que se agrega a cada pocillo de la placa qPCR en una hoja de registro del experimento.

5 4. Añadir 12 μ l de mezcla maestra de reacción PCR por pocillo de una placa LightCycler Multiwell 96 (Roche). Evitar la introducción de burbujas.

5. Agregar 8 μ l de muestra de ADNc diluido, estándar o agua MQ (control negativo de PCR) en cada pocillo, de conformidad con la hoja de registro del experimento. Evitar la introducción de burbujas.

10 6. Cubrir la placa qPCR con una lámina de sellado suministrada en el paquete LightCycler Multiwell Plate 96 (Roche). Asegurarse de que todos los pocillos estén bien sellados con la lámina de sellado para evitar la evaporación durante el ciclo qPCR.

7. Recolectar el contenido del pocillo en el fondo de los pozos centrifugando a 200 x g dentro de una centrifugadora Beckman Coulter Allegra 25R (Beckman Coulter Life Sciences).

15 8. Colocar la placa qPCR en el sistema Roche LightCycler 480. Configure las condiciones de la PCR de la siguiente manera:

(i) Activación de UDG

50°C 2 minutos (Tasa de aumento 4.4°C/seg)

1 ciclo

(ii) Desnaturalización inicial:

20 95°C 2 minutos (Tasa de aumento 4.4°C/seg)

1 ciclo

(iii) PCR

Modo de análisis: Cuantificación

95°C, 15 segundos (Tasa de aumento 4.4°C/seg)

25 55°C, 15 segundos (Tasa de aumento 2.2°C/seg)

72°C, 30 segundos (Tasa de aumento 4.4°C/seg, Modo de adquisición: único)

40 ciclos

(iv) Análisis de la curva de fusión

Modo de análisis: Curvas de fusión

5 95°C, 20 segundos (Tasa de aumento 4.4°C/seg)

55°C, 1 minuto (Tasa de aumento 2.2°C/seg)

95°C (Tasa de aumento 0.11°C/seg, Modo de adquisición: Continuo, Adquisiciones: 5 por °C)

1 ciclo

(v) Enfriamiento

10 4°C (Tasa de aumento 2.2°C/seg)

1 ciclo

9. Comenzar el ciclo de qPCR.

10. Después de que se complete el ciclo de qPCR, extraer la placa de qPCR. Verificar la validez del ciclo qPCR mediante los siguientes criterios:

15 (i) La eficiencia de la amplificación es del 90 al 105%,

(ii) El coeficiente de determinación (R^2) de la curva estándar es > 0.99 ,

(iii) Hay un único pico en el análisis de la curva de fusión,

(iv) El producto de la PCR debe producir una sola banda del tamaño correcto del amplicón después de la electroforesis en gel.

20 11. Registrar la eficiencia de la amplificación. La expresión relativa del gen diana se normaliza con respecto a la expresión relativa del gen constitutivo (es decir, Gapdh) y se puede calcular mediante el método Pfaffl, como se ilustra a continuación:

Expresión relativa del gen diana de B en comparación con A

$$= \frac{(1 + \text{eficiencia de amplificación del gen diana})^{\text{Ct(A)} - \text{Ct(B)}}}{(1 + \text{eficiencia de amplificación de Gapdh})^{\text{Ct(a)} - \text{Ct(b)}}}$$

En donde

Ct(A) = es el valor Ct del gen diana en la muestra A;

5 Ct(B) = es el valor Ct del gen diana en la muestra B;

Ct(a) = es el valor Ct de Gapdh en la muestra A;

Ct(b) = es el valor Ct de Gapdh en la muestra B.

Evaluación de la proliferación celular mediante el ensayo de proliferación celular CyQUANT.

10 Las siguientes etapas se llevan a cabo para evaluar la proliferación celular después del tratamiento mediante hidrolizados a través del ensayo de proliferación celular CyQUANT.

En la etapa de eliminación (212), se llevan a cabo las siguientes subetapas:

15 1. El ensayo de proliferación celular CyQUANT (Thermofisher Scientific) se puede utilizar para determinar el crecimiento celular midiendo indirectamente el contenido de ácido nucleico. Las células deben sembrarse en una placa de 96 pocillos. Después del tratamiento celular durante 16-24 horas, eliminar el medio de cultivo tanto como sea posible.

2. Congelar la placa a -70°C. La placa se puede almacenar hasta 4 semanas a -70°C.

Al terminar la etapa de finalización (212), se realiza la etapa CyQUANT (214), que incluye las siguientes subetapas:

20 1. Descongelar los componentes del kit de ensayo a temperatura ambiente. Preparar la solución madre CyQUANT GR como se muestra en la Tabla 6. Mezclar por pipeteo.

TABLA 6

Componentes	Volumen por pocillo (µl)
Componente A	0.5 µl
Componente B	10 µl
Agua MilliQ	189.5 µl
Total= 200 µl	

2. Descongelar la placa a temperatura ambiente.

3. Agregar 200 µl de solución madre CyQUANT GR a cada pocillo de la muestra y 200 µl a un pocillo ciego (sin control celular). Incubar durante 5 minutos.

4. Leer la placa en un lector de placas de fluorescencia (por ejemplo, en un sistema Molecular Devices SpectraMax iD5). Ajustar el filtro de estimulación a 480 nm y el filtro de emisión a 520 nm.

5. Sustraer todas las lecturas de fluorescencia de la muestra de la lectura de control sin células. Tabular los resultados.

En referencia a la Figura 9, la gráfica ilustra la diferencia en la expresión de laminina de las células cutáneas entre las células cutáneas tratadas con hidrolizado celular y las células cutáneas no tratadas con hidrolizado celular. La expresión de laminina de las células cutáneas que se tratan con hidrolizado celular es de alrededor de 140%, mientras que la expresión de laminina de las células cutáneas que no se tratan con hidrolizado celular es de alrededor de 100%.

La descripción anterior es ilustrativa mas no limitativa. Para los expertos en la materia, resultarán evidentes distintas variaciones de las modalidades una vez que hayan leído la presente divulgación. Por lo tanto, el alcance de las modalidades no debe determinarse con referencia a la descripción anterior, sino que debe determinarse con referencia a las reivindicaciones correspondientes junto con su alcance completo o equivalentes.

Una o más características de cualquier modalidad se pueden combinar con una o más características de cualquier otra modalidad, sin apartarse del alcance de las modalidades. La expresión "un", "uno" "una" o "el/la" se entiende como "un/uno/una o más", a menos que se indique específicamente lo contrario. La expresión "y/o" representa el sentido más inclusivo del término, a menos que se indique específicamente lo contrario.

Si bien la presente divulgación puede manifestarse bajo muchas formas distintas, las figuras y la descripción se presentan en el entendido de que la presente divulgación es una ejemplificación de los principios de una o más invenciones, y no pretende limitar ninguna modalidad a las modalidades ilustradas.

Por lo tanto, la divulgación, en sus aspectos más amplios, no se limita a los detalles específicos, al sistema, a los métodos representativos o a los ejemplos ilustrativos mostrados y descritos anteriormente. Se pueden realizar diversas modificaciones y variaciones a la descripción anterior sin apartarse del alcance o espíritu de la presente divulgación. Un objetivo de la presente divulgación es abarcar todas esas modificaciones y variaciones siempre que estén dentro del alcance de las siguientes reivindicaciones y sus equivalentes.

10 Protocolos Ilustrativos

A. Desarrollo de una línea celular de vejiga de pez

1. Conseguir una corvina amarilla, una lubina o un pez sano de categoría similar en una pescadería local.

2. Mantener el pez en hielo hasta el aislamiento celular.

15 3. Sumergir el pez en lejía al 10%.

4. Retirar la vejiga natatoria de los peces en condiciones asépticas.

5. Lavar el órgano una o más veces en ácido hipocloroso.

6. Lavar el órgano una o más veces en medio antibiótico (L-15 de Leibovitz o DMEM o EMEM con 400 IU/ml de penicilina, 400 pg/ml de estreptomicina).

20 7. Después del lavado, cortar el órgano en trozos pequeños (2 a 3 mm³).

8. Transferir el órgano cortado a un tubo de centrifuga que contiene 0.25% de tripsina-EDTA en PBS.

9. Incubar a temperatura ambiente con agitación continua durante 1 hora.

10. Filtrar el sobrenadante con una malla de 100 pm para eliminar el tejido no digerido.

25 11. Centrifugar el filtrado a 200 g durante 5 minutos.

12. Resuspender el sedimento celular con medio completo (L-15 de Leibovitz o DMEM o EMEM con 200 IU/ml de penicilina, 200 pg/ml de estreptomicina, 10% de suero fetal bovino).

13. Sembrar la célula en un matraz T25.

14. Incubar a 24 a 28°C.

5 15. Retirar las células que no estén adheridas al matraz de cultivo de tejidos al día siguiente.

16. Reemplazar la mitad del medio con medio nuevo cada 2 a 3 días.

17. Las células se consideran consolidadas cuando se forma una monocapa completa y las células consolidadas están listas para el subcultivo.

B. Desarrollo de una línea celular de vejiga de pez mediante explante tisular

10 1. Conseguir una corvina amarilla, una lubina o un pez sano de categoría similar en una pescadería local.

2. Mantener el pez en hielo hasta el aislamiento celular.

3. Sumergir el pez en lejía al 10%.

4. Retirar la vejiga natatoria de los peces en condiciones asépticas.

15 5. Lavar el órgano una o más veces en ácido hipocloroso.

6. Lavar el órgano una o más veces en medio antibiótico (L-15 de Leibovitz o DMEM o EMEM con 400 IU/ml de penicilina, 400 pg/ml de estreptomicina).

7. Después del lavado, cortar el órgano en trozos pequeños (1 a 2 mm³).

20 8. Colocar las piezas de los órganos en una placa de 24 pocillos que contenga de forma individual medio completo (L-15 de Leibovitz o DMEM o EMEM con 200 IU/ml de penicilina, 200 pg/ml de estreptomicina, 10% de suero bovino fetal).

9. Incubar a 24 a 28°C.

10. Reemplazar la mitad del medio con medio nuevo cada 2 a 3 días sin afectar el explante tisular.

25 11. Incubar el explante tisular hasta que se observen células adherentes.

12. Retirar el explante tisular.

13. Las células se consideran consolidadas cuando se forma una monocapa completa y las células consolidadas están listas para el subcultivo.

C. Desarrollo de una línea celular de músculo de pez

- 5 1. Obtener un mero, bacalao, lenguado, fletán, platija o un pez sano de categoría similar de una pescadería local.
2. Mantener el pez en hielo hasta el aislamiento celular.
3. Sumergir el pez en lejía al 10%.
4. Retirar los músculos de los peces en condiciones asépticas.
- 10 5. Lavar el tejido una o más veces con ácido hipocloroso.
6. Lavar el tejido una o más veces en medio antibiótico (L-15 de Leibovitz o DMEM o EMEM con 400 IU/ml de penicilina, 400 pg/ml de estreptomycin).
7. Después del lavado, cortar el tejido en trozos pequeños (2 a 3 mm³).
8. Transferir el tejido cortado a un tubo de centrifuga que contenga collagenasa y dispasa en
15 PBS.
9. Incubar a temperatura ambiente con agitación continua durante 1 hora.
10. Filtrar el sobrenadante con una malla de 100 pm para eliminar el tejido no digerido.
11. Centrifugar el filtrado a 200 g durante 5 minutos.
12. Resuspender el sedimento celular con medio completo (L-15 de Leibovitz o DMEM o
20 EMEM con 200 IU/ml de penicilina, 200 pg/ml de estreptomycin, 10% de suero fetal bovino).
13. Sembrar la célula en un matraz T25.
14. Incubar a 24 a 28°C.
15. Retirar las células que no estén adheridas al matraz de cultivo de tejidos al día siguiente.
16. Reemplazar la mitad del medio con medio nuevo cada 2 a 3 días.

17. Las células se consideran consolidadas cuando se forma una monocapa completa y las células consolidadas están listas para el subcultivo.

D. Desarrollo de una línea celular de músculo de pez a partir de un explante tisular

- 5 1. Obtener un mero, bacalao, lenguado, fletán, platija o un pez de categoría similar de una pescadería local.
2. Mantener el pez en hielo hasta el aislamiento celular.
3. Sumergir el pez en lejía al 10%.
4. Retirar los músculos de los peces en condiciones asépticas.
5. Lavar el tejido una o más veces con ácido hipocloroso.
- 10 6. Lavar el tejido una o más veces en medio antibiótico (L-15 de Leibovitz o DMEM o EMEM con 400 IU/ml de penicilina, 400 pg/ml de estreptomicina).
7. Después del lavado, cortar el músculo en trozos pequeños (1 a 2 mm³).
8. Colocar los trozos de músculo en una placa de 24 pocillos que contenga de forma individual un medio completo (L-15 de Leibovitz o DMEM o EMEM con 200 IU/ml de penicilina, 200 pg/ml de estreptomicina, 10% de suero bovino fetal).
- 15 9. Incubar a 24 a 28°C.
10. Reemplazar la mitad del medio con medio nuevo cada 2 a 3 días sin afectar el explante tisular.
11. Incubar el explante tisular hasta que se observen células adherentes.
- 20 12. Retirar el explante tisular.
13. Las células se consideran consolidadas cuando se forma una monocapa completa y las células consolidadas están listas para el subcultivo.

E. Aislamiento y cultivo de células madre adultas

- 25 1. Obtener un mero, bacalao, lenguado, halibut, platija o un pez de 6 meses o menos de categoría similar en una pescadería local.

2. Mantener el pez en hielo hasta el aislamiento celular.
3. Sumergir el pez en lejía al 10%.
4. Retirar los músculos de los peces en condiciones asépticas.
5. Lavar el tejido una o más veces con ácido hipocloroso.
- 5 6. Lavar el tejido una o más veces en medio antibiótico (L-15 de Leibovitz o DMEM o EMEM con 400 IU/ml de penicilina, 400 pg/ml de estreptomicina).
7. Después del lavado, cortar el tejido en trozos pequeños (2 a 3 mm³).
8. Transferir el tejido cortado a un tubo de centrifuga que contenga collagenasa y dispasa en PBS.
- 10 9. Incubar a temperatura ambiente con agitación continua durante 1 hora.
10. Filtrar el sobrenadante con una malla de 100 pm para eliminar el tejido no digerido.
11. Centrifugar el filtrado a 200 g durante 5 minutos.
12. Resuspender el sedimento celular con un medio completo (L-15 de Leibovitz o DMEM o EMEM con 200 IU/ml de penicilina, 200 pg/ml de estreptomicina, 10% de suero bovino fetal, 100 ng/ml de factor básico de crecimiento de fibroblastos).
- 15 13. Colocar las células en una placa sin recubrimiento durante 1 hora a 24-28°C.
14. Recolectar el sobrenadante y colocarlo en una placa recubierta de laminina, gelatina, Matrigel o una matriz similar.
15. Incubar a 24-28°C.
- 20 16. Después de 24 horas, lavar las células poco adheridas y no adherentes.
17. Reemplazar el medio todos los días con medio completo (L-15 de Leibovitz o DMEM o EMEM con 200 IU/ml de penicilina, 200 pg/ml de estreptomicina, 10% de suero fetal bovino, 100 ng/ml de factor básico de crecimiento de fibroblastos).

F. Generación y cultivo de iPSC

1. Entre 2 y 4 días antes de la transfección, colocar las células en medio completo (L15 con 10% de FBS) en un matraz de cultivo tisular. Las células deben tener una confluencia de 75 a 90% el día de la transfección (Día 0).
2. Aspirar el medio de las placas de 6 pocillos recubiertos de gelatina y sustituirlo por 2 ml de medio completo nuevo por pocillo. Colocar las placas recubiertas a 37°C hasta que estén listas para su uso.
3. Descongelar los vectores Epi5™ a 37°C y colocarlos en hielo húmedo hasta que estén listos para su uso. Antes de utilizarlos, centrifugar brevemente los vectores descongelados para recolectarlos en el fondo del tubo.
4. Lavar las células en PBS.
5. Añadir 3 ml de tripsina/EDTA al 0.05% al matraz de cultivo que contiene las células.
6. Incubar el matraz a temperatura ambiente durante 3 minutos.
7. Añadir de 5 a 8 ml de medio completo a cada matraz. Transferir cuidadosamente las células a un tubo cónico estéril vacío de 15 ml.
8. Comprobar la viabilidad mediante el ensayo de viabilidad celular por exclusión con colorante azul de tripano.
9. Centrifugar las células a 200g durante 2 min.
10. Aspirar cuidadosamente la mayor parte del sobrenadante y resuspender con medio completo.
11. Sembrar las células en placas recubiertas de gelatina y colocar entre 50 000 y 100 000 células por pocillo en una placa de 6 pocillos con un 30 a 60% de confluencia en 2 ml de medio completo e incubar durante la noche a 24-28°C.
12. Precalentar el Medio Opti-MEM/Suero Reducido a temperatura ambiente y preparar el Tubo A y el Tubo B como se describe a continuación.
13. Añadir 1.2 µl de cada una de las dos mezclas de Vectores de Reprogramación Epi5™ (2.4 µl en total) a 118 µl de medio Opti- MEM en un tubo de microcentrífuga de 1.5 ml etiquetado como Tubo A. Añadir 4.8 µl de Reactivo P3000™ y mezclar bien.
14. Diluir 3.6 µl de reactivo de Lipofectamina 3000 en 121 µl de medio Opti-MEM precalentado en un tubo de microcentrífuga de 5 ml etiquetado como Tubo B.

15. Para preparar una mezcla maestra de transfección, añadir el contenido del Tubo A al Tubo B y mezclar bien.

16. Incubar la mezcla maestra de transfección durante 5 minutos a temperatura ambiente.

5 17. Mezclar una vez más y añadir la totalidad de los 250 µl de mezcla maestra de transfección a cada pocillo.

18. Incubar durante la noche a 24-28°C.

19. 24 horas después de la transfección, aspirar el medio de las placas. Añadir 2 ml de Medio N2B27 (L15 con suplemento IX N-2, suplemento IX B27, 100 ng/mL de bFGF a cada pocillo.

10 20. Cambiar el medio N2B27 cada día durante un total de 14 días, sustituyendo el medio consumido por 2 ml de Medio N2B27.

21. Aspirar el Medio N2B27 consumido en el Día 14 y sustituirlo por un medio completo. Reanudar los cambios de medio cada día a 2 ml por pocillo.

15 22. Observar las placas cada dos días con el microscopio para ver si aparecen grupos de células, lo que indica la presencia de células transformadas. Entre 15 y 21 días después de la transfección, las colonias de iPSC crecerán hasta alcanzar un tamaño adecuado para la transferencia.

23. Las colonias son distintas en el Día 21 y pueden ser recolectadas para su posterior cultivo y expansión.

G. Método para el subcultivo de células

1. Retirar y desechar el medio de cultivo.

20 2. Enjuagar brevemente el PBS celular para eliminar todos los rastros de suero que contiene inhibidor de tripsina.

3. Añadir de 2 a 3 ml de solución de tripsina-EDTA al 0.25% al matraz.

4. Incubar a temperatura ambiente durante 1 min.

5. Añadir de 5 a 8 ml de medio de crecimiento completo.

25 6. Aspirar las células mediante un pipeteo ligero.

7. Añadir alícuotas adecuadas de la suspensión celular a nuevos frascos de cultivo en una proporción de subcultivo de 1:2 a 1:3.

8. Incubar a 24-28°C.

H. Adaptación al cultivo en suspensión

- 5 1. Traspasar el cultivo en monocapa a una frecuencia apropiada para la célula en cuestión mediante tripsinización.
2. En cada traspaso, lavar la monocapa celular con PBS y superponerla con tripsina al 0.25%.
3. Incubar a temperatura ambiente durante 5 min.
4. Inactivar la enzima con medio completo.
- 10 5. Recolectar la suspensión celular y comprobar la viabilidad mediante el ensayo de viabilidad celular por exclusión con colorante azul de tripano.
6. Sembrar la suspensión celular en otro matraz de cultivo.
7. Repetir el traspaso hasta que la viabilidad de las células suspendidas sea igual o superior al 90%.
- 15 8. Consolidar un cultivo en suspensión con 50 ml de medio completo en un matraz de centrifugado o agitación a una densidad celular de 0.1 a -0.5 millones/ml.
9. Incubar los cultivos en suspensión en matraces de centrifugado o agitación en una incubadora de CO₂ bajo las mismas condiciones de temperatura, humedad y atmósfera óptimas para los cultivos en monocapa.
- 20 10. Ajustar la densidad celular a 0.1 a -0.5 millones/ml con medio nuevo cada 2 a 3 días.
11. Comprobar la viabilidad mediante el ensayo de viabilidad de células de exclusión con colorante azul de tripano.
12. Consolidar múltiples cultivos paralelos a una densidad celular que favorezca el crecimiento de células sanas. 13. Aumentar la densidad celular gradualmente a 1 millón/ml usando parte del cultivo.
- 25 14. Si el aumento de la densidad celular da como resultado la muerte celular, descartar el cultivo de alta densidad.

15. Reiniciar la adaptación de alta densidad utilizando la células de la etapa 12.

16. Aumentar la escala a un biorreactor de 3 L cuando las células se adapten a crecer en suspensión.

I. Adaptación al medio sin suero (hidrolizado vegetal)

- 5 1. Cultivar las células en medio completo DMEM/F12 (mezcla 1:1 de medio DMEM y medio F12 de Ham, glutamina 2 a 4 mM, 10% de FBS).
2. Preparar un medio libre de suero (mezcla 1:1 de medio DMEM y medio F12 de Ham, glutamina 2 a 4 mM, 20% de hidrolizado vegetal, por ejemplo, de soya, de semilla de algodón, colza, trigo, de levadura o un equivalente).
- 10 3. Cuando las células alcancen la confluencia, sustituir el medio con el medio de adaptación I (40% de medio completo nuevo, 40% de medio acondicionado del traspaso anterior, 20% de medio sin suero).
4. Comprobar la viabilidad mediante un ensayo de viabilidad de células de exclusión con colorante azul de tripano cada 2 a 3 días.
5. Si la adaptación da como resultado la muerte celular, desechar el cultivo y repetir la etapa
- 15 3.
6. Cuando las células alcancen la confluencia, reemplazar el medio con el medio de adaptación II (30% de medio completo nuevo, 30% de medio acondicionado de las células en la etapa 1, 40% de medio libre de suero).
7. Comprobar la viabilidad mediante un ensayo de viabilidad de células de exclusión con
- 20 colorante azul de tripano cada 2 a 3 días.
8. Si la adaptación da como resultado la muerte celular, desechar el cultivo y repetir la etapa
- 6.
9. Cuando las células alcancen la confluencia, reemplazar el medio con el medio de adaptación III (20% de medio completo nuevo, 20% de medio acondicionado de las células en la etapa 1, 60%
- 25 de medio libre de suero).
10. Comprobar la viabilidad mediante un ensayo de viabilidad de células de exclusión con colorante azul de tripano cada 2 a 3 días

11. Si la adaptación da como resultado la muerte celular, desechar el cultivo y repetir la etapa 9.

12. Cuando las células alcancen la confluencia, reemplazar el medio con el medio de adaptación IV (10% de medio completo nuevo, 10% de medio acondicionado de las células en la etapa 1, 80% de medio libre de suero).

13. Comprobar la viabilidad mediante un ensayo de viabilidad de células de exclusión con colorante azul de tripano cada 2 a 3 días.

14. Si la adaptación da como resultado la muerte celular, desechar el cultivo y repetir la etapa 12.

15. Cuando las células alcancen la confluencia, reemplazar el medio con un medio libre de suero.

16. Comprobar la viabilidad mediante un ensayo de viabilidad de células de exclusión con colorante azul de tripano cada 2 a 3 días.

17. Si la adaptación da como resultado la muerte celular, desechar el cultivo y repetir la etapa 15.

18. El uso del medio libre de suero puede incrementarse más gradualmente en cada etapa, es decir, con un incremento del 20% o menos en cada etapa.

J. Adaptación al medio libre de suero (químicamente definido)

1. Cultivar las células en un medio completo DMEM/F12 (mezcla 1:1 de medio DMEM y medio F12 de Ham, glutamina 2 a 4 mM, 10% de FBS).

2. Preparar un medio libre de suero (mezcla 1:1 de medio DMEM y medio F12 de Ham, glutamina 2-4 mM, ácido ascórbico 2-fosfato (65-130 ug/ml), NaHCO_3 (550-1100 ug/ml), selenito sódico (14-28 ng/ml), insulina (19-38 ug/ml), transferrina (11-22 ug/ml), FGF-2 (100-200 ng/ml), TGF-beta (2-4 ng/ml).

3. Cuando las células alcancen la confluencia, sustituir el medio con el medio de adaptación I (40% de medio completo nuevo, 40% de medio acondicionado del traspaso anterior, 20% de medio sin suero).

4. Comprobar la viabilidad mediante un ensayo de viabilidad de células de exclusión con colorante azul de tripano cada 2 a 3 días. Si la adaptación da como resultado la muerte celular, desechar el cultivo y repetir la etapa 3.

6. Cuando las células alcancen la confluencia, reemplazar el medio con el medio de adaptación II (30% de medio completo nuevo, 30% de medio acondicionado de las células en la etapa 1, 40% de medio libre de suero).

5 7. Comprobar la viabilidad mediante un ensayo de viabilidad de células de exclusión con colorante azul de tripano cada 2 a 3 días.

6 8. Si la adaptación da como resultado la muerte celular, desechar el cultivo y repetir la etapa

10 9. Cuando las células alcancen la confluencia, reemplazar el medio con el medio de adaptación III (20% de medio completo nuevo, 20% de medio acondicionado de las células en la etapa 1, 60% de medio libre de suero).

10. Comprobar la viabilidad mediante un ensayo de viabilidad de células de exclusión con colorante azul de tripano cada 2 a 3 días.

9. 11. Si la adaptación da como resultado la muerte celular, desechar el cultivo y repetir la etapa

15 12. Cuando las células alcancen la confluencia, reemplazar el medio con el medio de adaptación IV (10% de medio completo nuevo, 10% de medio acondicionado de las células en la etapa 1, 80% de medio libre de suero).

13. Comprobar la viabilidad mediante un ensayo de viabilidad de células de exclusión con colorante azul de tripano cada 2 a 3 días.

20 14. Si la adaptación da como resultado la muerte celular, desechar el cultivo y repetir la etapa

12. 15. Cuando las células alcancen la confluencia, reemplazar el medio con un medio libre de suero.

25 16. Comprobar la viabilidad mediante un ensayo de viabilidad de células de exclusión con colorante azul de tripano cada 2 a 3 días.

15. 17. Si la adaptación da como resultado la muerte celular, desechar el cultivo y repetir la etapa

18. El uso del medio sin suero puede incrementarse más gradualmente en cada etapa. Por ejemplo, un incremento del 20% o menos en cada etapa.

K. Mejora postranscripcional de la expresión de proteínas

- 5 1. Células de cultivo en medio completo (L-15 de Leibovitz o DMEM o EMEM con 200 IU/ml de penicilina, 200 pg/ml de estreptomicina, 10% de suero fetal bovino), o medio libre de suero (DMEM/F12 con hidrolizado vegetal o compuestos químicamente definidos).
2. Retirar y desechar el medio de cultivo.
3. Enjuagar brevemente el PBS celular para eliminar todos los rastros de suero que contenga inhibidor de tripsina.
- 10 4. Añadir de 2 a 3 ml de solución de tripsina-EDTA al 0.25% al matraz.
5. Incubar a temperatura ambiente durante 1 min.
6. Aspirar las células mediante un pipeteo ligero.
7. Centrifugar las células a 200g durante 2 min.
8. Resuspender las células en medio completo o medio libre de suero.
- 15 9. Añadir 0.5 millones de células a cada pocillo de una placa de 6 pocillos.
10. Incubar durante la noche a 24-28°C.
11. Transfectar los oligonucleótidos de micro ARN (miR-21, miR-29a, análogo de miR-21, análogo de miR-29a, anti-miR-21 ,anti-miR-29a, o un equivalente) en la célula utilizando polietilenimina, liposomas, electroporación u otros métodos.
- 20 12. Incubar durante la noche a 24-28°C.
13. Transferir las células a un matraz multicapa, a un matraz giratorio o a un matraz de agitación en una incubadora de CO₂ bajo las mismas condiciones de temperatura, humedad y atmosféricas para un cultivo óptimo

L. Andamiaje para el cultivo de células (Konjac + goma)

- 25 1. Hervir agua con unos trozos de azafrán hasta que el color se vuelva amarillo pálido.

2. Retirar el azafrán y dejar reposar la solución hasta que esté tibia.
3. Preparar todo el ingrediente seco
 - a. Konjac-1-3%
 - b. Bicarbonato de sodio - 0.7-1.4%
 - 5 c. Goma de algarrobo - 0.5-1%
 - d. Goma xantana perfeccionada - 0.5-1%
4. Medir 100 ml de solución de azafrán.
5. Añadir bicarbonato de sodio, goma de algarrobo y goma xantana secuencialmente. Agitar bien la mezcla después de añadir cada ingrediente.
- 10 6. Añadir Konjac espolvoreando poco a poco sobre la solución. Continuar agitando La solución debería volverse pastosa.
7. Extender la mezcla de konjac en el molde de aproximadamente 1 a 15 mm de espesor.
8. Cubrir el molde con la tapa y dejar reposar a temperatura ambiente durante más de 30 min.
9. Colocar el molde en un refrigerador a 4°C durante 4 horas.
- 15 10. Colocar el molde al vapor a fuego lento durante 40 minutos.
11. Dejar reposar el molde a temperatura ambiente durante 2 horas.
12. Deshidratar el andamiaje a 45-55°C durante 15 minutos.

M. Andamiaje para el cultivo celular (alginato + harina de arroz glutinoso)

1. Pesar 1 g (1%) de alginato de sodio.
- 20 2. Añadir 100 ml de agua en la licuadora.
3. Añadir el polvo de alginato en la licuadora y licuar la mezcla hasta que se disuelva.
4. Cubrir el contenedor con una película de plástico y colocar la solución de alginato en el refrigerador durante la noche para eliminar las burbujas de gas.

5. Pesar 10% de harina de arroz glutinoso y colocar en un molde.
6. Añadir la solución de alginato en el molde de aproximadamente 1 a 15 mm.
7. Agitar la mezcla hasta que toda la harina se disuelva.
8. Poner la mezcla al vapor a fuego lento durante 30 minutos hasta que se consolide la forma.
9. Cubrir el molde con la tapa y dejar reposar a temperatura ambiente durante 30 min.
10. Pesar 1% de lactato de calcio y agitar para disolver en agua.
11. Sumergir el andamiaje con una solución de lactato de calcio al 1%, durante al menos 2.5 horas para permitir la formación de una membrana alrededor del andamiaje.

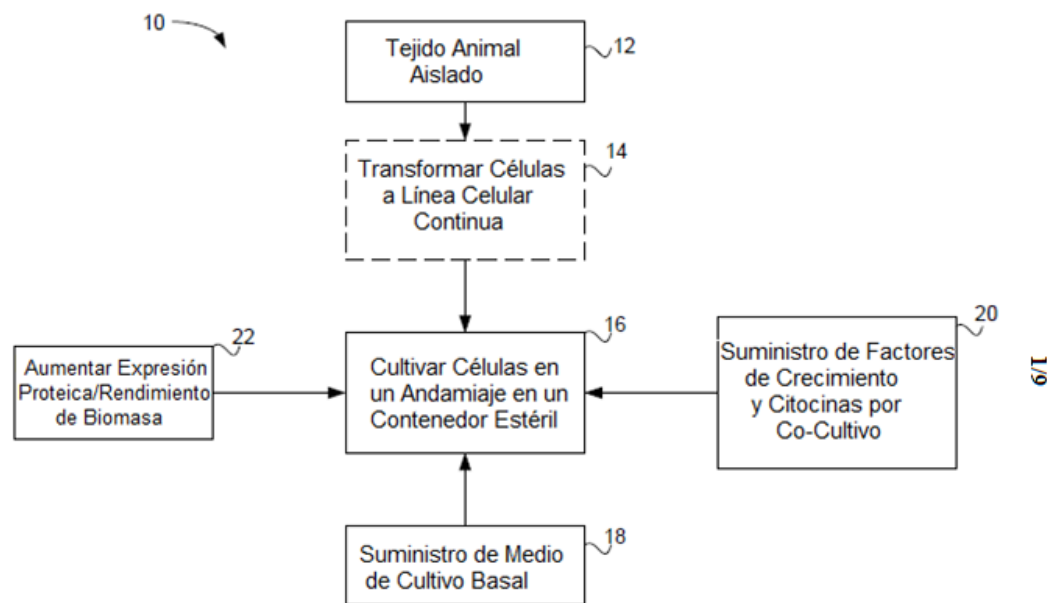


FIG. 1

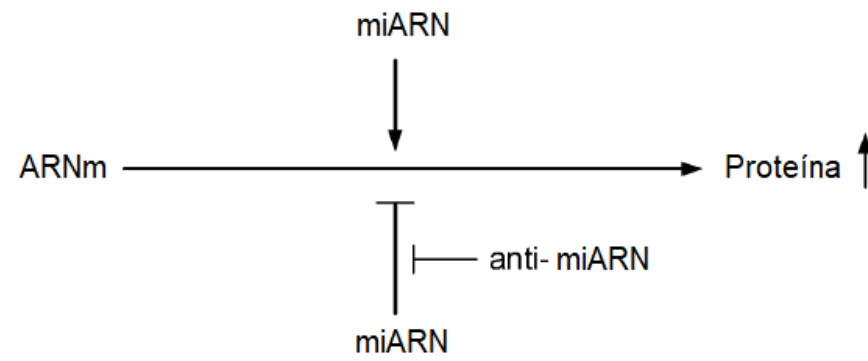


FIG. 2

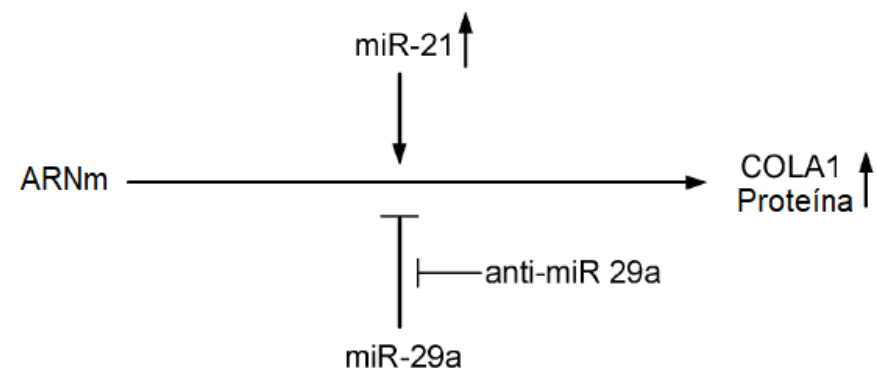


FIG. 3

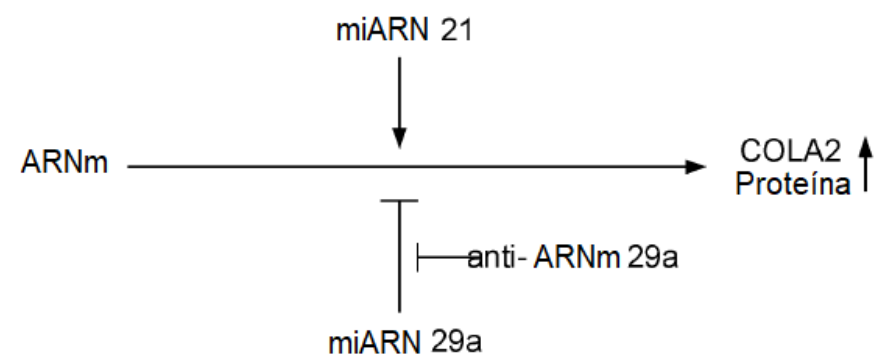


FIG. 4

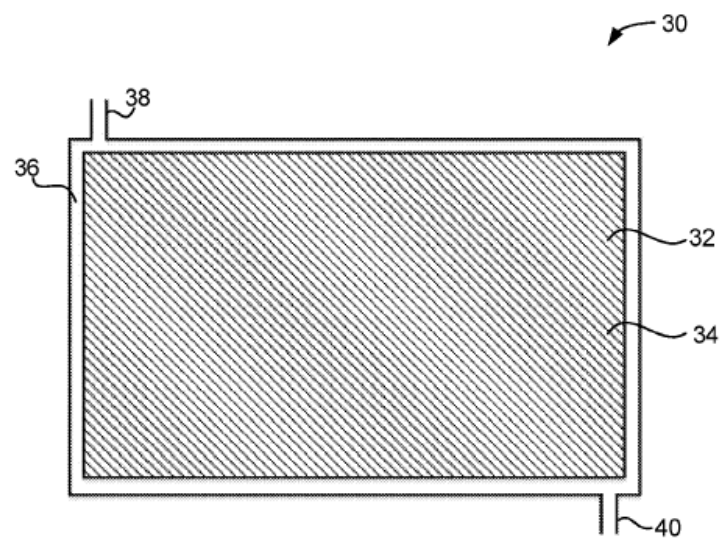


FIG. 5

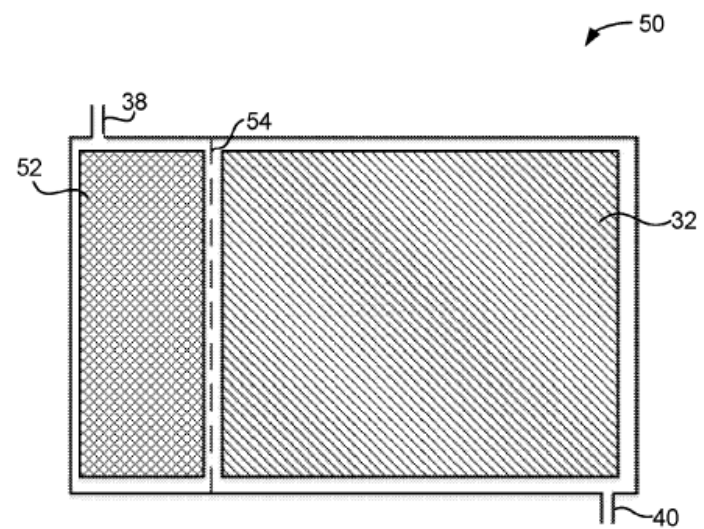


FIG. 6

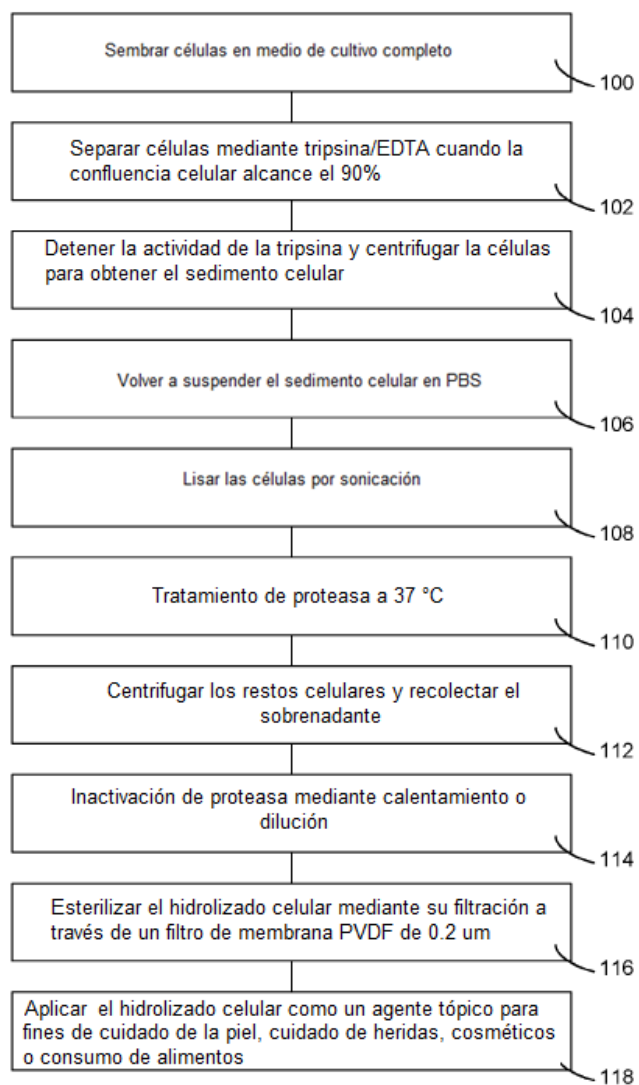


FIG. 7

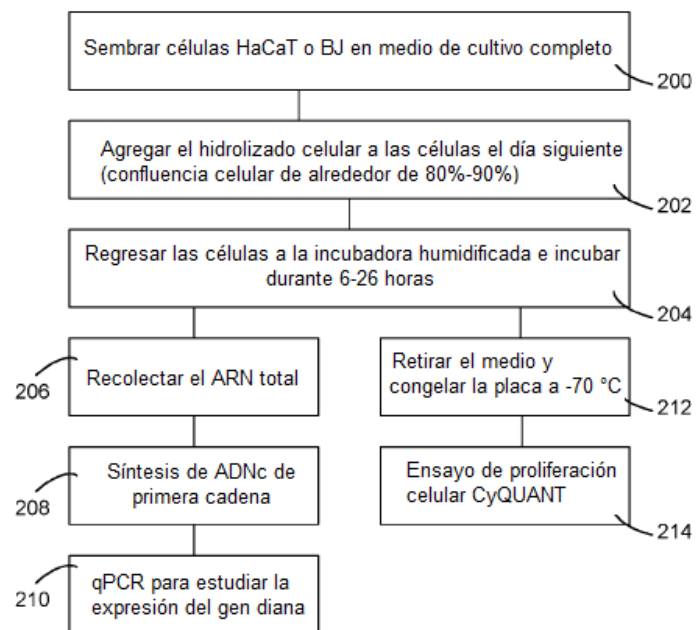


FIG. 8

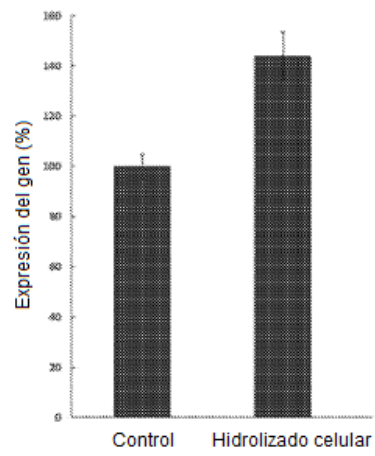


FIG. 9