

DERIVACIÓ DE LÍNIES DE CÈL·LULES MARE EMBRIONÀRIES A PARTIR DE BLASTÒMERS AÏLLATS

SHEYLA GONZÁLEZ, NUNO COSTA-BORGES, ELENA IBÁÑEZ I JOSEP SANTALÓ

*Departament de Biologia Cel·lular, Fisiologia i Immunologia, Unitat de Biologia Cel·lular,
Universitat Autònoma de Barcelona.*

Adreça per a la correspondència: Sheyla González. Unitat de Biologia Cel·lular,
Facultat de Biociències, Universitat Autònoma de Barcelona. Campus de Bellaterra.
08193 Bellaterra. Adreça electrònica: sheyla.gonzalez@uab.cat.

RESUM

La derivació de cèl·lules mare embrionàries (ESC) s'ha fet tradicionalment a partir de la massa cel·lular interna (ICM) de l'embrió en estadi de blastocist. Però aquesta estratègia, que comporta la destrucció de l'embrió, ha generat un intens debat ètic en el cas de l'espècie humana. En aquest sentit, diferents grups han intentat establir ESC a partir de blastòmers aïllats d'estadis embrionaris previs al blastocist. Però les dades són encara escasses i les freqüències de derivació fins al moment són relativament baixes. En aquest treball es pretén fer una revisió de l'estat de l'establiment de línies d'ESC a partir de cèl·lules aïllades i presentar els resultats de la comparació de tres mètodes de derivació. En el nostre estudi s'han derivat ESC a partir de blastòmers procedents d'embrions de ratolí 129/SV × C57Bl/6 F1 en estadis de quatre i vuit cèl·lules. També es van fer servir embrions en estadi de mòrula i blastocist, aquest últim emprat com a control positiu. Els resultats obtinguts han permès determinar que el mètode de derivació més eficient és el mètode de cultiu en medi definit, i que existeix una important influència de l'estadi embrionari i del nombre de blastòmers aïllats en cadascun dels mètodes emprats.

Paraules clau: ESC, massa cel·lular interna, blastocist, blastòmers.

DERIVATION OF EMBRYONIC STEM CELL LINES FROM ISOLATED BLASTOMERES

SUMMARY

Embryonic stem cells (ESC) are usually derived from the inner cell mass (ICM) of an embryo at the blastocyst stage. However, this strategy involves the destruction of the embryo

and has generated a great controversy in the case of the human species. In this sense, different groups have tried to derive ESC from isolated blastomeres of embryonic stages previous to blastocyst. But there is still very few data and the frequencies of ESC derivation obtained until now are low. In this study we present a review about the status of ESC derivation from isolated blastomeres and we report the results obtained with three methods of derivation. ESC lines have been derived from 4- and 8-cell SV129 × C57Bl/6 F1 mouse blastomeres. Morula and blastocyst stages were also used, the later as a positive control. Results obtained have allowed us to determine that the most efficient method is the culture in defined medium and that there is an important influence of the embryonic stage and the number of isolated blastomeres on the derivation of ESC by the three methods applied.

Key words: ESC, inner cell mass, blastocyst, blastomeres.

INTRODUCCIÓ

S'ha proposat que les cèl·lules mare (*stem cells*, SC) poden tenir un paper crucial per reconstituir teixits o òrgans danyats, per produir fragments d'òrgans o fins i tot òrgans sencers *ex vivo*. Existeixen diferents tipus de SC, que es distingeixen segons el seu potencial de diferenciació.

En els mamífers es considera que el zigot i els blastòmers dels estadis embrionaris més primerencs són totipotents, és a dir, tenen la capacitat de generar tots els tipus cel·lulars de l'organisme, incloent-hi teixit extraembrionari. Per contra, les cèl·lules mare embrionàries (ESC) de ratolí derivades a partir de la massa cel·lular interna (ICM) de l'embrió en estadi de blastocist es consideren pluripotents, ja que poden donar lloc a teixits de l'embrió *in vivo* i *in vitro*, però no poden produir teixit extraembrionari. Aquest fet s'ha demostrat en experiments de formació de quimeres per la incapacitat de les ESC de ratolí, a diferència de les humanes, per colonitzar el trofocoderm en ser injectades en el blastocist, i és que el trofocoderm en ratolí es forma simultàniament o fins i tot abans que la ICM del blastocist. D'altra banda, les cèl·lules mare adultes (ASC) poden ser multipotents o unipotents. Les ASC multipotents tenen l'habilitat de formar múltiples tipus cel·lulars

provinents d'un llinatge cel·lular amb una funció específica, ja sigui endoderma, mesoderma o ectoderma. En són un exemple les cèl·lules mare hematopoètiques. En canvi, les cèl·lules mare unipotents només poden donar lloc a un tipus cel·lular concret d'un llinatge cel·lular, com per exemple les cèl·lules epitelials intestinals.

La utilització de cèl·lules somàtiques indiferenciades com a font d'ASC s'ha considerat com a possible substitució a l'ús d'embrions per a la producció d'ESC. Però existeixen substancials problemes amb la manipulació de les ASC. Les SC de teixits adults són difícils d'aïllar, de caracteritzar i tenen una plasticitat o potencialitat limitada, és a dir, no poden donar lloc a tots els teixits de l'embrió.

A causa de la seva elevada capacitat d'autorenovació i del gran potencial regeneratiu, les ESC, en especial, han generat molt interès com a model en biologia del desenvolupament i, a més, es consideren una nova alternativa en el camp de la medicina regenerativa. El fet que tinguin una capacitat il·limitada d'autorenovació fa que puguin proliferar indefinidament sense entrar en senescència. Són cèl·lules sense funcions especialitzades i que, per tant, es troben en un estat indiferenciat i, a més, poden donar lloc a diferents tipus cel·lulars de les tres capes embrionàries i fins i tot a teixit extraem-

brionari, en el cas de les ESC humanes, en un procés anomenat *diferenciació*.

A començaments dels anys vuitanta es va desenvolupar la primera tècnica d'establiment d'ESC pluripotents a partir d'embrions de ratolí (Evans i Kaufman, 1981; Martin, 1981). Aquesta tècnica consistia a cocultivar les cèl·lules de la ICM de l'embrió amb fibroblasts de ratolí de la línia STO inactivats amb mitomicina C (*feeder cells*). Des de llavors hi ha hagut nombrosos grups que han aconseguit derivar ESC a partir de la ICM d'embrions de ratolí (Brook i Gardner, 1997) i humans (Thomson *et al.*, 1998) en estadi de blastocist, però aquesta pràctica produeix ESC que no són totipotents. A més, ha generat una gran controvèrsia ètica, ja que per obtenir-les és necessari destruir l'embrió a partir del qual deriven.

Paral·lelament es va iniciar l'establiment de les línies d'ESC a partir d'estadis embrionaris previs al blastocist. Així, Eistetter (1989) va desenvolupar línies d'ESC de ratolí a partir de l'estadi embrionari de mòrula. Delhaise *et al.* (1996) també van establir línies d'ESC de ratolí, però en aquest cas a partir d'embrions en estadi de vuit cèl·lules. Tesar (2005) va derivar ESC de ratolí a partir de diferents estadis embrionaris previs al blastocist, i va introduir una variació en el mètode de derivació. Finalment, pel que fa a ESC humanes, Strelchenko *et al.* (2004) van aconseguir desenvolupar per primer cop línies d'ESC a partir d'embrions en estadi de mòrula.

D'altra banda, diferents grups han intentat derivar ESC a partir de blastòmers aïllats (Chung *et al.*, 2005, 2008; Klimanskaya *et al.*, 2006; Wakayama *et al.*, 2007). Ara bé, encara no se sap quin és el nombre mínim de blastòmers que s'han d'aïllar per tenir una eficiència raonable d'obtenció de línies estables d'ESC, ja que en la majoria d'estudis les freqüències encara són relativament baixes. A més, també seria necessari determinar quin

és l'estadi embrionari més eficient i les condicions tècniques i de cultiu més adients.

Generació d'ESC a partir de blastòmers aïllats

La producció d'ESC a partir de blastòmers aïllats sorgeix en resposta al debat ètic i moral suscitat arran de la utilització d'embrions sencers per derivar ESC i es basa en els coneixements sobre les tècniques de diagnòstic genètic preimplantacional. En aquest tipus d'estudis es retiren un o dos blastòmers de l'embrió de 6-8 cèl·lules per a l'anàlisi, i la resta de l'embrió es desenvolupa *in vitro* normalment fins a la transferència (Veiga *et al.*, 1994). És un fet ben conegut que la retirada d'un nombre reduït de blastòmers de l'embrió preimplantacional humà no n'afecta la viabilitat ni la capacitat d'implantació, sempre que aquest nombre es mantingui dins d'uns límits raonables (Parriego *et al.*, 2003). D'altra banda, se sap que l'embrió humà és viable i capaç de portar a terme un embaràs normal sempre que es mantingui com a mínim la meitat de l'embrió intacte (Veiga *et al.*, 1987).

Atès que l'eficiència de derivació de les ESC a partir de blastòmers aïllats és més baixa que a partir d'embrions sencers, en els darrers anys s'ha intentat determinar quines són les condicions més favorables perquè aquestes línies es mantinguin en un estat indiferenciat *in vitro*, de manera que es pugui incrementar així la seva eficiència de derivació. Concretament, s'han introduït variacions en el cultiu i en la tècnica de derivació respecte al mètode tradicional de cultiu d'ESC en un medi suplementat amb FCS i factor inhibidor de la leucèmia (LIF), que impedeix la diferenciació espontània de les ESC (Eistetter, 1989).

Així, l'any 2005 Chung *et al.* van descriure un mètode consistent a agrupar els

blastòmers aïllats d'embrions de ratolí amb ESC preexistents marcades amb proteïna fluorescent verda (*green fluorescent protein*, ESC-GFP). Posteriorment, Klimanskaya *et al.* (2006) van derivar línies d'ESC humanes a partir de blastòmers aïllats en un medi condicionat per factors procedents d'ESC preexistents però sense que es produïssin contactes entre aquests. Wakayama *et al.* (2007) han derivat ESC de ratolí amb una altra variació en el mètode de cultiu que fa més eficient la derivació. Concretament, substitueixen el sèrum fetal boví (FCS) per *knockout serum replacement* (KSR) al medi de cultiu, ja que el primer conté factors diferenciadors, com per exemple el complement, que fan perdre la pluripotència de les ESC. També introdueixen l'hormona adenocorticotropa (ACTH), que afavoreix el cultiu a partir d'un únic blastòmer i d'una sola ESC sense perdre la pluripotència. Aquest mètode ha donat eficiències de derivació fins i tot més elevades que l'agregació amb ESC preexistents. Recentment, Chung *et al.* (2008) han comparat l'eficiència de derivació de línies d'ESC humanes a partir de l'agregació de blastòmers amb ESC-GFP i a partir de blastòmers aïllats cultivats en un medi que conté laminina i fibronectina. Arriben a la conclusió que en la derivació de les línies és més important l'addició de laminina i que, per tant, el cocultiu amb ESC-GFP no és essencial. Es considera que la laminina interromp les unions estretes i despolaritza les cèl·lules, de manera que fa que les ESC que s'estan formant assumeixin un fenotip d'ICM, i s'evita així la derivació envers trofectorma. Una altra alternativa introduïda recentment és la utilització de medis definits que, a més, eliminen la necessitat d'emprar *feeder cells* en cocultiu amb les ESC (Ying *et al.*, 2003). Aquests nous medis també permetrien eliminar la variabilitat de factors aportats per les *feeder cells* que no podem contro-

lar i que podrien estar afavorint la diferenciació.

Un altre aspecte important en la derivació a partir de cèl·lules aïllades i que encara és poc conegut és la competència dels blastòmers individuals procedents d'estadis embrionaris primerencs. Diferents estudis semblen indicar que només un dels dos blastòmers de l'embrió de dues cèl·lules de ratolí és capaç de portar a terme un desenvolupament normal i donar lloc a un nou individu (Papaioannou *et al.*, 1989). Durant molts anys s'han considerat els blastòmers d'estadis embrionaris primerencs com a pluripotents, i no com a totipotents. La qüestió actual és si el desenvolupament d'un blastòmer concret dona lloc a massa cel·lular interna o trofectorma. Se sap que en l'estadi de dues cèl·lules una contribueix més a la part embrionària del blastocist i l'altra cèl·lula a la part extraembrionària (Gardner, 2001; Fujimori *et al.*, 2003). A més, la localització dels blastòmers en l'estadi de quatre cèl·lules també s'ha determinat com a un factor important en el destí envers la ICM o el trofectorma (Piotrowska-Nitsche *et al.*, 2005). Així, diferències en la posició dels blastòmers en l'estadi de dues i quatre cèl·lules podrien estar indicant el futur destí dels blastòmers envers ICM o trofectorma ja en estadis primerencs del desenvolupament.

Tenint en compte que només una part dels blastòmers poden contribuir a la derivació, les freqüències de derivació a partir d'embrions en estadis primerencs són baixes. La recent derivació de línies d'ESC a partir de l'estadi de dues cèl·lules per part de Wakayama *et al.* (2007), amb una eficiència d'aproximadament el 50 %, suggereix que només un dels dos blastòmers contribueix a l'establiment. Així, concretament en l'estadi de dues cèl·lules, és molt important determinar si la biòpsia a l'atzar d'un blastòmer per derivar les línies d'ESC pot com-

prometre la viabilitat de l'embrió del qual procedeix, o si, per contra, tots els blastòmers són equivalents pel que fa al seu potencial de desenvolupament.

En el nostre laboratori estem treballant en el desenvolupament d'ESC de ratolí a partir de blastòmers aïllats d'estadis embrionaris previs a blastocist utilitzant tres mètodes diferents de derivació que combinen variacions en les condicions i en la tècnica de cultiu. Amb això pretenem incrementar la pluripotencialitat, millorar el rendiment i les capacitats regeneratives de les línies obtingudes i evitar la destrucció d'embrions, fet especialment important en parlar d'embrions humans.

A més, també volem estudiar la influència del nombre de blastòmers aïllats i de l'estadi embrionari en l'establiment de les línies d'ESC.

COMPARACIÓ DE TRES MÈTODES DE DERIVACIÓ D'ESC

La derivació de les ESC es va portar a terme a través d'embrions procedents de l'encreuament de femelles 129/Sv amb mascles C57Bl/6, que van ser cultivats *in vitro* fins que van assolir els estadis de quatre i vuit cèl·lules, moment en el qual es va procedir a aïllar els blastòmers mitjançant biòpsia embrionària per micromanipulació (vegeu la figura 1). La derivació també es va portar a terme a partir d'embrions sencers en estadi de mòrula i blastocist, aquest últim emprat com a control positiu de la derivació.

En el primer mètode de derivació, el mètode estàndard, es van emprar les condicions estàndards de cultiu d'ESC. Els blastòmers aïllats, mòrules o blastocists, se sembraren sobre una monocapa de *feeder cells* procedents de la inactivació de la línia STO de fibroblasts de ratolí amb mitomicina C i es van cultivar en *Dulbecco's modified Eagle's medium* (DMEM), suplementat amb FCS i LIF.

A partir d'aquest mètode s'han establert un total de vint-i-sis colònies d'ESC amb cent setanta-tres embrions (15 %). En tots els mètodes les ESC han estat caracteritzades en primera instància morfològicament, i, posteriorment, per immunofluorescència mitjançant la detecció dels marcadors d'indiferenciació Oct4, Sox2 i Nanog. Entre les colònies amb una morfologia típica d'ESC obtingudes amb el mètode estàndard, un 81,3 % van resultar positives per als tres marcadors (vegeu la figura 2).

Pel que fa a la influència de l'estadi embrionari en aquest mètode de derivació, s'ha vist que existeixen diferències estadísticament significatives en comparar l'eficiència de derivació de les ESC procedents de l'estadi de quatre cèl·lules respecte de les que provenen de l'estadi de vuit cèl·lules ($P = 0,025$, test de la χ^2 ; valors significatius,

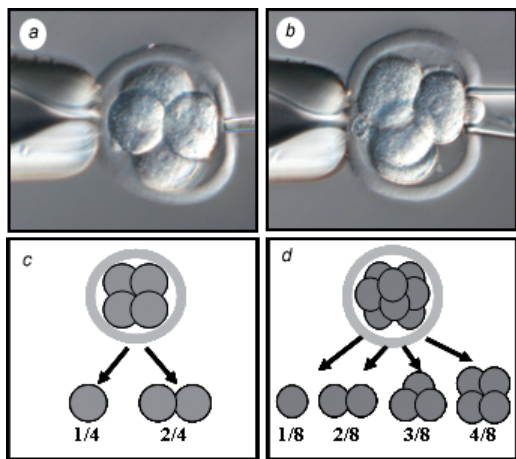


FIGURA 1. *a-b*) Biòpsia embrionària d'un blastòmer en l'estadi de quatre cèl·lules. *c-d*). Grups de blastòmers a partir dels quals es va portar a terme la derivació de les ESC en l'estadi de quatre i vuit cèl·lules, respectivament.

$P < 0,05$). A més, s'ha pogut observar que la derivació és més eficient a partir de l'estadi de mòrula en comparació d'estadis previs a la compactació ($P = 0,004$ per a la comparació amb l'estadi de quatre cèl·lules i $P = 0,016$ amb l'estadi de vuit cèl·lules). En canvi, no s'han observat diferències significatives en comparar l'estadi de vuit cèl·lules o de mòrula amb el de blastocist, emprat com a control positiu en la derivació de les ESC.

Quant al nombre de blastòmers aïllats, en l'estadi de quatre cèl·lules no s'han observat diferències significatives en aïllar una o dues cèl·lules. En l'estadi de vuit cèl·lules, en canvi, s'observa que a mesura que augmenta el nombre de blastòmers aïllats, incrementa significativament l'eficiència de derivació fins a arribar al grup de 3/8 ($P = 0,05$ respecte el grup de 2/8). Els resultats d'aquest mètode es mostren a la figura 3.

El segon mètode de derivació emprat va ser el mètode d'adhesió prèvia de blastòmers, en el qual els blastòmers aïllats, mòrules o blastocists van ser adherits a la placa de cultiu mitjançant una incubació amb

una solució sense proteïnes, i posteriorment es va introduir la suspensió de *feeder cells*. El medi de cultiu emprat per a aquest mètode va ser el mateix que per al mètode anterior.

Amb aquest mètode s'han establert un total de dinou colònies a partir de cent trenta-vuit embrions (13,8 %). Per immunofluorescència han resultat positives un 82,6 % d'aquestes colònies.

A diferència de l'anterior mètode, no es van detectar diferències significatives en l'eficiència de derivació fins a l'estadi de mòrula, de manera que no s'observa un efecte tan progressiu en l'augment de l'eficiència de derivació a partir de l'estadi de quatre o vuit cèl·lules. Així, veiem com apareixen diferències significatives en comparar l'eficiència en quatre cèl·lules respecte de mòrula i blastocist ($P = 0,0431$ i $P = 0,0117$, respectivament) i el mateix per a l'estadi de vuit cèl·lules ($P = 0,0234$ i $P = 0,0052$, respectivament). Com en el mètode anterior, l'estadi de mòrula tampoc no ha mostrat una eficiència significativament diferent de l'estadi control de blastocist.

Pel que fa al nombre de blastòmers aïllats, no s'han trobat diferències en aïllar un o dos blastòmers d'embrions de quatre cèl·lules ni tampoc en comparar els diferents grups de blastòmers en l'estadi de vuit cèl·lules. Malgrat això, es pot veure que tant en l'estadi de quatre com en el de vuit cèl·lules, en els grups amb un nombre de cèl·lules més reduït apareixen diferències significatives en comparar els percentatges de derivació respecte l'estadi de mòrula i l'estadi control de blastocist (1/4 vs. mòrula, $P = 0,018$; 1/4 vs. blastocist, $P = 0,004$; 1/8 vs. mòrula, $P = 0,025$; 1/8 vs. blastocist, $P = 0,007$; 2/8 vs. mòrula, $P = 0,04$; 2/8 vs. blastocist, $P = 0,032$). Els resultats d'aquest mètode es poden observar a la figura 4.

L'últim mètode d'establiment de línies d'ESC provat va ser el mètode de cultiu en

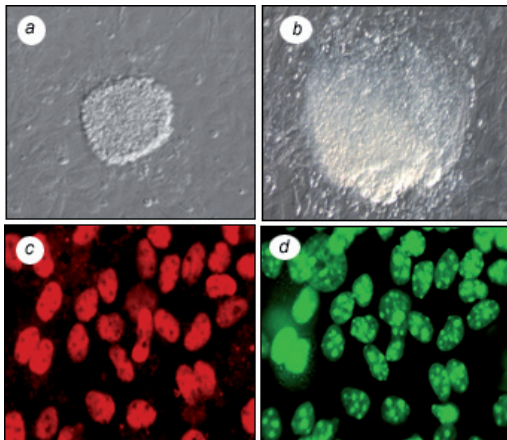


FIGURA 2. a-b) Exemples de colònies d'ESC derivades a partir dels grups de 2/8 i 4/8 respectivament. c-d) ESC positives per a la detecció de Sox2 i Oct4, respectivament.

medi definit. Aquest mètode va ser desenvolupat de la mateixa manera que el mètode estàndard, però es van introduir canvis en les condicions de cultiu per tal d'augmentar l'eficiència de derivació de les ESC. Concretament, el medi DMEM es va suplementar amb LIF, KSR i l'hormona ACTH.

Amb aquest mètode s'han establert un total de cinquanta-cinc colònies a partir de cent cinquanta embrions (36,7 %). Per immunofluorescència han resultat positives un 98,2 % de les colònies amb una morfologia típica d'ESC.

Respecte a la influència de l'estadi embrionari en aquest mètode, no s'han observat diferències significatives en comparar l'estadi de quatre cèl·lules amb el de vuit a l'ho-

ra de derivar les línies d'ESC. En canvi, la derivació es torna més eficient en emprar embrions a l'estadi de mòrula, ja que existeixen diferències en comparar aquest estadi amb el de quatre cèl·lules ($P = 0,032$) i amb el de vuit cèl·lules ($P = 0,008$). No s'observa un increment en l'eficiència de derivació de les línies en fer servir embrions en l'estadi control de blastocist respecte a l'estadi de mòrula.

Pel que fa al nombre de cèl·lules aïllades, no es detecten diferències significatives en aïllar un o dos blastòmers en l'estadi de quatre cèl·lules. Tampoc no s'han trobat diferències significatives en comparar els diferents grups d'aïllament en l'estadi de vuit cèl·lules, malgrat que s'observa una tendèn-

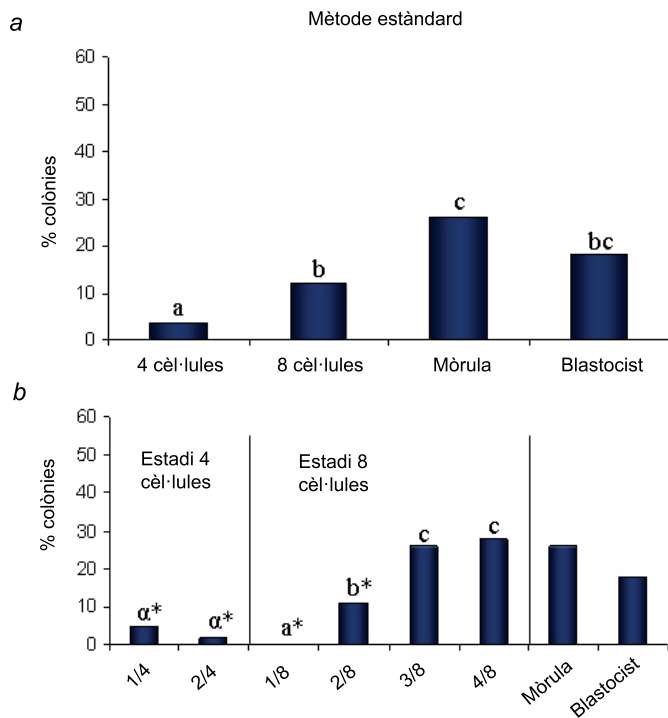


FIGURA 3. Resultats del mètode estàndard. Influència de l'estadi embrionari (a) i del nombre de blastòmers aïllats (b) en l'eficiència de derivació de les ESC. L'asterisc indica diferències significatives respecte a la derivació a partir d'embrions sencers (mòrula i blastocist).

cia a l'augment de l'eficiència de derivació amb un major nombre de blastòmers aïllats. Així, tant en l'estadi de quatre com de vuit cèl·lules, en comparar els grups amb menys nombre de blastòmers amb els estadis embrionaris de mòrula i blastocist apareixen diferències que en alguns casos són extremadament significatives (1/4 *vs.* mòrula, $P = 0,012$; 1/4 *vs.* blastocist, $P = 0,012$; 1/8 *vs.* mòrula, $P = 0,0008$; 1/8 *vs.* blastocist, $P = 0,0008$; 2/8 *vs.* mòrula, $P = 0,003$; 2/8 *vs.* blastocist, $P = 0,003$). Els resultats d'aquest mètode es poden observar a la figura 5.

Així, a partir d'aquest treball es confirma la possibilitat de desenvolupar línies d'ESC de ratolí a partir de blastòmers aïllats d'estadis embrionaris previs a la formació del

blastocist fent servir els tres mètodes d'establiment d'ESC descrits. L'excepció la constituïria el grup d'1/8 en el mètode estàndard, en el qual no s'ha aconseguit obtenir cap línia i que, en general, té una eficiència baixa de derivació. S'han establert línies d'ESC en estadis premòrula amb eficiències relativament elevades, que oscillen entre l'1,9 % i el 48 %.

Des que a mitjan dècada dels anys noranta Delhaise *et al.* (1996) van descriure per primera vegada l'establiment d'una línia d'ESC de ratolí a partir de blastòmers aïllats, diferents grups han intentat establir línies per incrementar el rendiment del procés. Aquests autors van aconseguir establir una única línia a partir de l'estadi de

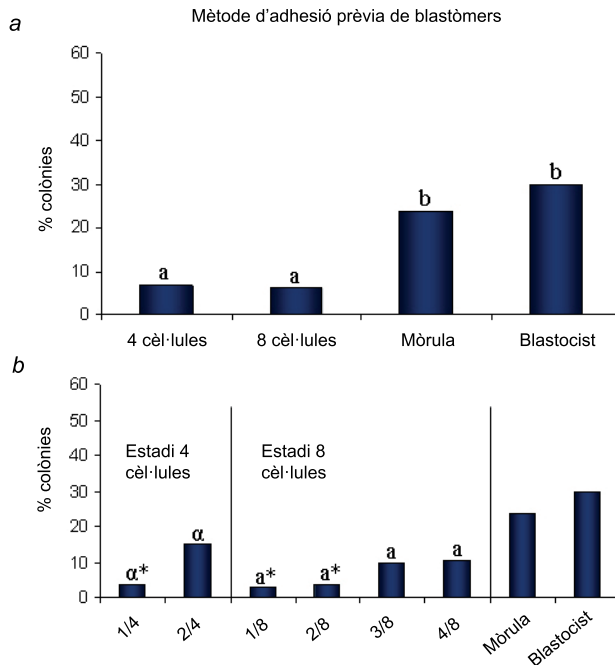


FIGURA 4. Resultats del mètode d'adhesió prèvia de blastòmers. Influència de l'estadi embrionari (a) i del nombre de blastòmers aïllats (b) en l'eficiència de derivació de les ESC. L'asterisc indica diferències significatives respecte a la derivació a partir d'embrions sencers (mòrula i blastocist).

vuit cèl·lules separant els blastòmers per disgregació amb una eficiència de derivació d'un 1,9 %. La línia, però, no va contribuir a la línia germinal dels animals químerics obtinguts per injecció de les ESC a la cavitat del blastocist. Això va posar de manifest, ja en aquell any, que l'establiment de línies d'ESC a partir de blastòmers aïllats no era senzill. En el nostre treball no s'ha aconseguit derivar cap línia a partir del grup d'1/8 pel mètode estàndard, que constituiria l'equivalent als experiments de Delhaise *et al.* És més, en general la tendència per a aquest grup és d'obtenir unes eficiències de derivació baixes (3 % per al mètode d'adhesió prèvia i 4 % per al mètode de cultiu en medi definit).

Malgrat això, s'ha observat que en augmentar el nombre de blastòmers aïllats incrementa de cop l'eficiència de derivació, i ja amb dos blastòmers aïllats (2/8) s'arriba fins a un 11,1 %, molt superior a la trobada de Delhaise *et al.* S'hauran de portar a terme més experiments per determinar el perquè de la baixa eficiència del grup d'1/8, ja que sembla que només el fet del nombre baix de blastòmers no sigui suficient per explicar-ho, tenint en compte que el grup d'1/4 mostra una eficiència relativament elevada amb un únic blastòmer. Els factors que podrien estar-hi involucrats podrien ser, entre d'altres, l'adhesió (Chung *et al.*, 2008) i la comunicació (Todorova *et al.*, 2008) entre blastòmers. Relacionat amb això, els resul-

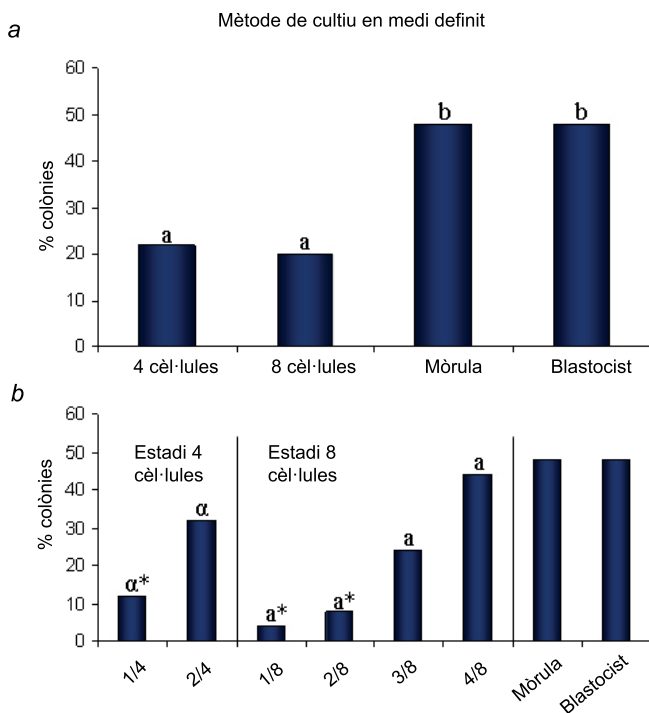


FIGURA 5. Resultats del mètode de cultiu en medi definit. Influència de l'estadi embrionari (a) i del nombre de blastòmers aïllats (b) en l'eficiència de derivació de les ESC. L'asterisc indica diferències significatives respecte a la derivació a partir d'embrions sencers (mòrula i blastocist).

tats preliminars al nostre laboratori mostren que el grup d'1/8 té una eficiència de derivació més baixa, ja que la majoria dels blastòmers aïllats no són capaços de dividir-se en cultiu.

L'any 2005 Tesar va introduir un nou mètode d'establiment de línies d'ESC de ratolí, amb el qual va aconseguir augmentar molt l'eficiència de derivació, en especial a partir de l'estadi de mòrula, mitjançant l'adhesió prèvia al substrat. Quan les mòrules s'adherien, l'eficiència augmentava fins al 48 %, molt superior a la tècnica estàndard de cocultiu dels blastocists amb les FSTO (25 %). Tesar suggereix que l'adhesió inicial de les mòrules al substrat fa que el contacte posterior amb les FSTO es produeixi més ràpidament, de manera que la influència indiferenciadora de les FSTO es veuria potenciada abans. Malgrat tot, Tesar només va poder aplicar la seva nova tècnica a l'estadi de mòrula, mentre que per als estadis de quatre i vuit cèl·lules va observar que no s'adherien fins que no assolien l'estadi equivalent a mòrula. A diferència de Tesar, utilitzant el mètode d'adhesió prèvia de blastòmers nosaltres hem aconseguit fixar els blastòmers del estadis embrionaris de quatre i vuit cèl·lules a la placa de cultiu, i hem obtingut eficiències de derivació variables en funció de l'estadi embrionari i del nombre de blastòmers emprats (3-15 %). A més, també hem adherit mòrules però, en aquest cas, amb una eficiència de derivació inferior a la trobada per Tesar (23,8 %), tot i que superior a l'eficiència de la tècnica estàndard de cocultiu dels blastocists amb les FSTO (18,1 %). Per tant, emprant aquest mètode de derivació hem aconseguit augmentar l'eficiència de derivació d'alguns grups, però aquestes diferències no són significatives per a cap dels grups analitzats, i això suggereix que aquesta adhesió prèvia dels blastòmers no aportaria grans beneficis.

No ha estat fins recentment que Waka-

yama *et al.* (2007) han desenvolupat el nou mètode de cultiu d'ESC en un medi definit. Van obtenir freqüències elevades de derivació a partir d'un blastòmer en estadis de dues cèl·lules (69 %), quatre cèl·lules primerencs (40 %) i tardà (22 %) i vuit cèl·lules (14 %). Cal destacar que en els nostres experiments a partir del mètode de cultiu en medi definit no s'han derivat ESC a partir de l'estadi de dues cèl·lules. En canvi, en l'estadi de quatre cèl·lules, l'eficiència trobada per al grup d'1/4 ha estat d'un 12 %. No s'ha tingut en compte si l'estadi de quatre cèl·lules era de fases primerencs o més tardanes en el desenvolupament, la qual cosa pot haver fet disminuir l'eficiència global tenint en compte que els autors, com es pot observar, troben l'eficiència més gran en estadis més primerencs. En l'estadi de vuit cèl·lules, Wakayama *et al.* obtenen una eficiència del 14 %, mentre que en els nostres experiments ha estat del 4 %, eficiència que continua sent baixa en coherència amb la trobada amb la resta de mètodes de derivació emprats.

Wakayama *et al.*, a partir de l'anàlisi dels seus resultats, troben una eficiència major de derivació d'ESC en estadis més primerencs del desenvolupament. Ja que alguns autors apunten al fet que la diferenciació en el procés d'embriogènesi comença ja en l'estadi de 2-4 cèl·lules (Gardner, 2001), seria lògic pensar que els estadis més primerencs tindrien una major eficiència a l'hora de produir ESC, mentre que els estadis més tardans tindrien una major tendència a diferenciar i, per tant, l'obtenció de línies d'ESC es produiria menys eficientment. De tota manera, la tendència en tots els experiments d'establiment de línies d'ESC és obtenir la major eficiència de derivació en l'estadi de blastocist i, per tant, aquesta premissa només seria certa per als estadis previs a la compactació; a més, s'ha de tenir en compte que la visió tradicional sempre havia estat que el primer succés de di-

ferenciació es posava de manifest a partir dels estadis de 8-16 cèl·lules. Per tant, aquest és un aspecte encara desconegut i d'actiu debat en el camp de la derivació d'ESC. La tendència trobada per Wakayama *et al.* és contrària a la dels nostres experiments amb el mètode de cultiu en medi definit i, també, a la resta de mètodes de derivació emprats en el treball. Malgrat que no s'han trobat diferències significatives entre els estadis de quatre i vuit cèl·lules, en l'estadi de mòrula es pot apreciar com el percentatge de derivació incrementa substancialment. Això podria estar suggerint que l'eficiència augmenta a mesura que avança el desenvolupament embrionari, malgrat que no es pot descartar que sigui l'efecte d'utilitzar embrions sencers en l'estadi de mòrula i blastocist per a la derivació. Així, nosaltres proposem que existeix una forta influència del nombre de blastòmers aïllats, ja que per a grups de derivació equivalents pel que fa al percentatge del volum embrionari, com 1/4 *vs.* 2/8 i 2/4 *vs.* 4/8, en general, tenen més eficiència els grups en els quals se sembren més blastòmers, malgrat que, com s'ha apuntat, també existeix influència de l'estadi, que és major en estadis més avançats. Aquest augment en l'eficiència amb un nombre major de blastòmers podria ser conseqüència de fenòmens d'adhesió o de comunicació entre blastòmers adjacents.

Pel que fa a la comparació dels tres mètodes de derivació descrits, s'ha pogut observar que el mètode que aporta una major eficiència a l'hora de derivar les línies d'ESC és el mètode de cultiu en medi definit. Concretament, hem trobat diferències significatives entre mètodes per als estadis de quatre, vuit cèl·lules i blastocist, i per als grups de blastòmers de 2/4 i 4/8. La resta de grups no han experimentat diferències significatives; per tant, per derivar ESC a partir d'aquests grups es podria fer ser-

vir indistintament qualsevol dels mètodes descrits.

En resum, pel que fa a la influència de l'estadi embrionari en la derivació de les línies d'ESC a partir de blastòmers aïllats, en el mètode estàndard s'observa que l'eficiència augmenta a mesura que avança el desenvolupament embrionari. No obstant això, en els altres dos mètodes de derivació emprats no s'observa un efecte tan progressiu com en el mètode anterior, sinó que només existeixen diferències significatives entre estadis pre i postcompactació. Pel que fa a la influència que comporta el nombre de blastòmers aïllats, s'observa que, per als tres mètodes de derivació emprats, l'eficiència augmenta a mesura que s'incrementa el nombre de blastòmers aïllats, tant en l'estadi de quatre com en el de vuit cèl·lules. Es considera que com més blastòmers se sembren més contactes i comunicació s'estableixen entre aquests, i això podria afavorir l'establiment de les línies d'ESC, tal com s'ha comentat anteriorment. En qualsevol cas, serà necessària més recerca per confirmar aquest fet.

AGRAÏMENTS

Aquest treball s'ha realitzat amb el finançament dels projectes MEC #BIO 2005-04341 i #BIO2006-11792, el projecte DGR #2005SGR-0047 i les beques MEC FPU AP2006-02038 i FCT portuguesa.

BIBLIOGRAFIA

- ALARCÓN, V. B.; MARIKAWA, Y. (2003). «Deviation of the blastocyst axis from the first cleavage plane does not affect the quality of mouse postimplantation development». *Biology of Reproduction*, 69: 1208-1212.
- ALLEGRUCCI, C.; YOUNG, L. E. (2007). «Differences be-

- tween human embryonic stem cell lines». *Human Reproduction*, 13: 103-120.
- BAHIA, A.; TAKEUCHI, T.; TANAKA, N.; NERI, Q. V.; ROSENWAKS, Z.; PALERMO, G. D. (2005). «Examination of individual blastomeres as a source of stem cells». *Human Reproduction*, 20: 16-17.
- BIGGERS, J.; MCGUINNIS, L. K.; RAFFIN, M. (2000). «Amino acids and preimplantation development of the mouse in the protein-free KSOM». *Biology of Reproduction*, 63: 281-293.
- BONGSO, A. (2004). «History and perspective of stem cell research». *Best Practice and Research Clinical Obstetrics and Gynaecology*, 18: 827-842.
- BRADLEY, A.; EVANS, M.; KAUFMAN, M. H.; ROBERTSON, E. (1984). «Formation of germline chimeras from embryo-derived teratocarcinoma cell-lines». *Nature*, 309: 255-256.
- BROOK, F. A.; GARDNER, R. L. (1997). «The origin and efficient derivation of embryonic stem cells in the mouse». *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 94: 5709-5712.
- CHAMBERS, I. (2004). «The molecular basis of pluripotency in mouse embryonic stem cells». *Cloning and stem cells*, 6: 386-391.
- CHUNG, Y.; KLIMANSKAYA, I.; BECKER, S.; LI, T.; MASERATI, M.; LU, S. J.; ZDRAVKOVIC, T.; ILIC, D.; GENBACEV, O.; FISHER, S.; KRTOLOVA, A.; LANZA, R. (2008). «Human embryonic stem cell lines generated without embryo destruction». *Cell Stem Cell Correspondence*. [En premsa]
- CHUNG, Y.; KLIMANSKAYA, I.; BECKER, S.; MARH, J.; LU, S. J.; JOHNSON, J.; MEISNER, L.; LANZA, R. (2005). «Embryonic and extraembryonic stem cell lines derived from single mouse blastomeres». *Nature*, 439: 216-219.
- DELHAISE, F.; BRALION, V.; SCHUURBIERS, N.; DESSY, F. (1996). «Establishment of an embryonic stem cell line from 8-cell stage mouse embryos». *European Journal of Morphology*, 34: 237-243.
- EDWARDS, B.; HANSIS, C. (2005). «Initial differentiation of blastomeres in 4-cell human embryos and its significance for early embryogenesis and implantation». *Reproductive Biomedicine Online*, 11: 206-218.
- EISTETTER, H. R. (1989). «Pluripotent embryonic stem cell lines can be established from disaggregated mouse morulae». *Developmental Growth & Differentiation*, 31: 275-282.
- EVANS, M. J.; KAUFMAN, M. H. (1981). «Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos». *Nature*, 292: 154-156.
- FONG, C. Y. (2006). «Unsuccessful derivation of human embryonic stem cell lines from pairs of human blastomeres». *Reproductive Biomedicine Online*, 13: 295-300.
- FRIEL, R.; SAR, S. VAN DER; MEE, P. (2005). «Embryonic stem cells: understanding their history, cell biology and signalling». *Advanced Drug Delivery Reviews*, 57: 1894-1903.
- FUJIMORI, T.; KUROTAKI, Y.; MIYAZAKI, J.; NABESHIMA, Y. (2003). «Analysis of cell lineage in two- and four-cell mouse embryos». *Development*, 130: 5113-5122.
- GARDNER, R. L. (2001). «Specification of embryonic axes begins before cleavage in normal mouse development». *Development*, 128: 839-847.
- GINIS, I.; LUO, Y.; MIURA, T.; THIES, S.; BRANDENBERGER, R.; GERECHT-NIR, S.; AMIT, M.; HOKE, A.; CARPENTER, M. K.; ITS KOVITZ-ELDOR, J.; RAO, M. S. (2003). «Differences between human and mouse embryonic stem cells». *Developmental Biology*, 269: 360-380.
- HANDYSIDE, A. H.; LESKO, J. G.; TARÍN, J. J.; WINSTON, R. M. L.; HUGHES, M. R. (1992). «Birth of a normal girl after in vitro fertilization and preimplantation diagnostic testing for cystic fibrosis». *New England Journal of Medicine*, 327: 905-909.
- HOGAN, B.; COSTANTINI, F.; LACY, E. (1994). *Manipulating the mouse embryo. A laboratory manual*. 2a ed. Nova York: Cold Spring Harbour Laboratory.
- HOVATTA, O.; MIKKOLA, M.; GERTOW, K. (2003). «A culture system using human foreskin fibroblasts as feeder cells allows production of human embryonic stem cells». *Human Reproduction*, 7: 1404-1409.
- KATKOV, I.; KIM, S.; BAJPAI, R.; ALTMAN, S.; MERCOLA, M.; LORING, F.; TERSKIKH, V.; SNYDER, Y.; LEVINE, F. (2006). «Cryopreservation by slow cooling with DMSO diminished production of Oct4 pluripotency marker in human embryonic stem cells». *Cryobiology*, 53: 194-205.
- KLIMANSKAYA, I.; CHUNG, Y.; BECKER, S.; LU, S. J.; LANZA, R. (2006). «Human embryonic stem cell lines derived from single blastomeres». *Nature*, 444: 481-485.
- LI, M.; ZHANG, D.; HOU, Y.; JIAU, L. (2003). «Isolation and culture of embryonic stem cells from porcine blastocysts». *Molecular Reproduction Development*, 4: 429-434.
- MARSHAK, D. R.; GARDNER, R. L.; GOTTLIEB, D. (2001). *Stem cell biology*. Nova York: Cold Spring Harbour Laboratory.
- MARTIN, G. R. (1981). «Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells». *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 78: 7634-7638.
- NIWA, H.; MIYAZAKI, J.; SMITH, A. G. (2000). «Quantitative expression of Oct3/4 defines differentiation,

- dedifferentiation or self-renewal of ES cells». *Nature genetics*, 24: 372-376.
- PAPAIANOOU, V. E.; MKANDAWIRE, J.; BIGGERS, J. D. (1989). «Development and phenotypic variability of genetically identical half mouse embryos». *Development*, 106: 817-827.
- PARRIEGO, M.; SOLÉ, M.; VIDAL, F.; BOADA, M.; SANTALÓ, J.; EGOZCUE, J.; VEIGA, A.; BARRI, P. N. (2003). «One or two cell biopsy: does it affect implantation potential in PGD?». *4th Biennial Alpha Conference. 8th Meeting of Andrology in the 2000's Twin-Meeting*. Anvers (24-27 setembre 2003).
- PIOTROWSKA-NITSCHKE, K.; ZERNICKA-GOETZ, M. (2005). «Spatial arrangement of individual four-cell stage blastomeres and the order in which they are generated correlate with blastocyst pattern in the mouse embryo». *Mechanism of Development*, 122: 487-500.
- ROSSANT, J. (2001). «Stem cells from the mammalian blastocyst». *Stem Cells*, 19: 477-482.
- SMITH, A. G. (2001). «Embryo-derived stem cells: of mice and men». *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 17: 435-462.
- TESAR, P. J. (2005). «Derivation of germ-line-competent embryonic stem cell lines from preblastocyst mouse embryos». *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 102: 8239-8244.
- THOMSON, J. A.; ITSKOVITZ-ELDOR, J.; SHAPIRO, S. S.; WAKNITZ, M. A.; SWIERGIEL, J. J.; MARSHALL, V. S.; JONES, J. M. (1998). «Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts». *Science Reports*, 282: 1145-1147.
- THOMSON, J. A.; KALISHMAN, J.; GOLOS, T. G.; DURNING, M.; HARRIS, C. P.; BECKER, R. A.; HEARN, U. P. (1995). «Isolation of a primate embryonic stem cells line». *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 94: 7844-7848.
- TODOROVA, M. G.; SORIA, B.; QUESADA, I. (2007). «Gap junctional intercellular communication is required to maintain embryonic stem cells in a non-differentiated and proliferative state». *Journal of Cellular Physiology*, 214: 354-362.
- TOLKUNOVA, E.; CAVALERI, F.; ECKARDT, S.; REINBOLD, R.; CHRISTENSON, L. K.; SCHÖLER, H. R.; TOMILIN, A. (2005). «The caudal-related protein Cdx2 promotes trophoblast differentiation of mouse embryonic stem cells». *Stem Cells*, 24: 139-144.
- VEIGA, A.; CALDERÓN, G.; BARRI, P. N.; COROLEU, B. (1987). «Pregnancy alter the replacement of a frozen-thawed embryo with less than 50 % intact blastomeres». *Human Reproduction*, 2: 321-323.
- VEIGA, A.; SANTALÓ, J.; VIDAL, F.; CALDERÓN, G.; GIMÉNEZ, C.; BOADA, M.; EGOZCUE, J.; BARRI, P. N. (1994). «Twin pregnancy after preimplantation diagnosis for sex selection: case report». *Human Reproduction*, 9: 2156-2159.
- WAKAYAMA, S.; HIKICHI, T.; SUETSUGU, R.; SAKAIDE, Y.; BUI, H. T.; MIZUTANI, E.; WAKAYAMA, T. (2007). «Efficient establishment of mouse embryonic stem cells from single blastomeres and polar bodies». *Stem Cells*, 25: 986-993.
- WEBER, R. J.; PEDERSEN, R. A.; WIANNY, F.; EVANS, M. J.; ZERNICKA-GOETZ, M. (1999). «Polarity of the mouse embryo is anticipated before implantation». *Development*, 126: 5591-5598.
- YATES, A.; CHAMBERS, I. (2005). «The homeodomain protein Nanog and pluripotency in mouse embryonic stem cells». *Biochemical Society Transactions*, 33: 1518-1521.
- YING, Q. L.; NICHOLS, J.; CHAMBERS, I. (2003). «BMP induction of Id proteins suppresses differentiation and sustains embryonic stem cell self-renewal in collaboration with STAT3». *Cell*, 115: 281-292.
- ZAVOS, P. (2006). «In-vitro developmental potential of individual mouse blastomeres cultured with and without zona pellucida: future implications for human assisted reproduction». *Reproductive Biomedicine Online*, 13: 284-294.