

DERIVACIÓ DE LÍNIES DE CÈL·LULES MARE EMBRIONÀRIES HUMANES: ENVERS EL CULTIU EN CONDICIONS LLIURES DE XENOBIÒTICS I EN CONDICIONS QUÍMICAMENT DEFINIDES

I. Rodríguez,^{1*} A. Raya,¹ B. Aran,¹ A. Consiglio,¹ Y Muñoz,¹ A. Veiga,^{1,2} J. C. Izpisua^{1,3}

¹ Banc de línies cel·lulars, Centre de Medicina Regenerativa de Barcelona (CMR[B])

Dr Aiguader, 88, 4a. 08003 Barcelona. irodriguez@cmrb.eu.

² Servei de Medicina de la Reproducció, Institut Universitari Dexeus

³ Salk Institute. La Jolla, EUA

Resum

Les cèl·lules mare embrionàries humanes (hESC) són una font potencial per a la curació de moltes malalties conseqüència d'un dèficit de funció cel·lular. Per a ser acceptades per a la seva utilització clínica són necessàries unes condicions de cultiu lliures de xenobiòtics i sota condicions de *good manufacturing practices* (GMP). Aquí presentem les nostres dades actuals de derivacions de línies de hESC i de la caracterització inicial del protocols dels medis *xenobiotic-free* i químicament definit per la propagació de hESC. En concret, presentem la derivació de cinc noves línies de hESC. A més a més, proposem que el plasma humà i els seus derivats poden ser una bona alternativa als derivats de sèrum animal extensament utilitzats i que el medi químicament definit N2-B27 prèviament caracteritzat pot mantenir el cultiu de les nostres línies de hESC. Finalment, presentem evidències que la laminina, la fibronectina i el col·lagen IV humans són tres possibles alternatives per a mantenir aquest cultiu evitant l'ús de cèl·lules de suport.

Paraules clau Cèl·lules mare embrionàries, *xenobiotic-free*, derivació, condicions definides.

Abstract

Human embryonic stem cells (hESC) represent a potential source for the cure of many loss-of-function cellular diseases. However, if hESC are to be used in clinical applications, their derivation and culture should be carried out under xenobiotic-free and good manufacturing practice conditions. Here we present our current data on derivation of hESC lines and on the initial characterization of protocols for both xenobiotic-free and chemically-defined media for hESC propagation. Specifically, we present the derivation of five new hESC lines. In addition, we show that human plasma and its derivatives may be good alternatives to the widely used animal-derived serum products and that the previously characterized chemically-defined medium N2-B27 supports the propagation of our hESC lines. Finally, we present evidence showing that human laminin, fibronectin and collagen IV may be valid alternatives to feeder cells for hESC culture.

INTRODUCCIÓ

Les cèl·lules mare embrionàries humanes han esdevingut una revolució científica els últims anys a causa de la seva capacitat potencial de formar qualsevol tipus cel·lular del organisme. Moltes malalties produïdes per un dèficit de funció cel·lular tenen amb les hESC una porta oberta a la curació (Thomson *et al.*, 1998).

Tot i això, la seva aplicació en teràpia clínica requereix unes condicions de cultiu concretes per tal d'evitar riscos potencials alhora que un rebuig immunitari addicional o la possible transmissió de malalti-

es de qualsevol origen. La derivació i el cultiu tradicional de hESC inclou l'ús de productes d'origen animal, tal com el KO-Serum Replacement, la gelatina i la pronasa. Publicacions recents descriuen possibles noves fonts de proteïna humana que permeten substituir les d'origen boví (Amit *et al.*, 2004; Gembacev *et al.*, 2005), i alternatives a l'ús de pronasa o gelatina durant la derivació i cultiu de les línies (Klimanskaya *et al.*, 2005; Elleström *et al.*, 2006).

Una vegada s'aconsegueixen eliminar els xenobiòtics del cultiu de les hESC, el següent pas és aconseguir derivar una línia en aquestes condicions de cultiu i sota condicions de treball de *good manufac-*

turing practice (GMP), per tal de possibilitar la seva futura utilització en teràpia clínica.

Per una altra banda, la tendència dels laboratoris de recerca en hESC es mantenen les cèl·lules en unes condicions de cultiu el més definides possible (Lu *et al.*, 2006; Ludwig *et al.*, 2006; Shuyuan Yao *et al.*, 2006). D'aquesta manera es pot mantenir un control absolut sobre els factors que les mantenen indiferenciades i, per tant, quins són els factors que, afegits al medi, poden induir una diferenciació dirigida envers una estirp celular en concret.

MATERIAL I MÈTODES

Derivació i cultiu

Els embrions, procedents de cicles de fecundació *in vitro*, van ser donats per les parelles progenitores després de cinc o més anys d'emmagatzement en nitrogen líquid, un cop obtingut el seu consentiment informat, l'aprovació del comitè ètic de l'Institut Universitari Dexeus, l'aprovació de l'Institut de Salut Carlos III i del Departament de Salut de la Generalitat de Catalunya.

Després de la descongelació, els embrions van ser cultivats fins l'estadi de blastocist. La zona pellúcida es va eliminar incubant els embrions amb pronasa o Acid Tyrode's, segons el cas. Els embrions sense zona van ser transferits a plaques d'un pou central amb gelatina (Cambrex) sobre una monocapa de *human foreskin fibroblasts* (HFF) irradiats a 37° C i 5 % CO₂ en medi hES (hESm: Knockout Dulbecco's modified Eagle's KO-DMEM) suplementat amb 2 mmol/l GlutaMAX (Gibco, InVitrogen corporation), 0,05 mmol/l 2-mercaptoetanol (Gibco, InVitrogen corporation), 8 ng/ml *basic fibroblast growth factor* (bFGF) (Invitrogen), 1 % *non-essential amino*

acids (Cambrex), 20 % *knockout serum replacement* (InVitrogen), 50 u/ml de penicillina i 50 µg/ml d'estreptomicina (ambdues de Gibco, InVitrogen corporation). El medi es va reemplaçar diàriament a partir del tercer dia de cultiu.

Les HFF van ser cultivades amb *Iscove's Modified Dulbecco's Medium* (IMDM) (InVitrogen) suplementat amb 10 % de sèrum fetal boví (FBS) (Gibco, InVitrogen corporation), 100 u/ml de penicillina i 100 µg/ml d'estreptomicina (ambdues de Gibco, InVitrogen corporation).

Les plaques es van controlar diàriament fins que es va veure un creixement de les cèl·lules de la massa celular interna (ICM) prou gran per a fer un *split* mecànic de la colònia inicial (figura 1). D'aquesta manera, cada 5-7 dies es van passar mecànicament les colònies en petits fragments a una placa amb una monocapa de HFF nova.

Les colònies van ser criopreservades periòdicament en petits fragments en criotubs (NUNC, Roskilde, Dinamarca) en 90 % FBS i 10 % DMSO (Sigma) a una taxa de refrigeració d'1° C/min i emmagatzemats en nitrogen líquid. Les cèl·lules van ser descongelades a 37° C i cultivades per a assegurar la seva capacitat de supervivència.

Caracterització de les línies hESC

Es van realitzar cariotips mitjançant el mètode de *G-banding* analitzant 15 metafases després de cultivar les colònies 30 minuts amb 2 µl/ml de colcemid (Invitrogen).

L'activitat fosfatasa alcalina es va provar mitjançant el *kit* Alkaline Phosphatase Red Membrane Substrate Solution (Sigma) després de fixar les cèl·lules dos minuts amb paraformaldehid (PFA) al 4 % a temperatura ambient (TA).

Els marcadors de indiferenciació es varen posar de manifest mitjançant un test immunocitoquímic.

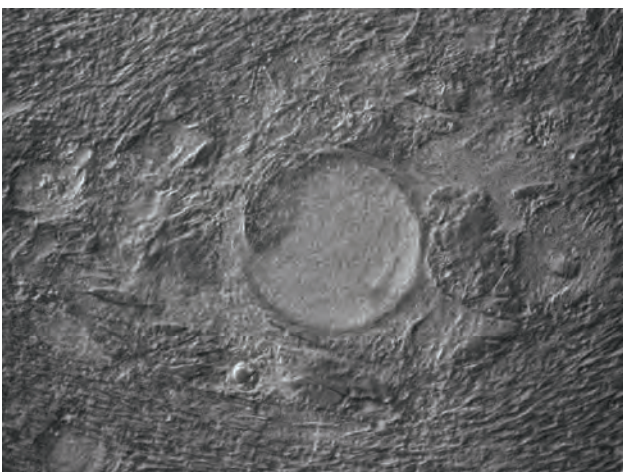


Figura 1 Creixement de la ICM de l'ES[3] després de dotze dies en cultiu sobre una monocapa de HFF.

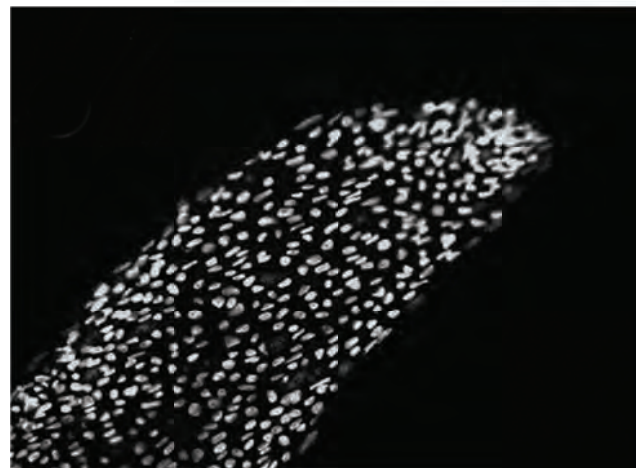


Figura 2 Colònia de l'ES[2] positiva per Oct4.

Les colònies varen ser cultivades sobre *polystyrene slide flasks* (NUNC, Roskilde, Denmark) i fixades 5 minuts amb PFA 4 % a TA. Les colònies varen ser incubades amb els anticossos primaris per a *stage-specific embryonic antigen* (SSEA)-3, SSEA-4, *tumor-related antigen* TRA-1-60 i TRA-1-81, SOX-2 (Chemicon International, Inc., Temecula, CA), *octamer binding transcription factor-4* (OCT-4) (Santa Cruz Biotechnology, Califòrnia, EUA) i NANOG (Abcam, Cambridge, RU). A continuació, els portes van ser incubats dues hores a TA amb els anticossos secundaris Cy2 and Cy3 (Jackson Immuno Research, Suffolk, RU). Els anticossos primaris i secundaris varen ser diluïts 1:20 i 1:100, respectivament, excepte NANOG, que es va diluir 1:500.

L'antigen leucocitari humà (HLA) es va analitzar mitjançant la metodologia de tipificació basada en la seqüència amb el *kit AlleleSEQR HLA Sequencing* (Atria Genetics). Per l'estudi de microsatèl·lits es va realitzar una PCR *multiplex* de 9 microsatèl·lits o STR (*short tandem repeats*) més el gen de l'amelogenina (per a detectar el cromosoma Y), amb marcatge fluorescent amb el *kit AmpliFISTR Profiler Plus* (Applied Biosystems).

Per a la demostració de la pluripotencialitat *in vitro* es van generar *embryoid bodies* (EB) aixecant mecànicament colònies senceres de hESC i mantenint-les en suspensió 3-4 dies en hESM. A continuació es van cultivar sobre *slide flasks* amb gelatina durant 15-25 dies abans de fixar-les 15 minuts amb PFA al 4 %. Com a anticossos primaris es varen fer servir α -actinina (SIGMA) com a marcador de mesoderm, β -tubulina (Covance) com a marcador de

ectoderm i α -fetoproteïna (Dako) com a marcador d'endoderm.

La pluripotencialitat *in vivo* de les hESC es va demostrar mitjançant la injecció intramuscular d'aproximadament 1 milió de cèl·lules en ratolins amb una immunodeficiència severa combinada (SCID) per a induir la formació de teratomes. Després de dos mesos els ratolins van ser sacrificats i els teratomes desenvolupats van ser analitzats mitjançant tècniques d'histologia convencional i immunofluorescència.

Cultiu lliure de xenobiòtic

Es van testear quatre medis diferents de composició idèntica a l'hESM en els quals se substitueix el KO-Serum Replacement per plasma humà (HP) (Grifols) al 10 i al 20 % i per sobrenedant de crioprecipitat de plasma humà (SCP) (Grifols) al 10 i al 20 %.

El medi es va anar canviant progressivament afegint un 25 % més de medi *xenofree* el tercer dia després de cada *split* fins arribar a un 100 % del medi propi de cada condició.

Cultiu en condicions definides

Es van testear dos medis químicament definits. Un, el N2-B27, conté DMEM/F12, suplement N2 (1 \times) i B27 (1 \times) (ambdós de Gibco, InVitrogen corporation), Glutamax 2 mM, 2-mercaptoetanol 0,11 mM, NEAA (100 \times), bFGF 100 μ g/ml, 50 u/ml de penicil·lina i 50 μ g/ml d'estreptomicina (ambdues de Gibco, InVitrogen corporation). El segon medi testejat (N2-B27-LC) incorpora un suplement de *lipid concentrate* (Gibco, InVitrogen corporation). Les cèl·lules es cultiven originàriament en medi condicionat per

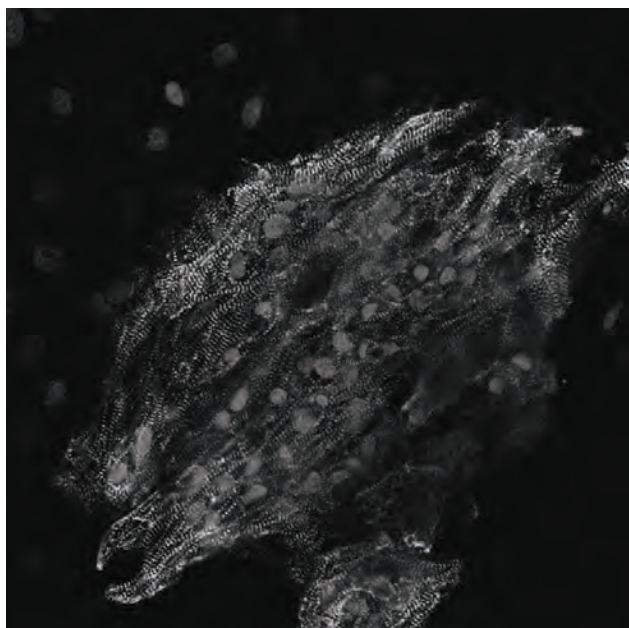


Figura 3 Creixement diferenciat de ES[2] positiu per α -actinina.

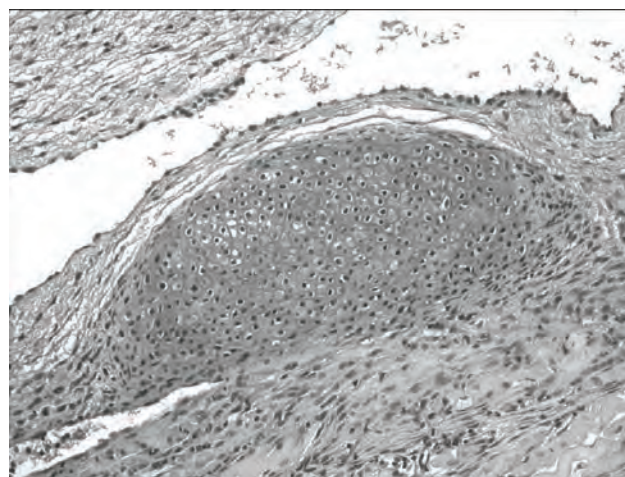


Figura 4 Teixit condroide present en un teratoma procedent de la injecció de cèl·lules de l'ES[2] a ratolins SCID.

fibroblasts embrionaris murins (MEF) i es canvia a un 25 % adicional de medi definit a cada *split*.

Per una altra banda es van testejar matrius de proteïnes extracel·lulars humanes o sintètiques. Les matrius provades contenen laminina a 5 µg/cm² (Sigma), fibronectina a 5 µg/cm² (BD), collagen IV a 0,1-10 µg/cm² (BD), PuraMatrix (BD) i fibrina (Gri-fols) (Ludwig *et al.*, 2006).

RESULTATS

En una sèrie es van descongelar sis blastocists dels quals quatre (66,7 %) van sobreviure i es van sembrar. D'aquests quatre van resultar dues línies de hESC: l'ES[2] i l'ES[3]. En una sèrie posterior es van descongelar 55 embrions en estadis primerencs (pronucleis o cèl·lules), dels quals 38 (69,1 %) van sobreviure i 13 (34,2 %) van arribar a blastocist. D'aquests 13, van resultar tres noves línies de hESC: ES[4], ES[5] i ES[6].

L'ES[2] i l'ES[3] procedeixen d'embrions d'una mateixa parella. Ambdues línies varen presentar un cariotip normal (46, XY). També van donar resultat positius per a tots els marcadors d'indiferenciació testejats: SSEA3, SSEA4, TRA-1-60, TRA-1-81, Nanog, SOX2 i Oct4 (figura 2 i resultats no mostrats) i per a l'activitat fosfatasa alcalina. La tipificació HLA va ser idèntica i homozigòtica en les dues línies, mentre que l'anàlisi de microsatèl·lits mostrava una compatibilitat pròpia de línies germanes.

La diferenciació *in vitro* va posar de manifest la capacitat de les dues línies de formar teixits procedents de les tres capes germinals: mesoderm (α -actina) (figura 3), ectoderm (β -tubulina) i endoderm (α -fetoproteïna). Els teratomes resultants de la diferenciació *in vivo* estaven composts de teixits procedents de les tres capes germinals, tals com epitelí



Figura 5 Colònies de l'ES[2] cultivades 1:1 HP (20%) / hESm.

respiratori, teixit condroide (figura 4) i acúmuls neuronals.

L'embrió del qual procedeix l'ES[4] va ser tractat amb pronasa, mentre que l'ES[5] i l'ES[6] van ser derivades prèvia eliminació de la zona pellúcida amb Acid Tyrode's, evitant d'aquesta manera la pronasa a les derivacions, un dels xenobiòtics d'ús freqüent. Les tres línies es troben actualment en procés de caracterització.

El cultiu en condicions lliures de xenobiòtics, amb els medis amb HP i SCP, mostren una clara tendència a la diferenciació. Tot i això, el cultiu amb HP i SCP (100 % de medi *xenofree*) permet mantenir les línies indiferenciades de manera continuada i amb una eficàcia suficient. En una anàlisi preliminar sembla que les cèl·lules cultivades en HP al 20 % (figura 5) són les que més tendeixen a la diferenciació, mentre que les cultivades en SCP al 10 % mostrarien la tendència més baixa.

El procés de test els nous medis definits es troba en les fases inicials. Actualment les cèl·lules estan sent cultivades en paral·lel amb N2-B27 i N2-B27-LC amb un 25 % de medi definit i un 75 % de medi condicionat i no s'observa cap alteració al cultiu.

Pel que fa a les matrius extracel·lulars, uns resultats molt preliminars mostren que la laminina, la fibronectina, el collagen IV i les seves combinacions ofereixen un suport acceptable al creixement de les hESC.

CONCLUSIONS

La derivació de línies de hESC sobre HFF i el seu cultiu en presència de xenobiòtics és una tècnica ja descrita i reproducible en les condicions publicades. Tot i això, prèviament a la seva possible utilització clínica s'han d'aconseguir derivar i mantenir noves línies en condicions GMP i lliures de xenobiòtics.

L'eliminació de la gelatina del cultiu de les HFF, la substitució de la pronasa per Acid Tyrode's, la sembra del blastocist sencer o aïllar la ICM mecànicament per evitar la utilització d'anticossos i complement d'origen animal, i també la substitució del KO-SR per una font de sèrum humà són possibles i suposen el primer pas per a assolir una derivació en condicions lliures de xenobiòtics.

De les fonts humanes testejades, tant l'HP com l'SCP al 10 o al 20 % poden representar una font de proteïna acceptable per a substituir el KO-SR, però sembla que el SCP al 10 % és capaç de mantenir millor l'estat indiferenciat de les colònies. Una vegada es pugui mantenir amb èxit el cultiu de les actuals línies en aquestes condicions, serà possible plantejar

la derivació de noves línies de hESC en condicions totalment lliures de xenobiòtics.

Un altre objectiu important a assolir és el d'aconseguir cultivar les colònies de hESC en les condicions químicament més definides possibles per tal de poder controlar en tot moment quins són els factors que afecten la seva diferenciació o indiferenciació. Els medis definits N2-B27 i N2-B27-LC poden mantenir el cultiu indiferenciat de les hESC. Per una altra banda, sembla que la laminina, la fibronectina i el collagen són capaços de mantenir el cultiu de les hESC per si sols o combinant-los entre si.

BIBLIOGRAFIA

- AMIT, M.; SHARIKI, C.; MARGULETS, V. [et al.] (2004). «Feeder layer- and serum-free culture of human embryonic stem cells». *Biol. Reprod.*, 70: 837-845.
- ELLERSTRÖM, C.; STREGEL, R.; MOYA, K. [et al.] (2006). «Derivation of a Xeno-Free Human Embryonic Stem Cell Line». *Stem. Cells*, 24: 2170-2176.
- GENBACEV, O.; KRTOLICA, A.; ZDRAVKOVIC, T. [et al.] (2005). «Serum-free derivation of human embryonic stem cell lines on human placental fibroblast feeders». *Fertil. Steril.*, 83: 1517-1529.
- KLIMANSKAYA, I.; CHUNG, Y.; MEISNER, L. [et al.] (2005). «Human embryonic stem cells derived without feeder cells». *Lancet*, 365: 1636-1641.
- LU, J.; HOU, R.; BOOTH, C. J. [et al.] (2006). «Defined culture conditions of human embryonic stem cells». *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*; 103: 5688-5693.
- LUDWIG, T. E.; LEVENSTEIN, M. E.; JONES, J. M. [et al.] (2006). «Derivation of human embryonic stem cells in defined conditions». *Nat. Biotechnol.*, 24: 185-187.
- SHUYUAN, Y.; SHUIBING, C.; ERGENG, H. [et al.] (2006). «Long term self-renewal and directed differentiations of human embryonic stem cells in chemically defined conditions». *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103: 6907-6912.
- THOMSON, J. A.; ITSKOVITZ-ELDOR, J.; SHAPIRO, S. S. [et al.] (1998). «Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts». *Science*, 282: 1145-1147.