

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

S. González, E. Ibáñez, N. Costa-Borges, J. Santaló

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

08193 Bellaterra. Tel. 935 811 112. Fax 935 812 295. *Sheyla.Gonzalez@uab.cat, Elena.Ibanez@uab.cat,*
NunoLuis.Borges@uab.cat, Josep.Santaló@uab.cat.

Resum

La derivació de les cèl·lules mare embrionàries (ESC) s'ha fet tradicionalment a partir de la massa cel·lular interna (ICM) a l'estadi de blastocist, però aquest procés, a més de produir ESC que no són totipotents, té l'inconvenient que es destrueix l'embrió del qual procedeixen aquestes ESC. Al nostre estudi pretenem establir línies d'ESC a partir d'estadis previs a blastocist i a través de l'aïllament de blastòmers, ja que les cèl·lules resultants podrien ser totipotents i es contribuiria a resoldre la qüestió ètica de la destrucció dels embrions emprats. Per a portar a terme aquest objectiu es van fer servir embrions de ratolins provinents de l'encreuament SV129 × C57Bl i es van aïllar els blastòmers que constituïen els grups de 1/4, 2/4, 1/8, 2/8, 3/8, 4/8 i mòrula. L'estadi de blastocist es va fer servir com a control positiu. D'un total de 108 embrions es van aconseguir establir un total de 19 colònies d'ESC corresponents als grups de 1/4, 2/8, 3/8, 4/8, mòrula i blastocist. Amb aquest estudi s'ha arribat a determinar que tant l'estadi embrionari del qual procedeixen els blastòmers com el nombre de blastòmers aïllats tenen influència a l'hora d'establir línies d'ESC de ratolí.

Paraules clau ESC, ICM, blastocist, blastòmers, mòrula.

Abstract

Embryonic stem cells (ESC) are typically derived from the inner cell mass (ICM) at the blastocyst stage but this process can not produce totipotent cells and destroys the embryos from which the ESC are derived. We have carried out a study to try to derive ESC from isolated blastomeres at preblastocyst stages because the resultant ESC may be totipotent and we could contribute to solve the ethical controversy of destroying embryos. SV129 × C57Bl F1 mouse embryos were used and blastomeres were removed constituting groups of 1/4, 2/4, 1/8, 2/8, 3/8, 4/8 and morula. Blastocyst stage was used as a positive control. A total of 19 ESC-colonies from the 1/4, 2/8, 3/8, 4/8, morula and blastocyst groups were derived out of 108 embryos. In our study we have determined that the embryonic stage and the number of isolated blastomeres have an influence in deriving mouse ESC.

Key words ESC, ICM, blastocyst, blastomeres, morula.

INTRODUCCIÓ

L'interès creixent per obtenir línies d'ESC va fer que l'any 1981 dos grups d'investigadors independents desenvolupessin una tècnica per a establir un cultiu de cèl·lules pluripotencials a partir d'embrions de ratolí (Evans i Kaufman, 1981; Martin, 1981).

Les tècniques habituals d'establiment de línies d'ESC han fet servir la ICM de l'embrió a estadi de blastocist (Brook i Gardner, 1997). Posteriorment a aquesta pràctica habitual inicial es van començar a intentar establir línies a partir d'estadis embrionaris previs a blastocist (Delhaisie *et al.*, 1996; Eistetter *et*

al., 1997; Tesar, 2005). Però, malgrat tot, encara es tenen poques dades sobre la possibilitat de desenvolupar ESC a partir de cèl·lules embrionàries aïllades procedents d'embrions en estadis previs a blastocist (Chung *et al.*, 2005; Klimanskaya *et al.*, 2006).

Per tal de contribuir a resoldre aquesta qüestió, el nostre estudi pretén determinar la influència de l'estadi embrionari i el nombre de cèl·lules aïllades a l'hora de derivar línies d'ESC. A través de diferents experiments, hem intentat establir línies d'ESC a partir de blastòmers aïllats d'estadis previs a blastocist. El fet d'emprar un nombre reduït de blastòmers de l'embrió també ens portarà a contribuir a resoldre

Taula 1 Percentatge de colònies d'ESC tenint en compte la influència de l'estadi embrionari.

Estadi embrionari	Nombre grups	Total colònies ESC	% colònies / Nr. grups
4 cèl·lules	118	4	3,4
8 cèl·lules	108	7	6,5
mòrula	23	6	26,1
blastocist	17	2	11,8

Taula 2 Percentatge de colònies d'ESC segons el nombre de blastòmers aïllats.

Grup	Nombre grups	Total colònies ESC	% colònies / Nr. grups
1/4emb	78	4	5,1
2/4emb	40	0	0
1/8emb	59	0	0
2/8emb	27	3	11,1
3/8emb	8	1	12,5
4/8emb	14	3	21,4
mòrula	23	6	26,1
blastocist	17	2	11,8

les qüestions ètiques i morals sobre la destrucció d'embrions, que són especialment importants en el cas d'embrions humans. A més, cal fer especial referència al fet que fins al moment ningú no ha descrit l'establiment de línies d'ESC a partir de blastòmers aïllats procedents d'embrions de 4 cèl·lules.

Un altre aspecte interessant de fer servir estadis embrionaris previs a blastocist és que les ESC derivades de la ICM del blastocist no són totipotents; en concret, no poden donar trofoblast (Smith, 2001) i podria limitar el potencial de diferenciació d'aquestes ESC. Per tant, resulta important avaluar si les ESC derivades a partir d'estadis preblastocist tenen efectivament la capacitat de ser totipotents o si, pel contrari, evolucionen fins a estadis similars a ICM i després esdevenen ESC.

MATERIALS I MÈTODES

Obtenció d'embrions de ratolí

Els embrions de ratolí de 2 cèl·lules van ser obtinguts de l'encreuament de femelles de la soca SV129 amb mascles C57Bl, ja que ofereixen un major rendiment en termes d'obtenció de línies d'ESC (Brook i Gardner, 1997).

Les femelles van ser superovulades mitjançant la injecció intraperitoneal de 5 UI de PMSG seguides

de 5 UI de hCG 48 hores més tard. Immediatament després les femelles superovulades es van col·locar en grups de dues amb un mascle de la soca C57Bl, per tal que les fecundés. Al cap de 48 hores es va procedir al sacrifici dels animals per dislocació cervical i a la perfusió dels oviductes amb medi KSOM-H (Biggers *et al.*, 2000) per a obtenir-ne els embrions.

Cultiu dels embrions

Els estadis embrionaris analitzats van ser els de 4, 8 cèl·lules i mòrula. Com a controls positius de la derivació d'ESC es va emprar l'estadi de blastocist.

Així, els embrions de 2 cèl·lules obtinguts es van cultivar en medi KSOMaag (Biggers *et al.*, 2000) fins a assolir els estadis esmentats.

Obtenció de blastòmers aïllats

Els blastòmers dels embrions en estadi a 4 i 8 cèl·lules van ser separats en els grups de 1/4, 2/4, 1/8, 2/8, 3/8, 4/8. L'aïllament d'aquestes cèl·lules embrionàries es va portar a terme a través de dos protocols.

D'una banda, els blastòmers van ser aïllats a través de l'exposició a una solució de pronasa que induïx la digestió de la zona pellúcida. Posteriorment, per tal de separar els blastòmers, els embrions es van incubar en una solució de PBS sense Ca^{++} ni Mg^{++} i

suplementat amb EDTA, juntament amb una lleu aspiració per a trencar les unions intercel·lulars entre blastòmers.

L'altre mètode d'aïllament va consistir en realitzar una biòpsia embrionària mitjançant micromanipulació. Es va foradar la zona pellúcida amb una solució àcida de Tyrode i a través d'aquest forat i amb una pipeta de micromanipulació es van extreure els blastòmers.

Derivació d'ESC de ratolí

La derivació de les ESC es va portar a terme sobre una monocapa de fibroblasts de ratolí inactivats (FSTO) amb 1 µg/ml de mitomicina C, que són necessaris per al manteniment de la indiferenciació cel·lular.

Els blastòmers aïllats es van dipositar sobre la monocapa de FSTO.

El cultiu es va portar a terme en medi DMEM suplementat amb 1mM L-glutamina, 0,1 mM d'aminoàcids no essencials, antibiòtics, 15 % de sèrum fetal boví (FCS), 0,1 mM de β-mercaptoetanol i 10³ U/ml de *mouse recombinant leukemia inhibitory factor* (LIF) i en una atmosfera al 5 % de CO₂ i a 37° C.

Al cap d'uns 2-3 dies en cultiu, quan s'observaven petites colònies i sense deixar que comencessin a diferenciar espontàniament, van ser disgregades via tripsinització i sembrades en un placa nova de FSTO per tal d'incrementar el nombre de cèl·lules.

Caracterització de les línies de ESC

Per tal de confirmar que les colònies obtingudes són realment ESC indiferenciades, vàrem extreure l'RNA total cel·lular, vàrem realitzar una RT-PCR

amb *primers* a l'atzar i, finalment, vàrem realitzar una PCR amb *primers* específics per als marcadors d'indiferenciació Oct-4 i Rex-1. Com a controls positius es van analitzar ESC comprovades i el gen constitutiu GAPDH.

La morfologia de les colònies va ser l'aspecte fonamental a tenir en compte a l'hora de caracteritzar les colònies d'ESC establertes.

Anàlisi estadística de les dades

Els resultats van ser analitzats estadísticament mitjançant el test de la χ^2 o el test exacte de Fisher. Els valors amb $P < 0,05$ van ser considerats estadísticament significatius.

RESULTATS

A partir d'un total de 108 embrions es va aconseguir arribar a establir un total de 19 colònies d'ESC. Aquestes colònies corresponen als grups de 1/4, 2/8, 3/8, 4/8, mòrula i blastocist (figura 1A-E).

Influència de l'estadi embrionari

En analitzar la influència de l'estadi embrionari (taula 1) en l'eficiència de derivació de les ESC, es van trobar diferències significatives ($P = 0,004$), especialment en comparar les colònies derivades a partir de mòrules (26,1 %) amb estadis previs a la compactació (3,4 % per a l'estadi de 4 cèl·lules i 6,5 % per al de 8 cèl·lules). També es va observar que, malgrat que no era estadísticament significatiu, l'estadi a 8 cèl·lules (6,5 % de formació de colònies) era lleugerament més eficaç que el de 4 cèl·lules (3,4 %). L'es-

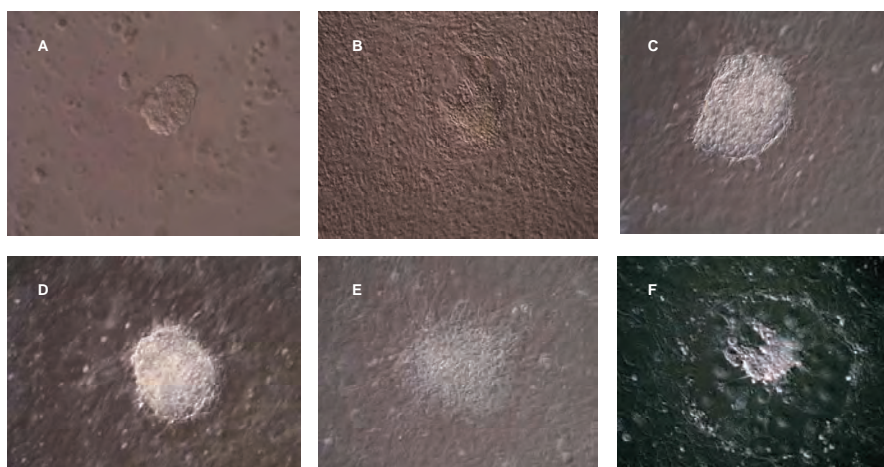


Figura 1 Colònies d'ESC. A) Colònia d'ESC derivada de 1/4 al dia 6. B) Colònia derivada de 2/8 al dia 6. C) Colònia procedent de 4/8 al dia 21. D) Colònia procedent de mòrula al dia 28. E) Colònia procedent de blastocist al dia 21. F) Colònia procedent de 3/8 amb la diferenciació envers trofoblast al voltant.

tadi de blastocist triat com a control positiu va donar un 11,8 % de colònies.

Influència del nombre de blastòmers aïllats

En referència a la importància del nombre de cèl·lules embrionàries aïllades (taula 2), es va observar que a l'estadi de 4 cèl·lules no es va aconseguir establir cap línia d'ESC del grup de 2/4, mentre que el percentatge de formació de colònies del grup de 1/4 va ser d'un 5,13 %, tot i que és important esmentar que les diferències entre aquests grups no són significatives. En considerar l'estadi de 8 cèl·lules, es va observar que, en general, el percentatge de derivació de colònies d'ESC anava augmentant a mesura que el nombre de blastòmers aïllats s'incrementava. Malgrat aquest fet, només va resultar significativa la comparació entre els grups de 1/8 i 2/8 ($P = 0,0286$), tenint en compte que la contribució del grup de 1/8 a l'hora de formar colònies va ser nul·la. Pel que fa a l'estadi de mòrula, si analitzem la seva importància a la formació de colònies pel que fa al seu nombre cel·lular, es pot observar que el percentatge obtingut va ser el més elevat, amb un 26,1 %.

Resultats de la caracterització de les línies establertes

De les 19 colònies establertes totes presentaven una morfologia de colònia ben definida als extrems sense diferenciació aparent amb cèl·lules que presenten una mida inferior a les FSTO que les suporten i una morfologia arrodonida. Les colònies que presentaven diferenciació espontània en cultiu al voltant seu es van descartar (figura 1F).

Fins al moment s'han arribat a caracteritzar per RT-PCR dues colònies positives per als marcadors d'indiferenciació Oct-4 i Rex-1 procedents dels

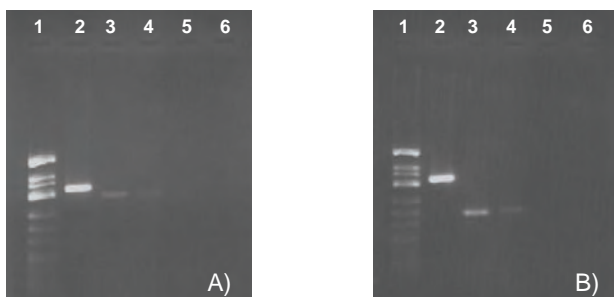


Figura 2 Detecció de marcadors d'expressió gènica d'una línia procedent de 4/8. A) Detecció del marcador d'expressió gènica Oct-4. B) Detecció del marcador d'expressió gènica Rex-1. Carril 1: marcador de pes molecular ØX174/Hinf I . Carril 2: control positiu del gen constitutiu GAPDH. Carril 3: control positiu d'ESC provades. Carril 4: mostra problema. Carril 5: control negatiu sense retrotranscriptasa. Carril 6: control negatiu sense RNA.

grups de 4/8 (figura 2) i mòrula (figura 3). La resta de colònies es troben pendents de confirmació.

DISCUSSIÓ

Influència de l'estadi embrionari

Tal com s'ha demostrat als resultats, l'estadi embrionari té importància a l'hora d'avaluar la seva contribució a la formació de colònies de ESC. S'ha observat que en derivar colònies d'ESC a partir d'embrions en estadis previs a blastocist, l'eficàcia millora a mesura que avança el desenvolupament embrionari, especialment en estadis posteriors a la compactació. L'estadi de mòrula ha demostrat ser el més eficient comparat amb els estadis de 4 i 8 cèl·lules, i millor fins i tot que el grup control de blastocists.

Influència del nombre de blastòmers aïllats

Pel que fa al nombre de blastòmers aïllats, els resultats demostren que a l'estadi de 4 cèl·lules la contribució era similar quan aïllàvem 1 o 2 blastòmers.

Pel que fa a l'estadi de 8 cèl·lules, el percentatge de colònies derivades a partir de 2/8 va ser similar al grup control dels blastocists (11,1 % vs. 11,8 %). D'altra banda, s'ha constatat que la situació òptima era aïllar 2 blastòmers, ja que, a mesura que incrementàvem el nombre de blastòmers aïllats, l'eficiència de derivació de ESC no augmentava significativament, mentre que, òbviament, podria comprometre la viabilitat de l'embrió a partir del qual s'obtenen els blastòmers. Per altra banda, s'observa una bona correlació entre el nombre inicial de cèl·lules i la probabilitat d'obtenir una línia d'ESC.

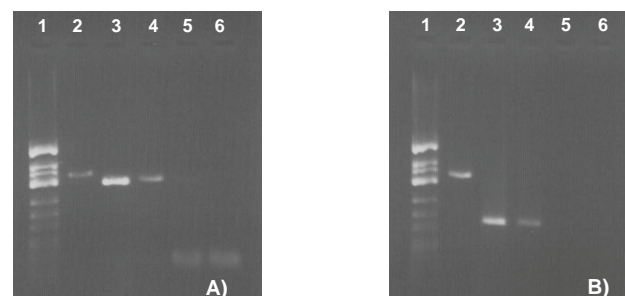


Figura 3 Detecció de marcadors d'expressió gènica d'una línia procedent de mòrula. A) Detecció del marcador d'expressió gènica Oct-4. B) Detecció del marcador d'expressió gènica Rex-1. Carril 1: marcador de pes molecular ØX174/Hinf I . Carril 2: control positiu del gen constitutiu GAPDH. Carril 3: control positiu d'ESC provades. Carril 4: mostra problema. Carril 5: control negatiu sense retrotranscriptasa. Carril 6: control negatiu sense RNA.

Aquesta tendència podria explicar que l'estadi de mòrula tingui una major aportació a l'hora de formar colònies d'ESC, ja que està constituït per un nombre més elevat de cèl·lules.

Caracterització de les línies establertes

Els resultats trobats tant pel que fa a la morfologia de les cèl·lules de la colònia com la detecció dels marcadors de cèl·lules indiferenciades ens fan concloure que les colònies derivades *in vitro* són realment colònies d'ESC.

CONCLUSIONS

Pel que fa a l'estadi embrionari emprat, s'han pogut arribar a derivar colònies a partir de l'estadi de 4 cèl·lules. La utilització d'estadis preblastocist és força eficient, especialment a partir de l'estadi de 8 cèl·lules. A més, s'ha vist que l'eficàcia millora a mesura que avança el desenvolupament embrionari, especialment en estadis posteriors a la compactació. Pel que fa al nombre de blastòmers aïllats, s'observa una bona correlació entre el nombre inicial de cèl·lules i la probabilitat d'obtenir una línia d'ESC, la qual cosa podria fer que l'estadi més eficient per a derivar ESC sigui el de mòrula.

AGRAÏMENTS

Aquest treball s'ha realitzat amb el finançament dels projectes del MEC BIO2005-04341 i BIO 2006-11792 i dels projectes DGR 2004-XT00054 i 2005-SGR00437.

BIBLIOGRAFIA

- 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(suppl. 1): 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.
- BROOK, F. A.; GARDNER, R. L. (1997). «The origin and efficient derivation of embryonic stem cells in the mouse». *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94(11): 5709-5712.
- 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(7073): 216-219.
- DELHAISE, F.; BRALION, V.; SCHURBIERS, N.; DESSY, F. (1996). «Establishment of an embryonic stem cell line from 8-cell stage mouse embryos». *European Journal of Morphology*, 34: 237-243.
- 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.
- KLIMANSKAYA, I.; CHUNG, Y.; BECKER, S.; LU, S. J.; LANZA, R. (2006). «Human embryonic stem cell lines derived from single blastomeres». *Nature*, 444(7118): 481-485.
- MARTIN, G. R. (1981). «Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells». *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78(12): 7634-7638.
- SMITH, A. G. (2001). «Embryo-derived stem cells: of mice and men». *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, 17: 435-462.
- TESAR P. J. (2005). «Derivation of germ-line-competent embryonic stem cell lines from preblastocyst mouse embryos». *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 102(23): 8239-8244.