

Aislamiento, cultivo y caracterización de líneas celulares embrionarias bovinas

A. Rodríguez*, P. Fisher**, R. Alberio**, E. Gómez*, C. Díez *, L.J. Royo*, J.N. Caamaño*, S. Pérez***, K.H.S. Campbell**

* Área de Genética y reproducción Animal. SERIDA-Somió, C/ Camino de los Claveles 604, 33203-Gijón (Asturias), España. E-mail: airodriguez@serida.org.

** Division of Animal Physiology, University of Nottingham. Sutton Bonington Campus. Leicester. LE12 5RD, England.

*** Hospital Universitario Central de Asturias, Oviedo (Asturias), España.

Resumen

El objetivo principal de este trabajo es el aislamiento, cultivo y caracterización de líneas embrionarias producidas a partir del aislamiento de masa celular interna (MCI) de blastocisto bovino. Las MCI se aislaron mediante inmunocirugía y se cultivaron en monocapas de fibroblastos embrionarios de ratón (MEF) mitóticamente inactivados. Tras 10-15 días de cultivo primario, las colonias surgidas se disgregaron, resembraron en una nueva MEF, y cultivaron por tiempo variable para tratar de obtener nuevas colonias. Tanto los cultivos primarios como los pases 2 y 3, así como las colonias supervivientes a la congelación, expresaron los marcadores de pluripotencia SSEA-4, TRA-1-60 y Oct4, y fueron positivos al test de la fosfatasa alcalina. A falta de pruebas para el diagnóstico de la pluripotencia y capacidad de autorrenovación, las células obtenidas presentan parte de las características de las células troncales embrionarias (*ES-like*).

Palabras clave: Células troncales embrionarias, colonia, masa celular interna, blastocisto bovino.

Summary

Isolation, culture, and characterization of embryonic cell lines from bovine blastocysts

This study was aimed to develop methods for isolation, culture and characterization of embryonic cell lines from in vitro produced bovine blastocysts. Inner cell masses arising from blastocysts were isolated by immunosurgery onto mitomycin-C-inactivated mouse embryonic fibroblast (MEF). After 10 to 15 days of culture the primary cell colonies were disaggregated, seeded in a new MEF, and cultured for 3 to 6 days up to form new colonies. The primary cell colonies, passage 2, passage 3 and post-thawed colonies expressed pluripotency markers such as SSEA-4, TRA-1-60 and Oct4 and were alkaline phosphatase positive. More research is needed to confirm pluripotency and self-renewal stage within the obtained embryonic stem-like cells (ES-like).

Key words: Embryonic stem cells, outgrowth, inner cell mass, bovine blastocyst.

Introducción

Las células troncales embrionarias (*Embryonic stem cells*, ES) derivan de la masa celular interna (MCI) del embrión preimplantacional y se caracterizan por su capacidad de proliferar indefinidamente y de diferenciarse en una amplia variedad de tipos celulares. En el estadio avanzado de blastocisto, el epiblasto, o ectodermo primitivo, se localiza en la MCI. La MCI es la fuente última de células ES, que más adelante dará lugar a las tres hojas blastodérmicas embrionarias. (Brook y Gardner, 1997). La mejora genética convencional presenta limitaciones. Los animales seleccionados son mezcla de los caracteres de sus parentales, pudiendo coseleccionarse rasgos no deseados e inadvertidos. La modificación génica por transgénesis puede permitir superar estas limitaciones (Clark y Whitelaw, 2003). El estado de indiferenciación e inmortalidad de las células pluripotentes facilita la modificación génica de estas células.

A pesar de que el conocimiento de los procesos de control del crecimiento y diferenciación celular de las células ES es bastante limitado, la sistematización de su cultivo tendría amplio impacto en biomedicina y en programas de mejora animal y de recuperación de especies. De forma más precisa, se puede decir que las características que debe cumplir una población de células embrionarias para ser pluripotente son: mantenimiento de un cariotipo diploide normal en cultivo, propagación de forma indefinida en cultivo (inmortalidad) y capacidad de diferenciarse en tejidos extraembrionarios y células somáticas representativas de cualquiera de las 3 hojas embrionarias. (Pera y col., 2000). Cuando alguna de estas cualidades no se cumple o no se ha podido demostrar, la línea celular obtenida se denominará *ES-like*, (semejante a las células ES).

Se han logrado líneas celulares embrionarias pluripotentes estables en hámster (Doetschman T. y col., 1988), visón (Sukoyan y col., 1993), mono Rhesus (Thomson y col., 1995), marmota común (Thomson y col., 1996) y humano (Thomson y col., 1998). También en especies de interés ganadero han sido definidas líneas celulares *ES-like*: oveja (Notarianni y col., 1991; Dattena y col., 2006), conejo (Graves y Moreadith, 1993), cerdo (Notarianni y col., 1990; Wheeler, 1994) y vaca (Stice y col., 1996). En bovino, el aislamiento y el cultivo de líneas celulares ES han sido especialmente dificultosos, aunque recientemente Wang y col. (2005) lograron generar y caracterizar células pluripotentes de embriones bovinos.

En este trabajo se describen las primeras etapas del aislamiento y el cultivo de MCI de embriones producidos *in vitro* y la caracterización de las colonias celulares resultantes. Para la identificación del fenotipo de las células ES se ha estudiado su morfología y la expresión de marcadores específicos, así como el mantenimiento de estos rasgos a lo largo del cultivo y de los ciclos de congelación-descongelación.

Material y Métodos

Producción *In Vitro*

Los ovocitos utilizados para la producción *in vitro* se recuperaron de ovarios procedentes del matadero, que se transportaron en una solución salina con antibióticos (NaCl 9 mg/mL, Penicilina 100 UI/mL, Sulfato de Espitreptomicina 100mg/mL) y a una temperatura de 30°C. Los complejos cumulus ovocito (CCO) se obtuvieron por punción de folículos (3 a 8 mm de diámetro). Se seleccionaron solamente ovocitos con cumulus compacto y ooplasma homogéneo. El

medio de maduración consistió en TCM 199, 10% Suero Fetal Bovino (FCS), 1 µg/mL FSH porcina, 5 µg/mL LH ovina y 1 µg/mL 17-β-estradiol. Para la maduración in vitro (MIV) se cultivaron grupos de 40-50 CCO en 500 µL de medio de maduración, a 39°C, 5% CO₂ y atmósfera húmeda durante 24 h.

Los ovocitos se fertilizaron in vitro con espermatozoides motiles obtenidos mediante swim-up a partir de semen congelado y descongelado. Los presuntos cigotos se cultivaron en 500 µL de *modified synthetic oviduct fluid* (mSOF), suplementado con 5% de FCS desde el día 3 al día 9 del cultivo y con 5% CO₂, 5% O₂ y en atmósfera saturada de humedad. Para el aislamiento de MCI se seleccionaron blastocistos expandidos y eclosionados de días 7, 8 y 9 de cultivo con excelente calidad morfológica.

Aislamiento de MCI, aislamiento de colonias y mantenimiento del cultivo

Se utilizaron blastocistos eclosionados, y expandidos cuya zona pelúcida se eliminó por incubación en pronasa (4mg/mL). Tras un lavado en PBS con PVA (0,2 mg/mL) la MCI fue separada del trofotodermo (TE) por un procedimiento de inmunocirugía descrito por Solter y Knowles (1975), con pequeñas modificaciones. Abreviadamente, los embriones se incubaron en 50 µL de *bovine antiserum* (Sigma B 1520) durante 40 min a 37°C y 5% CO₂. Después dos lavados en PBS-PVA, los embriones se incubaron en 50 µL de *Complement Rabbit Serum* (Sigma S7764) durante 40 min a 37°C y 5% CO₂. Tras un lavado en PBS-PVA, se eliminó el TE, con ayuda de una pipeta, hasta que la MCI se desprendió del resto del embrión.

Cada MCI aislada se cultivó por separado a 37°C, 5% O₂ y 5% CO₂. El medio de cultivo consistió en 80% DMEM (Sigma D 6429) suplementado con 20% de FCS (Hyclone),

0,5 mL de Glutamina 200 mM, 0,5 mL de aminoácidos no esenciales, 0,5 mL de Penicilina-Estreptomicina, 40 ng/µL de *Fibroblast Growth Factor b* (bFGF, Sigma F 0291)) y 1000 U/µL de *Leukemia inhibitory factor* humano (LIFh, Sigma L5283). El cultivo se realizó sobre una monocapa de fibroblastos embrionarios de ratón (*mouse embryonic fibroblast*, MEF) inactivados mitóticamente, sembrados 48 horas antes del comienzo del cultivo de las MCI. El medio de cultivo se renovó 24 horas antes y 48 h después de la puesta en cultivo de las MCI. A partir de aquí, se añadió medio fresco cada 48 horas, al tiempo que se evaluaban el crecimiento de la colonia y la morfología de las células.

Tras 10-15 días de cultivo, las colonias se aislaron y cultivaron en una nueva monocapa sin variar las condiciones de cultivo. Para el aislamiento de las colonias se probaron dos métodos: disociación enzimática con Tripsina-EDTA (Sigma T3924), y aislamiento mecánico realizado con la ayuda de pipetas finas de cristal para separar, en función de su morfología, las partes de interés de la colonia.

Procedimiento de congelación/descongelación

Dos o tres grupos de células procedentes del aislamiento de una colonia se lavaron una vez en medio de cultivo y se depositaron en 90% de medio de cultivo con 10% de DMSO (Sigma D 4540) (medio de congelación). El tiempo de permanencia en el medio de congelación a temperatura ambiente se minimizó dado el carácter tóxico del DMSO. Para la congelación se utilizaron crioviales Corning (Ref 430488) con 0,5 mL de medio de congelación. El criovial se enfrió a -1°C/min hasta -80°C y se mantuvo 24 h a esta temperatura. Después, los crioviales se introdujeron en nitrógeno líquido. La descongelación se realizó sumergiendo

el criovial en un baño a 37°C. El contenido del vial se diluyó en 10 mL de medio de cultivo y se centrifugó a 300g durante 10 min. Se eliminó el sobrenadante y el sedimento de células se diluyó en 0,5 mL de medio de cultivo. De esta suspensión, se añadieron 250 µL a monocapas de MEF sembradas en pocillos (4-well; Nunc) hasta completar un volumen final de 500 µL.

Fosfatasa Alcalina

La expresión de la fosfatasa alcalina (FA; Sigma 86R) se analizó en las MCI y en las colonias. Las muestras se fijaron con metanol:formaldehído (9:1) durante 2 min. y se incubaron, durante 15 min, en la oscuridad y a temperatura ambiente con la mezcla de FA, según instrucciones del fabricante. Las colonias positivas se tiñeron de color rojizo, mientras que las negativas aparecieron mucho más tenues o sin color.

Marcadores específicos de superficie y nucleares

Los marcadores TRA-1-60, SSEA1, SSEA4 y Oct4 se detectaron por inmunofluorescencia. Las colonias se fijaron con paraformaldehído al 4% durante 20 min y se lavaron dos veces en tampón de lavado (1% BSA, 0,05% Na Azide, 0,1% Tween 20 en PBS). La permeabilización de las colonias se realizó con TritonX-100 al 0,1% en PBS durante 20 min, seguida de un lavado y una incubación de 1 h, en solución de bloqueo (5% BSA; 0,05% Na Azide en PBS). Posteriormente, las colonias se incubaron, por separado para cada uno de los marcadores, toda la noche a 4°C con los anticuerpos (Ac) primarios. Las concentraciones de Ac utilizadas fueron las siguientes: Ac monoclonales de ratón contra TRA-1-60 (IgM dilución 1:20), SSEA 1 (IgM dilución 1:10) y SSEA 4 (IgG dilución 1:30) (ES cell characterization kit, Cat

SCR001, Chemicon International) y Ac polyclonal de conejo Oct4 (IgG, 1:100; ABCAM ab18976). El Ac no unido específicamente se eliminó mediante lavados y las muestras se incubaron 1 h con el Ac secundario correspondiente: *Goat anti Mouse* IgM Cy3 (1:400, Laboratorios Jackson, 115-166-020), *Rabbit anti Mouse* IgG FITC (1:20, Dako F0261) y *Donkey anti Rabbit* IgG FITC (1:400, Laboratorios Jackson, 711-096-152). Los Ac primarios y secundarios fueron diluidos usando solución de bloqueo.

Resultados y Discusión

Con tripsina-EDTA no se consiguió una suspensión celular capaz de establecer nuevamente un cultivo estable y no diferenciado. Sin embargo, el procedimiento mecánico permitió obtener colonias que se mantuvieron creciendo indiferenciadas en algunos casos. El aislamiento mecánico ha tenido éxito en embriones producidos *in vitro* (Mitalipova y col., 2001) y en embriones producidos por clonación (Wang y col., 2005). En cambio, en el ovino la disociación enzimática ha demostrado ser el sistema de aislamiento de elección (Dattena y col., 2006).

Las colonias obtenidas presentaron una característica forma circular con una clara frontera de separación con las MEF y las células procedentes del TE residual que crecieron a su alrededor (figura 1a) tal como describieron Wang y col. (2005). Las células que integran las colonias presentan límites bien definidos (figura 1b). Esta morfología se mantuvo en los sucesivos pases de cultivo y después del ciclo de congelación-descongelación.

A mayor expresión de marcadores de pluripotencia, más alejada estará la colonia de un estado de diferenciación. La expresión de

estos marcadores no es constante dentro de una misma colonia, siendo típico encontrar un mosaico de células positivas y negativas para un mismo marcador. Aparentemente, la capacidad de las células ES para mantener su pluripotencia y, por tanto, generar un nuevo embrión completo, depende del número de pases (Nagy y col., 1990). Puesto que la pluripotencia puede desaparecer, es necesario analizar marcadores de indiferenciación a lo largo del cultivo. Las líneas celulares obtenidas en nuestro estudio expresan SSEA4, TRA-1-60 y Oct4, mientras que son negativas a SSEA1. Para el estudio de este marcador se utilizó como control positivo células madre embrionarias de ratón, que han demostrado ser SSEA1 positivas (Solter y Knowles, 1978; Resnick y col., 1992). En células ES-like bovinas, la expresión de SSEA1 es controvertida obteniéndose tanto resultados positivos (Wang y col., 2005) como negativos (Mitali-

pova y col., 2001). Mientras que Wang y col. (2005) obtuvieron colonias positivas para Oct4 y negativas para TRA-1-60, la línea ES-like producida en nuestro laboratorio fue positiva tanto para TRA-1-60 como para Oct4. En el presente trabajo, todas las MEF utilizadas carecían de expresión para los marcadores estudiados. (datos no mostrados). En la tabla 1 se presentan los resultados de la expresión de los marcadores detectados por inmunohistoquímica. La fosfatasa alcalina fue positiva en todas las colonias analizadas, tanto en fresco como después de descongeladas. Sin embargo, se ha descrito heterogeneidad en la actividad de la FA (Gjorret y Maddox, 2005; Yadav y col., 2005). La FA se expresa de forma constante en células ES de ratón (Wobus y col., 1984) y humanas (Kim y col., 2004; Stojkovic y col., 2004; Oh y col., 2005).

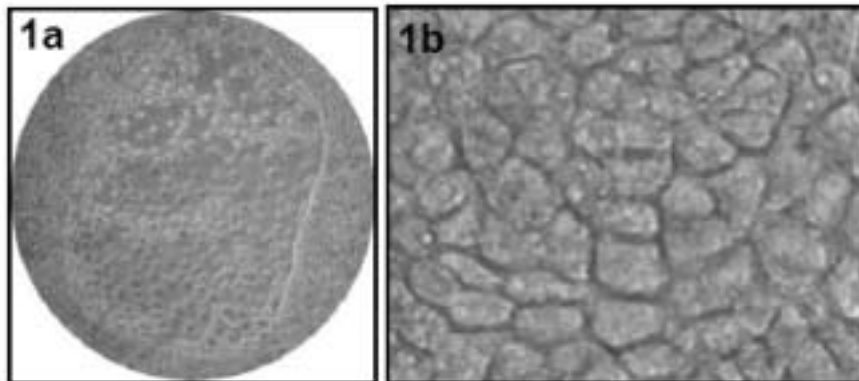


Figura 1. 1a) Figura representativa de las colonias *ES-like* obtenidas. 1b) Detalle de la morfología de las células *ES-like* mostrando la clara definición de los límites celulares de la colonia.

Figure 1. 1a) A representative *ES-like* colony. 1b) *ES-like* cell detail, showing distinguishable cell-cell boundaries.

En este trabajo se han descrito procedimientos que han permitido aislar, mantener y caracterizar colonias celulares con cualidades *ES-like* procedentes de embriones bovinos producidos por fertilización *in vitro*. Es

preciso ahora determinar la pluripotencia e inmortalidad de estas colonias celulares. Nuestros estudios futuros permitirán determinar el grado de indiferenciación de las poblaciones celulares utilizando PCR a tiem-

po real (Noaksson, y col., 2005) y cuantificar la actividad de la telomerasa. De esta enzima, las células diferenciadas presentan menor actividad que las indiferenciadas (Pericuesta y col., 2006). Es preciso además determinar la capacidad de estas células para formar los denominados cuerpos embrioides, estructuras que se diferencia-

rán de forma espontánea en las tres capas embrionarias si están básicamente formadas por células pluripotentes.

Los procedimientos empleados permitieron establecer una colonia *ES-like*, aunque los autores son conscientes de la necesidad de evaluar la pluripotencia y capacidad de autorrenovación de las células obtenidas.

Tabla 1. Análisis inmunohistoquímico de cultivos primarios, pase 2, pase 3 y las colonias formadas por los grupos celulares supervivientes a congelación-descongelación

Table 1. Immunocytochemical analysis of bovine embryonic outgrowths. Pluripotency markers detected on primary culture, passage 2, passage 3 and post-thawed colonies

Marcador	Cultivo Primario	Pase 2	Pase 3	Post-descongelación
SSEA1	-	-	-	-
SSEA4	+	+	+	+
TRA-1-60	+	+	+	+
Oct 4	+	+	+	+

Agradecimientos

Este trabajo se ha financiado parcialmente por los proyectos AGL2002-01175 y 2005-04479 y las ayudas a la realización de estancias en centros extranjeros de becas FPI del MEC en su convocatoria de 2005. El trabajo se llevó a cabo durante la estancia de Aida Rodríguez en la Universidad de Nottingham, Division of Animal Physiology, University of Nottingham. Los autores agradecen su colaboración a Division of Animal Physiology (University of Nottingham) y a sus estudiantes de doctorado.

Bibliografía

Brook FA, Gardner RL, 1997. The origin and efficient derivation of embryonic stem cell. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94: 5709-5712.

Clark J, Whitelaw B, 2003. A future for transgenic livestock. Nature Review 4: 825-833.

Dattena M, Chessa B, Lacerenza D, Accardo C, Pilichi S, Mara L, Chessa F, Vincenti L, Cappai P, 2006. Isolation, culture, and characterization of embryonic cell lines from vitrified sheep blastocysts. Mol. Reprod. Dev. 73(1): 31-9.

Doetschman T, Williams P, Maeda N, 1988. Establishment of hamster blastocyst-derived embryonic stem (ES) cells. Dev. Biol.; 127: 224-227.

Gjørret JO y Maddox-Hyttel P, 2005. Attempts towards derivation and establishment of bovine embryonic stem cell-like cultures. Reprod. Fertil. Dev. 17: 113-124.

Graves KH, Moreadith RW, 1993. Derivation and characterization of putative pluripotential embryonic stem cells from preimplantation rabbit embryos. Mol. Reprod. Dev. 36: 424-433.

Kim SJ, Park JH, Lee JE, Kim JM, Lee JB, Moon SY, Roh SI, Kim CG, Yoon HS, 2004. Effects of type IV collagen and laminin on the cryopreservation of human embryonic stem cells. Stem Cells. 22(6): 950-61.

- Mitalipova M, Beyhan Z, Neal LF, 2001. Pluripotency of bovine embryonic cell line derived from precompacting embryos. *Cloning* 3: 59-67.
- Nagy A, Rossant J, Nagy R, Abramow-Newerly W, Roder JC, 1990 Embryonic stem cells alone are able to support fetal development in the mouse. *Development*. 110, 815-821.
- Noaksson K, Zoric N, Zeng X, Rao MS, Hyllner J, Semb H, Kubista M, Sartipy P, 2005. Monitoring differentiation of human embryonic stem cells using Real-Time PCR. *Stem Cells*, 23: 1460-1467.
- Notarianni E, Laurie S, Moor RM, Evans MJ, 1990. Maintenance and differentiation in culture of pluripotential embryonic cell lines from pig blastocysts. *J. Reprod. Fertil. suppl.* 41: 51-56.
- Notarianni E, Galli C, Laurie S, Moor RM, Evans MJ, 1991. Derivation of pluripotent, embryonic cell lines from the pig and sheep. *J. Reprod. Fertil.* 43: 255-260.
- Oh SK, Kim HS, Ahn HJ, Seol HW, Kim YY, Park YB, Yoon CJ, Kim DW, Kim SH, Moon SY, 2005. Derivation and characterization of new human embryonic stem cell lines: SNUhES1, SNUhES2, and SNUhES3. *Stem Cells*. Feb; 23(2): 211-9.
- Pera MF, Reubinoff B, Trounson A, 2000. Human embryonic stem cells. *Journal of Cell Science*, 113: 5-10.
- Pericuesta E, Ramirez MA, Villa-Diaz A, Relanogines A, Torres JM, Nieto M, Pintado B, Gutierrez-Adan A, 2006. The proximal promoter region of mTert is sufficient to regulate telomerase activity in ES cells and transgenic animals. *Reprod. Biol. Endocrinol.* Feb 3; 4:5.
- Resnick J, Bixler LS, Cheng L, Donovan PJ, 1992. Long-term proliferation of mouse primordial germ cells in culture. *Nature* 359: 550-551.
- Solter D, Knowles BB. 1975. Immunosurgery of mouse blastocyst. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 72: 5099-5102.
- Solter D, Knowles BB, 1978. Monoclonal antibody defining a stage specific mouse embryonic antigen (SSEA-1). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75: 5565-5569.
- Stice SL, Strelchenko NS, Keefer CL, Matthews L, 1996. Pluripotent bovine embryonic cell lines direct embryonic development following nuclear transfer. *Biol Reprod.* 54: 100-110.
- Stojkovic M, Lako M, Stojkovic P, Stewart R, Przyborski S, Armstrong L, Evans J, Herbert M, Hyslop L, Ahmad S, Murdoch A, Strachan T, 2004. Derivation of human embryonic stem cells from day-8 blastocysts recovered after three-step in vitro culture. *Stem Cells*. 22(5): 790-797.
- Sukoyan MA, Vatolin SY, Golubitsa AN, Zhelezova AI, Semenova LA, Serov OL, 1993. Embryonic stem cells derived from morulae, inner cell mass, and blastocysts of mink: comparisons of their pluripotencies. *Mol. Reprod. Dev.*; 36: 148-158.
- Thomson JA, Kalishman J, Golos TG, Durning M, Harris CP, Becker RA, Hearn JP, 1995. Isolation of a primate embryonic stem cell line. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*; 92: 7844-7848.
- Thomson JA, Kalishman J, Golos TG, Durning M, Harris CP, Hearn JP, 1996. Pluripotent cell lines derived from common marmoset (*Callithrix jacchus*) blastocysts. *Biol. Reprod.* 55: 254-259.
- Thomson JA, Itskovotzeldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, Jones JM, 1998. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 282: 1145-1147
- Wang L, Duan E, Sung L, Jeong B, Yang X, Tian XC, 2005. Generation and characterization of pluripotent stem cells from cloned bovine embryos. *Biol Reprod.* 73, 149-155.
- Wobus AM, Holzhausen H, Jakel P, Schoneich J, 1984. Characterization of a pluripotent stem cell line derived from a mouse embryo. *Exp. Cell. Res.* 152(1): 212-9.
- Yadav P, Kues W, Herrmann D, Carnwath J, Niemann H, 2005. Bovine ICM derived cells express the Oct4 Ortholog. *Mol. Reprod. Develop.* 72(2): 182-190.

(Aceptado para publicación el 2 de mayo de 2006)