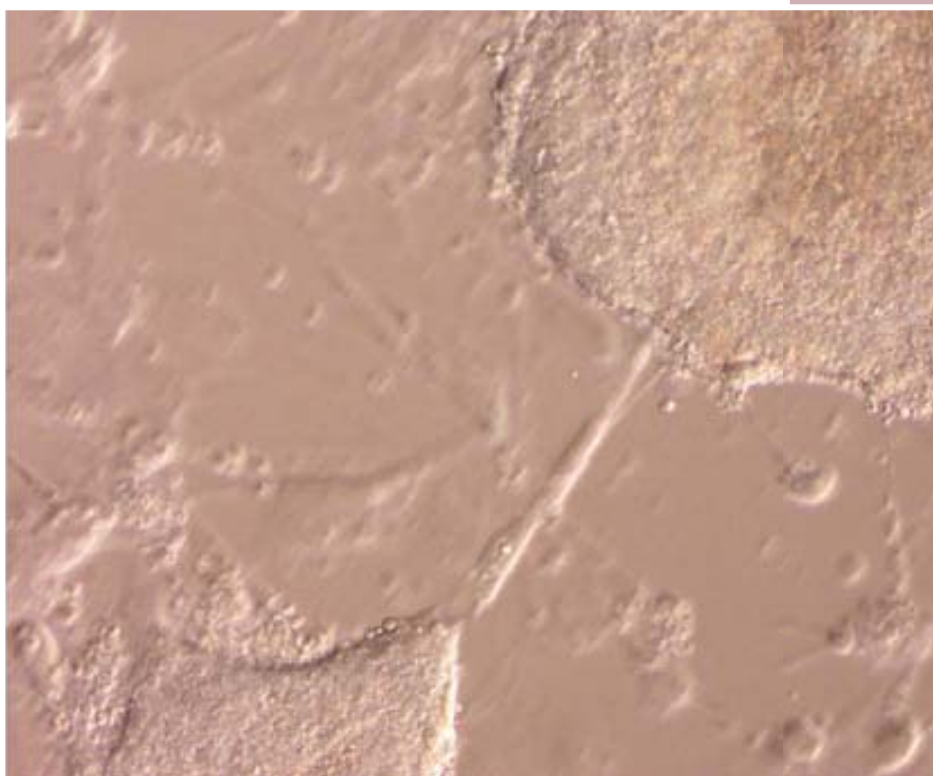


TESI DOCTORAL

Anàlisi de paràmetres que influeixen en la derivació de línies de cèl·lules mare embrionàries de ratolí a partir de blastòmers aïllats



Sheyla González Garrido

ABRIL 2011

ANÀLISI DE PARÀMETRES QUE INFLUEIXEN EN LA DERIVACIÓ DE LÍNIES DE
CÈL·LULES MARE EMBRIONÀRIES DE RATOLÍ A PARTIR DE BLASTÒMERS AÏLLATS

Memòria presentada per

Sheyla González Garrido

Per optar al grau de **Doctor en Biologia Cel·lular** per la **Universitat Autònoma de Barcelona**

Sota la direcció de

Dr. Josep Santaló Pedro

Dra. M^a Elena Ibáñez de Sans

A la Unitat de Biologia Cel·lular de la Facultat de Biociències de la Universitat Autònoma de Barcelona

El Dr. Josep Santaló Pedro, Catedràtic de Biologia Cel·lular i la Dra. M^a Elena Ibáñez de Sans, Professora Agregada del Departament de Biologia Cel·lular, de Fisiologia i d'Immunologia de la Universitat Autònoma de Barcelona,

CERTIFIQUEN:

que Sheyla González Garrido ha realitzat la Tesi Doctoral titulada "Anàlisi de paràmetres que influeixen en la derivació de línies de cèl·lules mare embrionàries de ratolí a partir de blastòmers aïllats" sota la seva direcció.

Bellaterra, abril 2011.

Dr. Josep Santaló Pedro

Dra. M^a Elena Ibáñez de Sans

Sheyla González Garrido

Aquesta tesi doctoral s'ha realitzat amb el finançament dels projectes:

- BIO2005-04341 *Ministerio de Educación y Ciencia*
- BIO2006-11792 *Ministerio de Educación y Ciencia*
- DGR #2005SGR-0047 Generalitat de Catalunya
- DGR #2009SGR-00282 Generalitat de Catalunya

Sheyla González Garrido ha gaudit d'una beca predoctoral per a la Formació de Professorat Universitari (FPU) concedida pel *Ministerio de Ciencia e Innovación* (AP2006-02038).

A mi familia

Al Carles

“Queda prohibido no sonreír a los problemas,
no luchar por lo que quieres,
abandonarlo todo por miedo,
no convertir en realidad tus sueños”.

Pablo Neruda.

ÍNDEX

| | |
|---|----|
| ABREVIATURES I ACRÒNIMS | 1 |
| RESUM | 5 |
| INTRODUCCIÓ | 9 |
| 1. CÈL·LULES MARE | 11 |
| 1.1. Cèl·lules mare embrionàries..... | 11 |
| 1.2. Altres tipus de cèl·lules mare segons el potencial de diferenciació..... | 13 |
| 2. DERIVACIÓ DE CÈL·LULES MARE EMBRIONÀRIES | 17 |
| 2.1. Tècniques d'establiment de línies de cèl·lules mare embrionàries | 19 |
| 2.2. Caracterització de línies de cèl·lules mare embrionàries | 22 |
| 3. MECANISMES DE MANTENIMENT DE LA PLURIPOTÈNCIA <i>IN VIVO</i> I <i>IN VITRO</i> | 24 |
| 3.1. Factors extrínsecs i vies de senyalització intracel·lular | 26 |
| 3.1.1. Matriu extracel·lular | 26 |
| 3.1.2. Senyalització a través de LIF/JAK/STAT..... | 26 |
| 3.1.3. Senyalització a través del factor TGF β | 27 |
| 3.1.4. Via de les quinases PI3K i MAPK | 28 |
| 3.1.5. Via Ras/Raf/ERK | 28 |
| 3.1.6. Via Wntless/Int | 29 |
| 3.1.7. Unions intercel·lulars | 30 |
| 3.2. Reguladors intrínsecs de la pluripotència i de la diferenciació | 37 |
| 3.2.1. Factors de transcripció..... | 37 |
| 3.2.2. Reguladors epigenètics..... | 41 |
| 3.2.3. microRNAs | 43 |
| 4. MODELS DE SEGREGACIÓ DELS LLINATGES CEL·LULARS EN L'EMBRIÓ PREIMPLANTACIONAL I INFLUÈNCIA EN LA DERIVACIÓ DE CÈL·LULES MARE EMBRIONÀRIES | 45 |
| 4.1. Segregació de la massa cel·lular interna i el trofèctoderma | 45 |
| 4.1.1. Interacció entre polaritat cel·lular, posició i proteïnes de destí cel·lular | 46 |
| 4.1.2. Determinació primerenca del destí dels blastòmers..... | 49 |
| 4.2. Potencialitat dels blastòmers aïllats en el desenvolupament embrionari i en la derivació de cèl·lules mare embrionàries | 52 |
| OBJECTIUS | 55 |
| RESULTATS I DISCUSSIÓ | 59 |
| ARTICLE I | 61 |
| ARTICLE II | 75 |
| ARTICLE III | 89 |

| | |
|---|-----|
| DISCUSSIÓ GENERAL | 121 |
| CONCLUSIONS | 135 |
| ANNEXES | 139 |
| ANNEX I. PROTOCOLS DE TREBALL..... | 141 |
| 1. TÈCNiques GENERALS..... | 143 |
| 1.1. Obtenció i cultiu d'embrions | 143 |
| 1.2. Aïllament de blastòmers mitjançant biòpsia embrionària | 143 |
| 1.3. Inactivació de fibroblasts embrionaris de ratolí per a la producció de MEFs..... | 144 |
| 1.4. Congelació de MEFs i mESCs..... | 144 |
| 1.5. Cultiu de les MEFs..... | 144 |
| 1.6. Caracterització de les línies de mESCs | 145 |
| 1.6.1. Caracterització morfològica | 145 |
| 1.6.2. Detecció de marcadors de pluripotència per immunofluorescència..... | 145 |
| 1.6.3. Diferenciació <i>in vitro</i> i detecció de marcadors de diferenciació primerencs de les tres làmines embrionàries per immunofluorescència | 146 |
| 1.7. Anàlisi estadística..... | 147 |
| 2. EXPERIMENTAL I (ARTICLE I): DERIVACIÓ DE mESCs A PARTIR DE BLASTÒMERS AÏLLATS I EMBRIONS SENCERS COMPARANT TRES MÈTODES DE DERIVACIÓ DESCRITS..... | 148 |
| 2.1. Establiment de línies de mESCs | 148 |
| 2.1.1. Mètode de derivació clàssic o estàndard..... | 148 |
| 2.1.2. Mètode de derivació amb una adhesió prèvia al substrat..... | 148 |
| 2.1.3. Mètode de derivació en un medi de cultiu definit..... | 148 |
| 2.2. Expansió de les línies de mESCs..... | 149 |
| 3. EXPERIMENTAL II (ARTICLE II): INFLUÈNCIA DE LES UNIONS ADHERENTS AMB E-CADHERINA EN L'EFICIÈNCIA DE DERIVACIÓ DE mESCs | 152 |
| 3.1. Unió i detecció d'una E-cadherina quimèrica | 152 |
| 3.2. Immunodetecció de l'E-cadherina en embrions en estadi de 8 cèl·lules | 152 |
| 3.3. Immunodetecció i anàlisi de la mitjana de cèl·lules de la ICM i del TE en pseudoblastocists formats a partir de blastòmers únics aïllats en estadi de 8 cèl·lules..... | 153 |
| 3.4. Establiment de línies de mESCs en presència de l'E-cad-Fc | 153 |
| 3.5. Derivació i caracterització de línies de TSCs de ratolí en presència de l'E-cad-Fc | 153 |
| 4. EXPERIMENTAL III (ARTICLE III): INFLUÈNCIA DE LES DECISIONS PRIMERENQUES DELS BLASTÒMERS EN ESTADI DE 4 CÈL·LULES PEL QUE FA AL DESTÍ CAP A LA ICM O EL TE EN L'EFICIÈNCIA DE DERIVACIÓ DE LES mESCs | 155 |
| 4.1. Marcatge de blastòmers amb un colorant fluorescent | 155 |

| | |
|--|------------|
| 4.2. Establiment de línies de mESCs a partir de blastòmers aïllats en estadi de 4 cèl·lules... | 156 |
| 4.3. Immunodetecció i anàlisi de la proporció de cèl·lules de la ICM i del TE en pseudoblastocists formats a partir de blastòmers aïllats en estadi de 4 cèl·lules | 156 |
| ANNEX II. COMPOSICIÓ DELS MEDIS DE CULTIU I SOLUCIONS..... | 157 |
| 1. MEDI KSOM-H DE MANIPULACIÓ EMBRIONÀRIA | 159 |
| 2. MEDIS DE CULTIU DE MANTENIMENT DE LES MEFs I D'ESTABLIMENT DE mESCs | 160 |
| 3. MEDIS DE CULTIU DE TSCs..... | 160 |
| 4. SOLUCIÓ ÀCIDA DE TYRODE | 162 |
| BIBLIOGRAFIA | 163 |
| AGRAÏMENTS | 185 |

ABREVIATURES I ACRÒNIMS

| | |
|--------------|---|
| ACTH | <i>Adrenocorticotropic Hormone</i> |
| AFP | <i>Alpha-fetoprotein</i> |
| ASCs | <i>Adult Stem Cells</i> |
| bFGF/FGF2 | <i>Basic Fibroblast Growth Factor/ Fibroblast Growth Factor 2</i> |
| BMP | <i>Bone Morphogenetic Protein</i> |
| BSA | <i>Bovine Serum Albumine</i> |
| CARM1 | <i>Coactivator-associated Arginine Methyltransferase 1</i> |
| DMEM | <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i> |
| DMSO | <i>Dimethylsulfoxide</i> |
| ECCs | <i>Embryonal Carcinoma Cells</i> |
| EGCs | <i>Embryonal Germ Cells</i> |
| EGF | <i>Epithelial Growth Factor</i> |
| ELF | <i>Extreme Low Frequency</i> |
| EpiSCs | <i>Epiblastic Stem Cells</i> |
| ERK | <i>Extracellular Signal-Regulated Kinase</i> |
| ESCs | <i>Embryonic Stem Cells</i> |
| FCS | <i>Fetal Calf Serum</i> |
| FGF | <i>Fibroblast Growth Factor</i> |
| FITC | <i>Fluorescein Isothiocyanate</i> |
| FSH | <i>Follicle Stimulating Hormone</i> |
| GFP | <i>Green Fluorescence Protein</i> |
| GSK3 β | <i>Glycogen Synthase Kinase 3 beta</i> |
| HBSS | <i>Hank's Balance Saline Solution</i> |
| hCG | <i>Human Chorionic Gonadotropin</i> |
| hESCs | <i>Human Embryonic Stem Cells</i> |
| HMG | <i>High Mobility Group</i> |
| ICM | <i>Inner Cell Mass</i> |
| ICSI | <i>Intracytoplasmic Sperm Injection</i> |
| Id | <i>Inhibitor of differentiation</i> |
| IgG1 | <i>Immunoglobulin G1</i> |
| iPSCs | <i>Induced Pluripotent Stem Cells</i> |
| iu | <i>International units</i> |
| JAK | <i>Januns Kinase</i> |
| JAM | <i>Junction Adhesion Molecule</i> |
| KLF | <i>Krüppel Like Factor</i> |
| KSOM | <i>K⁺-modified simplex optimized medium</i> |
| KSR | <i>Knockout Serum Replacement</i> |
| LH | <i>Luteinizing Hormone</i> |

| | |
|--------|---|
| LIF | <i>Leukemia Inhibitory Factor</i> |
| MAPK | <i>Mitogen-Activated Protein Kinase</i> |
| MEFs | <i>Mouse Embryonic Fibroblasts</i> |
| mESCs | <i>Mouse Embryonic Stem Cells</i> |
| Nestin | <i>Neuroepithelial stem cell protein</i> |
| PB | <i>Polar Body</i> |
| PBS | <i>Phosphate Buffered Saline</i> |
| PDGF | <i>Platelet-Derived Growth Factor</i> |
| PGCs | <i>Primordial Germ Cells</i> |
| PGD | <i>Preimplantational Genetic Diagnosis</i> |
| PI3K | <i>Phosphatidylinositol-3-Kinase</i> |
| PIP3 | <i>Phosphatidylinositol trisphosphate 3</i> |
| PKA | <i>Protein Kinase A</i> |
| PKC | <i>Protein Kinase C</i> |
| PMSG | <i>Pregnant Mare's Serum Gonadotropin</i> |
| RPMI | <i>Royal Park Memorial Institute (culture medium)</i> |
| SCs | <i>Stem Cells</i> |
| SEP | <i>Sperm Entry Position</i> |
| SMA | <i>Smooth Muscle Actin</i> |
| SSCs | <i>Spermatogonial Stem Cells</i> |
| SSEA | <i>Stage Specific Embryonic Antigen</i> |
| STAT | <i>Signal Transducer and Activator of Transcription</i> |
| TCF | <i>T-Cell Factor</i> |
| TE | <i>Trophectoderm</i> |
| TGFβ | <i>Transforming Growth Factor beta</i> |
| TRA | <i>Tumor Related Antigen</i> |
| TSCs | <i>Trophoblast Stem Cells</i> |
| Wnt | <i>Wingless/Int</i> |
| YAP | <i>Yes-Associated Protein</i> |
| ZP | <i>Zona Pellucida</i> |

RESUM

La derivació de línies de cèl·lules mare embrionàries (ESCs) depèn de tot un conjunt de factors relacionats tant amb l'embrió com amb el propi procés de derivació, el coneixement dels quals és de gran importància per tal d'incrementar l'eficiència d'establiment d'aquestes línies. Les ESCs de ratolí (mESCs), en concret, representen un model d'especial rellevància en ciència bàsica per tal d'optimitzar i estandarditzar uns protocols de derivació que produeixin una eficiència de derivació raonable i condueixin a l'obtenció de línies d'ESCs de qualitat pel que fa a la seva pluripotencialitat i estabilitat durant el cultiu *in vitro*. La present tesi doctoral pretén aclarir alguns dels paràmetres que podrien ser importants durant el procés de derivació de mESCs a partir de blastòmers aïllats dels estadis embrionaris de 4 i 8 cèl·lules. La derivació a partir de blastòmers aïllats representa un avenç important per tal d'evitar la destrucció d'embrions, un aspecte especialment important en el cas dels embrions humans, i incrementar l'eficiència de derivació d'embrions, que per les seves característiques, siguin especialment valuosos.

En la primera part del disseny experimental, s'ha analitzat la influència del mètode de derivació, el nombre de blastòmers aïllats i l'estadi embrionari, en l'eficiència d'establiment de línies de mESCs. Els resultats obtinguts a partir de la comparació de tres mètodes de derivació de mESCs indicaren que l'eficiència d'establiment és més elevada quan la derivació es produeix en un medi de cultiu definit sense sèrum evitant, així, la diferenciació espontània de les mESCs. A més, es va determinar que l'adhesió prèvia al substrat dels blastòmers o embrions a partir dels quals s'inicia la derivació no incrementa l'eficiència del procés, sinó que el contacte inicial amb les cèl·lules nodridores o de suport en co-cultiu és crucial. Pel que respecta a la influència del nombre de blastòmers aïllats, tant en estadi de 4 com 8 cèl·lules, el rendiment del procés d'establiment incrementa utilitzant un major nombre de blastòmers aïllats, de manera que la màxima eficiència es produeix quan s'utilitza la meitat de l'embrió com a màxim per no comprometre la viabilitat del mateix. Finalment, els estadis embrionaris que van aportar una major eficiència de derivació de línies de mESCs van ser els estadis posteriors a la compactació (mòrula i blastocist). No es van trobar diferències entre els estadis de 4 i 8 cèl·lules, encara que la tendència apuntava a un augment en l'eficiència a partir d'embrions en estadi de 8 cèl·lules.

Recentment, s'ha determinat la importància de les unions adherents amb E-cadherina en la derivació i el manteniment de línies de mESCs i també de línies humanes (hESCs). En aquest sentit, en una segona part de l'experimental es va estudiar la importància d'aquest tipus d'unió tant en la proliferació com en l'inici del procés de derivació de línies de mESCs a partir de blastòmers únics aïllats en estadi de 8 cèl·lules (grup 1/8). Amb aquest objectiu es va unir una proteïna quimèrica formada pel domini extracel·lular de l'E-cadherina i el domini Fc de la IgG1 humana (E-cad-Fc) a la superfície dels blastòmers del grup de 1/8. Aquesta proteïna quimèrica es creu que desencadena una cascada de senyalització semblant a la que es produiria quan dos o més blastòmers contacten a través d'unions amb E-cadherina nativa, el que es tradueix en un increment en la taxa de divisió dels blastòmers individuals i en l'eficiència de derivació de mESCs després d'una exposició de 24 h. L'efecte en l'eficiència de derivació podria ser conseqüència de la distribució uniforme que adopta l'E-cad-Fc en la superfície dels blastòmers i que determinaria que els blastòmers tinguessin una

predeterminació a formar part de la massa cel·lular interna (ICM) del blastocist, a partir de la qual es deriven les línies de mESCs.

Finalment, donat que existeixen evidències moleculars i citològiques que indiquen que els blastòmers podrien tenir la seva localització en la ICM o el trofotoderma (TE) del blastocist prefixada ja en estadis embrionaris primerencs, l'aïllament d'un blastòmer concret de l'embrió amb un destí preferencial a formar part de la ICM podria incrementar l'eficiència del procés de derivació. En una etapa final de l'experimental, es va intentar determinar si l'aïllament de blastòmers concrets en estadi de 4 cèl·lules produeix eficiències de derivació diferents en funció de la temporalitat i l'orientació dels plans de divisió que s'estableixen en estadi de 2 cèl·lules. A partir d'experiments de seguiment dels blastòmers al llarg de les divisions embrionàries fins a l'estadi de blastocist amb un colorant lipofilic vam determinar que els blastòmers procedents de la primera divisió en sentit equatorial tendien a formar part del TE del blastocist. En canvi, no es va trobar una tendència clara per als blastòmers procedents de la primera divisió en estadi de 2 cèl·lules en sentit meridional, malgrat que un percentatge major dels descendents d'aquests blastòmers es localitzaven en la ICM del blastocist. Els experiments de derivació de línies de mESCs, en canvi, mostraren eficiències de derivació semblants per tots els grups estudiats, independentment de si aquests blastòmers dins l'embrió mostraven una predeterminació concreta. Se sap que l'aïllament de blastòmers pot produir un redireccionament en el destí dels mateixos, de manera que tots ells tindrien les mateixes possibilitats de formar una línia de mESCs, fet que podria explicar els resultats trobats en el nostre estudi.

Mitjançant l'anàlisi d'aquests factors, i combinant les condicions descrites per altres autors i algunes de les aproximacions descrites en la pròpia tesi doctoral, hem determinat quines són les condicions òptimes que aporten un increment de l'eficiència de derivació de les línies de mESCs a partir de blastòmers aïllats del estadis embrionaris de 4 i 8 cèl·lules.

INTRODUCCIÓ

1. CÈL·LULES MARE

Les cèl·lules mare (SCs) o cèl·lules troncales són un tipus cel·lular especial, ja que posseeixen la capacitat única de renovar-se indefinidament i a la vegada de donar lloc a cèl·lules especialitzades. Malgrat que la majoria de les cèl·lules del cos estan especialitzades en una funció concreta, les SCs es mantenen indiferenciades fins que reben un senyal que les dirigeix cap a un tipus cel·lular especialitzat. Aquestes dues propietats que fan de les SCs un tipus cel·lular únic han d'estar ben regulades i són fonamentals en l'ontogènia i el manteniment correcte dels teixits.

L'aïllament i manteniment *in vitro* de línies de SCs és un aspecte fonamental en recerca bàsica per tal d'entendre els principis moleculars i genètics bàsics mitjançant els quals aquestes cèl·lules poden proliferar indefinidament o diferenciar-se sota un estímul determinat. A més, el manteniment *in vitro* proporciona una quantitat suficient de cèl·lules que, una vegada diferenciades en un tipus cel·lular concret, estarien disponibles per a possibles transplantaments en pacients amb una malaltia particular.

Però la capacitat de les SCs de donar lloc a cèl·lules especialitzades depèn del potencial de diferenciació de cada tipus concret de SC. En els propers apartats s'explica amb més detall els diferents tipus de SCs en funció del seu potencial de diferenciació, centrant-nos en les cèl·lules mare embrionàries (ESCs) en les quals es basa la present tesi doctoral.

1.1. Cèl·lules mare embrionàries

Les cèl·lules mare embrionàries (ESCs) són cèl·lules indiferenciades, és a dir, no especialitzades en tipus cel·lulars concrets, que s'estableixen a partir d'embrions preimplantacionals, normalment en estadi de blastocist. L'estadi embrionari de blastocist es caracteritza per la presència de dos llinatges cel·lulars ben diferenciats, un epitel polaritzat anomenat trofotoderma (TE) i una massa de cèl·lules pluripotents anomenada massa cel·lular interna (ICM) d'on concretament deriven les ESCs. Aquestes ESCs presenten una sèrie de característiques pròpies d'aquest tipus cel·lular (Smith, 2001). Tenen la capacitat de replicar-se indefinidament sense diferenciar (*self-renewal*) i, sota l'estímul adequat, poden diferenciar *in vitro* a teixits de les tres làmines embrionàries (ectoderma, endoderma i mesoderma). A més, en ser introduïdes en embrions produeixen animals quimèrics i colonitzen la línia germinal, o un cop injectades en animals produeixen tumors *in vivo*. A banda, les ESCs, a diferència de les cèl·lules somàtiques, es caracteritzen per l'absència de punt de control en la fase G1 del cicle cel·lular, fet que implica una disminució en la capacitat de reparació del DNA. Malgrat això, les línies d'ESCs han de mantenir un cariotip diploide estable

durant el seu manteniment *in vitro*. Una altra característica de les ESCs és que no experimenten la inactivació del cromosoma X.

Des dels inicis de la derivació d'ESCs a partir de la ICM de l'embrió en estadi de blastocist (Evans i Kaufman, 1981; Martin, 1981), s'ha intentat derivar línies d'ESCs de ratolí (mESCs) i humanes (hESCs) a partir d'embrions sencers en estadis previs a blastocist (Strelchenko *et al.*, 2004; Tesar, 2005), i a partir de blastòmers aïllats d'estadis embrionaris previs a la mòrula (Klimanskaya *et al.*, 2006; Wakayama *et al.*, 2007). A més, s'han provat diferents aproximacions en la tècnica i composició del mètode de cultiu per tal de millorar l'eficiència d'establiment de les línies (Chung *et al.*, 2006 i 2008). Malgrat això, s'ha trobat molt difícil l'establiment d'unes directrius clares en la derivació de les línies de mESCs i hESCs, ja que no existeix un consens entre laboratoris, les eficiències de derivació són bastant variables i, a més, la derivació de línies pot ésser influenciada per factors molt variats. Se sap que factors com l'adhesió (Tesar, 2005), les unions intercel·lulars entre blastòmers (Todorova *et al.*, 2008; Xu *et al.*, 2010) o el destí cap a la ICM o el TE dels blastòmers procedents d'estadis embrionaris primerencs (Lorthongpanich *et al.*, 2008) poden ser claus en l'estudi dels paràmetres que influeixen la derivació de línies d'ESCs.

Una de les característiques més importants de les ESCs és la seva pluripotència. Les ESCs es defineixen com a pluripotents degut a la seva capacitat de produir teixits de les tres làmines embrionàries. En canvi, les cèl·lules totipotents serien aquelles que, a més, presenten la capacitat de produir TE, el teixit extraembrionari que donarà lloc a la placenta del fetus en gestació, a banda dels teixits embrionaris de les tres làmines embrionàries. D'aquesta manera, el terme totipotent es reserva per a l'estadi embrionari de zigot i els blastòmers d'estadis embrionaris primerencs que, en principi, encara retenen un potencial de diferenciació complet, és a dir, un cop aïllats poden donar lloc a un individu sencer (Tarkowski i Wroblewska, 1967; Rossant, 1976). Malgrat això, s'ha descrit que les hESCs tenen la capacitat de diferenciar-se en teixit del TE, cosa que indicaria un origen diferent al de les mESC (Thomson *et al.*, 1998; Rossant, 2008).

El significat del terme pluripotència i les característiques que ha de presentar una línia establerta d'ESCs per tal de considerar-la com a pluripotent ha generat una certa controvèrsia durant anys. Maherali i Hochedlinger (2008) van formular una definició més estricta del terme, de manera que en ratolí les ESCs es consideren pluripotents quan són capaces de formar un embrió a través de la complementació tetraploide, consistent en injectar les ESCs en blastocists tetraploides (vegeu apartat 2.2 sobre caracterització de les ESCs).

Degut a la seva capacitat de produir teixits de les tres làmines embrionàries, les línies d'ESCs es consideren bones candidates per regenerar teixits i òrgans danyats en futures teràpies cel·lulars, així com potents eines d'estudi de processos fonamentals que tenen lloc durant el desenvolupament embrionari, i com a models de malalties per tal de realitzar un cribatge de fàrmacs i analitzar la seva toxicitat. A més, la utilització d'aquestes cèl·lules obre les portes a l'eliminació de l'ús de models animals d'experimentació per la realització d'aquests estudis, així com els problemes ètics i econòmics derivats d'aquesta utilització. Les línies de mESCs constitueixen un bon model en recerca bàsica donat que s'estableixen a partir d'embrions relativament fàcils d'obtenir en gran nombre i presenten característiques moleculars molt semblants a les de les hESCs, on resideix la vertadera aplicabilitat de les ESCs. Però l'aplicació de les ESCs per al tractament de malalties presenta moltes limitacions i riscos, i requereix encara de més coneixements. D'entre les limitacions trobem el desconeixement dels factors específics diferenciadors de les hESCs, la dificultat en la integració de les cèl·lules diferenciades en el teixit hoste i l'estructuració del nínxol i, finalment, el creixement fora el cos en la producció d'òrgans. Respecte als riscos que comporta el transplantament hi trobem el rebuig immunitari i la formació de tumors (Wobus i Boheler, 2005).

1.2. Altres tipus de cèl·lules mare segons el potencial de diferenciació

A banda de les ESCs, en les quals es centra la present tesi doctoral, existeixen altres tipus de SCs que es caracteritzen pel seu potencial de diferenciació (**Figura 1**). A continuació es detallen els principals models de línies cel·lulars pluripotents *in vitro* que existeixen i les cèl·lules *in vivo* a partir de les quals s'originen. A més, s'expliquen els conceptes de SCs multipotents i unipotents (Cavaleri i Scholer, 2009; Kuijk *et al.*, 2011).

Les cèl·lules mare tumorals (ECCs) van ser les primeres cèl·lules pluripotents aïllades de teixits fetals de ratolí (Kahan i Ephrussi, 1970; Rosenthal *et al.*, 1970). Són cèl·lules indiferenciades amb una elevada taxa de renovació que deriven de teratocarcinomes, tumors gonadals malignes amb cèl·lules indiferenciades barrejades amb teixits diferenciats de les tres làmines embrionàries. Les ECCs poden tornar a induir teratocarcinomes *in vivo* i diferenciar *in vitro* a teixits de les tres làmines embrionàries un cop cultivades en suspensió. De tota manera, la seva contribució a la formació de teixits adults és pobre i rarament s'ha vist la seva contribució a la línia germinal, probablement degut a que són línies tumorals, i per tant, aneuploides.

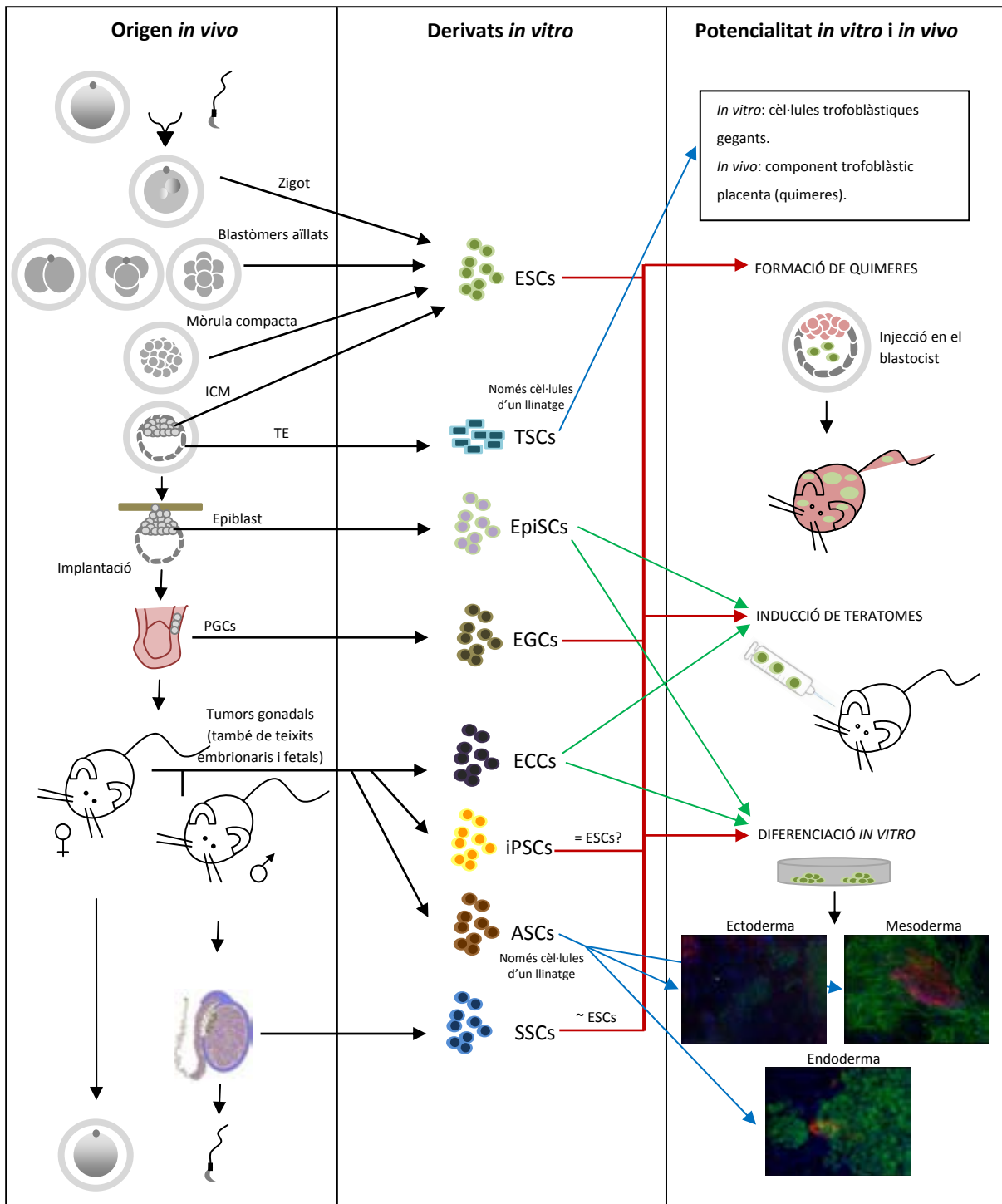


Figura 1. Origen i potencialitat de les SCs pluripotents i multipotents. En la columna de l'esquerra s'indica l'origen *in vivo* de les cèl·lules pluripotents i multipotents. A la columna del mig s'hi troben representades les SCs que deriven de cada origen. Finalment, a la columna de la dreta es mostra la seva potencialitat *in vitro* i *in vivo*. ESCs: *embryonic stem cells*; TSCs: *trophoblast stem cells*; EpiSCs: *epiblast stem cells*; EGCs: *embryonic germ cells*; ECCs: *embryonal carcinoma cells*; iPSCs: *induced pluripotent stem cells*; ASCs: *adult stem cells*; SSCs: *spermatogonial stem cells*. Adaptat de Kuijk i col·laboradors (2011).

Les cèl·lules mare germinals (EGCs) van ser aïllades per primera vegada a partir de cèl·lules primordials germinals (PGCs) de ratolí que es troben a la cresta germinal de l'embrió i representen les cèl·lules precursors dels gàmetes masculins i femenins (Matsui *et al.*, 1992; Resnick *et al.*, 1992). Les EGCs presenten una morfologia de colònia en cultiu molt semblant a la de les ESCs, mostren una total capacitat de diferenciació, ja que poden diferenciar a qualsevol teixit de les tres làmines embrionàries *in vitro*, formen teratocarcinomes *in vivo* i poden contribuir a tots els teixits d'un ratolí quimèric, incloent la línia germinal, en ésser injectades en blastocists hostes.

Les cèl·lules mare espermatogòniques (SSCs) deriven d'espermatòcits de ratolí que migren a la membrana basal dels túbuls seminífers poc abans del naixement. Malgrat que les SSCs són unipotents, és a dir, només poden diferenciar a un tipus cel·lular concret, en aquest cas a cèl·lules espermàtiques *in vivo*, s'ha demostrat que les SSCs un cop cultivades *in vitro* poden donar lloc a colònies de cèl·lules pluripotents semblants a les de les ESCs (Conrad *et al.*, 2008).

Les cèl·lules mare epiblastiques (EpiSCs) deriven de l'epiblast d'embrions postimplantacionals de ratolí i rata (Brons *et al.*, 2007; Tesar *et al.*, 2007). En el blastocist tardà, la ICM es diferencia en dos tipus de poblacions cel·lulars: l'epiblast, format per cèl·lules pluripotents que donaran lloc a les tres làmines embrionàries; i l'hipoblast, que donarà lloc a l'endoderma primitiu en el blastocist tardà i a l'endoderma visceral després de la implantació (**Figura 2**). Aquesta segregació s'explicarà detalladament més endavant. Tant l'endoderma primitiu com l'endoderma visceral formaran part del sac vitel·lí en el desenvolupament postimplantacional. Les EpiSCs presenten unes característiques molt més semblants a les hESCs que no a les mESCs. Concretament, les EpiSCs tenen una morfologia epitelial semblant a la de les colònies de hESCs, són independents de la suplementació de la citoquina anomenada factor inhibidor de la leucèmia (LIF) en el medi de cultiu, i necessiten de la senyalització a través del factor de creixement fibroblàstic (FGF), concretament del FGF bàsic (bFGF o FGF2), per mantenir-se indiferenciades. A més, poden diferenciar-se en cèl·lules que expressen marcadors de TE. L'expressió gènica de les EpiSCs també s'assembla més a la de les hESCs que a la de les mESCs, indicant que les hESCs podrien derivar de l'epiblast de l'embrió humà (Tesar *et al.*, 2007). Les EpiSCs mostren un baix potencial de contribució en la formació de quimeres i la transmissió a la línia germinal no s'ha descrit. Malgrat això, les EpiSCs poden diferenciar-se en cèl·lules de les tres làmines embrionàries *in vitro* i, un cop injectades en ratolins, indueixen la formació de tumors també amb cèl·lules de les tres làmines embrionàries.

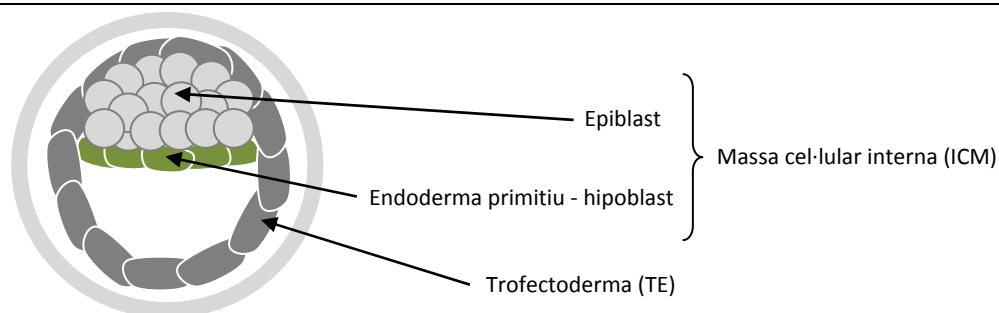


Figura 2. Llinatges cel·lulars en el blastocist tardà. En el blastocist tardà se segreguen els llinatges de l'epiblast, l'endoderma primitiu o hipoblast i el trofectorma. *Adaptat de Arnold i Robertson (2009).*

Recentment, s'ha desenvolupat un nou model de cèl·lules pluripotents, les cèl·lules mare de pluripotència induïda (iPSCs), que demostra que cèl·lules somàtiques diferenciades poden ser reprogramades *in vitro* a un estat pluripotent. Les línies d'iPSCs tenen un especial interès en medicina regenerativa, ja que a partir d'aquestes línies es poden generar cèl·lules específiques de pacient que eliminarien els problemes de rebuig immunitari. Les primeres línies d'iPSCs de ratolí es van obtenir l'any 2006 (Takahashi i Yamanaka, 2006) a través de l'expressió ectòpica de quatre factors de transcripció, *c-Myc*, *KLF4* (*Krüppel Like Factor 4*), *OCT4* i *SOX2*. Des de llavors, s'han fet molts esforços per tal de millorar l'eficiència de reprogramació (Maherali *et al.*, 2007; Meissner *et al.*, 2007; Okita *et al.*, 2007; Wernig *et al.*, 2007), s'ha intentat eliminar la incorporació dels gens *c-Myc* i *Klf4*, ja que les línies presentaven una elevada taxa de tumorigenicitat en els ratolins quimèrics obtinguts degut a la reactivació de l'oncogen *c-Myc* (Yu *et al.*, 2007; Nakagawa *et al.*, 2008), i s'han derivat línies d'iPSCs en humans (Takahashi *et al.*, 2007; Park *et al.*, 2008). Malgrat tot, les iPSC no es consideren totalment equivalents a les ESCs, ja que existeixen diferències en l'activitat transcripcional, la regulació epigenètica i el potencial de diferenciació, de manera que de moment la seva aplicació en medicina regenerativa és qüestionable (Chin *et al.*, 2009; Doi *et al.*, 2009; Feng *et al.*, 2010).

Les línies de cèl·lules mare multipotents, en canvi, tenen la capacitat de diferenciar a múltiples tipus cel·lulars però d'un únic llinatge cel·lular, ectoderma, endoderma o mesoderma. Les cèl·lules mare adultes (ASCs) són l'exemple per excel·lència de cèl·lules mare multipotents i es troben tant en individus adults com als teixits fetals, amb la funció de mantenir i renovar els teixits durant tota la vida adulta. L'exemple més comú d'ASCs són les cèl·lules hematopoietiques, malgrat que també existeixen altres tipus de SCs multipotents específiques de teixit (Bryder *et al.*, 2006). Un altre tipus de cèl·lules mare multipotents són les cèl·lules mare trofoblàstiques (TSCs), la derivació de les quals també s'ha dut a terme en la present tesi doctoral. Les TSCs deriven del TE de

l'embrió en estadi de blastocist i es poden mantenir en un estat proliferatiu i indiferenciat *in vitro* si es cultiven en presència del FGF4, amb el seu cofactor, la heparina, i una monocapa de fibroblasts embrionaris de ratolí (MEFs) inactivats. Les TSCs majoritàriament diferencien a cèl·lules trofoblàstiques gegants o *trophoblastic giant cells* en retirar el FGF4, la heparina o la monocapa de MEFs. A més, les TSCs tenen la capacitat de contribuir en la formació d'un animal quimèric però només al component trofoblàstic de la placenta i del sac vitel·lí parietal (Tanaka, 2006).

Finalment, les cèl·lules mare unipotents són les cèl·lules que només poden diferenciar a un tipus cel·lular concret, com per exemple les cèl·lules mare espermatogòniques ja esmentades.

2. DERIVACIÓ DE CÈL·LULES MARE EMBRIONÀRIES

La primera tècnica de derivació i manteniment de línies de mESCs pluripotents es va descriure l'any 1981 (Evans i Kaufman, 1981; Martin, 1981). Aquesta tècnica consistia en el cultiu de cèl·lules de la ICM de l'embrió en estadi de blastocist sobre una monocapa de MEFs de la línia STO, prèviament inactivats amb mitomicina C. La pluripotència d'aquestes línies va ser comprovada a través de la inducció de teratomes que contenien cèl·lules de les tres làmines embrionàries. Des de llavors, diferents grups han aconseguit establir línies d'ESCs a partir de la ICM del blastocist de ratolí (Williams *et al.*, 1988; Brook i Gardner, 1997), conill (Graves i Moreadith, 1993), porc (Li *et al.*, 2003) i primats (Thomson *et al.*, 1995). Però no va ser fins el 1998 quan es van derivar per primera vegada línies de hESCs, utilitzant també embrions en estadi de blastocist (Thomson *et al.*, 1998). Aquestes hESCs expressaven marcadors de pluripotència i, en ser injectades en ratolins immunodeficients, produïen teratomes amb cèl·lules de les tres làmines embrionàries.

Posteriorment, es van començar a derivar línies de mESCs i hESCs a partir d'embrions sencers en estadis embrionaris previs a la formació del blastocist, en resposta a la necessitat d'incrementar l'eficiència d'establiment de les línies obtinguda fins llavors. Atès que el primer fenomen de diferenciació del desenvolupament embrionari es produeix amb la segregació dels llinatges de la ICM i el TE en l'estadi de blastocist, es considera que estadis embrionaris previs tenen un potencial de diferenciació major i, per tant, en no tenir un destí definit cap ICM o TE podrien aportar una major eficiència de derivació de línies d'ESCs. En aquest sentit, Eistetter (1989) va derivar línies de mESCs a partir de l'estadi embrionari de mòrula fent servir les condicions tradicionals de cultiu utilitzades en els primers experiments de derivació d'ESCs

esmentades, obtenint una eficiència de derivació a partir d'aquestes mòrules disgregades (37%) superior a la produïda a partir de blastocists (8%). Tesar (2005) també va derivar línies de mESCs, però en aquest cas, a partir d'embrions sencers en diferents estadis embrionaris i fent servir una nova aproximació en la qual els embrions prèviament eren adherits al substrat de cultiu, ja que consideraven que la adhesió inicial dels blastòmers era clau a l'hora d'augmentar l'eficiència de derivació de les línies. En aquest cas, Tesar va produir línies de mESCs a partir de mòrules amb una eficiència del 48% mentre que pels estadis de 4 i 8 cèl·lules l'eficiència d'establiment va incrementar en més d'un 50%. Finalment, pel que fa a les hESCs, Strelchenko i col·laboradors (2004) van ser els primers en derivar aquestes línies a partir d'embrions sencers en estadi de mòrula compacta amb una eficiència del 17%, molt similar a l'obtinguda en la derivació a partir de blastocists.

La utilització d'embrions sencers per a la producció de línies d'ESCs, però, ha generat una gran controvèrsia ètica i moral en el cas dels humans, ja que aquesta pràctica implica la destrucció dels embrions a partir dels quals es deriven les línies. A més, no és possible obtenir ESCs específiques de pacient, la qual cosa podria implicar problemes d'histocompatibilitat i, per tant, de rebuig immunitari de cara a un possible ús terapèutic d'aquestes cèl·lules. Per tal de resoldre aquestes qüestions, es va plantejar la possibilitat de desenvolupar ESCs a partir de blastòmers aïllats d'estadis embrionaris previs a blastocist. És un fet ben documentat que la retirada d'un nombre reduït de blastòmers de l'embrió preimplantacional humà no afecta la seva viabilitat ni capacitat implantatòria, sempre que aquest nombre es mantingui dins d'uns límits raonables. Aquests coneixements provenen de nombrosos estudis que s'han fet sobre la tècnica de diagnòstic genètic preimplantacional (PGD). En aquest tipus d'estudis es retira un o dos blastòmers de l'embrió a 6-8 cèl·lules per a la seva anàlisi i la resta de l'embrió es desenvolupa *in vitro* normalment fins la transferència (Veiga *et al.*, 1994; Goossens *et al.*, 2008). D'altra banda, és ben conegut que l'embrió humà és viable i capaç de dur a terme un embaràs normal sempre que es mantingui com a mínim un quart de l'embrió intacte (Veiga *et al.*, 1987). Així, Delhaise i col·laboradors (1996) van aconseguir establir una línia de mESCs a partir dels blastòmers aïllats d'embrions en estadi de 8 cèl·lules utilitzant el mètode de cultiu tradicional. Chung i col·laboradors (2006) també van establir línies de mESCs a partir de blastòmers aïllats en estadi de 8 cèl·lules però, en aquest cas, a partir d'una nova aproximació que consistia en l'agregació d'aquests blastòmers amb ESCs preexistents transfectades amb la proteïna verda fluorescent (GFP), la qual cosa permetia distingir-les de les recent derivades. Klimanskaya i col·laboradors (2006) també van derivar línies de hESCs a partir d'embrions en estadi de 8-10 cèl·lules però, en aquest cas, en un medi condicionat per factors procedents d'ESCs establertes sense que es produïssin contactes entre

ambdós tipus cel·lulars. Però la derivació d'ESCs a partir del cultiu amb ESCs preexistents no va aportar eficiències de derivació de mESCs i hESCs molt elevades (4 i 2%, respectivament). Wakayama i col·laboradors (2007) van aconseguir augmentar l'eficiència d'establiment de les línies de mESCs a partir de blastòmers aïllats d'embrions en estadi de 2, 4 i 8 cèl·lules amb una aproximació més senzilla que la utilització d'ESCs establertes, produint línies de mESCs amb una eficiència d'entre el 14% i 69%. Concretament, van afegir KSR (*Knockout Serum Replacement*) i l'hormona adrenocorticotropa (ACTH) al medi de cultiu, ja que es considera que el KSR, que presenta una composició més o menys definida, elimina els factors diferenciadors continguts en el sèrum fetal boví (FCS) i, a més, l'ACTH afavoreix la derivació a partir d'un únic blastòmer i la propagació del cultiu a partir d'una única cèl·lula. Més tard, Chung i col·laboradors (2008) van incrementar al 50% l'eficiència de derivació de línies de hESCs a partir de blastòmers aïllats en estadi de 8 cèl·lules introduint laminina i fibronectina en el medi de cultiu, malgrat que només van fer servir dos embrions, i Geens i col·laboradors (2009) van descriure l'establiment de dues línies humanes a partir de blastòmers aïllats de 4 embrions en estadi de 4 cèl·lules simplement cultivant els blastòmers en una monocapa de fibroblast inactivats.

Malgrat tots aquests estudis sobre la derivació d'ESCs a partir de blastòmers aïllats, encara queden per resoldre qüestions com el mínim nombre de blastòmers aïllats necessari per tal d'obtenir una eficiència d'establiment raonable, així com les condicions de cultiu més adients.

2.1. Tècniques d'establiment de línies de cèl·lules mare embrionàries

Des de l'any 1981, quan es van establir per primera vegada línies de mESCs (Evans i Kaufman, 1981; Martin, 1981), les tècniques d'establiment de línies de mESCs i hESCs han anat variant per tal de millorar la puresa de la població de cèl·lules amb la qual es deriven les línies i augmentar la pluripotència de les línies amb l'objectiu de millorar-ne l'eficiència de derivació. Actualment existeixen molts protocols de derivació i manteniment de línies d'ESCs donat que no existeix un consens entre laboratoris i un mateix mètode de derivació pot aportar eficiències d'establiment molt diferents en funció del laboratori on s'apliqui.

La derivació d'ESCs a partir de la ICM del blastocist s'ha realitzat a partir de dues grans estratègies per tal d'eliminar al màxim la contaminació de cèl·lules del TE: l'aïllament de la ICM per immunocirurgia i l'aïllament mecànic. En l'aïllament de la ICM per immunocirurgia (Solter i Knowles, 1975; Chen i Melton, 2007), en primer lloc, la zona pel·lúcida (ZP) de l'embrió es digereix enzimàticament amb pronasa o través d'una solució àcida de Tyrode i l'embrió s'incuba amb els anticossos del sèrum i el complement per tal que es produeixi la lisi de les cèl·lules del TE. La ICM

de l'embrió no es destrueix ja que la penetració dels anticossos no es produeix degut a les unions estretes entre les cèl·lules del TE. L'aïllament mecànic de la ICM, en canvi, consisteix en l'aïllament parcial de les cèl·lules de la ICM a través d'agulles de dissecció embrionària (Gardner i Rossant, 1979; Strom *et al.*, 2007) o a través d'un làser (Tanaka *et al.*, 2006; Turetsky *et al.*, 2008). Malgrat tot, l'estratègia més emprada a l'hora de derivar línies d'ESCs a partir de la ICM de blastocist ha estat la sembra del blastocist sencer un cop digerida la ZP. En aquest cas les cèl·lules de la ICM proliferaran i formaran una petita colònia que posteriorment serà selectivament separada de la possible contaminació de cèl·lules del TE i es continuarà propagant (Brook i Gardner, 1997).

La necessitat d'incrementar la pluripotencialitat de les línies establertes, però, va portar a l'establiment de línies d'ESCs a partir d'estadis embrionaris previs a blastocist, com s'ha comentat anteriorment. En aquest cas, els embrions se sembren directament sobre la monocapa de MEFs un cop digerida la ZP amb pronasa o amb una solució àcida de Tyrode.

Pel que respecta a la derivació de les línies d'ESCs a partir de blastòmers aïllats d'estadis embrionaris primerencs, els blastòmers son separats de la resta de l'embrió a través de dues aproximacions. D'una banda, els blastòmers es poden separar en una solució de PBS (*Phosphate Buffered Saline*) sense calci ni magnesi i pipetejant-los amb l'ajuda d'una pipeta Pasteur estirada a la flama d'un diàmetre aproximat al de l'embrió (Hogan *et al.*, 1994). D'altra banda, els blastòmers poden ser aïllats a través de tècniques de micromanipulació amb pipetes de biòpsia embrionària d'un diàmetre en funció de l'estadi embrionari dels blastòmers (Handyside *et al.*, 1989). Aquest darrer mètode es descriu amb més detall a l'apartat de protocols de treball de l'annex I. Un cop aïllats, aquests blastòmers es poden sembrar directament en el suport de derivació o fer-los desenvolupar fins l'adquisició de l'estadi equivalent al blastocist, anomenat pseudoblastocist, i posteriorment sembrar-los per iniciar el procés de derivació.

Posteriorment a la decisió del material de partida de la derivació, la ICM aïllada, els embrions sencers o els blastòmers aïllats se sembren sobre la monocapa de MEFs que en co-cultiu aporten factors de creixement necessaris per al manteniment de l'estat indiferenciat i una superfície on els blastòmers s'enganxen i poden començar a proliferar i formar petites colònies de cèl·lules indiferenciades o *outgrowths*. Les cèl·lules a sobre de la monocapa creixen en forma de colònies tridimensionals compactes que es poden separar fàcilment a través de mètodes mecànics de disgregació durant les primeres etapes d'establiment de les línies d'ESCs (vegeu apartat de protocols de treball de l'annex I). En els últims anys, però, s'ha descrit l'ús d'altres tipus cel·lulars alternatius a les MEFs com, per exemple, fibroblasts procedents de biòpsies de prepuci de nadons

(Hovatta *et al.*, 2003), fibroblasts autogènics derivats de la diferenciació de les hESCs (Stojkovic *et al.*, 2005) o fibroblasts de pulmó fetal humà (Chavez *et al.*, 2008), entre d'altres. L'ús d'aquests tipus cel·lulars evita la utilització de components d'origen animal que podrien provocar la transmissió de molècules o virus als humans en el cas d'una futura aplicació de les línies de hESCs en medicina regenerativa. A més, també s'han descrit altres estratègies per a la derivació de les línies d'ESCs que eviten el co-cultiu amb altres tipus cel·lulars, simplificant-ne així el mètode de derivació. En aquest sentit, existeixen diferents tipus de matrius proteiques que, a més, permeten l'obtenció d'un cultiu pur d'un únic tipus cel·lular, important en l'obtenció de mostres per a la realització de proves bioquímiques (Xu *et al.*, 2001) o el cultiu de les ESCs en medis de cultiu definits, comercials o no, que eviten la utilització de cèl·lules en co-cultiu o matrius proteiques (Wang *et al.*, 2005; Nichols i Ying, 2006).

Pel que fa als medis de cultiu emprats en la derivació d'ESCs, des dels orígens de la derivació d'ESCs s'han emprat medis de cultiu suplementats amb FCS, la composició del qual no podem conèixer en la seva totalitat però que se sap que conté una gran quantitat de factors de creixement. Aviat es va determinar que aquesta composició tan rica en factors de creixement produïa la diferenciació de les ESCs, de manera que l'eficiència d'establiment de les línies es veia reduïda (Koivisto *et al.*, 2004; Bryja *et al.*, 2006). Com a alternativa a l'ús de FCS en els medis de cultiu es va començar a fer servir el KSR, que és un sèrum amb una composició més o menys definida que conté com a complement principal la proteïna albúmina sèrica. Així, l'eliminació del FCS i la introducció del KSR va aportar una composició més definida al medi de cultiu de les ESCs de manera que la taxa de diferenciació espontània es va reduir i, per tant, l'eficiència d'establiment de línies d'ESCs va augmentar (Amit *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 2006; Wakayama *et al.*, 2007). En aquest sentit, els medis químicament definits, que permeten una anàlisi més acurada dels factors importants en el manteniment de l'estat indiferenciat de les ESCs, representen una alternativa als medis de cultiu tradicionals.

Cal esmentar un suplement important en els medis de cultiu de derivació de mESCs, la citoquina LIF. Les primeres línies de mESCs es van derivar en presència de LIF, ja que es va considerar un factor indispensable en el manteniment de l'estat indiferenciat de les mESCs. Actualment, els medis de cultiu de mESCs encara es continuen suplementant amb aquesta citoquina. En canvi, s'ha vist que el manteniment de la pluripotència de les línies de hESCs és independent de LIF (Daheron *et al.*, 2004; Humphrey *et al.*, 2004). El mecanisme d'actuació del LIF i la via de senyalització que desencadena s'explicarà amb més detall a l'apartat de mecanismes de manteniment de la pluripotència.

El subcultiu de les ESCs és el procés mitjançant el qual expandim i amplifiquem la població d'ESCs per tal d'obtenir línies d'ESCs establertes. En una primera etapa de derivació de les línies, quan la població cel·lular encara és reduïda, s'apliquen mètodes mixtes de disgregació que combinen l'estratègia mecànica de disgregació amb una incubació enzimàtica que actuarà sobre les cèl·lules més superficials de la colònia. En aquest mètode les colònies se separen de la monocapa de MEFs amb una nansa i s'incuben en una solució enzimàtica, normalment tripsina. Posteriorment, les colònies es tallen en fragments d'entre 50-200 cèl·lules amb l'ajuda d'una pipeta *Pasteur* estirada a la flama i es tornen a sembrar en una nova monocapa de MEFs. Aquest mètode de disgregació combinat suposa una major viabilitat de les cèl·lules de la colònia, ja que les cèl·lules es disgreguen en fragments i, per tant, no obtenim una suspensió de cèl·lula única que en estadis d'establiment primerencs podria comprometre la viabilitat de la població cel·lular.

Quan la població cel·lular d'ESCs és més elevada, les línies són expandides rutinàriament a través de mètodes enzimàtics, normalment amb tripsina. En aquest cas, s'intenta disgregar al màxim les colònies fins arribar a tenir cèl·lules úniques aïllades per tal d'incrementar molt la població d'ESCs.

Però les estratègies per tal de subcultivar les línies d'ESCs són molt variades en funció de la línia cel·lular, el moment en què es troba el procés de derivació i les condicions de cultiu emprades. Així, per exemple, es poden emprar tipus d'enzims molt variats més o menys agressius, aproximacions comercials que simplifiquen el procés, etc. A més, se sap que les hESCs són molt més sensibles a la disgregació enzimàtica que les de ratolí. En aquest sentit, existeixen inhibidors de la via Rho/ROCK de senyalització que se sap que incrementen la viabilitat de les hESCs un cop disgregades enzimàticament (Xu *et al.*, 2010).

2.2. Caracterització de línies de cèl·lules mare embrionàries

La caracterització de línies d'ESCs comprèn diferents etapes de determinació morfològica, molecular i de funcionalitat, amb l'objectiu de comprovar que la línia derivada realment conté cèl·lules pluripotents, és a dir, que poden formar cèl·lules de les tres làmines embrionàries (ectoderma, endoderma i mesoderma).

Pel que fa a la caracterització morfològica, les colònies d'ESCs han de presentar un límits ben definits, evitant la presència de cèl·lules provinents de processos de diferenciació espontània. Les colònies de mESCs tenen una estructura tridimensional i contenen cèl·lules petites i rodones amb

una relació nucli-citoplasma molt elevada. Al contrari, les colònies de hESCs tenen una forma més aviat aplanada.

La caracterització molecular comprèn la detecció de l'expressió d'enzims com la telomerasa i la fosfatasa alcalina, la detecció de marcadors de superfície com els glicolípid SSEA (*Stage Specific Embryonic Antigen*) i les glicoproteïnes TRA (*Tumor Related Antigen*), i la detecció de factors de transcripció claus en la determinació de la pluripotència com OCT4, SOX2 i Nanog. Respecte a l'expressió d'aquests últims marcadors moleculars, les ESCs han d'expressar uns nivells equivalents de cadascun dels tres factors de transcripció. OCT4 pertany a la família de factors de transcripció POU i Nanog a la família *homeobox*. Concretament, s'ha vist que el manteniment d'uns nivells constants d'aquests dos factors de transcripció és clau en el manteniment de la pluripotència tant de les mESCs com de les hESCs. Així, un increment de l'expressió d'OCT4 indueix la diferenciació de les ESCs cap a teixits mesodèrmics i endodèrmics, mentre que una disminució en els nivells d'expressió comporta la diferenciació cap a llinatges trofodèrmics. Per contra, una sobreexpressió de Nanog manté les ESCs indiferenciades, mentre que una reducció en l'expressió induiria la diferenciació cap a endoderma primitiu (Chambers, 2004). SOX2 és un altre factor de transcripció de la família HMG-*box* clau en el manteniment de la pluripotència que actua en paral·lel amb OCT4 per tal de modular l'expressió d'altres gens diana que poden afectar de manera positiva o negativa en el manteniment de la pluripotència de les ESCs (Niwa, 2001).

A nivell funcional, les ESCs han de demostrar la seva capacitat de diferenciar-se en cèl·lules de les tres làmines embrionàries. S'ha proposat una classificació amb diversos criteris per ordre de rigor en la caracterització de les línies d'ESCs (Maherali i Hochedlinger, 2008): diferenciació *in vitro* espontània o induïda, formació de teratomes un cop injectades en ratolins immunodeprimits, contribució en la formació de quimeres un cop injectades en embrions en estadi de blastocist, transmissió a la línia germinal en la formació de quimeres i complementació tetraploide a través de la injecció de les ESCs en blastocists tetraploides, de manera que l'embrió només derivarà de les ESCs diploides injectades i el TE contindrà les cèl·lules tetraploides. Malgrat tot, i tal com s'ha comentat abans, el nombre i tipus de proves que s'han de realitzar per tal de comprovar la pluripotencialitat de les línies és un aspecte de controvèrsia i existeixen diferents opinions al respecte.

A banda de demostrar la pluripotència de les línies d'ESCs, assegurar l'estabilitat genòmica de les ESCs és un requisit important per a la seva possible aplicació terapèutica i en investigació, ja que l'adquisició d'instabilitat genòmica en les línies d'ESCs provoca la transformació

oncogènica de les cèl·lules (Lefort *et al.*, 2009). L'instabilitat genòmica inclou anomalies cromosòmiques, mutacions gèniques i canvis epigenètics (Pannetier i Feil, 2007) que es produeixen durant períodes llargs de cultiu. Les anomalies cromosòmiques es poden detectar mitjançant l'obtenció del cariotip per tècniques citogenètiques clàssiques i la tinció uniforme o per bandes G dels cromosomes. Malgrat això, molts laboratoris també han utilitzat mètodes de cariotipatge molt més sensibles i d'elevada resolució que permeten detectar petites alteracions genètiques de l'ordre de megabases que es produeixen en les línies d'ESCs (Lefort *et al.*, 2009).

3. MECANISMES DE MANTENIMENT DE LA PLURIPOTÈNCIA *IN VIVO* I *IN VITRO*

Una vegada l'oòcit és fecundat per l'espermatozoide comença el desenvolupament embrionari preimplantacional, que ha d'estar altament regulat a diferents nivells per tal d'assegurar que les cèl·lules totipotents dels estadis embrionaris primerencs donin lloc a dos llinatges cel·lulars ben diferenciats en el blastocist, la ICM i el TE. El zigot és la màxima representació de la totipotència, però el compromís (*commitment*) dels blastòmers va augmentant a mesura que avança el desenvolupament embrionari, de manera que els estadis de 2 i 4 cèl·lules encara es podrien considerar totipotents, mentre que els blastòmers d'estadis embrionaris més tardans es considerarien pluripotents. Malgrat que en estadis embrionaris primerencs ja es produeixen fenòmens de diferenciació morfològica i molecular, no és fins l'estadi de blastocist quan el potencial de diferenciació de totes les cèl·lules queda totalment restringit a la ICM o el TE. Malgrat això, els blastòmers no es poden considerar SCs, ja que no tenen la capacitat de renovar-se indefinidament (Bongso i Richards, 2004).

Per tal de conèixer millor els mecanismes subjacents a la pluripotència, és important entendre els mecanismes que controlen el desenvolupament embrionari preimplantacional i l'establiment de la població cel·lular pluripotent *in vivo* en aquests embrions que donarà lloc a les línies d'ESCs *in vitro*. En aquest sentit, les línies d'ESCs es consideren un model d'estudi dels processos que tenen lloc durant el desenvolupament embrionari relacionats amb el manteniment de l'estat pluripotent. A més, els fenòmens de morfogènesi i predeterminació del destí dels blastòmers durant el desenvolupament poden afectar la derivació de línies d'ESCs. Així, els mecanismes que regulen la pluripotència de les poblacions cel·lulars *in vivo* i *in vitro* estan estretament relacionats.

Malgrat això, s'ha vist que les ESCs no són totalment equivalents a les cèl·lules embrionàries pluripotents *in vivo*, de manera que les ESCs es consideren un artefacte *in vitro* d'aquestes cèl·lules dins l'embrió en condicions fisiològiques. Aquesta afirmació es basa en diferències en

l'expressió gènica, la taxa de proliferació, la dependència de citoquines i les marques epigenètiques. Es considera que aquests canvis de les ESCs respecte a les cèl·lules pluripotents *in vivo* es produeixen per tal d'adaptar-se a les condicions del cultiu *in vitro* (Smith, 2001). Per tal de minimitzar aquestes diferències, s'intenta reproduir les condicions fisiològiques el més fidelment possible durant el cultiu *in vitro* de les ESCs.

L'estat pluripotent de les cèl·lules embrionàries en condicions fisiològiques és molt transitori i aquestes cèl·lules estan sotmeses a un ambient que varia molt ràpidament (Lensch *et al.*, 2006). Malgrat això, se sap que existeix un procés biològic anomenat diapausa que manté l'estat pluripotent de les cèl·lules de la ICM del blastocist durant períodes llargs de temps per tal d'assegurar l'èxit reproductiu. Aquest estat està controlat per hormones com els estrògens i la prolactina, el factor de creixement epitelial (EGF) i el LIF, i s'ha vist que està present en més de cent espècies, incloent el ratolí i possiblement els humans (Tarin i Cano, 1999).

L'interès humà en el manteniment de la pluripotència de les línies d'ESCs *in vitro* va dirigit a la seva aplicació en el camp de la medicina regenerativa i al coneixement dels mecanismes que tenen lloc durant el desenvolupament embrionari. Per tal que les ESCs puguin tenir una aplicació clínica, aquestes cèl·lules han de poder-se diferenciar eficientment en cèl·lules d'un llinatge específic, i les ESCs indiferenciades han de poder separar-se fàcilment de les cèl·lules diferenciades. En aquest sentit, és important entendre els mecanismes moleculars implicats en el manteniment de la pluripotència de les ESCs per tal de tenir un major coneixement sobre les diferències existents entre l'estat pluripotent i el diferenciat. A més, l'emergent camp de la reprogramació de les cèl·lules somàtiques cap a un estat pluripotent mitjançant factors definits (iPSCs) necessita adreçar determinades qüestions com la manera com els factors necessaris per mantenir la pluripotència regulen la transcripció durant la reprogramació i com interaccionen amb la cromatina i amb els complexos de modificació de les histones per tal de reprogramar la cromatina a un estat pluripotent.

Així, els mecanismes que regulen el manteniment de l'estat pluripotent *in vivo* i *in vitro* tenen un origen comú i depenen de tot un conjunt de factors interrelacionats: els factors externs actuen a través de les vies de senyalització i els factors de transcripció i els microRNAs indueixen patrons específics d'expressió gènica que modifiquen també l'estat epigenètic de la cromatina. En els següents apartats s'explica amb detall el funcionament de cadascun d'aquests mecanismes de manteniment de la pluripotència *in vivo* i *in vitro*.

3.1. Factors extrínsecs i vies de senyalització intracel·lular

Els senyals extracel·lulars són crucials en el manteniment de l'estat pluripotent. Es coneixen molts factors externs que, a través de vies de senyalització, influencien el balanç entre supervivència, renovació i diferenciació (Lensch *et al.*, 2006). Molts dels coneixements sobre aquests factors externs provenen d'estudis fets *in vitro* en ESCs. A continuació es descriuen les vies de senyalització conegudes que regulen l'estat pluripotent, centrant-nos en les ESCs i la importància d'aquestes vies dins l'embrió en condicions fisiològiques.

3.1.1. Matriu extracel·lular

La senyalització desencadenada arrel de la interacció amb la matriu extracel·lular constitueix un aspecte crític en la determinació de l'ambient de les cèl·lules pluripotents. La fibronectina, la laminina i el col·lagen IV són els principals components de la matriu extracel·lular que s'expressen d'una manera dinàmica en el blastocist de ratolí. Així, la ICM s'encarrega de la major producció de col·lagen IV i laminina, que s'estructuren en una làmina situada a la superfície basal de les cèl·lules del TE. La fibronectina, en canvi, és independent d'aquesta làmina basal però deu participar transitòriament en l'adhesió cel·lular (Thorsteinsdottir, 1992). Per tal de simular artificialment aquestes condicions durant l'establiment de línies d'ESCs, les mESCs es cultiven en plaques recobertes amb gelatina, com s'ha comentat anteriorment, i les hESCs s'expandeixen sobre Matrigel®, que és una barreja de factors de creixement i molècules de la matriu extracel·lular. Recentment s'ha determinat que la laminina és l'únic factor de la matriu extracel·lular necessari per al cultiu de les hESCs *in vitro* (Xu *et al.*, 2001; Chung *et al.*, 2008).

3.1.2. Senyalització a través de LIF/JAK/STAT

Dins l'embrió en condicions fisiològiques, la citoquina LIF s'expressa en el TE del blastocist mentre que els dos gens que codifiquen pel seu receptor, LIFR β i gp130, es troben en les cèl·lules de la ICM (Nichols *et al.*, 1996). La unió del LIF a aquest receptor heterodimèric provoca l'activació de les tirosina quinases JAK (*Janus Kinase*) que fosforilen els residus de tirosina de gp130 i LIFR β de manera que es produeix el reclutament de transductors del senyal i activadors de la transcripció com les proteïnes STAT (*Signal Transducer and Activator of Transcription*), que es transloquen al nucli on actuen com a factors de transcripció (Okita i Yamanaka, 2006). El LIF però, no és essencial per al desenvolupament i manteniment de la pluripotència de les cèl·lules *in vivo*, excepte durant el procés de la diapausa (Nichols *et al.*, 2001).

El manteniment de les línies d'ESCs, com s'ha comentat anteriorment, s'ha fet rutinàriament des dels seus orígens sobre una monocapa de MEFs que les manté indiferenciades. Però, més endavant, es va determinar que la monocapa de MEFs podia ser eliminada i que les línies d'ESCs es podien mantenir a través del condicionament del medi de cultiu amb factors procedents d'aquestes MEFs. En aquest sentit, el 1988 es va determinar que les MEFs inhibien la diferenciació de les ESCs a través de la producció del LIF (Smith *et al.*, 1988; Williams *et al.*, 1988), malgrat que inicialment el LIF havia estat identificat per la seva activitat diferenciadora en cèl·lules M1 de leucèmia (Tomida *et al.*, 1984; Gearing *et al.*, 1987). Llavors es va considerar que el LIF era l'únic factor extrínsec necessari per al manteniment de la pluripotencialitat de les línies de mESCs. L'absència de LIF produeix la diferenciació de les mESCs en poblacions cel·lulars morfològicament diferents que expressen marcadors característics de mesoderma i endoderma (Niwa *et al.*, 1998). S'ha demostrat que l'activació de STAT3 és suficient per al manteniment de l'estat indiferenciat de les mESCs sempre i quan el medi contingui FCS (Matsuda *et al.*, 1999). Així, s'ha determinat que la senyalització a través de LIF no és suficient per al manteniment de la pluripotència sinó que es requereix de la suplementació extra del FCS, de manera que altres factors continguts en el sèrum o aportats per la monocapa de MEFs serien imprescindibles en la derivació i manteniment de les línies de mESCs. El manteniment de la pluripotència de les línies de hESCs i de mico, però, s'ha vist que és independent de la senyalització a través de LIF (Daheron *et al.*, 2004; Humphrey *et al.*, 2004; Sumi *et al.*, 2004).

3.1.3. Senyalització a través del factor TGF β

Les BMP (*Bone Morphogenetic Proteins*) són proteïnes membres de la família del factor de creixement transformador β (TGF β) que, un cop unides als complexos heterodimèrics que formen els seus receptors, desencadenen una cascada de senyalització que acaba en la fosforilació de les proteïnes Smad que es transloquen al nucli on actuen com a factors de transcripció. S'ha determinat que BMP4 induïx l'expressió de les proteïnes Id (*Inhibitor of differentiation*) que inhibeixen factors de transcripció implicats en la diferenciació de diversos tipus cel·lulars. El paper d'aquesta via en els embrions està poc clar, però si tingués alguna funció actuaria durant el procés de diàpauza (Nichols *et al.*, 2001). S'ha vist, però, que la via és important durant la gastrulació en la formació del mesoderma i les PGCs a partir de l'epiblast, demostrant que el paper de les BMP és dual i controla el balanç entre pluripotència i diferenciació *in vivo*. Aquesta via, en canvi, és d'especial rellevància en les línies d'ESCs. Concretament, s'ha vist que el FCS podia ser substituït per les proteïnes BMP tipus 2 o 4 sempre i quan el medi de cultiu estigués suplementat amb LIF, ja que d'aquesta manera s'inhibia la diferenciació cap a cèl·lules neurals (Ying *et al.*, 2003). En les

hESCs, en canvi, BMP4 induïx la diferenciació cap a mesoderma i endoderma, de manera que la inhibició de la senyalització a través de les BMP mitjançant l'addició del seu antagonista anomenat Noggin i elevades dosis de bFGF o FGF2 manté la pluripotència d'aquestes línies.

La via de TGF β també pot ésser induïda a través de l'activació de les proteïnes Activina i Nodal. Aquesta via no sembla important en el manteniment de la pluripotència de les línies de mESCs, però sí en els embrions des de l'estadi de 4 cèl·lules fins al blastocist i en les hESCs (Lensch *et al.*, 2006). Això mostra alguna de les diferències que poden existir entre les cèl·lules pluripotents *in vivo* i *in vitro*.

3.1.4. Via de les quinases PI3K i MAPK

La via de la fosfatidil inositol 3 quinasa (PI3K) s'indueix en resposta a l'activació de receptors tirosina quinasa mitjançant la unió de factors de creixement com FGF, EGF i PDGF (*Platelet-Derived Growth Factor*). Aquesta activació porta a l'acumulació del fosfatidil inositol trifosfat (PIP3) que és un segon missatger que a la vegada activa Akt1, implicada en diverses respostes cel·lulars com la proliferació i la supressió de mort cel·lular. Concretament, la via de la quinasa PI3K es considera un potent regulador de la proliferació en les línies d'ESCs (Sun *et al.*, 1999; Jirmanova *et al.*, 2002). A més, es creu que aquesta via de senyalització podria estar implicada en el manteniment de la pluripotència de línies de mESCs i hESCs, però els estudis que mostren una clara implicació d'aquesta via són escassos (Paling *et al.*, 2004).

La via de la PI3K també està relacionada amb la quinasa MAPK (*Mitogen-Activated Protein Kinase*). L'activació de la via MAPK-ERK (*Extracellular signal-regulated Kinase*) està associada amb el manteniment del TE i l'endoderma primitiu, que representen les dues línies principals no pluripotents de l'embrió primerenc. En aquest sentit, no és estrany que les línies de mESCs i hESCs es mantinguin indiferenciades en presència d'inhibidors d'aquesta via MAPK-ERK, com a conseqüència de l'activació de la PI3K.

3.1.5. Via Ras/Raf/ERK

Molts factors de creixement també són capaços d'activar la via de les proteïnes Ras que pertanyen a una família de proteïnes d'unió a GTP de baix pes molecular implicades en el control de la proliferació i diferenciació de diversos tipus cel·lulars. L'activació de Ras provoca la seva unió a altres proteïnes efectores com Raf, que a la vegada activa la quinasa ERK que porta a l'activació de determinats factors de transcripció. En embrions de ratolí, l'expressió del receptor de FGF

s'observa en totes les cèl·lules del blastocist (Lensch *et al.*, 2006). Concretament, *Fgf4* és un gen diana d'OCT4 que s'expressa en les cèl·lules de l'epiblast i és important en la proliferació de la ICM, però que també és crític en el manteniment i la proliferació de les cèl·lules del TE. A més, aquesta via se sap que és important en l'estadi embrionari de 2 cèl·lules per tal que el desenvolupament embrionari progressi (Yamauchi *et al.*, 1994). Malgrat que aquesta via estimula la proliferació de diferents tipus cel·lulars, s'ha vist que provoca la diferenciació i suprimeix la proliferació de les línies de mESCs (Burdon *et al.*, 1999; Yoshida-Koide *et al.*, 2004). Per contra, el factor bFGF o FGF2 s'ha vist que és important en el manteniment de les línies de hESCs, al contrari del que succeeix amb les mESCs (Amit *et al.*, 2004).

3.1.6. Via Wingless/Int

La via Wnt (*Wingless/Int*) també és important en el manteniment de la pluripotència *in vivo* i *in vitro*. Un cop les proteïnes Wnt s'uneixen als seus receptors Frizzled i LRP5/6, l'acció de la serina/treonina quinasa GSK3 β (*Glycogen Synthase Kinase β*) és inhibida, la qual cosa produeix un acúmul de β -catenina en el citoplasma, que és transportada al nucli i allà s'associa amb el factor de transcripció anomenat TCF (*T-Cell Factor*). En embrions, l'activació de la via Wnt es restringeix a la ICM dels blastocists de ratolí, mentre que la β -catenina es troba majoritàriament a la regió cortical de les cèl·lules del TE (Wang *et al.*, 2004). La majoria d'estudis suggereixen que la via Wnt està implicada en la supressió de la diferenciació en les línies de mESCs i hESCs (Lensch *et al.*, 2006; Okita i Yamanaka, 2006). Malgrat això, alguns autors han demostrat que la via Wnt podria estar implicada en la diferenciació de les ESCs (Yamaguchi *et al.*, 1999; Kielman *et al.*, 2002; Pereira *et al.*, 2006).

Les vies de senyalització esmentades poden interrelacionar-se per tal de realitzar un control molt més acurat sobre la pluripotència (**Figura 3**). En aquest sentit, *c-Myc* s'ha vist que és un gen important en el manteniment de la pluripotència de les ESCs i en el cas de les mESCs pot mantenir la pluripotència de les línies fins i tot en absència de LIF. Aquest gen s'activa a través de la inducció de la via LIF-STAT3 i pot ser inhibit a través de l'acció de GSK3 β per fosforilació i degradació al proteasoma. La via BMP-Smad, a banda d'activar els gens *Id*, és capaç d'inhibir l'acció d'ERK. A més, la quinasa PI3K també pot inhibir la senyalització a través d'ERK probablement mitjançant la fosforilació de Raf per l'acció d'Akt.

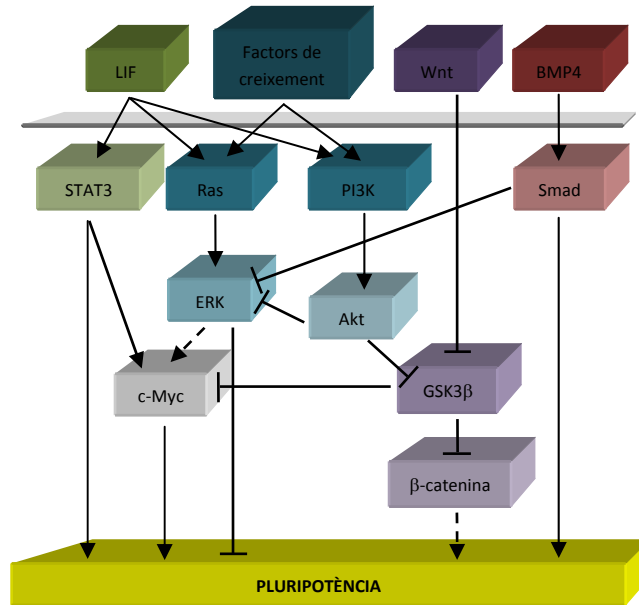


Figura 3. Vies de senyalització que regulen la pluripotència en les mESCs. Interrelació de les vies de senyalització que regulen la pluripotència en les mESCs. *Adaptat de Okita i Yamanaka (2006).*

3.1.7. Unions intercel·lulars

El primer fenomen de diferenciació durant el període del desenvolupament embrionari preimplantacional es produeix amb la segregació de la ICM i el TE en l'estadi de blastocist. Els canvis morfològics produïts fins que s'assoleix aquest estadi depenen de tota una dinàmica relacionada amb l'establiment de diferents tipus d'unions intercel·lulars entre blastòmers en funció de l'estadi embrionari. En estadis embrionaris primerencs, 2 i 4 cèl·lules, els blastòmers connecten entre ells mitjançant unions no específiques, per simple aposició de membranes. Les unions intercel·lulars més especialitzades comencen a aparèixer a l'estadi de 8 cèl·lules amb la formació de les unions gap, les unions adherents i les unions estretes o *tight junctions*, per tal de formar el blastocist (Fleming *et al.*, 1993). Tots aquests tipus d'unions estan implicades en processos morforeguladors com, per exemple, la comunicació, adhesió, diferenciació, senyalització i proliferació (Steinberg i McNutt, 1999), importants en el desenvolupament embrionari preimplantacional per tal que es produeixi la diferenciació de la ICM i el TE. La formació d'aquestes unions especialitzades està regulada a través de l'expressió temporal de determinats gens i els mecanismes d'assemblatge a la membrana cel·lular de les subunitats proteiques que constitueixen cada tipus d'unió depenen del moment en què es produeix la transcripció, la traducció i les modificacions post-transcripcionals d'aquestes subunitats (Fleming

et al., 2000). Ens centrarem en les unions gap i les unions adherents degut a la seva importància en el manteniment de la pluripotència de les línies de mESCs i hESCs.

Unions gap

Les unions gap mantenen l'homeòstasi cel·lular, ja que permeten el pas de petites molècules entre cèl·lules adjacents. S'ha vist que en el desenvolupament embrionari preimplantacional, la correcta comunicació entre blastòmers a través d'unions gap és essencial per al manteniment de la compactació i el posterior desenvolupament fins a l'estadi de blastocist (Hardy *et al.*, 1996). Les unions gap estan estructurades en dos connexons situats en cadascuna de les membranes de les cèl·lules que connecten (**Figura 4**). Cada connexó està format per sis proteïnes anomenades connexines que poden ser iguals (connexó homodimèric) o diferents (connexó heterodimèric) dins el mateix connexó. Al centre de cada connexó hi ha un porus per on passen metabòlits, segons missatgers i ions que no sobrepassen els 1000 Daltons. Les connexines són proteïnes integrals de membrana que estan formades per quatre dominis transmembrana, dos dominis extracel·lulars i tres intracel·lulars (Houghton, 2005). Se sap que en embrions preimplantacionals, tant humans com de ratolí, la connexina predominant és la connexina 43 o Cx43 i que aquesta comença a expressar-se en l'estadi de 2 cèl·lules i fins a l'estadi de blastocist (De Sousa *et al.*, 1993). L'estructuració de les connexines en unions gap a la membrana del blastòmer es produeix a l'estadi de 8 cèl·lules i és regulada post-transcripcionalment mitjançant la fosforilació de l'extrem C-terminal de les connexines per la proteïna quinasa A (PKA) (Kidder i Winterhager, 2001).

S'ha vist que les unions gap també són importants en el manteniment de la pluripotència de les línies de mESCs i hESCs. En aquest sentit, Wong i col·laboradors (2004) van veure unions gap formades per les connexines Cx43 i Cx45 distribuïdes per tota la superfície de les colònies de hESCs. Posteriorment, investigadors del mateix grup demostraren que les unions gap inhibeixen l'apoptosi i permeten la proliferació de les colònies de hESCs mantingudes en un medi sense sèrum (Wong *et al.*, 2006). Pel que fa a les línies de mESCs, se sap que són importants en el manteniment de la pluripotència i la proliferació (Todorova *et al.*, 2008) i que la pèrdua d'aquest tipus d'unions en situacions d'estrès, comportaria un augment d'apoptosi (Worsdorfer *et al.*, 2008).

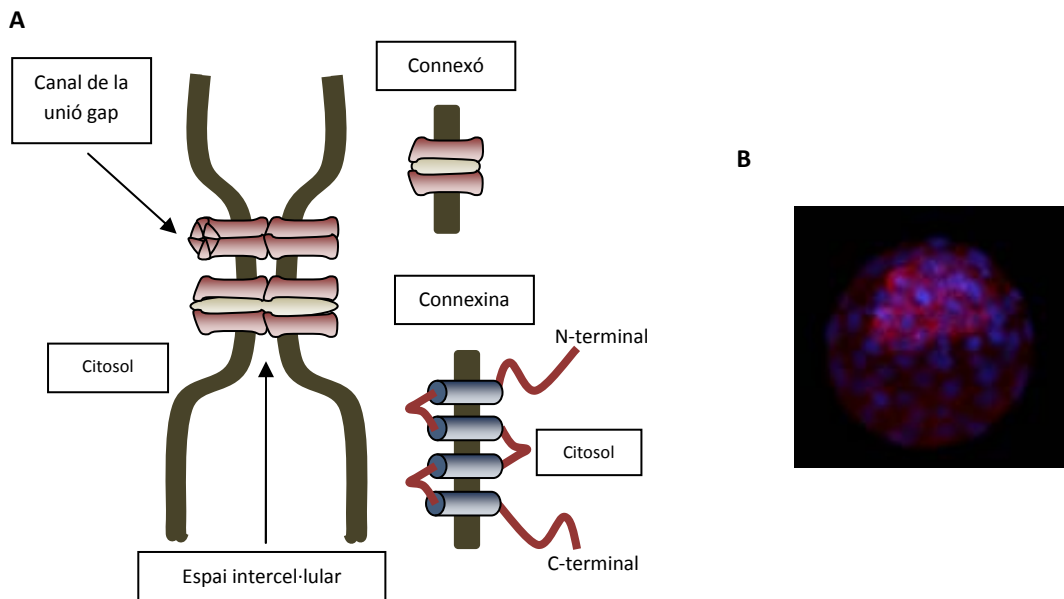


Figura 4. Unions gap. A. Estructura de les unions gap. A l'esquerra es pot observar la conformació que adopten les subunitats per tal de formar les unions gap en la membrana de les cèl·lules que connecten. A la dreta s'observa l'estructura d'un connexó constituït per les proteïnes connexines. *Modificat de Lodish i col·laboradors (2000)*. B. Immunofluorescència de la proteïna Cx43 en les unions gap formades entre les cèl·lules de la ICM d'un blastocist de ratolí.

Unions adherents

Les unions adherents són estructures cel·lulars que es troben entre cèl·lula-cèl·lula i cèl·lula-substrat, i estan formades per molècules d'adhesió normalment transmembranals com integrines, cadherines, immunoglobulines i proteoglicans (Vleminckx i Kemler, 1999). Ens centrarem en les unions adherents via cadherines que són estrictament intercel·lulars, concretament en les formades per E-cadherina o uvomorulina que és la cadherina més freqüent en les unions adherents i està present durant el desenvolupament embrionari preimplantacional i en les ESCs.

Les cadherines formen part d'una família de glicoproteïnes transmembranals que intervenen en el procés d'adhesió cel·lular que és dependent de calci. L'E-cadherina madura presenta tres dominis; el domini extracel·lular que té una estructura modular formada per cinc dominis d'unió, separats els uns dels altres a través de dominis d'unió de calci; el domini transmembranal, estructurat en hèlix α ; i el domini intracel·lular que serveix d'unió d'altres proteïnes com les catenines. L'E-cadherina s'associa indirectament als filaments d'actina del citoesquelet de la cèl·lula a través del complex E-cadherina/ β -catenina/ α -catenina (van Roy i Berx, 2008), de

manera que l'E-cadherina s'uneix al domini central de la β -catenina, mentre que la unió entre la β -catenina i α -catenina es produeix entre els seus dominis N-terminal. Finalment, la α -catenina és la que contacta directament amb els filaments d'actina del citoesquelet (**Figura 5**).

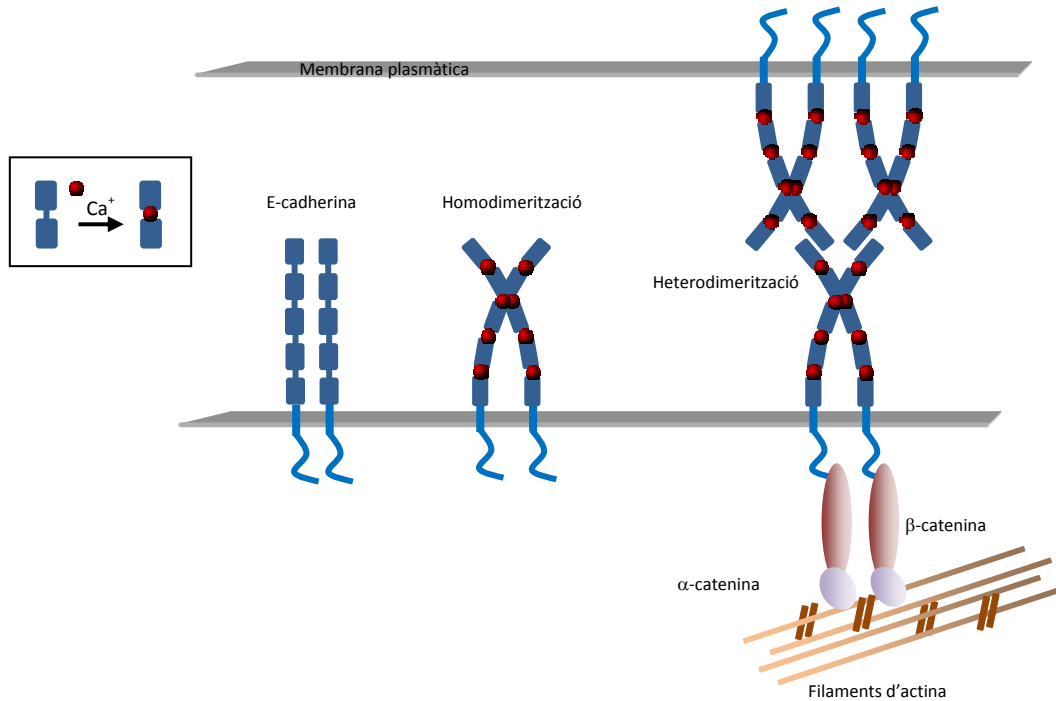


Figura 5. Senyalització a través de la molècula d'adhesió E-cadherina. En presència de calci, els dominis de l'E-cadherina s'estructuren i esdevenen rígids per tal de formar un homodímer, format per dues molècules d'E-cadherina de la mateixa cèl·lula. La heterodimerització, en canvi, es produeix quan molècules d'E-cadherina de dues cèl·lules adjacents contacten, de manera que es transmet el senyal a l'interior de la cèl·lula mitjançant la unió amb la β -catenina que a la vegada contacta amb l' α -catenina. L' α -catenina és la proteïna que contacta directament amb els filaments d'actina del citoesquelet. *Adaptat de Steinberg i McNutt (1999).*

L'adhesió que proporciona l'ancoratge indirecte de l'E-cadherina al citoesquelet de la cèl·lula resulta en una reorganització del mateix que es tradueix en múltiples processos morforeguladors com l'establiment de límits entre teixits, formació de teixits, proliferació, metàstasi, migració i apoptosi (Steinberg i McNutt, 1999).

Però les funcions de l'E-cadherina no només es limiten a la interacció física entre cèl·lules, sinó que l'E-cadherina també intervé en la senyalització cel·lular (Steinberg i McNutt, 1999). S'ha establert una clara connexió entre l'adhesió proporcionada per la E-cadherina i la via de senyalització Wnt a través de la β -catenina. Així, la β -catenina actua de proteïna intermediària

entre la regulació de l'expressió gènica i l'adhesió cel·lular (**Figura 6**). Se sap que la capacitat de la β -catenina de participar en aquests dos processos es deu a l'existència de dos grups de β -catenina ben restringits que formarien part de cadascuna de les vies. La β -catenina que participa en l'adhesió cel·lular és estable i està associada a la membrana de la cèl·lula; en canvi, la β -catenina que participa en la via Wnt és soluble i inestable (Willert i Nusse, 1998). En aquest sentit, l'adhesió cel·lular a través de l'E-cadherina modularia d'una manera indirecta la via de senyalització Wnt, a través del reclutament de β -catenina lliure i soluble en el citoplasma com a conseqüència d'un augment del senyal a través d'aquesta E-cadherina (Bienz, 2005).

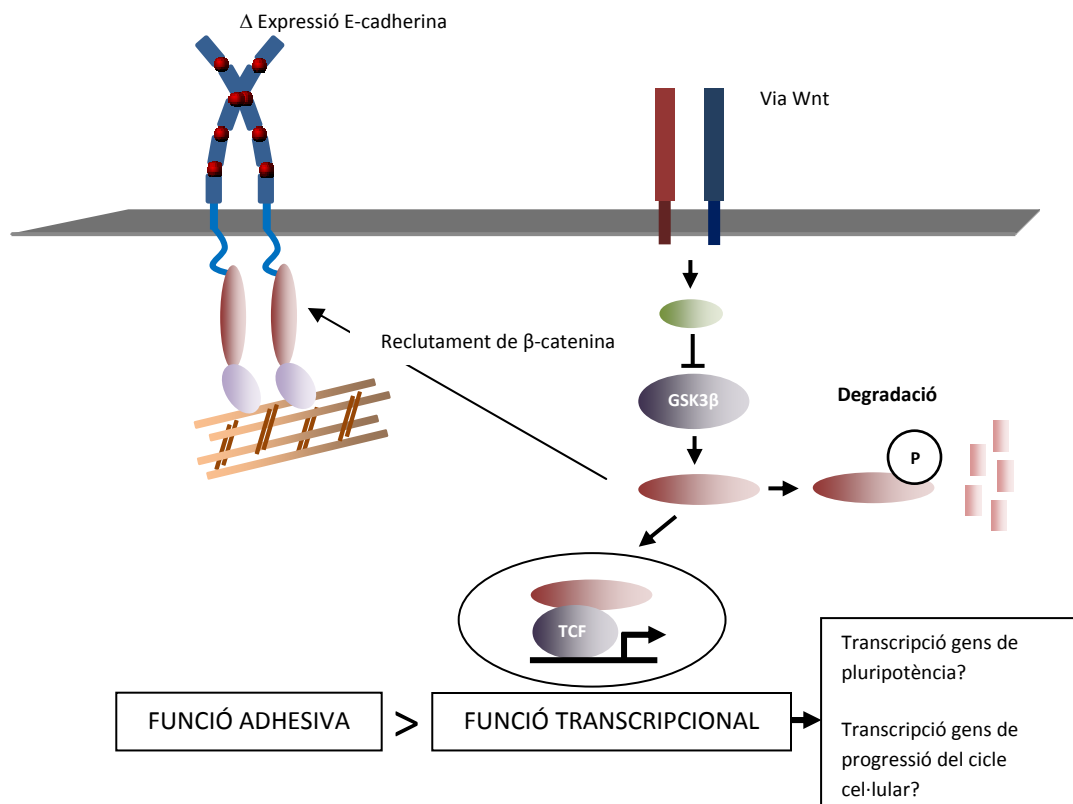


Figura 6. Interrelació entre la via d'adhesió de l'E-cadherina i la via Wnt. Interrelació entre la via d'adhesió de l'E-cadherina i la via Wnt. Davant d'un increment de l'expressió de l'E-cadherina es produeix un reclutament de la β -catenina soluble del citoplasma de la via Wnt cap a la via de l'E-cadherina. Aquest reclutament suposaria un augment de la senyalització generada per la via d'adhesió de l'E-cadherina davant la funció transcripcional de la via Wnt que podria comprometre la transcripció de gens de pluripotència i de progressió del cicle cel·lular. *Adaptat de Okita i Yamanaka (2006).*

Les unions adherents formades per E-cadherina tenen un paper fonamental en el desenvolupament embrionari preimplantacional, ja que controlen la diferenciació del TE i la morfogènesi del blastocist. Concretament estan implicades en el fenomen de compactació en

l'estadi de mòrula i en la transició de l'estadi de mòrula a blastocist. La seva funció és crucial per tal de formar un TE funcional ja que indueixen la polarització (Kan *et al.*, 2007; vegeu apartat 4.1). Se sap que en embrions preimplantacionals, la síntesi de l'E-cadherina comença a l'estadi de 2 cèl·lules tardà, però s'estructura per primera vegada a la membrana cel·lular en l'estadi de 8 cèl·lules. Durant la compactació és retirada progressivament del domini apical de la membrana dels blastòmers perifèrics, de manera que predomina en les regions de contacte dels blastòmers exteriors i resta uniformement distribuïda als blastòmers interiors. En l'estadi de blastocist, l'E-cadherina continua present tant en les cèl·lules del TE, localitzada en la regió basolateral de la membrana, com en les cèl·lules de la ICM, distribuïda homogèniament per tota la superfície (Vestweber *et al.*, 1987; Clayton *et al.*, 1993).

No ha estat fins fa pocs anys que s'ha determinat la importància de les unions adherents amb E-cadherina en la supervivència i el manteniment de la pluripotència en les línies de mESCs i hESCs. En aquest sentit, Spencer i col·laboradors (2007 i 2011) van determinar que l'E-cadherina era necessària per tal d'evitar la diferenciació de les línies de mESCs, ja que van observar que la diferenciació espontània implicava un canvi d'E-cadherina per N-cadherina i un augment en l'expressió de molècules repressores de l'E-cadherina com les proteïnes Slug i Snail. Així, van concloure que l'E-cadherina estabilitza l'actina del citoesquelet i d'aquesta manera manté les mESCs indiferenciades. Estudis posteriors en mESCs van corroborar la influència de l'E-cadherina en el manteniment de la pluripotència (Chou *et al.*, 2008; Horie *et al.*, 2010), però Soncin i col·laboradors (2009) van matissar que l'E-cadherina només era necessària en el manteniment de l'estat indiferenciat en presència de LIF, de manera que les mESCs es podien mantenir en absència d'E-cadherina i LIF afegint Activina A, Noggin i FGF2.

Recentment també s'ha demostrat la implicació de l'E-cadherina en el manteniment de la pluripotència de les hESCs (Chen *et al.*, 2010a; Ohgushi *et al.*, 2010; Xu *et al.*, 2010) i molts d'aquests estudis, a més, han ajudat a entendre els mecanismes a través dels quals actua l'E-cadherina per tal d'incrementar la supervivència i mantenir la pluripotència, evitant així la diferenciació espontània de les línies d'ESCs. Així, Xu i col·laboradors (2010) van veure que la baixa taxa de supervivència de les hESCs un cop dissociades enzimàticament estava associada a la pertorbació de la senyalització a través de l'E-cadherina i la integrina, que a la vegada és regulada mitjançant la senyalització a través de la via Rho-ROCK. Rho és una quinasa que regula la remodelació del citoesquelet i la generació de la força contràctil i que té com a efector ROCK, que és una altra quinasa associada (Etienne-Manneville i Hall, 2002). Un cop les hESCs són dissociades, es genera una hipercontracció cel·lular que es pot evitar tractant aquestes ESCs amb inhibidors de

la via Rho o ROCK, deduint així que les deficiències en quant a l'adhesió entre les ESCs són degudes a la hipercontractió produïda per la senyalització a través d'aquesta via. Xu i col·laboradors (2010), a més, van voler determinar si l'estabilitat de l'E-cadherina en mESCs també estava regulada a través de la senyalització de Rho-ROCK. Un cop les mESCs són tractades amb tripsina s'observa la degradació de la majoria de l'E-cadherina de superfície, tal com passa en les hESCs, però l'E-cadherina sintetitzada de nou és molt més estable i no s'observa un augment d'activitat en la via Rho-ROCK, suggerint que en les mESCs l'estabilitat de l'E-cadherina deu estar regulada mitjançant un altre mecanisme. Aquests autors, a més, confirmen que les diferències en les condicions de cultiu entre ambdós tipus de línies cel·lulars condicionen l'estabilitat de l'E-cadherina. Més tard, Chen i col·laboradors (2010a) van observar que la contractibilitat de l'actina-miosina és la causa de la baixada en la viabilitat un cop les hESCs són dissociades. Van veure que la disrupció de l'E-cadherina provoca un augment d'apoptosi, de manera que quan les ESCs no estan estructurades en colònies la seva viabilitat és molt baixa. En aquest sentit, van demostrar que inhibint la via de senyalització Rho-ROCK, disminuïa la fosforilació de la cadena lleugera de la miosina, per tant, es reduïa la contractió actina-miosina i, així, augmentava la supervivència de les hESCs. Ohgushi i col·laboradors (2010) també confirmaren la importància d'aquesta hipercontractió actina-miosina en la viabilitat de les hESCs.

En les mESCs també s'han proposat altres mecanismes d'actuació de l'E-cadherina per tal d'inhibir la diferenciació. Spencer i col·laboradors (2007) van veure que l'antigen oncofetal 5T4 estava associat amb la diferenciació primerenca de les mESCs, de manera que en absència d'E-cadherina es produïa la traslocació de 5T4 del citoplasma cap a la membrana de la cèl·lula en un procés dependent d'energia. Així, quan l'E-cadherina es troba intacta a la membrana, el citoesquelet d'actina cortical s'estabilitza i s'impedeix la translocació de l'antigen 5T4. A més, Sineva i Pospelov (2010) van determinar la importància de la inhibició de GSK3 β en el manteniment de la pluripotència de les línies de mESCs a través de l'E-cadherina. En aquest sentit, la inhibició de GSK3 β , que és un regulador de la via Wnt, incrementava l'adhesió induïda per E-cadherina i la senyalització a través de la β -catenina en les ESCs, de manera que es produïa un acúmulo de β -catenina en la membrana disponible per ser unida a l'E-cadherina i també en el citoplasma que es translocava al nucli on activava la transcripció de gens. Curiosament, aquesta activitat transcripcional no activava la majoria de gens de la via Wnt o de gens de progressió del cicle cel·lular, de manera que la funció adhesiva predominava davant la transcripcional.

Finalment, també s'ha determinat la importància de la distribució de l'E-cadherina en les mESCs i hESCs per tal de mantenir la pluripotència de les línies. Nagaoka i col·laboradors (2006)

van proposar que les mESCs es mantenen indiferenciades quan es cultiven en monocapa sobre una superfície recoberta d'E-cadherina, ja que l'estructuració d'aquestes cèl·lules en colònies crea un ambient heterogeni i impedeix la difusió de factors solubles entre les ESCs. Així, l'E-cadherina és necessària per al manteniment de l'estat indiferenciat però no l'estructura en colònies. En canvi, en les hESCs, Li i col·laboradors (2010) van observar que l'expressió de l'E-cadherina era elevada i es trobava uniformement distribuïda en la superfície de les colònies indiferenciades, a diferència de les colònies que començaven a diferenciar, indicant que la distribució homogènia de l'E-cadherina en la superfície de les ESCs que formen la colònia contribueix al manteniment de la pluripotència, evitant així la diferenciació espontània de les línies.

3.2. Reguladors intrínsecs de la pluripotència i de la diferenciació

3.2.1. Factors de transcripció

Les cèl·lules embrionàries en condicions fisiològiques i les ESCs *in vitro* expressen un conjunt definit de factors de transcripció que defineixen l'estat pluripotent. Aquests factors, a més de servir com a marcadors de cèl·lules pluripotents, són d'especial importància en el manteniment de la pluripotència. Estudis inicials sobre el patró transcripcional global en embrions, en ESCs i en els seus derivats diferenciats, juntament amb la posterior utilització de la tècnica de *microarray*, van ser de gran utilitat per tal d'identificar quins eren els factors clau en la determinació de la pluripotència. Els factors de transcripció mostren una restricció en el seu patró d'expressió amb la segregació de les cèl·lules de la ICM i del TE en els embrions (**Figura 7**). Aquest patró transcripcional *in vivo* a les cèl·lules de la ICM es mantindrà en les línies d'ESCs establertes *in vitro* a partir dels embrions. Els factors de transcripció OCT4 i Nanog van ser les dues primeres proteïnes identificades com a essencials durant el desenvolupament embrionari i el manteniment de l'estat indiferenciat de les línies d'ESCs (Nichols *et al.*, 1998; Chambers *et al.*, 2003; Mitsui *et al.*, 2003). Aquests factors de transcripció s'expressen en la ICM del blastocist però abans, en l'estadi de mòrula, s'expressen en tots els blastòmers que la constitueixen. Posteriorment, estudis d'immunoprecipitació van permetre la identificació d'un altre factor de transcripció clau en la determinació de la pluripotència, SOX2, que forma un heterodímer amb OCT4 i junts regulen diversos gens, alguns d'ells importants en la determinació de la pluripotència. OCT4, Nanog i SOX2 regulen la transcripció els uns dels altres en una xarxa de regulació complexa i, a més, tenen en comú diferents gens diana que controlen la diferenciació i el desenvolupament. A banda d'aquests tres factors, s'ha vist que existeixen altres gens que també són necessaris per al manteniment de la pluripotència com per exemple *Rex1* i *Esrrb* (Ivanova *et al.*, 2006; Wang *et al.*,

2006). La importància d'aquests factors ha estat recentment reafirmada en estudis de reprogramació de cèl·lules somàtiques per a la producció de les iPSCs pluripotents. Com interaccionen tots aquests factors per tal de mantenir l'estat indiferenciat és un fet que no està del tot clar, però sí se sap que uns regulen els altres formant tota una xarxa complexa d'interaccions.

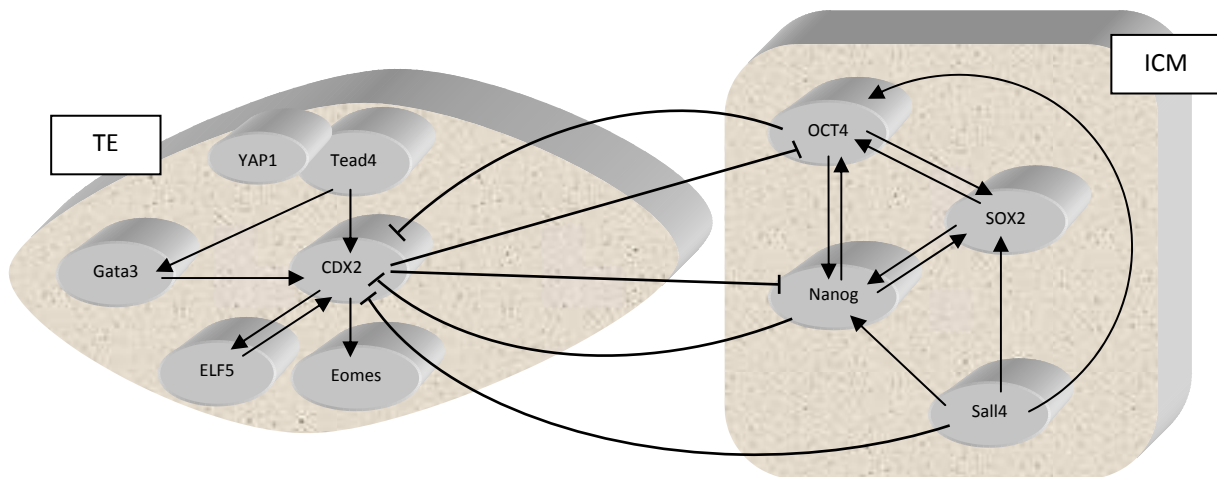


Figura 7. Factors de transcripció implicats en la regulació de la segregació de la ICM i el TE. En la diferenciació del TE, Tead4 coopera amb YAP1 per tal d'activar CDX2 que a la vegada regula ELF5 i Eomes. ELF5 incrementa l'expressió de CDX2, i Gata3 pot activar la seva expressió. En la diferenciació de la ICM, Nanog, OCT4 i SOX2 formen un nucli regulador per tal de promoure aquest destí. Sall4, a banda d'activar els tres factors de transcripció esmentats, és capaç de suprimir l'expressió de CDX2. També existeix una regulació creuada entre els factors de transcripció de la ICM i el TE que assegura el destí individual dels blastòmers. *Adaptat de Chen i col·laboradors (2010b).*

CDX2 i Tead4, en canvi, actuen en una fase inicial per tal de dirigir el destí cap al llinatge cel·lular del TE, mentre que Eomes i ELF5 (*Extreme Low Frequency 5*) actuen posteriorment per a reforçar aquest llinatge cel·lular (Chen *et al.*, 2010b). En primer lloc, CDX2 activa la transcripció de gens específics de TE i, posteriorment, promou la formació de divisions simètriques, que donen lloc a dues cèl·lules polaritzades, en l'embrió en estadi de 8 cèl·lules per tal de localitzar més blastòmers a la part externa del futur TE. CDX2 també afecta la polaritat cel·lular augmentant l'expressió de proteïna quinasa C (PKC), la distribució de la qual es polaritza en estadi de 8 cèl·lules mentre que l'expressió disminueix en les cèl·lules de l'interior de la mòrula (Plusa *et al.*, 2005). Però la polaritat cel·lular també influeix a l'expressió de CDX2 a través d'una distribució asimètrica del seu mRNA en els blastòmers polaritzats. Així, l'expressió de CDX2 i la polaritat cel·lular es reforcen una a l'altra per tal de fixar el destí d'aquests blastòmers cap a TE (Jedrusik *et*

al., 2008). Tead4 també s'ha vist que és essencial en el desenvolupament del TE. Se sap que l'activitat de Tead4 és modulada per la localització cel·lular del seu coactivador YAP1 (*Yes-Associated Protein 1*). Tead4 coopera amb YAP1 defosforilat i localitzat al nucli per tal d'activar CDX2 i altres gens específics de la formació del TE (Nishioka *et al.*, 2009). Per tant, sembla que YAP1 actua abans que CDX2 en l'especificació del TE. Aquests darrers factors de transcripció que regulen l'expressió de CDX2 formen part de la via de senyalització anomenada *Hippo* que també està relacionada amb l'asimetria de contacte entre les cèl·lules internes i externes mitjançant l'E-cadherina. Pel que fa a Eomes i ELF5, se sap que no són necessaris per a la correcta formació del TE i la implantació de l'embrió, però sí poc després de la implantació, per tant, actuen posteriorment a CDX2 i Tead4.

Així, degut a la importància d'aquests factors de transcripció en la determinació dels llinatges cel·lulars específics, la seva expressió temporal i quantitativa ha de ser estrictament regulada. Nanog, OCT4 i SOX2 es coordinen per tal de mantenir la pluripotència dels blastòmers en una primera etapa. OCT4 i Nanog, a més, estan regulats per l'acció d'altres factors com, per exemple, KLF4, Esrrb, Smad1, STAT3 i Sall4 (Wu *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2006). A més, els factors específics de la ICM i del TE es regulen positivament uns als altres i, a la vegada, suprimeixen els promotors dels gens específics de l'altre llinatge, reforçant un destí cel·lular concret. OCT4, per exemple, ocupa el promotor de CDX2, i a l'inrevés, regulant-se en aquest cas, d'una manera antagònica. A més, el factor de pluripotència associat Sall4, a banda de regular l'expressió de Nanog i OCT4, suprimeix l'expressió de gens específics de TE (Zhang *et al.*, 2006; Yuri *et al.*, 2009). Gata3 és un altre factor important en la regulació de la formació del TE que actua després de Tead4 i en paral·lel a CDX2 (Ralston *et al.*, 2010).

Durant una segona segregació dels llinatges cel·lulars en el desenvolupament embrionari preimplantacional, la ICM es divideix en dues poblacions cel·lulars, l'epiblast i l'endoderma primitiu. Aquesta segregació és dependent de l'actuació de factors de transcripció específics que a través de vies de senyalització restringiran la seva expressió i, per tant, faran que se separin aquestes dues poblacions cel·lulars. En aquest sentit, la diferenciació de l'endoderma primitiu necessita de l'activació dels factors de transcripció Gata4 i Gata6, que s'ha proposat que antagonitzen l'expressió de factors de transcripció de pluripotència com Nanog. El primer model descrit sobre aquesta segregació és l'anomenat *positional induction* (Gardner i Rossant, 1979; Gardner, 1982 i 1984) i proposa que les cèl·lules més properes a la cavitat del blastocist reben uns senyals inductius que no poden ser transmesos a les cèl·lules més internes i es diferencien en l'endoderma primitiu. Així, aquest model assumeix que les cèl·lules de la ICM són homogènies i

bipotents, de manera que es poden diferenciar en ambdós tipus cel·lulars en funció del senyal rebut. Però existeix un model més recent anomenat *cell sorting* (Chazaud *et al.*, 2006), proposat arrel de l'observació de que totes les cèl·lules primerenques de la ICM no són homogènies sinó que expressen uns nivells diferents de Nanog i Gata6 i que implica a la via de senyalització mitjançant la MAPK en aquesta segregació (**Figura 8**). En aquest sentit, la senyalització desencadenada a través de FGF fa que s'activi tota una cascada de senyalització que porta a l'activació de la MAPK de manera que s'estimula l'expressió de Gata6 i s'inhibeix la de Nanog i aquestes cèl·lules, per tant, formaran part de l'endoderma primitiu. Gata6 a la vegada activa tota una sèrie de gens diana com el gen de la laminina que formarà part de la làmina basal que divideix les cèl·lules de l'epiblast i de l'endoderma primitiu. Finalment, Zernicka-Goetz i col·laboradors (2009) recentment han proposat un tercer model anomenat *social mobility* que contempla l'existència de dues onades de divisions successives que posicionarien les cèl·lules agrupant-les en funció del seu destí futur en cadascun dels llinatges cel·lulars. Aquest model constitueix una barreja dels dos anteriors ja que, malgrat que les cèl·lules expressin uns nivells diferents dels factors Gata6 i Nanog en la ICM primerenca, encara retindrien una certa flexibilitat de respondre a la inducció per factors posicionals.

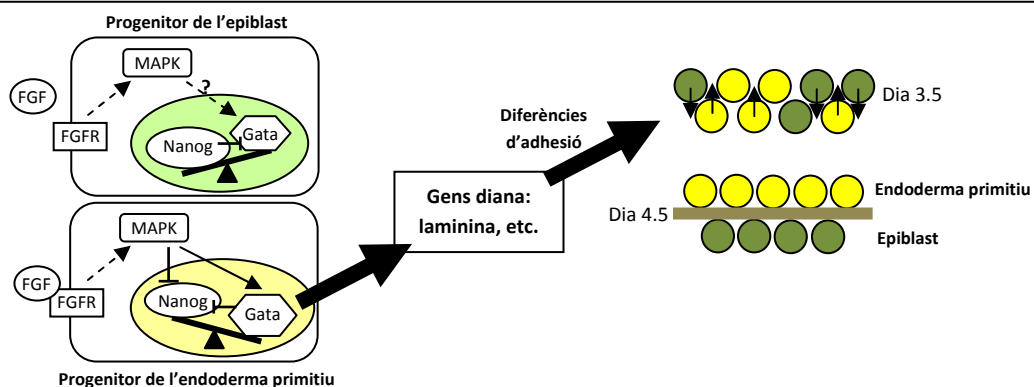


Figura 8. Mecanismes de segregació de l'epiblast i l'endoderma primitiu en el blastocist tardà. L'activació de la via de senyalització de la MAPK pel FGF condueix a un augment en l'expressió de Gata6 que regula altres gens diana implicats en la formació de la membrana basal que separa ambdues poblacions cel·lular. Com a conseqüència, es defineix la població de l'endoderma primitiu que se separa de l'epiblast. *Adaptat de Chazaud i col·laboradors (2006).*

Aquesta segregació de l'epiblast i l'endoderma primitiu és d'especial interès en el camp de la derivació d'ESCs, ja que es pensa que les hESCs, a diferència de les mESCs, presenten unes característiques molt més semblants a les de l'epiblast que no a les de les cèl·lules de la ICM primerenca i que, per tant, podrien tenir el seu origen en aquestes cèl·lules. A més, les diferències en l'expressió dels factors de transcripció Gata6 i Nanog entre les cèl·lules de la ICM podria

condicionar l'eficiència de derivació d'ESCs en funció de si l'estadi de blastocist és més o menys avançat.

3.2.2. Reguladors epigenètics

Durant el desenvolupament embrionari preimplantacional des de l'estadi de zigot fins a la formació del blastocist, la cromatina està sotmesa a una regulació epigenètica que controla l'activitat transcripcional de regions genòmiques específiques. Aquestes modificacions epigenètiques són alteracions no genètiques heretables que inclouen la metilació del DNA, les modificacions d'histones, les variants d'histones i la remodelació de la cromatina (**Figura 9A**). Algunes d'aquestes modificacions epigenètiques són importants en el manteniment de la pluripotència *in vivo* i *in vitro*. Atès que les cèl·lules somàtiques tenen el DNA genòmic idèntic a les cèl·lules pluripotents, han d'existir mecanismes epigenètics que regulin el diferent potencial d'ambdós tipus cel·lulars. Així, les ESCs mantenen la cromatina en un estat molt dinàmic i transcripcionalment permissiu que facilita canvis ràpids en el patró de transcripció quan comença la diferenciació.

La metilació del DNA, concretament, té un paper molt important en la determinació de la pluripotència. Els patrons de metilació del DNA es regulen d'una manera dinàmica durant el desenvolupament embrionari preimplantacional primerenc, i aquests canvis són necessaris per tal d'establir uns patrons específics coherents amb el fenotip de la ICM del blastocist (Farthing *et al.*, 2008). Poc després de la fecundació es produeix una ràpida disminució de la metilació del DNA patern, mentre que els nivells de metilació globals del DNA matern disminueixen més lentament. Durant la transició de l'estadi de mòrula a blastocist, es produeix una onada de metilació *de novo* que, en el ratolí, resulta en una gran metilació en les cèl·lules de la ICM i menor en les cèl·lules del TE (Dean *et al.*, 2001). Però en els embrions humans succeeix el contrari, ja que les cèl·lules del TE adquireixen un nivells de metilació més elevats que les de la ICM (Fulka *et al.*, 2004). De ben segur aquestes modificacions epigenètiques diferencials són traduïdes en l'establiment de les línies de mESCs i hESCs. En les ESCs, els promotors de gens que tenen una gran quantitat d'illes CpG estan hipometilats mentre que promotors amb poques illes CpG romanen hipermetilats (Meissner *et al.*, 2008). Un cop comença la diferenciació *in vitro*, la majoria de promotors mantenen el seu estat de metilació a excepció dels promotors de gens de pluripotència que incrementen els seus nivells.

Se sap que existeixen molts gens que pateixen modificacions d'histones, regulant així l'accessibilitat del DNA i, per tant, l'activitat transcripcional. Concretament, s'ha vist que en les

ESCs existeixen acetilacions a la lisina 9 de la histona H3 (H3K9) i metilacions a la lisina 4 també de la histona H3 (H3K4) en gens específics de llinatge que fan accessible la cromatina, a banda d'altres marques repressives com la trimetilació a la lisina 27 també de la histona H3 (H3K27me3; Zhao *et al.*, 2007). Aquestes modificacions epigenètiques oposades s'anomenen dominis bivalents.

Finalment, la remodelació de la cromatina és un altre aspecte important dins les modificacions epigenètiques que regulen la pluripotència. L'estructura de la cromatina també pot ser modificada a través de l'activitat de complexes dependents d'ATP que afecten la mobilitat del nucleosoma i, per tant, alteren l'expressió gènica. Així, l'adopció de configuracions específiques de la cromatina és un fet essencial en el manteniment de la pluripotència. Alguns d'aquests complexes ATP-dependents tenen com a gens diana els tres factors de transcripció més importants implicats en el manteniment de la pluripotència, OCT4, SOX2 i Nanog.

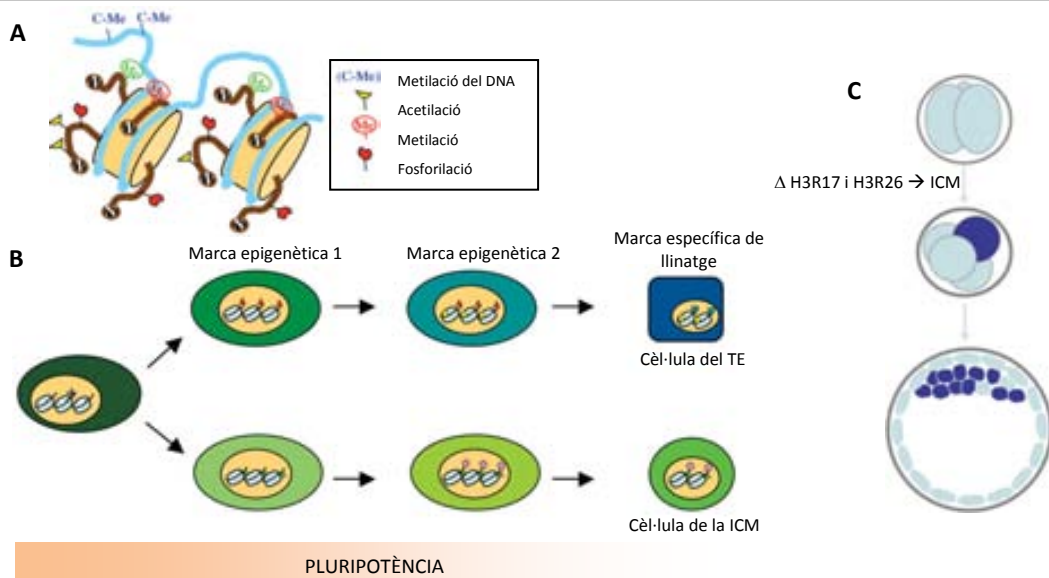


Figura 9. Regulació epigenètica de la segregació de la ICM i el TE. A. Tipus de marques epigenètiques en el DNA o en les histones que conformen el nucleosoma. B. Dinàmica de les marques epigenètiques durant el desenvolupament embrionari preimplantacional. En aquest model s'introduiria una primera marca epigenètica que podria influir o ser influenciada per una segona marca en cèl·lules amb un destí més definit. Les marques epigenètiques poden ser necessàries per establir un destí concret o per induir un nivell més en la diferenciació. Però les marques epigenètiques també podrien ser el resultat de l'establiment del destí cel·lular. C. Distribució desigual d'H3R17 i H3R26 en alguns blastòmers d'embrions de ratolí en estadi de 4 cèl·lules i la seva distribució preferencial en la ICM del blastocist (en blau fosc). *Adaptat de Hemberger i Dean (2007) i Torres-Padilla (2008).*

Molts estudis han relacionat el diferent potencial de diferenciació dels blastòmers en els diferents estadis embrionaris amb l'asimetria en les marques epigenètiques presents al genoma (Dean *et al.*, 2001; Margueron *et al.*, 2005). La qüestió de si el patró epigenètic és una conseqüència de la diferenciació de la ICM i el TE o, si pel contrari, les marques epigenètiques guien la diferenciació cap a ambdós tipus de llinatges cel·lulars ja en estadis embrionaris primerencs, és un aspecte controvertit (**Figura 9B**). En aquest sentit, Torres-Padilla i col·laboradors (2007) van observar que els blastòmers individuals d'embrions de ratolí en estadi de 4 cèl·lules amb conformació tetraèdrica diferien entre ells en el seu perfil epigenètic, ja que presentaven diferents nivells de metilació en les arginines 17 i 26 de la histona H3 (H3R17 i H3R26). CARM1 (*Coactivator-associated Arginine Methyltransferase 1*) és la metiltransferasa responsable d'aquesta metilació en concret, de manera que un increment en els nivells de H3Rme o un augment de l'expressió de CARM1 sembla que predetermina els blastòmers a formar part de la ICM. El paper de CARM1 en el destí cel·lular també podria estar associat amb la modificació d'altres enzims que no tenen histones com a substrat. A més, se sap que CARM1 pot activar Nanog i SOX2, mantenint els blastòmers en un estat pluripotent (**Figura 9C**). Per tant, sembla que el patró epigenètic primerenc dels blastòmers pot estar predeterminant el destí d'aquests, malgrat que modificacions epigenètiques posteriors en el desenvolupament embrionari preimplantacional poden modular i fixar definitivament el seu destí.

3.2.3. microRNAs

Recentment, s'ha vist que existeixen altres reguladors intrínsecs de la pluripotència, els microRNAs, que són petites seqüències de RNA no codificant d'aproximadament 22 nucleòtids de llargada. Aquests microRNAs regulen l'expressió gènica a través de la degradació de mRNAs o mitjançant la inhibició de la traducció (Kloosterman i Plasterk, 2006).

Els microRNAs, com a reguladors de l'expressió gènica, també han d'estar implicats en la determinació dels diferents llinatges cel·lulars. Se sap que microRNAs de l'oòcit són essencials per al manteniment dels primers estadis de l'embriogènesi (Tang *et al.*, 2007). A més, s'ha vist que el perfil d'expressió d'aquests microRNAs experimenta canvis importants durant el desenvolupament embrionari preimplantacional. Concretament, s'ha suggerit que un clúster de microRNAs anomenat miR-290, l'expressió del qual comença en estadi de 4 cèl·lules i va incrementant fins a l'estadi de blastocist, pot tenir un paper important en la determinació dels llinatges cel·lulars en estadis primerencs del desenvolupament (Viswanathan *et al.*, 2009). A més, s'han trobat microRNAs específics de determinació de la ICM i també s'han identificat alguns

microRNAs específics del TE, però d'aquests últims no es coneix la seva regulació en la determinació del TE. La majoria d'aquests es creu que estarien implicats en la regulació de la diferenciació embrionària en estadis tardans.

Els microRNAs ajuden a mantenir la pluripotència de les línies de mESCs i hESCs, malgrat que alguns d'ells promouen la diferenciació (Kanellopoulou *et al.*, 2005; Murchison *et al.*, 2005). L'expressió dels microRNAs és regulada a nivell transcripcional i post-transcripcional, de manera que són processats per tal de formar un microRNA madur un cop les ESCs comencen a diferenciar com a conseqüència d'una davallada en l'expressió de gens de pluripotència.

La **Figura 10** il·lustra tot el conjunt de factors implicats en el manteniment de la pluripotència i els canvis que experimenta aquesta xarxa complexa de regulació una vegada comença el procés de diferenciació cel·lular.

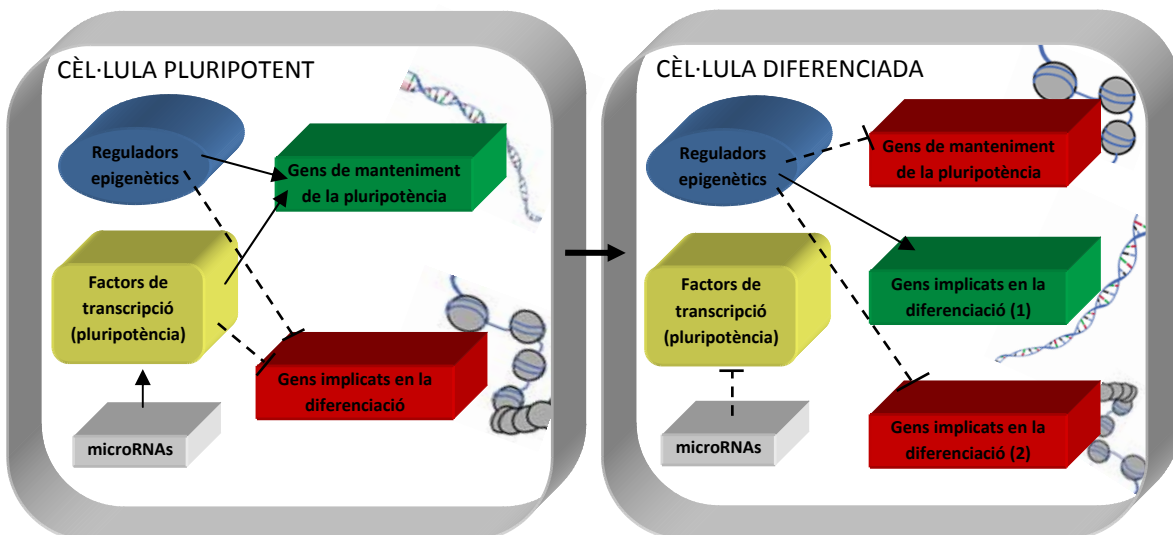


Figura 10. Mecanismes de determinació de la pluripotència i la diferenciació. En les cèl·lules pluripotents (esquema de l'esquerra), tant els reguladors epigenètics com els factors de transcripció de la cèl·lula activen l'expressió dels gens de manteniment de la pluripotència (en verd) i, a la vegada, inhibeixen els gens implicats en la diferenciació cel·lular (en vermell). En canvi, en les cèl·lules diferenciades, el perfil epigenètic canvia de manera que només s'activen uns determinats gens de diferenciació específics d'un llinatge cel·lular concret (en verd). Els gens implicats en el manteniment de la pluripotència o els gens de diferenciació d'un altre llinatge cel·lular romanen inhibits també pels reguladors epigenètics. En aquest cas, l'expressió dels factors de transcripció de pluripotència de la cèl·lula està reprimida com a conseqüència de l'acció dels reguladors epigenètics i dels microRNAs. *Adaptat de Chen i Daley (2008).*

4. MODELS DE SEGREGACIÓ DELS LLINATGES CEL·LULARS EN L'EMBRIÓ PREIMPLANTACIONAL I INFLUÈNCIA EN LA DERIVACIÓ DE CÈL·LULES MARE EMBRIONÀRIES

L'establiment dels eixos embrionaris juntament amb la regulació del manteniment de la pluripotència i dels primers fenòmens de diferenciació embrionària són aspectes fonamentals durant el desenvolupament embrionari preimplantacional que afectaran al posterior desenvolupament postimplantacional i la derivació d'ESCs *in vitro*. Concretament, el moment de la segregació de la ICM i el TE en el blastocist requereix d'un canvi en el patró transcripcional de les cèl·lules per tal de separar la població pluripotent de cèl·lules de la ICM de les cèl·lules del TE que a la vegada està controlat per tota una maquinària complexa de regulació que inclou canvis epigenètics i l'acció de microRNAs entre d'altres. Donat que actualment es creu que la predeterminació en el destí dels blastòmers es pot produir en estadis embrionaris primerencs, els mecanismes que regulen l'estat pluripotent jugarien també un paper crucial fins i tot abans de la segregació de la ICM i el TE en el blastocist, per tal de definir i separar la població de cèl·lules pluripotents de la futura ICM del TE.

Per altra banda, cada vegada es deriven més línies d'ESCs a partir de blastòmers aïllats d'estadis embrionaris primerencs en comptes de fer servir la ICM del blastocist, de manera que les restriccions imposades en la pluripotència d'algunes cèl·lules embrionàries abans de la formació del blastocist poden repercutir en la capacitat de derivació de les ESCs a partir d'estadis embrionaris primerencs. Així, l'extensió de tots aquests coneixements, tant dels mecanismes que regulen la pluripotència com la determinació de la polaritat *in vivo*, al camp de la derivació d'ESCs podria ser de gran interès per tal de determinar si els mecanismes que controlen les decisions primerenques pel que fa al potencial de diferenciació dels blastòmers, també poden explicar els mecanismes de manteniment de la pluripotència i el potencial diferenciador cap a altres tipus cel·lulars especialitzats de les ESCs, així com proporcionar un increment en l'eficiència de derivació de les línies.

4.1. Segregació de la massa cel·lular interna i el trofectorma

Estudis en espècies animals inferiors han ajudat a entendre millor els principis embriològics que determinen els primers fenòmens de diferenciació dels principals llinatges cel·lulars de la ICM i el TE en l'estadi de blastocist en els mamífers. Les extrapolacions entre animals inferiors i mamífers, però, s'han de fer amb cautela, ja que a banda de les grans diferències evolutives que presenten, la viviparitat complica la comparació amb els no mamífers. Es creu que la polaritat pot existir ja a l'òocit (Edwards i Beard, 1997) degut a l'organització dels mRNAs en l'ooplasma, la

localització del corpuscle polar (PB) i el lloc d'entrada de l'espermatozoide (SEP). També es creu que pot existir una primera predeterminació del destí dels blastòmers en estadis embrionaris primerencs influenciada per tots els mecanismes de manteniment de la pluripotència esmentats en apartats anteriors (vies de senyalització, unions intercel·lulars, factors de transcripció, reguladors epigenètics, microRNAs), a banda de la temporalitat i l'orientació de determinats plans de divisió (Edwards i Beard, 1997). Així, se sap que en algunes espècies d'animals inferiors com *Caenorhabditis elegans* (Goldstein, 1995; Watts *et al.*, 1996), *Xenopus laevis* (Gurdon, 1992; Schnabel, 1996) i *Drosophila melanogaster* (Deng *et al.*, 1997), els blastòmers tenen un destí cel·lular molt definit, ja que existeix una polaritat induïda per factors de transcripció materns de vida curta en l'oòcit i de vida llarga en l'embrió, i també pels plans de divisió que regulen i mantenen la diferenciació dels llinatges cel·lulars. En altres espècies, però, els blastòmers tenen un potencial de diferenciació equivalent durant els estadis embrionaris primerencs, de manera que responen a senyals inductives en els estadis embrionaris posteriors.

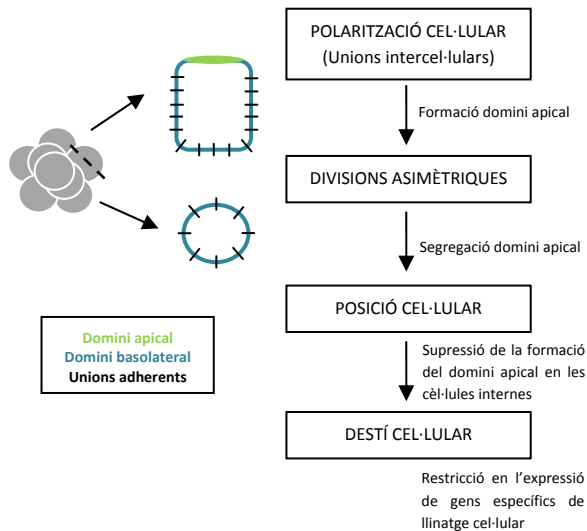
Diferents estudis realitzats en mamífers, sobretot en el model murí, han suggerit visions contraposades sobre si la polaritat i, per tant, les decisions sobre el destí dels blastòmers, es prenen en estadis embrionaris més tardans del desenvolupament preimplantacional o, si pel contrari, existeix una certa predeterminació ja en el propi oòcit i en estadis embrionaris primerencs. En aquest sentit, existeixen dues visions principals que expliquen el desenvolupament embrionari preimplantacional de ratolí pel que fa al moment en què es prenen les primeres decisions de la diferenciació dels llinatges de la ICM i del TE (**Figura 11**).

4.1.1. Interacció entre polaritat cel·lular, posició i proteïnes de destí cel·lular

El primer model de diferenciació dels llinatges de la ICM i el TE, el model regulatiu, proposa que el zigot és completament simètric, no té un eix animal-vegetal ni presenta qualsevol altre indicatiu de polaritat i, per tant, es desenvolupa amb cèl·lules idèntiques que es divideixen en una orientació a l'atzar (Alarcon i Marikawa, 2003; Hiiragi i Solter, 2004; Johnson i McConell, 2004; Motosugi *et al.*, 2005; Dietrich i Hiiragi, 2007; Kurotaki *et al.*, 2007; Suwinska *et al.*, 2008; Tarkowski *et al.*, 2010). Aquest model afirma que no existeix una correlació directa entre el primer pla de divisió i l'eix embrionari-extraembrionari del blastocist i que aquesta relació no afectaria al posterior desenvolupament postimplantacional. Segons aquesta teoria, les primeres diferències entre blastòmers pel que fa al destí cel·lular apareixerien quan es comencen a diferenciar les cèl·lules internes i externes entre l'estadi de 8 cèl·lules tardà i la mòrula, de manera que la cavitat del blastocist es formaria en una posició a l'atzar i l'orientació de l'eix embrionari-extraembrionari

del blastocist no correlacionaria amb cap fenomen de diferenciació primerenc del desenvolupament.

MODEL REGULATIU: DETERMINACIÓ TARDANA DELS LLINATGES CEL·LULARS DE LA ICM I EL TE



MODEL PRE-PATTERNING: DETERMINACIÓ PRIMERENCA DELS LLINATGES CEL·LULARS DE LA ICM I EL TE

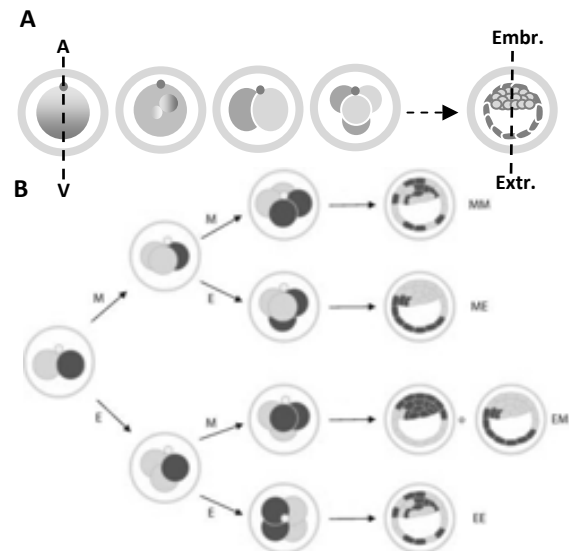


Figura 11. Models de diferenciació de la ICM i del TE. MODEL REGULATIU. A l'esquerra s'observa com una divisió asimètrica en estadi de 8 cèl·lules tardà produeix una cèl·lula exterior i una interior. La distribució de les unions adherents en zones de contacte entre cèl·lules i els dominis apical i basolateral s'il·lustren en ambdós tipus cel·lulars. A la dreta s'il·lustra la seqüència de processos que tindrien lloc per tal de segregar les cèl·lules de la ICM i el TE en el blastocist. MODEL *PRE-PATTERNING*. La polaritat de l'òciti i factors del desenvolupament primerenc poden guiar el destí dels blastòmers (A). L'orientació del pla de divisió en estadi de 4 cèl·lules es considera un factor important en la predeterminació del destí (B). A: animal; V: vegetal; Embr.: embrionari; Extr.: extraembrionari; M: meridional; E: equatorial; *Adaptat de Henckel i col·laboradors (2007) i Yamanaka i col·laboradors (2006).*

El model regulatiu contempla dues teories que intenten explicar com s'adquireixen les diferències entre les cèl·lules internes i les externes de l'embrió. La primera d'aquestes teories es coneix amb el nom de *inside-outside hypothesis* (Tarkowski i Wroblewska, 1967) i proposa que el destí dels blastòmers s'establiria per la posició que ocupen un cop estructurats en les cèl·lules interiors i exteriors en l'estadi de 16 cèl·lules, i que aquesta traducció de posició en destí cel·lular podria ser induïda per l'ambient diferencial que comparteixen aquestes cèl·lules, com per exemple els contactes que estableixen amb les cèl·lules veïnes, en funció de la posició que ocupen i que determinaria un destí diferent. Però el mecanisme mitjançant el qual l'ambient determina la

posició cel·lular i el dubte sobre si el destí cel·lular únicament està guiat per la posició dels blastòmers va fer que sorgís una nova teoria anomenada *cell polarity hypothesis* (Johnson i Ziomek, 1981) que proposa que els blastòmers es polaritzen al llarg de l'eix apical-basal abans que les cèl·lules internes comencin a diferenciar-se. Així, les divisions asimètriques posteriors generen cèl·lules internes i externes que difereixen en la seva polaritat.

Originalment, aquestes dues teories que contempla el model regulatiu es consideraven alternatives, malgrat que treballs més recents (Vinot *et al.*, 2005; Zernicka-Goetz *et al.*, 2009) apunten a que podrien actuar en conjunt per tal de segregar els llinatges de la ICM i el TE (**Figura 11**). Atès que les divisions asimètriques localitzen els blastòmers cap a posicions diferents i, per tant, els blastòmers resultants varien en la seves propietats pel que fa a la polaritat, sembla difícil diferenciar l'efecte de la posició i de la polaritat. A més, no només variant la posició dels blastòmers s'afecta la polaritat, sinó que un canvi en la polaritat també afecta la localització dels blastòmers. Existeixen tot un seguit de proteïnes que caracteritzen aquesta polaritat, la majoria de les quals pertanyen a la família de gens *Par* com, per exemple, JAM1 (*Junction Adhesion Molecule 1*), α PKC i Par3, que es localitzen a la regió apical dels blastòmers en estadi de 8 cèl·lules o Par1 que es troba a la regió basolateral (Yamanaka *et al.*, 2006). Finalment, canvis en els nivells d'expressió dels gens de pluripotència afecten la posició dels blastòmers molt probablement com a conseqüència de canvis en la polaritat. OCT4, Nanog i SOX2 s'expressen tant en les cèl·lules internes com en les externes, fins que la seva expressió es restringida per l'acció de CDX2 que sembla que juga un paper important en el trencament de la simetria dels blastòmers un cop s'assoleix l'estadi de 8 cèl·lules. Sembla que tant la polaritat com CDX2 es regulen positivament l'una a l'altra per tal de diferenciar els llinatges de la ICM i el TE en el blastocist (Jedrusik *et al.*, 2008 i 2010), de manera que la polaritat cel·lular proporciona una distribució heterogènia del mRNA de CDX2, i CDX2, a la vegada, reforça la polaritat a través d'un increment en l'expressió apical de α PKC. A més, a banda de la polaritat induïda per l'expressió de CDX2, es creu que el recent descobriment de la via de senyalització *Hippo*, implicada en l'especificació del TE dels embrions preimplantacionals, també podria explicar la localització dels blastòmers com a conseqüència de la polaritat induïda pels contactes diferencials mitjançant l'E-cadherina entre els blastòmers en funció si ocupen una posició externa o interna (Nishioka *et al.*, 2009). La via de senyalització *Hippo* s'activa en resposta al contacte cel·lular mitjançant les unions adherents amb E-cadherina, de manera que la proteïna Lats fosforila YAP1, coactivador de Tead4, i YAP1 és exclòs del nucli. Com a conseqüència, Tead4 es manté inactiu i no activa la transcripció de CDX2, de manera que aquests blastòmers aniran a formar part de la ICM. Una vegada més, totes aquestes dades suporten la hipòtesi de que ambdues teories del model regulatiu, basades en l'efecte de la

posició i de la polaritat, estan relacionades i regulades a través d'una xarxa transcripcional complexa, de manera que la posició i la polaritat juntament amb la restricció de l'expressió dels gens específics de llinatge portarà a que els blastòmers adquireixin el seu destí final en el blastocist (Yamanaka *et al.*, 2006).

4.1.2. Determinació primerenca del destí dels blastòmers

Un segon model de segregació dels llinatges de la ICM i el TE (*pre-patterning model*) apuntaria a que existeixen diferències entre blastòmers detectables en estadis embrionaris primerencs, abans que aquestes cèl·lules es diferenciïn en les cèl·lules internes i externes en estadi de 8 cèl·lules tardà (**Figura 11**). El plantejament sobre la possibilitat de que les decisions del destí dels blastòmers es prenguessin ja en estadis embrionaris primerencs va sorgir, en part, arrel de l'observació de que l'expressió de CDX2 era heterogènia en les cèl·lules de l'embrió a 8 cèl·lules primerenc en què els blastòmers encara no han experimentat canvis morfològics i, per tant, no s'han diferenciat les cèl·lules externes i internes. L'estudi dels patrons de divisió, el seguiment dels blastòmers durant el desenvolupament des dels seus orígens, la llargada del cycle cel·lular, els moviments i la posició relativa dels blastòmers combinat amb l'expressió quantitativa del perfil transcripcional de les cèl·lules i les modificacions epigenètiques ha revelat alguns dels orígens de la diferenciació primerenca dels blastòmers (Zernicka-Goetz *et al.*, 2009). Aquestes diferències però, no tenen perquè deixar totalment definit el destí dels blastòmers en estadis embrionaris primerencs, sinó que els senyals inductius en el desenvolupament posterior poden fixar definitivament o modular el destí final dels blastòmers en la ICM o el TE dels embrions.

A banda d'això, i tal com s'ha comentat anteriorment, la polaritat pot estar determinada ja a l'oòcit dels mamífers (Edwards i Beard, 1997). Concretament, se sap que l'expressió temporal i espacial dels mRNAs acumulats durant el creixement i maduració de l'oòcit en el pol animal i vegetal pot ser important en la determinació primerenca de la polaritat. Per exemple, l'OCT4 matern es localitza només en un pronucli (normalment el matern) i en el PB dels embrions en estadi de 2 cèl·lules, i posteriorment en alguns blastòmers en estadi de 8 cèl·lules es produeix una disminució de la seva expressió, majoritàriament en aquells que formaran part del TE. L'existència de polaritat en els oòcits de ratolí també es va observar a través de l'anàlisi de moviments dels orgànuls de l'ooplasma i per l'absència de microvellositats en la regió adjacent al primer PB, tot i que en oòcits humans es van veure distribuïdes homogèniament per tota la superfície de l'oòcit (Pickering *et al.*, 1988). Malgrat que en general es considerava que el SEP no produïa una polarització en l'oòcit, alguns estudis en espècies inferiors com *Xenopus* (Gerhart *et al.*, 1989) i *C. elegans* (Goldstein i Hird, 1996) van comprovar que aquest constitueix una font de polaritat. No

va ser fins el 2001 quan Piotrowska i Zernicka-Goetz proposaren la importància del SEP en la determinació de la polaritat en ratolí (Piotrowska i Zernicka-Goetz, 2001).

Se sap que processos que tenen lloc poc després de la fecundació també són importants en l'establiment de la polaritat. En aquest sentit, s'ha vist que com a conseqüència de l'entrada de l'espermatozoide, l'ooplasma de l'oòcit pateix una redistribució, de manera que es produeixen canvis en la posició dels orgànuls i diverses proteïnes adopten una disposició cortical polaritzada en els oòcits madurs (Ji *et al.*, 1997). Els pronuclis, tant el masculí com el femení, també s'han vist implicats en la determinació de la polaritat dels embrions de mamífer com a conseqüència de l'estat de condensació de la cromatina durant la seva aposició en el centre de l'embrió, a banda de les petites onades de transcripció presents al pronucli masculí que també podrien ser les responsables de la inducció de la polaritat (Edwards i Beard, 1997).

Posteriorment en el desenvolupament, existeixen altres fenòmens que també es pensa que són molt importants per tal de guiar el destí dels blastòmers en el futur blastocist. L'activació del genoma embrionari entre l'estadi de zigot i de 2 cèl·lules es creu que podria imposar restriccions en el potencial de diferenciació dels blastòmers ja en estadis primerencs del desenvolupament (Nothias *et al.*, 1995). A més, tal com s'ha comentat anteriorment, la metilació diferencial de la histona H3 en les arginines 17 i 26 en l'estadi de 4 cèl·lules de ratolí és la diferència molecular quantificable més primerenca que s'ha trobat en el desenvolupament embrionari que podria estar guiant el destí d'aquests blastòmers (Torres-Padilla *et al.*, 2007). Recentment, Plachta i col·laboradors (2011) han observat que la cinètica d'OCT4 en els estadis embrionaris de 4 i 8 cèl·lules de ratolí, com a reflex de l'accessibilitat d'aquest factor de transcripció a les seves regions d'unió al DNA, és una bona predictora del destí d'aquests blastòmers. Així, els blastòmers amb una taxa d'exportació-importació baixa d'OCT4 en el nucli i, per tant, amb una elevada fracció d'OCT4 immòbil dins el mateix experimentarien un increment en la taxa de divisions asimètriques i contribuirien amb més cèl·lules a la ICM del blastocist. Per contra, els blastòmers amb una major mobilitat de la proteïna OCT4 nuclear tendrien a presentar divisions simètriques formant majoritàriament cèl·lules del TE.

Però a banda de les evidències citològiques i moleculars trobades en els oòcits i els estadis embrionaris primerencs que poden induir la polaritat, altres factors que també actuen durant els estadis embrionaris primerencs poden constituir importants efectors en l'establiment d'un destí concret en aquests estadis. Concretament, s'ha determinat que la temporalitat i orientació dels plans de divisió d'estadis embrionaris primerencs poden influir en el potencial de diferenciació

dels blastòmers. En aquest sentit, un seguit d'autors han proposat que l'eix embrionari-extraembrionari del blastocist correlaciona amb l'eix animal-vegetal del zigot i que aquests són perpendiculars entre si (Gardner, 1997 i 2001; Piotrowska *et al.*, 2001 i 2005; Piotrowska i Zernicka-Goetz, 2001). Altres estudis, però, van determinar que malgrat existís aquesta correlació entre eixos, no seria necessària per al desenvolupament ni tampoc deixaria fixat definitivament el destí dels blastòmers en estadis primerencs (Ciemerych *et al.*, 2000).

Se sap que les dues divisions en estadi de 2 cèl·lules de ratolí no es produeixen de manera sincrònica, sinó que un dels blastòmers es divideix abans que el seu blastòmer germà. Diferents autors van proposar que la descendència del primer blastòmer que es divideix contribueix a la part embrionària del blastocist (Kelly *et al.*, 1978; Graham i Deussen, 1978, Spindle, 1982; Surani i Barton, 1984), malgrat que altres estudis de l'època van suggerir que els primers blastòmers a dividir-se contribuïen a la part extraembrionària del blastocist (Garbutt *et al.*, 1987). Més recentment, Piotrowska i col·laboradors (2001) utilitzant un mètode no invasiu amb un colorant lipofílic per tal de seguir els blastòmers al llarg de les divisions embrionàries, van veure que els blastòmers d'embrions en estadi de 2 cèl·lules de ratolí tenen una forta tendència a formar part de la part embrionària o extraembrionària del blastocist. Concretament, el primer blastòmer a dividir-se acostuma a formar part de la ICM del blastocist, per tant, conclouen que ja en estadi de 4 cèl·lules es pot predir quins dels blastòmers es localitzaran en la part embrionària del blastocist. Aquesta idea ja havia estat proposada per investigadors del mateix grup en el mateix any, ja que Piotrowska i Zernicka-Goetz (2001) van observar que existien diferències en el moment de la divisió dels dos blastòmers en estadi de 2 cèl·lules de ratolí, de manera que el blastòmer que heretava el SEP era el primer a dividir-se i les mateixes autores el 2002 (Piotrowska i Zernicka-Goetz, 2002) van acabar afirmant que tant l'òocit com l'espermatozoide presenten una forta contribució en l'establiment de la polaritat després de la fecundació. Fujimori i col·laboradors (2003) van reforçar aquesta idea d'especificació del destí dels blastòmers entre 2-4 cèl·lules, malgrat que afirmen que el destí cel·lular en aquests estadis primerencs encara no estaria totalment determinat, sinó que factors del desenvolupament embrionari tardà podrien variar el seu potencial de diferenciació.

També s'ha proposat que aquesta determinació primerenca dels blastòmers descendents de l'estadi de 2 cèl·lules depèn d'una separació de les parts animal i vegetal del zigot. Durant anys es va creure que les dues divisions embrionàries en cadascun dels blastòmers en estadi de 2 cèl·lules per formar l'embrió a 4 cèl·lules es produïen en una orientació meridional (Gulyas, 1975) i que el segon blastòmer rotava 90° donant la impressió de que el pla de divisió era equatorial. Però fa

relativament pocs anys, Gardner (2002) va proposar que els blastòmers de l'estadi de 4 cèl·lules de ratolí procedien d'una divisió produïda en sentit meridional i l'altra equatorial, en relació a la posició del PB. Així, els blastòmers que procedien de la divisió meridional formaven dos blastòmers iguals pel que fa a la seva quantitat de components animal i vegetal, mentre que els que derivaven d'una divisió equatorial formaven dos blastòmers clarament diferents, on un presentava majoritàriament component animal i l'altre component vegetal. Aquesta teoria va ser reforçada i ampliada posteriorment amb els estudis de Piotrowska i Zernicka-Goetz (2005). Aquestes autores afirmen que del 80% dels embrions a 2 cèl·lules en els quals una divisió es produeix en una orientació equatorial i l'altra meridional (embrions EM o ME), només els primers blastòmers que es divideixen meridionalment tindran un destí definit, i en aquest cas formaran part de la ICM del blastocist. En canvi, no s'ha vist tan clar que els blastòmers procedents de la segona divisió en sentit equatorial tinguin un destí definit cap a la ICM o el TE en el blastocist. Més tard, Bischoff i col·laboradors (2008) van descriure l'existència de dues etapes en el desenvolupament embrionari preimplantacional durant les quals es determinaria el destí dels blastòmers dins el blastocist. En una primera etapa, tindrien especial rellevància l'ordre i orientació dels plans de divisió entre els estadis de 2 i 4 cèl·lules i, en una segona etapa, l'establiment de les cèl·lules internes i externes entre els estadis de 8 i 32 cèl·lules com a conseqüència de les divisions asimètriques. Aquesta visió correspondria a una combinació d'ambdós models comentats anteriorment, el model regulatiu i el *pre-patterning model*, que proposa que el patró de les divisions influeix la futura localització dels blastòmers en la compactació i, per tant, el seu destí final en el blastocist.

Així, la qüestió de si les cèl·lules resultants de la divisió dels dos blastòmers germans en estadi de 2 cèl·lules presenten un potencial diferent en funció del moment en què es produeix la divisió o de l'orientació d'aquesta ha estat un tema de debat durant molts anys, però sembla que cada cop està més clar que en determinats casos el potencial de diferenciació d'aquests blastòmers es pot predir.

4.2. Potencialitat dels blastòmers aïllats en el desenvolupament embrionari i en la derivació de cèl·lules mare embrionàries

Les observacions sobre el diferent potencial de diferenciació que presenten els blastòmers en estadi de 4 cèl·lules han estat reforçades amb estudis de formació de quimeres i de derivació d'ESCs. Els primers estudis sobre el potencial de diferenciació dels blastòmers en diferents espècies de mamífers ja afirmaven que els blastòmers en estadi de 4 cèl·lules tenien la capacitat

de produir un individu normal i fèrtil un cop transferits a femelles receptores. Moore i col·laboradors (1968) van ser els primers en demostrar aquest fet en conill. Kelly (1977) va observar que els blastòmers en estadi de 4 cèl·lules de ratolí eren capaços de contribuir en la formació de la part embrionària i també en la formació de l'animal, per tant, aquests blastòmers es consideraven totipotents. Més tard, Willadsen (1981) va arribar a la mateixa conclusió en ovella. Schramm i Paprocki (2004) van observar que els blastòmers del macac rhesus procedents de l'estadi de 4 cèl·lules mostraven un increment en el seu potencial de diferenciació quan s'agregaven amb blastòmers tetraploides. En canvi, quan les agregacions es feien amb blastòmers en estadi de 16 cèl·lules, els blastòmers en estadi de 4 cèl·lules menys avançats no contribuïen en la formació del blastocist. Però aquests estudis sobre el potencial de diferenciació dels blastòmers en estadi de 4 i 8 cèl·lules a partir de l'agregació quimèrica amb altres blastòmers, o bé mantenint-los aïllats, no han provat quants blastòmers de cada estadi embrionari contribueixen a la formació de l'embrió pròpiament dit. Tarkowski i col·laboradors (2001) van determinar que només dos dels quatre blastòmers de l'embrió de ratolí en estadi de 4 cèl·lules contribueixen a la formació de l'embrió pròpiament dit i produeixen un individu normal i fèrtil en experiments de formació de quimeres. Piotrowska-Nitsche i col·laboradors (2005) van determinar també, a partir d'agregacions quimèriques entre blastòmers, que quan els blastòmers en estadi de 4 cèl·lules de ratolí que s'agregaven eren del mateix tipus en funció del moment i de l'orientació del pla de divisió, les quimeres no es desenvolupaven bé i, per tant, hi havia una reducció en la viabilitat. A més, també van observar que el blastòmer que es divideix primer i en una orientació meridional contribueix significativament a la part embrionària. Estudis més recents d'agregacions quimèriques entre blastòmers, però, han demostrat que els blastòmers individuals dels estadis embrionaris de 16 i 32 cèl·lules de ratolí encara retenen la capacitat de formar fetus i ratolins. En aquest sentit, Suwinska i col·laboradors (2008) van estudiar la potencialitat dels blastòmers externs i interns dels estadis de 16 i 32 cèl·lules de ratolí i van observar que només les agregacions quimèriques entre blastòmers, tant interns com externs, procedents de l'estadi de 16 cèl·lules tenien la capacitat de donar lloc a individus un cop transferits a femelles receptores. Per tant, aquests autors afirmen que la redirecció del destí dels blastòmers és factible durant la compactació però no una vegada comença la blastulació en estadi de 32 cèl·lules. Anys més tard, investigadors del mateix grup (Tarkowski *et al.*, 2010) i a partir d'agregacions quimèriques de blastòmers individuals en estadi de 16 i 32 cèl·lules amb blastòmers tetraploides, van observar que en estadi de 32 cèl·lules alguns blastòmers encara retenen la capacitat de donar lloc a un fetus però, en canvi, no són capaços de donar lloc a un individu.

Finalment, l'estudi sobre la determinació primerenca del potencial de diferenciació dels blastòmers també s'ha estès a la producció de línies d'ESCs, per tal de determinar si cadascun dels blastòmers individuals que constitueix l'embrió difereix en el seu potencial i, per tant, alguns blastòmers de l'embrió presenten una capacitat major de produir línies d'ESCs que d'altres. En la majoria d'aquests estudis, es compara la capacitat que tenen cadascun dels blastòmers aïllats del mateix embrió de formar un pseudoblastocist amb una ICM visible amb la seva capacitat de derivar una línia d'ESCs. Pel que fa a les mESCs, Lorthongpanich i col·laboradors (2008) no van aconseguir derivar cap línia a partir dels blastòmers aïllats d'embrions en estadi de 4 cèl·lules de ratolí, tot i que alguns d'ells tenien la capacitat de formar una ICM visible un cop aquests blastòmers aïllats en estadi de 4 cèl·lules es desenvolupaven en un blastocist. Malgrat això, Wakayama i col·laboradors (2007) ja havien demostrat que blastòmers individuals en estadi de 4 cèl·lules podien produir línies de mESCs. Van de Velde i col·laboradors (2008) van observar que tots quatre blastòmers de l'embrió humà en estadi de 4 cèl·lules eren capaços de formar un blastocist amb ICM i TE però, més tard, investigadors del mateix grup van descriure que només un dels quatre blastòmers havia estat capaç de derivar hESCs (Geens *et al.*, 2009).

Així, els experiments de derivació de línies d'ESCs han demostrat que la capacitat dels blastòmers de formar un pseudoblastocist amb cèl·lules de la ICM no correlaciona amb la producció de línies d'ESCs. A més, s'ha plantejat la hipòtesi de que el potencial de diferenciació dels blastòmers pot no ser equivalent depenent de si aquests blastòmers s'aïllen o si pel contrari romanen formant part de l'embrió. Sembla que els blastòmers individuals poden tenir un potencial de diferenciació major que el que expressen dins l'embrió (Cockburn i Rossant, 2010). Se sap que quan es produeix l'aïllament dels blastòmers, la nova posició d'aquest un cop es divideix i s'envolti de més blastòmers, induirà la formació o la supressió del domini apical en funció si ocupa una posició externa o interna. Aquesta polarització, per tant, serà la que en aquest cas determinarà el destí final del blastòmer juntament amb la restricció de l'expressió dels gens específics de llinatge (Yamanaka *et al.*, 2006). Aquesta regulació dual segons l'ambient que comparteixen els blastòmers pot tenir especial rellevància en els estudis de la totipotència dels blastòmers, la diferenciació en la mòrula tardana segons si ocupen una posició interna o externa, l'habilitat dels blastòmers de redirigir la pèrdua d'un o més blastòmers en l'embrió i, finalment, l'increment en l'eficiència d'establiment de les línies d'ESCs que pot aportar el fet de triar un blastòmer concret durant el procés de derivació. Alguns d'aquests aspectes han estat d'interès en la present tesi doctoral.

OBJECTIUS

Amb la finalitat de contribuir en el coneixement dels aspectes d'interès sobre el procés de derivació de línies de mESCs ens hem plantejat els següents objectius:

1. Comparar tres mètodes descrits de derivació de línies de mESCs per tal de determinar quin aporta una major eficiència de derivació, en funció de les condicions de cultiu i la tècnica d'establiment.
2. Determinar quin nombre mínim de blastòmers aïllats dels estadis de 4 i 8 cèl·lules aporta una major eficiència d'establiment de línies de mESCs, sempre dins d'uns límits que no comprometi la viabilitat de l'embrió utilitzat.
3. Determinar quin estadi embrionari (4 cèl·lules, 8 cèl·lules, mòrula o blastocist) produeix una eficiència de derivació major de línies de mESCs.
4. Determinar la importància de les unions adherents amb E-cadherina en l'eficiència de derivació de mESCs a partir d'un blastòmer aïllat en estadi de 8 cèl·lules.
5. Analitzar la influència de la determinació primerenca del destí dels blastòmers a l'estadi de 4 cèl·lules en la derivació de línies de mESCs.

RESULTATS I DISCUSSIÓ

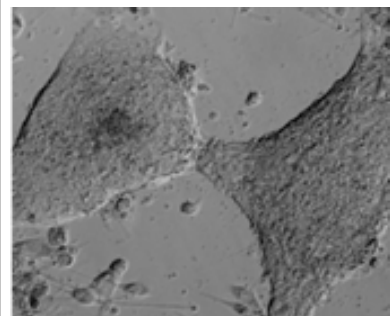
Establishment of mouse embryonic stem cell lines from isolated blastomeres and whole embryos using three derivation methods

Journal of Assisted Reproduction and Genetics 27(12):671-82 (2010).

Sheyla González · Elena Ibáñez · Josep Santaló

Factor d'impacte (2009): 1.359

ARTICLE I



Establishment of mouse embryonic stem cells from isolated blastomeres and whole embryos using three derivation methods

Sheyla González · Elena Ibáñez · Josep Santaló

Received: 16 June 2010 / Accepted: 23 August 2010 / Published online: 23 September 2010
© Springer Science+Business Media, LLC 2010

Abstract

Purpose The aim of the present study is to compare three previously described mouse embryonic stem cell derivation methods to evaluate the influence of culture conditions, number of isolated blastomeres and embryonic stage in the derivation process.

Methods Three embryonic stem cell derivation methods: standard, pre-adhesion and defined culture medium method, were compared in the derivation from isolated blastomeres and whole embryos at 4- and 8-cell stages.

Results A total of 200 embryonic stem cell lines were obtained with an efficiency ranging from 1.9% to 72%.

Conclusions Using either isolated blastomeres or whole embryos, the highest rates of mouse embryonic stem cell establishment were achieved with the defined culture medium method and efficiencies increased as development progressed. Using isolated blastomeres, efficiencies increased in parallel to the proportion of the embryo volume used to start the derivation process.

Keywords Embryo volume · ESC derivation · Isolated blastomeres · mESC

Introduction

Because of their high capacity to self-renew and their regenerative potential, embryonic stem cells (ESCs) have generated a great interest as a developmental model in biology and as a new source of cells for tissue replacement treatments in regenerative medicine. ESCs have the ability to proliferate indefinitely without entering senescence and do not have specialized functions. Therefore, they are in an undifferentiated state and, after a differentiation process, they can produce different tissues of the three germinal layers, even extraembryonic tissue in the case of human ESCs [1].

In the 1980s, the first technique for pluripotent ESCs establishment from mouse blastocysts was developed [2, 3]. In this case, cells from the inner cell mass (ICM) were co-cultured with mouse STO embryo fibroblasts that had been previously inactivated by a mitomycin C treatment. Since then, many groups have achieved the establishment of mouse ESC lines [4] and human ESC lines [5] from blastocysts. However, ESC derivation from blastocysts has some drawbacks. First, it results in the destruction of the embryos from which the ESCs are derived, a controversial issue when dealing with human embryos, and second, it may not produce fully totipotent ESCs [1]. In fact, it is considered that mouse ESCs derived from blastocysts do not have the same developmental potential as those derived from embryonic stages previous to blastocyst. In experiments on chimera formation, it has been observed that ESCs from the ICM can not colonize trophectoderm (TE) when injected into blastocysts [1, 6]. This is due to the fact that, in the mouse, the formation of TE is simultaneous or even previous to the formation of the ICM. This is not the case in humans, as TE can develop from ESCs in vitro [5].

Capsule Influence of the embryonic stage and the number of isolated blastomeres on the derivation of mouse embryonic stem cells using three described derivation methods.

S. González · E. Ibáñez · J. Santaló (✉)
Departament de Biologia Cel·lular, Fisiologia i Immunologia,
Facultat de Biociències, Universitat Autònoma de Barcelona,
08193 Bellaterra, Spain
e-mail: josep.santaló@uab.cat

Concurrently, new experiments aimed to establish ESC lines from stages previous to blastocyst were attempted. In this sense, mouse ESC lines have been derived from morulae [7] using the traditional culture conditions mentioned before [2]. Tesar (2005) [8] also derived mouse ESC lines from several embryonic stages previous to blastocyst, but in this case introducing a variation in the traditional derivation method consisting in the attachment of the embryo to the culture dish prior to the derivation process. In humans, Strelchenko et al. (2004) [9] were the first who achieved the derivation of human ESCs from the morula stage.

On the other hand, different groups have tried to derive ESCs from isolated blastomeres [10–14]. The production of ESC lines from isolated blastomeres arose as an answer to the ethic and moral debate about the use of whole embryos for ESC derivation and it is based on the preimplantation genetic diagnosis (PGD) experience. In PGD studies one blastomere is removed from an embryo at the 6–8-cell stage for its analysis while the rest of the embryo is cultured in vitro until transfer [15]. It is well known that the human embryo remains viable and able to produce a normal pregnancy as long as at least a quarter of the embryo is intact [16].

Presumptively, ESC derivation efficiency from isolated blastomeres may be lower than from whole embryos. For this reason, during many years several groups have attempted to determine the most favorable culture and technical conditions for the efficient derivation and maintenance of such ESC lines in an undifferentiated state in vitro. These approaches include changes in the composition of the culture medium and in the adhesion properties and communication of the cells. In this sense, Chung et al. (2006) [10] developed a new method consisting in the association of mouse isolated blastomeres with a clump of proven ESCs expressing the green fluorescent protein (ESCs-GFP). Later, Klimanskaya et al. (2006) [13] established human ESC lines from isolated blastomeres in a conditioned culture medium from proven ESCs-GFP but in this case without contact between both cell types. Wakayama et al. (2007) [14] produced mouse ESC lines introducing a variation in the culture medium in order to improve the derivation efficiency. Particularly, fetal calf serum (FCS) was replaced by Knockout Serum Replacement (KSR) because it is known that FCS may contain some factors that promote ESCs differentiation. Moreover, the adrenocorticotrophic hormone (ACTH) was added to the culture because it favours the derivation from a single blastomere and the culture propagation from a single ESC without losing pluripotency. This method provided higher efficiencies of derivation than the method of aggregation with proven ESCs-GFP. Recently, Chung et al. (2008) [11] have found that the derivation efficiency of human ESC

lines established from 8-cell stage blastomeres can be improved by culturing them in a medium containing laminin and fibronectin, a new approach that recreates the ICM niche. By contrast, Geens et al. (2009) [12] described the derivation of human ESC lines from isolated blastomeres of 4-cell stage embryos by simply culturing blastomeres onto a monolayer of feeder cells.

Although a bulk of information has been obtained from these studies, there are still some aspects that need to be addressed. In this study, three previously described methods for ESC derivation that combine variations in the technical and culture conditions were compared for the establishment of mouse ESC lines both from isolated blastomeres and whole embryos at different developmental stages. This allowed us to address the importance of different parameters such as the composition of the culture medium, adhesiveness, and the influence of the number of blastomeres and the embryonic stage on ESC derivation efficiency.

Material and methods

Feeder cells culture

STO mouse embryo fibroblasts (ECACC, Salisbury, UK) were inactivated by a mitomycin C (Invitrogen, Prat de Llobregat, Barcelona, Spain) treatment during 3 hours at a concentration of 10 µg/ml to produce feeder cells [17]. The culture medium used for feeder cells was Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (Invitrogen, Prat de Llobregat, Barcelona, Spain) supplemented with 15% FCS (Invitrogen, Prat de Llobregat, Barcelona, Spain).

Embryo collection

Embryos were collected from 129/Sv female mice mated with C57Bl/6 male mice [18]. Prior to mating, females were subjected to a superovulation process by intraperitoneal injection of 5 iu of pregnant mare serum gonadotrophin (PMSG) (Intervet, Alcobendas, Madrid, Spain) followed by 5 iu of human chorionic gonadotrophin (hCG) (Farma-Lepori, Barcelona, Spain) 48 h after the first injection. Embryos at the 2-cell stage were obtained by flushing the oviducts with KSOM-H [19] 48 h after the injection with hCG and were cultured at 37 C under 5% CO₂ until the stages of 4-cell, 8-cell, morula and blastocyst were reached.

All this methodology has been carried out according to the *Guiding Principles in the Care and Use of Animals* and has been approved by the *Comissió d'Ètica en Experimentació Animal i Humana* of the *Universitat Autònoma de Barcelona* and of the *Departament de Medi Ambient i Habitatge* of the *Generalitat de Catalunya*.

Blastomere isolation

Blastomeres from 4- and 8-cell stage embryos were isolated by micromanipulation [15] in a calcium- and magnesium-free phosphate buffered solution (PBS). Briefly, the zona pellucida was disrupted with a 10 µm drilling micropipette containing Tyrode’s acid solution and individual blastomeres were aspirated with a 30 or 20 µm diameter micropipette for 4- and 8-cell stages, respectively (Fig. 1, a and b). Blastomeres were isolated constituting the groups of 1/4 and 2/4 from the isolation of 1 and 2 blastomeres at the 4-cell stage, respectively, and the groups of 1/8, 2/8, 3/8 and 4/8 from the isolation of 1, 2, 3 and 4 blastomeres at the 8-cell stage, respectively (Fig. 1c).

Establishment of embryonic stem cell lines

ESC lines were derived either from isolated blastomeres or whole embryos, using three already described derivation methods. When working with whole embryos, the zona pellucida was digested with Tyrode’s acid solution prior to the culture.

In the standard method [20], isolated blastomeres and whole embryos were seeded onto a feeder cell monolayer and kept in culture.

In the pre-adhesion method, adapted from Tesar (2005) [8], isolated blastomeres and whole embryos were first attached to the bottom of the culture dish by incubating them in a DMEM solution without proteins during 15 min. Then, a feeder cell suspension was gently poured on.

In both methods, the culture was performed in 4-well dishes with a 1.6 cm diameter per well (Nunc, Langensfeld, Germany) containing 1 ml per well of DMEM medium supplemented with 100 µM 2-β-mercaptoethanol (Invitrogen, Prat de Llobregat, Barcelona, Spain), 200 mM

L-glutamine (Invitrogen, Prat de Llobregat, Barcelona, Spain), 100X non-essential aminoacids (Invitrogen, Prat de Llobregat, Barcelona, Spain), 10³ units/ml of leukemia inhibitory factor (LIF) (Millipore, Madrid, Spain) and 15% FCS at 37 C and in a 5% CO₂ atmosphere. The medium was changed every 2 days.

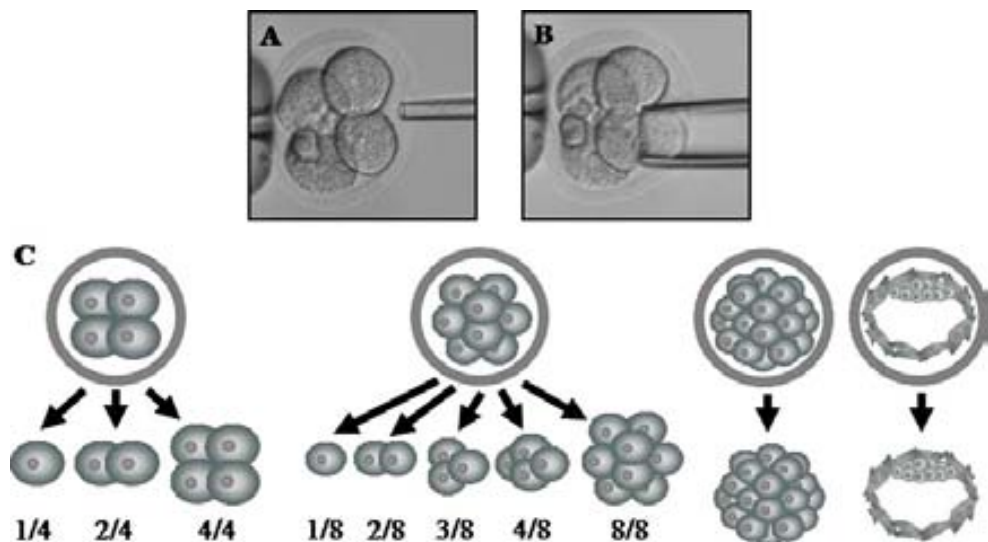
Finally, in the defined culture medium method [14] isolated blastomeres and whole embryos were seeded onto a feeder cell monolayer cultured in 50 µl drops contained in a 60 mm Petri dish (Nunc, Langensfeld, Germany) with DMEM medium supplemented with 100 µM 2-β-mercaptoethanol, 1mM L-glutamine, 1X non-essential aminoacids, 10³ units/ml of LIF, 20% KSR (Invitrogen, Prat de Llobregat, Barcelona, Spain) and 0.1 mg/ml ACTH (Sigma, Madrid, Spain). As in the previous methods, culture was performed at 37 C in a 5% CO₂ atmosphere and the medium was changed every 2 days.

In the three methods, isolated blastomeres or whole embryos were kept in culture until outgrowths of embryonic cells were observed. ESC outgrowths were passaged using a mechanical method 7 or more days after the blastomeres or embryos were plated. In brief, cells of the ESC-like clump were disaggregated by a trypsin-EDTA (LabClinics, Barcelona, Spain) treatment using a mouth-controlled Pasteur pipette to draw the clump in and out of the end of the pipette in order to reduce the ESC-like clump into smaller cell fragments and a few single cells [21]. The subculture procedure was performed approximately 7 times until ESC stable lines were considered to be definitively established.

Embryonic stem cells characterization

ESC lines were first selected based on the morphology of their colonies. An ESC colony had to present a defined

Fig. 1 a–b Embryo biopsy at the 4-cell stage. **a** Drilling process. **b** Blastomere removal. **c** Derivation groups from which embryonic stem cells were established



morphology at its edge, without differentiated cells. Later, the pluripotency of the selected ESC-like lines was determined by immunofluorescence, using specific markers: Oct4, Nanog, Sox2, Cdx2 and SSEA3 (Table 1). Briefly, ESC lines were washed 3 times in a PBS solution, fixed in 4% paraformaldehyde (Sigma, Madrid, Spain) during 15 min and washed again 3 times in PBS. Blocking and permeabilization was performed in a PBS solution containing 0.5% Triton X-100 (Sigma, Madrid, Spain), 3% goat serum (Sigma, Madrid, Spain) and 0.2% sodium azide (Sigma, Madrid, Spain) during 30 min. Incubation with primary antibodies was done overnight at 4 C. Then, they were washed 3 times in PBS and incubated with the corresponding secondary antibody (Table 1) during 2 h at room temperature. Finally, samples were washed again in PBS and stained with Hoechst 33258 (Invitrogen, Prat de Llobregat, Barcelona, Spain) at 10 µg/ml as a nuclear counterstain. Samples were examined with an epifluorescence microscope Olympus Bx60 (Olympus, Barcelona, Spain) and an image capture and analyzing system (Software Genus, 3.0 version, Cupertino, California, USA).

In vitro differentiation of embryonic stem cell lines

To confirm the pluripotency of the established ESC lines, some of them were subjected to differentiating culture conditions to produce cells of the three germ layers: ectoderm, endoderm and mesoderm. The in vitro differentiation procedure was performed in ESC lines produced with the standard method and the defined culture medium method as these two methods are the most different in terms of culture conditions used to derive the lines. ESC lines were subculture to dishes pre-coated with gelatin (Sigma,

Madrid, Spain) but in the absence of feeder cells and LIF. Moreover, in the defined culture medium method the KSR was replaced with FCS to favor differentiation. Culture medium was replaced every 2 days and after a period of approximately 7 days, the lines were fixed for immunofluorescence analysis.

Characterization of embryonic stem cell lines differentiated in vitro

The characterization of the in vitro differentiated ESC lines was performed by immunofluorescence for the detection of specific markers as the neuroepithelial stem cell protein (Nestin), characteristic of the ectodermal layer; alpha-fetoprotein (AFP), characteristic of endoderm; and α -smooth muscle actin (α -SMA), characteristic of mesoderm. Primary and secondary antibodies used are detailed in Table 1. All ESC lines were also immunostained with Oct4 in addition to each marker of differentiation to detect not fully differentiated cells and, finally, stained with Hoechst 33258 as a nuclear counterstain. The immunofluorescence procedure was the same used for the characterization of the undifferentiated ESC lines.

Experimental design

Experiments to determine ESC derivation efficiency were carried out in two series. In the first one, the influence of the number of isolated blastomeres used to start the derivation process was analysed while, in the second the influence of the embryonic stage on this parameter was assessed. Three ESC derivation methods aforementioned (the standard method, the pre-adhesion method and the

Table 1 Primary and secondary antibodies used for embryonic stem cell characterization

| Primary antibody | Localization | Dilution | Reference | Secondary antibody | Concentration | Reference |
|--|--------------|----------|---------------------|--|---------------|--------------------------|
| Mouse monoclonal anti-Oct4 | Nuclear | 1:50 | Santa Cruz sc-5279 | Chicken anti-mouse IgG Alexa Fluor 488 | 6 µg/ml | Molecular Probes A-21200 |
| Rabbit polyclonal anti-Nanog | Nuclear | 1:200 | Abcam ab21603 | Goat anti-rabbit IgG Alexa Fluor 594 | 6 µg/ml | Molecular Probes A-11037 |
| Rabbit polyclonal anti-Sox2 | Nuclear | 1:200 | Chemicon AB5603 | Goat anti-rabbit IgG Alexa Fluor 594 | 6 µg/ml | Molecular Probes A-11037 |
| Goat polyclonal anti-Cdx2 (negative control) | Nuclear | 1:50 | Santa Cruz sc-19478 | Rabbit anti-goat IgG Alexa Fluor 488 | 6 µg/ml | Molecular Probes A-11078 |
| Rat monoclonal anti-SSEA3 (negative control) | Membrane | 1:20 | Chemicon MAB4303 | Goat anti-rat IgM Alexa Fluor 488 | 6 µg/ml | Molecular Probes A-21212 |
| Rabbit polyclonal anti-Nestin | Cytosolic | 1:250 | Abcam ab5968 | Goat anti-rabbit IgG Alexa Fluor 594 | 6 µg/ml | Molecular Probes A-11037 |
| Rabbit polyclonal anti-AFP | Cytosolic | 1:400 | Dako A0008 | Goat anti-rabbit IgG Alexa Fluor 594 | 6 µg/ml | Molecular Probes A-11037 |
| Mouse monoclonal anti- α -SMA | Cytosolic | 1:400 | Sigma A5228 | Chicken anti-mouse IgG Alexa Fluor 488 | 6 µg/ml | Molecular Probes A-21200 |

defined culture medium method) were used for each set of experiments in order to determine which of them provided the highest derivation efficiency.

In the first set of the experiments, a minimum of 25 blastomeres for each test group (1/4 and 2/4 and 1/8, 2/8, 3/8 and 4/8 at the 4-cell and 8-cell stages respectively) were used. Isolated blastomeres of the same derivation group at the 4- or 8-cell stages were pooled, randomly distributed and individually plated in order to avoid their aggregation. In the second series of experiments 25 embryos for each test group (4-cell and 8-cell whole embryos) were used. In both series of experiments the positive controls were morula and blastocyst stages, traditionally used in ESC derivation.

Statistical analysis

Results were statistically analyzed by X^2 or Fisher exact test using the GraphPad InStat™ program (La Jolla, California, USA). Values with a $p < 0.05$ were considered statistically significant.

Results

Influence of the derivation method on ESC derivation efficiency

Three different derivation methods (the standard method, the pre-adhesion method and the defined culture medium method) were used in order to determine which one provided the highest efficiency in terms of ESC derivation. The influence of the method applied was tested in experiments of ESC derivation from isolated blastomeres and from whole embryos at different developmental stages in two different series of experiments, as previously mentioned. A total of 227 ESC lines consisting in colonies with an ESC-like morphology were obtained in these two series of experiments of which 200 (88%) tested positive for all pluripotency markers analyzed by immunofluorescence. ESC derivation efficiencies were calculated based on these positive ESC lines. Data showing these results from isolated blastomeres and whole embryos are illustrated in Tables 2 and 3.

In both series of experiments, the defined culture medium method turned out to be the most efficient for ESC derivation from post-compaction control groups, i.e. morula and blastocyst (Tables 2 and 3). It is important to note that, in general, ESC derivation efficiencies from these control groups were lower in the first series of experiments (Table 2) than in the second one (Table 3), but differences between them were only significant for the standard method (morula $p = 0.0357$; blastocyst $p = 0.0255$).

Table 2 Influence of the method on the percentage of embryonic stem cell lines derived from isolated blastomeres

| | Derivation groups | | | | | | | |
|-------------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|------------------------|-------------------------|--------------------------|--------------------------|
| | 1/4 (n) | 2/4 (n) | 1/8 (n) | 2/8 (n) | 3/8 (n) | 4/8 (n) | Morula (n) | Blastocyst (n) |
| Standard method | 3.8 (3/78) ^a | 1.9 (1/53) ^a | 0 (0/57) ^a | 6.5 (2/31) ^a | 20 (5/25) ^a | 28 (7/25) ^{ab} | 15.6 (5/32) ^a | 12.5 (3/25) ^a |
| Pre-adhesion method | 2.3 (1/44) ^a | 4 (1/25) ^a | 3.7 (1/27) ^a | 4 (1/25) ^a | 8 (2/25) ^a | 8 (2/25) ^a | 20 (5/25) ^{ab} | 24 (6/25) ^{ab} |
| Defined culture medium method | 12 (3/25) ^a | 32 (8/25) ^b | 4 (1/25) ^a | 8 (2/25) ^a | 24 (6/25) ^a | 44 (11/25) ^b | 48 (12/25) ^b | 48 (12/25) ^b |

a, b Values with different superscripts within the same column differ significantly among derivation methods

Table 3 Influence of the method on the percentage of embryonic stem cell lines derived from whole embryos

| | Derivation groups | | | |
|-------------------------------|------------------------|-------------------------|--------------------------|--------------------------|
| | 4-cell stage (n) | 8-cell stage (n) | Morula (n) | Blastocyst (n) |
| Standard method | 8 (2/25) ^a | 16 (4/25) ^{ab} | 44 (11/25) ^{ab} | 44 (11/25) ^{ab} |
| Pre-adhesion method | 8 (2/25) ^a | 4 (1/25) ^a | 24 (6/25) ^a | 28 (7/25) ^a |
| Defined culture medium method | 36 (9/25) ^b | 44 (11/25) ^b | 72 (18/25) ^b | 72 (18/25) ^b |

^{a, b} Values with different superscripts within the same column differ significantly among derivation methods

When isolated blastomeres were used to start the ESC derivation process, significant differences among methods did not appear until at least half of the embryo was used to start the ESC derivation (Table 2). Particularly, the most efficient method for the derivation from the 2/4 group turned out to be the defined culture medium method ($p=0.0003$ and $p=0.0232$ when comparing with the standard and the pre-adhesion methods, respectively). Similarly, the defined culture medium method provided the highest percentage of ESC derivation for the 4/8 group, but in this case significant differences were only found when compared to the pre-adhesion method ($p=0.0083$).

Interestingly, whole pre-compaction embryos at the 4- and 8-cell stages showed a similar pattern to their half-embryos counterparts in terms of the influence of the method on ESC derivation efficiency (Table 3). Thus, the defined culture medium method was the most efficient in terms of ESCs production both for 4- and 8-cell stage embryos, although not significantly different from the standard method at the 8-cell stage.

Influence of the number of isolated blastomeres on ESC derivation efficiency

In the first set of experiments, the influence of the number of isolated blastomeres on ESC derivation was assessed using the three derivation methods previously analyzed. In this case, results are expressed in graphs and data is statistically analyzed between derivation groups of a particular method to observe the trend while increasing the number of isolated blastomeres (Fig. 2). A significant correlation between the number of isolated blastomeres and the number of positive ESC lines derived was found for all the three derivation methods analyzed (standard method $p<0.0001$; pre-adhesion method $p=0.0241$; defined culture medium method $p=0.0001$). Figure 3 (a–c) shows an example of an ESC line in culture derived from two isolated blastomeres at the 8-cell stage (2/8 group). Positive ESCs from this derivation group confirmed by immunofluorescence are illustrated in Fig. 4 (Panel a, A–D). Moreover, the confirmation of the in vitro differentiation of an ESC line derived from 4/8 blastomeres by the standard method is shown in Fig. 4 (Panel b, A–C).

As previously mentioned, the differentiated lines were immunostained with three markers of differentiation and also with Oct4 to detect undifferentiated cells remaining inside ESC colonies. The combination of both kinds of markers showed the distribution of the newly differentiated cells with respect to the remaining undifferentiated cells inside the ESC colonies. Particularly, Nestin-positive cells were uniformly distributed around the colonies of ESCs at low density, AFP-positive cells were found inside some ESC colonies, either as a group or isolated; and, finally, α -SMA-positive cells were also uniformly distributed around ESC colonies like Nestin-positive cells, but at higher density.

The comparison, in terms of ESC derivation efficiency, between both control stages (morula and blastocyst) turned

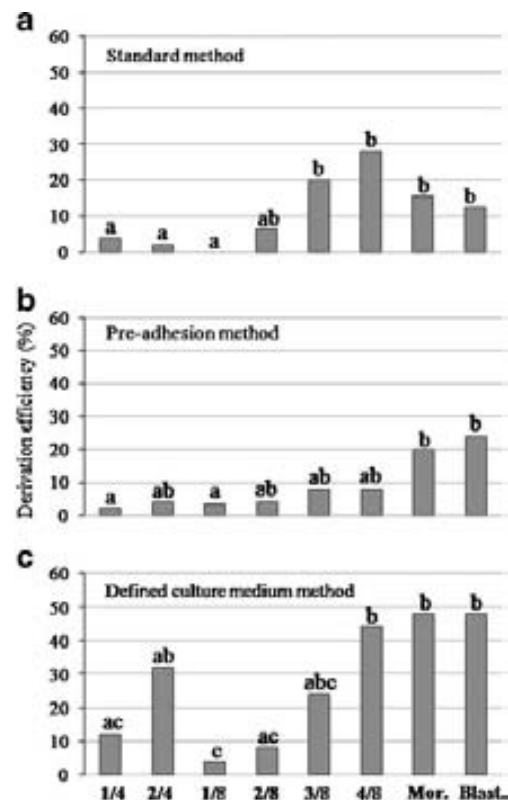


Fig. 2 Influence of the number of isolated blastomeres on embryonic stem cell derivation by the standard (a), the pre-adhesion (b) and the defined culture medium method (c)

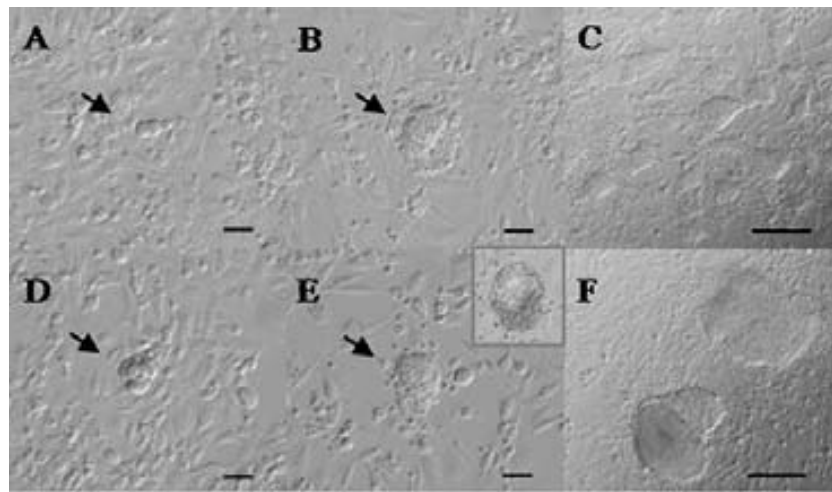
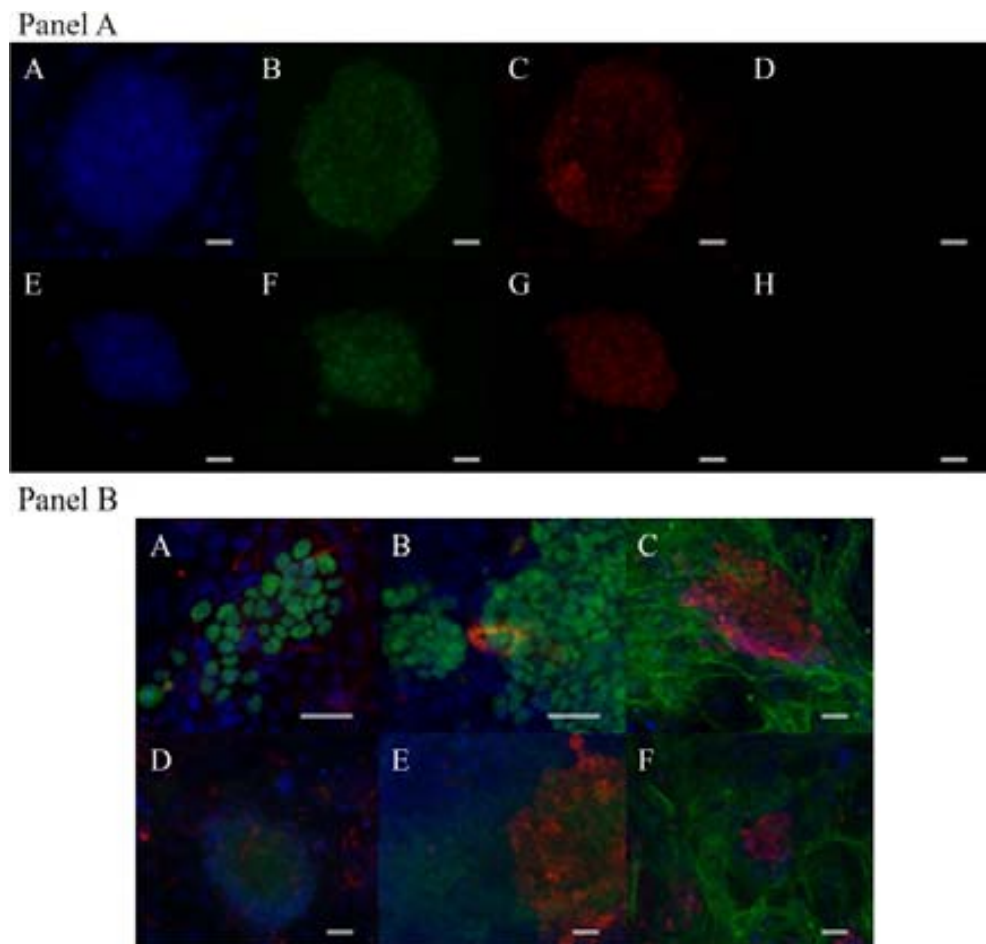


Fig. 3 A–C. Embryonic stem cell (ESC) derivation from 2 blastomeres at the 8-cell stage (2/8 group) by the standard method. A. Two blastomeres from an embryo at the 8-cell stage onto a monolayer of feeder cells (Scale bar: 50 μ m). B. A 3-day outgrowth (Scale bar: 50 μ m). C. 30-day ESC colonies (Scale bar: 100 μ m). D–F. ESC derivation from a whole embryo at the 4-cell stage by the defined

culture medium method. D. A 4-cell stage embryo without zona pellucida onto a feeder cell monolayer (Scale bar: 50 μ m). E. A 4-day outgrowth (Scale bar: 50 μ m). In this method, embryos used to initiate the process by forming a blastocyst and then attaching to the feeder cells (inset) F. 30-day ESC colonies (Scale bar: 100 μ m)

Fig. 4 Panel a: characterization of embryonic stem cell (ESC) lines by immunofluorescence. A–D ESC line derived from 2/8 blastomeres stained with Hoechst (A), positive for Oct4 (B) and Nanog (C) markers and negative for the expression of Cdx2 marker (D). E–H. ESC line derived from a whole 4-cell embryo stained with Hoechst (E), positive for Oct4 (F) and Sox2 (G) markers and negative for the expression of SSEA3 marker (H). Scale bars: 30 μ m. Panel b: characterization of ESC lines differentiated in vitro. A–C In vitro differentiation of an ESC line derived from 4/8 blastomeres by the standard derivation method positive for Nestin (A), AFP (B) and α -SMA (C). D–F In vitro differentiation of an ESC line derived from a whole 4-cell stage embryo by the defined culture medium method positive for Nestin (D), AFP (E) and α -SMA (F). Oct4 is detected in green in pictures A, B, D and E and in red in picture C and F. Scale bars: 30 μ m



out to be not statistically significant for any of the three methods used. ESC derivation from one or two blastomeres at the 4-cell stage (1/4 and 2/4 groups) was similarly efficient in all the three methods. However, when compared to control groups (morula and blastocyst), derivation from the 1/4 group provided significantly lower efficiencies in the three methods whereas the 2/4 group resulted in similar derivation efficiencies as the controls, except for the standard method. When the ESC derivation was started with 1–4 isolated blastomeres at the 8-cell stage a general tendency towards higher derivation efficiencies was observed when increasing the number of isolated blastomeres, but the significance of this tendency varied according to the derivation method used. In the standard method, derivation from 2, 3 or 4 blastomeres turned out to be equivalent to the control groups, while derivation from a single blastomere was null (Fig. 2a). A similar trend was observed in the pre-adhesion method though, in this case, derivation from the 1/8 group, while still less efficient than from the control groups, was not significantly different from the 2/8, 3/8 and 4/8 groups (Fig. 2b). Finally, in the defined culture medium method, only the 3/8 and 4/8 groups resulted in a similar number of ESC lines as the control groups, and significant differences between both the 1/8 and 2/8 groups and the 4/8 group were found (Fig. 2c).

It is interesting to point out that independently of the derivation method applied and the embryonic stage from which the blastomeres were obtained, derivation efficiencies from single blastomeres (1/4 and 1/8) were low (<12%) and in all cases significantly lower than from whole post-compaction control embryos. Moreover, for the 1/8 group in particular, no ESC lines could be obtained when using the standard method (Fig. 2a). Despite the two-fold difference in cell volume between the 1/4 and the 1/8 groups, they provided similar derivation efficiencies under the three derivation methods applied.

To try to gain some insight into the cause for such low derivation efficiency from the 1/4 and 1/8 groups, the rates of blastomere division after the first 24 hours in culture were compared among all the groups. As shown in Table 4, the division capacity of the 1/8 group resulted to be extremely significantly lower than the one of the 1/4 group

($p < 0.0001$) in all the methods tested except for the standard one. Moreover, the rate of division of the 1/8 group was significantly lower than those of the rest of the derivation groups with a higher number of blastomeres at the 8-cell stage (2/8, 3/8 and 4/8 groups) for all three derivation methods. By contrast, when comparing the division capacity of the 1/4 group to the one of the 2/4 group, differences only appeared in the standard method.

Influence of the embryonic stage on ESC derivation efficiency

In the second set of experiments, whole embryos at different developmental stages were used to assess the influence of the embryonic stage on ESC derivation. In this case, results have been also expressed in graphs in order to show the trend as development proceeds and statistical analysis has been performed between embryonic stages among a particular derivation method (Fig. 5). A significant association between the embryonic stage and the number of positive ESC lines derived was found for the standard and the defined culture medium methods ($p = 0.0044$ and $p = 0.0134$, respectively). Figure 3 (D–F) shows an example of ESC colonies in culture derived from a whole 4-cell stage embryo. An example of a positive ESC line from a 4-cell whole embryo, confirmed by immunofluorescence, is shown in Fig. 4 (E–H). Moreover, the confirmation of the in vitro differentiation of an ESC line derived from a whole 4-cell stage embryo by the defined culture medium method is shown in Fig. 4 (Panel b, D–F). In this case, the distribution of the markers of differentiation with respect to Oct4 followed the same trend described before.

As shown in Fig. 5, no significant differences in the ESC derivation efficiency were found between post-compaction control stages (morula and blastocyst) or between pre-compaction stages (4-cell and 8-cell stages) for any of the three methods used. However, comparing pre- and post-compaction stages, the derivation efficiency obtained from 4-cell embryos was significantly lower than from post-compaction control stages for both the standard ($p = 0.0083$; Fig. 5a) and the defined culture medium methods ($p = 0.0222$; Fig. 5c). By contrast, 8-cell stage embryos resulted

Table 4 First division percentages of isolated blastomeres

| | Derivation groups | | | | | |
|-------------------------------|----------------------------|----------------------------|---------------------------|----------------------------|---------------------------|----------------------------|
| | 1/4 (n) | 2/4 (n) | 1/8 (n) | 2/8 (n) | 3/8 (n) | 4/8 (n) |
| Standard method | 39.7 (31/78) ^{ac} | 77.4 (41/53) ^b | 28.1 (16/57) ^c | 61.3 (19/31) ^{ab} | 72.0 (18/25) ^b | 84.0 (21/25) ^b |
| Pre-adhesion method | 70.5 (31/44) ^{ac} | 60.0 (15/25) ^{ac} | 22.2 (6/27) ^b | 76.0 (19/25) ^{ac} | 56.0 (14/25) ^a | 88.0 (22/25) ^c |
| Defined culture medium method | 84.0 (21/25) ^a | 92.0 (23/25) ^a | 16.0 (4/25) ^b | 84.0 (21/25) ^a | 88.0 (22/25) ^a | 100.0 (25/25) ^a |

^{a, b, c} Values with different superscripts within the same row differ significantly among derivation methods

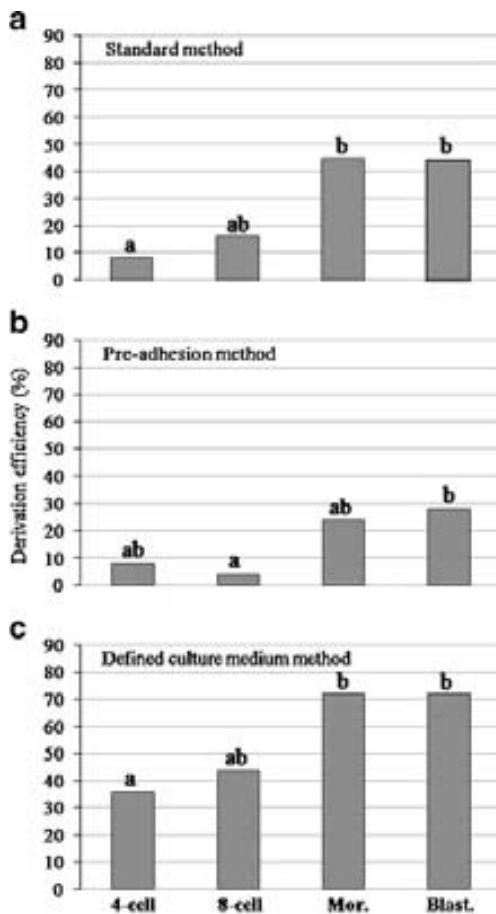


Fig. 5 Influence of the embryonic stage on embryonic stem cell derivation by the standard (a), the pre-adhesion (b) and the defined culture medium method (c)

in an equivalent percentage of ESC colonies than control post-compaction embryos, with the only exception of a significantly lower derivation efficiency in comparison to blastocysts in the pre-adhesion method ($p=0.0488$; Fig. 5b). Therefore, derivation of ESC lines from post-compaction embryos is in general more efficient than from pre-compaction stages, even though 8-cell stage embryos are more similar to the post-compaction groups than 4-cell embryos.

Discussion

The aim of the present study was to develop mouse ESC lines from isolated blastomeres and whole embryos at the 4- and 8-cell stages by comparing three already described derivation methods and to analyze the influence of the number of blastomeres and the embryonic stage on the derivation efficiency.

ESC lines could be derived from all groups of blastomeres and whole embryos at the 4- and 8-cell stages

with a reasonable efficiency (1.9–44%) using the three derivation methods compared. There was only one exception, the 1/8 group which did not produce any ESC line when using the standard method. Moreover, pluripotency of ESC lines described in our study was confirmed by the expression of specific markers of undifferentiated cells and by the ability of these lines to differentiate in vitro into cells of the three germ layers.

Control post-compaction stages (morula and blastocyst) exhibited variable derivation efficiencies ranging from 12.5% to 72%. Particularly, in the first series of experiments, ESC derivation efficiencies from morulae and blastocysts were relatively low (12.5–48%) when compared to those reported by other authors, specially for the standard method. It is well known that ESC lines can be derived from up to 50% of the blastocysts by using the same culture method [22] and in a more recent study, using a method equivalent to our defined culture medium method, Wakayama et al. (2007) [14] reported 88% of derivation from blastocysts (vs. 48% in our study). These previous data suggested us that ESC derivation efficiencies were susceptible to be increased by changing the batch of feeder cells. Due to their long term culture (for more than 200 passages), the feeder cells could have a reduced capacity to sustain the ESC derivation process, therefore producing low rates of ESC derivation. The new batch of feeder cells used to perform the second set of experiments increased the efficiency of ESC derivation from control post-compacted embryos reaching percentages more similar to those found by the previous aforementioned studies. Moreover, due to the fact that differences between the two series of experiments were statistically significant only for the standard method, it could be deduced that the contact between blastomeres or embryos and feeder cells could be more crucial in this method than in the others. By contrast, in the defined culture medium method, which uses the same technical conditions but a different composition of the medium, the contact with feeder cells seems to be less important suggesting that the composition of the medium is the crucial aspect to produce ESC lines. As previously described [14], the use of KSR results in a more defined composition of the medium that may overcome the differentiating phenomena of the putative ESC induced by the uncontrolled factors provided by the FCS. Moreover, the introduction of the ACTH hormone supports the derivation from single blastomeres as well as the propagation of the ESC line from single cells.

When analyzing the influence of the derivation method on the derivation efficiencies obtained from pre-compacted embryos, significant differences were found between the three methods compared only when the derivation process was initiated by at least half of the embryo (2/4 and 4/8 groups) or by the whole embryo (4- and 8-cell stages). This could be due

to the fact that a low number of blastomeres involved in the derivation process may result in low efficiency rates that could conceal differences among methods.

Several attempts have been done in the last few years to increase the derivation efficiency from single blastomeres by testing different technical and culture conditions. Delhaise et al. (1996) [20] used the conventional derivation method, equivalent to the standard method used in our experiments, to derive mouse ESC lines from disaggregated uncompact 8-cell stage embryos (1/8 group) and obtained a derivation efficiency of 1.9% using the 129/Sv strain. More recently, Wakayama et al. (2007) [14] established mouse ESCs from isolated blastomeres at early 4-cell (28–40%), late 4-cell (22%) and 8-cell (14–16%) stages from (B6D2F1×129/Sv)F1 and (129/Sv×129/Sv)F1 embryos using equivalent culture conditions to the defined culture medium method in our experiments. The rates of ESC lines production in the aforementioned studies are higher than those obtained in our experiments and it could be attributed to differences in the genetic background of the embryos used to derive the ESC lines. It is well established that the mouse strains used to obtain the embryos have an influence on the derivation process [23].

The technical conditions of the ESC culture were also compared in our experiments by using the pre-adhesion method, equivalent to the one set up by Tesar (2005) [8] in which denuded 4- and 8-cell stage mouse embryos were first attached to the culture dish by incubating them in a protein free PBS solution. After the attachment, the feeder cell suspension was poured on 5 min later. Using this technique, the author claims that ESC derivation efficiency from pre-compacted stages increased over 50%. He suggested that the first adhesion to the culture dish, like morulae do spontaneously after they are seeded onto the feeder cell monolayer, was crucial to increase ESC derivation efficiency. In our study, we were able to attach isolated blastomeres to the culture dish using the pre-adhesion method, in addition to whole embryos at the 4- and 8-cell stages as were used in Tesar's experiments. However, this pre-adhesion method resulted the least efficient among all the derivation groups analyzed at the 4- and 8-cell stages, maybe because it involves a more extensive manipulation of the blastomeres and embryos which could decrease their viability. Moreover, our results suggest that this initial attachment is not required to increase the derivation efficiency and that the crucial aspect may be the first contact with the feeder cells.

Therefore, from the analysis of the effect of the ESC derivation method we can conclude that the higher rates of ESC lines derivation are obtained with the defined culture medium method, probably because of the use of KSR and ACTH, compounds not present in the culture medium used in the standard method, and the more gentle manipulation it involves as compared to the pre-adhesion method. It seems

that the adhesion to the substrate at the beginning of the derivation process in the pre-adhesion method is not so important in the efficiency of the method.

Concerning the influence of the number of isolated blastomeres on ESC derivation, studies with different number of isolated blastomeres at different development stages had never been performed, but previous experiments [24, 25] suggested the importance of cell number reduction on the viability of the embryo after transfer. He reported that both a single blastomere at the 4-cell stage and two blastomeres at the 8-cell stage formed a pseudoblastocyst with a clear and distinguishable ICM resulting in an equivalent embryonic survival rate after transfer. By contrast, one single blastomere at the 8-cell stage formed a pseudoblastocyst which showed a reduced viability due to the lack of an evident ICM. He suggested that it was not due to a reduced developmental potential of the single blastomere but a matter of the remaining proportion of the embryo volume to form the whole embryo. Assuming that embryos that reach cavitation with a higher number of ICM cells have higher chances to produce ESC lines, Tarkowski et al. (2005) [26] suggested a relationship between the number of blastomeres involved in the ESC derivation and the efficiency of the process. In groups starting the derivation with a higher embryo volume, the number of blastomeres at the ICM was higher too thus obtaining a higher efficiency of ESC lines derivation. Altogether, these data seem to indicate that the remaining proportion of the embryo volume and the number of isolated blastomeres are two aspects intimately linked and that the number of blastomeres involved is the main aspect to ensure both embryo viability and ESC derivation.

Consistent with these data, our study shows a general tendency towards similar derivation efficiencies among groups that have different cell number and different embryonic stage but the same remaining embryo volume. These results, obtained by the comparison of groups of 1/4 vs. 2/8 and 2/4 vs. 4/8, suggest an important relationship between the remaining embryo volume used to derive ESCs and the efficiency of the process. Moreover, the comparison between derivation groups which have different embryonic stage and embryo volume but the same number of isolated blastomeres (1/4 vs. 1/8 and 2/4 vs. 2/8) reveals equivalent derivation efficiencies for the three derivation methods also suggesting an important role of the number of blastomeres on the derivation process. Therefore, these two sets of comparisons between groups with the same embryo volume first, and with the same cell number second, suggest again the relationship between the embryo volume and the cell number to ensure the ESC derivation process. The fact of having a higher number of ICM-like blastomeres, key to the ESC derivation process, could explain the higher efficiency of this process when starting with a higher proportion of the embryo volume. Furthermore, cell to cell adhesion and communica-

tion could be responsible for the influence of the cell number on the derivation capacity as will be further discuss below.

It is important to note that no ESC lines could be derived from the 1/8 group by using the standard method and that low derivation rates were obtained from this group using the pre-adhesion (3.7%) and the defined culture medium methods (4%). This low efficiency could be attributed to the reduced division capacity of the 1/8 group which in turn could be due to the lack of contact with neighboring blastomeres. In fact, intercellular junctions between blastomeres at the 8-cell stage are thought to be involved in multiple processes such as cell differentiation, cell signaling and cell proliferation [27]. Therefore, further research will be needed to determine the possible role of such junctions in ESC derivation.

Finally, the analysis of the effect of the embryonic stage on the derivation process revealed significant differences between pre- and post-compaction stages, being the latter the most efficient to derive ESC lines. However, recent studies have pointed out the possibility that early cleavage stages provide higher derivation efficiencies due to a higher degree of pluripotency of the blastomeres at these stages [14]. Despite this, the blastocyst is the stage which has traditionally provided the highest derivation efficiencies [28] and, moreover, Wakayama and co-workers in the aforementioned study obtained the highest ESC derivation rates (88%) from blastocysts. This fact agrees with other authors' suggestion that the key aspect to derive ESCs is to have blastomeres with a defined ICM phenotype [29]. Moreover, it has been suggested that cell fate decisions could be earlier made at 2- and 4-cell stages [30–32]. On the other hand, early studies on artificial twinning [33, 34] suggested the importance of having a sufficient amount of ICM-like cells from the isolated blastomeres before cavitation to ensure embryo viability. From these studies it can be deduced that early embryonic stages could have higher chances to produce ESC lines than late embryonic stages, not because of an increased development potential but as a matter of a higher amount of ICM-like cells due to the superior number of cleavages they can perform. This issue has to be further studied.

Our results from isolated blastomeres show that ESC derivation efficiency increases as development progresses suggesting that late embryonic stages, which have a more committed and defined ICM phenotype, contribute more efficiently to form ESC lines than early embryonic stages. In this situation, the higher number of ICM-like blastomeres formed from early cleavage stages seems to be less important in the derivation process, suggesting that the real important event is to have a more committed and defined ICM phenotype provided by late stages. When using whole embryos to obtain ESCs, however, all blastomeres are involved in the derivation process so the number of blastomeres is not a limiting factor to produce enough cells with an ICM phenotype. In this case, the influence of the

embryonic stage can be properly analyzed and again our results point out to higher derivation efficiencies as development progresses, when blastomeres have the possibility to acquire a more defined ICM phenotype.

Moreover, the standard and defined culture medium methods showed equivalent derivation efficiencies from the 8-cell stage and control stages. These results again support the previous hypothesis since inner blastomeres at the 8-cell stage should have a more defined fate to produce ICM cells than 4-cell stage blastomeres. In the pre-adhesion method this tendency is not observed perhaps because the low derivation efficiencies of this method could be concealing differences between embryonic stages.

Overall, from the study we present, we can conclude that mouse ESC lines from isolated blastomeres and whole embryos can be efficiently derived by using the defined culture medium method which has provided the highest rates of ESC lines production. Particularly, when deriving from isolated blastomeres, ESC derivation efficiency increases by using the highest proportion of the embryo volume and therefore, the maximum number of isolated blastomeres at the 4- and 8-cell stages that can be removed without compromising embryo viability. Likewise, ESC derivation from whole embryos was more efficient as embryonic development progresses, when blastomeres acquire a more defined ICM phenotype.

Conclusions

Overall, from the study we present, we can conclude that mouse ESC lines from isolated blastomeres can be efficiently derived by using the highest proportion of the embryo volume and therefore the maximum number of isolated blastomeres at the 4- and 8-cell stages that can be removed without compromising embryo viability. Moreover, the method which provides the highest rates of ESC lines production is the defined culture medium method.

Acknowledgements This work received financial support from the Spanish *Ministerio de Educación y Ciencia* (MEC) projects BIO 2005-04341 and BIO2006-11792, the *Generalitat de Catalunya* DGR project #2005SGR-0047 and MEC FPU fellowship AP2006-02038. We thank Marc Puigcerver and Jonatan Lucas their technical assistance.

References

1. Rossant J. Stem cells and early lineage development. *Cell*. 2008;132:527–31.
2. Evans MJ, Kaufman MH. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature*. 1981;292:154–6.
3. Martin GR. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc Natl Acad Sci*. 1981;78:7634–8.

4. Williams RL, Hilton DJ, Pease S, Willson TA, Stewart CL, Gearing DP, et al. Myeloid leukaemia inhibitory factor maintains the developmental potential of embryonic stem cells. *Nature*. 1988;336:684–7.
5. Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*. 1998;282:1145–7.
6. Niwa H. Molecular mechanism for cell-fate determination in ES cells. *Tanpakushitsu Kakusan Koso*. 2000;45:2047–55. In Japanese.
7. Eistetter HR. Pluripotent embryonal stem cell lines can be established from disaggregated mouse morulae. *Develop Growth Differ*. 1989;31:275–82.
8. Tesar PJ. Derivation of germ-line-competent embryonic stem cell lines from preblastocyst mouse embryos. *Proc Natl Acad Sci*. 2005;102:8239–44.
9. Strelchenko N, Verlinsky O, Kukharenko V, Verlinsky Y. Morula-derived human embryonic stem cells. *Reprod Biomed Online*. 2004;9:623–9.
10. Chung Y, Klimanskaya I, Becker S, Marh J, Lu SJ, Johnson J, et al. Embryonic and extraembryonic stem cell lines derived from single mouse blastomeres. *Nature*. 2006;439:216–9.
11. Chung Y, Klimanskaya I, Becker S, Maserati M, Lu SJ, Zdravkovic T, et al. Human embryonic stem cell lines generated without embryo destruction. *Cell Stem Cell*. 2008;2:113–7.
12. Geens M, Mateizel I, Sermon K, De Rycke M, Spits C, Cauffman G, et al. Human embryonic stem cell lines derived from single blastomeres of two 4-cell stage embryos. *Hum Reprod*. 2009;24:2709–17.
13. Klimanskaya I, Chung Y, Becker S, Lu SJ, Lanza R. Human embryonic stem cell lines derived from single blastomeres. *Nature*. 2006;444:481–5.
14. Wakayama S, Hikichi T, Suetsugu R, Sakaide Y, Bui HT, Mizutani E, et al. Efficient establishment of mouse embryonic stem cell lines from single blastomeres and polar bodies. *Stem Cells*. 2007;25:986–93.
15. Handyside AH, Lesko JG, Tarin JJ, Winston RM, Hughes MR. Birth of a normal girl after in vitro fertilization and preimplantation diagnostic testing for cystic fibrosis. *N Engl J Med*. 1992;327:905–9.
16. Veiga A, Calderon G, Barri PN, Coroleu B. Pregnancy after the replacement of a frozen-thawed embryo with less than 50% intact blastomeres. *Hum Reprod*. 1987;2:321–3.
17. Martin GR, Evans MJ. Differentiation of clonal lines of teratocarcinoma cells: formation of embryoid bodies in vitro. *Proc Natl Acad Sci*. 1975;72:1441–5.
18. Brook FA, Gardner RL. The origin and efficient derivation of embryonic stem cells in the mouse. *Proc Natl Acad Sci*. 1997;94:5709–12.
19. Biggers JD, McGinnis LK, Raffin M. Amino acids and preimplantation development of the mouse in protein-free potassium simplex optimized medium. *Biol Reprod*. 2000;63:281–93.
20. Delhaise F, Bralio V, Schuurbiens N, Dessy F. Establishment of an embryonic stem cell line from 8-cell stage mouse embryos. *Eur J Morphol*. 1996;34:237–43.
21. Robertson EJ. Embryo-derived stem cell lines. In: Robertson EJ, editor. *Teratocarcinomas and embryonic stem cells a practical approach*. Oxford: IRL; 1987. p. 71–112.
22. Lanza R, Weissman I, Thomson J, Pedersen R, Hogan B, Gearhart J, et al. *Isolation and maintenance of murine embryonic stem cells*. New York: Cold Spring Harbor; 2004.
23. Kawase E, Suemori H, Takahashi N, Okazaki K, Hashimoto K, Nakatsuji N. Strain difference in establishment of mouse embryonic stem (ES) cell lines. *Int J Dev Biol*. 1994;38:385–90.
24. Willadsen SM. The viability of early cleavage stages containing half the normal number of blastomeres in the sheep. *J Reprod Fertil*. 1980;59:357–62.
25. Willadsen SM. The development capacity of blastomeres from 4- and 8-cell sheep embryos. *J Embryol Exp Morphol*. 1981;65:165–72.
26. Tarkowski AK, Ozdzinski W, Czolowska R. Identical triplets and twins developed from isolated blastomeres of 8- and 16-cell mouse embryos supported with tetraploid blastomeres. *Int J Dev Biol*. 2005;49:825–32.
27. Steinberg MS, McNutt PM. Cadherins and their connections: adhesion junctions have broader functions. *Curr Opin Cell Biol*. 1999;11:554–60.
28. Rossant J. Stem cells from the Mammalian blastocyst. *Stem Cells*. 2001;19:477–82.
29. Lorthongpanich C, Yang SH, Piotrowska-Nitsche K, Pampai R, Chan AW. Development of single mouse blastomeres into blastocysts, outgrowths and the establishment of embryonic stem cells. *Reproduction*. 2008;135:805–13.
30. Gardner RL. Specification of embryonic axes begins before cleavage in normal mouse development. *Development*. 2001;128:839–47.
31. Fujimori T, Kurotaki Y, Miyazaki J, Nabeshima Y. Analysis of cell lineage in two- and four-cell mouse embryos. *Development*. 2003;130:5113–22.
32. Piotrowska-Nitsche K, Zernicka-Goetz M. Spatial arrangement of individual 4-cell stage blastomeres and the order in which they are generated correlate with blastocyst pattern in the mouse embryo. *Mech Dev*. 2005;122:487–500.
33. Tarkowski AK, Wroblewska J. Development of blastomeres of mouse eggs isolated at the 4- and 8-cell stage. *J Embryol Exp Morphol*. 1967;18:155–80.
34. Rossant J. Postimplantation development of blastomeres isolated from 4- and 8-cell mouse eggs. *J Embryol Exp Morphol*. 1976;36:283–90.

Influence of E-cadherin-mediated cell adhesion on mouse embryonic stem cells derivation from isolated blastomeres

Stem Cell Reviews and Reports (en prensa)

DOI 10.1007/s12015-010-9221-7

Sheyla González · Elena Ibáñez · Josep Santaló

Factor d'impacte (2009): 5.083

ARTICLE II



Influence of E-Cadherin-Mediated Cell Adhesion on Mouse Embryonic Stem Cells Derivation from Isolated Blastomeres

Sheyla González · Elena Ibáñez · Josep Santaló

© Springer Science+Business Media, LLC 2010

Abstract Efforts to efficiently derive embryonic stem cells (ESC) from isolated blastomeres have been done to minimize ethical concerns about human embryo destruction. Previous studies in our laboratory indicated a poor derivation efficiency of mouse ESC lines from isolated blastomeres at the 8-cell stage (1/8 blastomeres) due, in part, to a low division rate of the single blastomeres in comparison to their counterparts with a higher number of blastomeres (2/8, 3/8 and 4/8 blastomeres). Communication and adhesion between blastomeres from which the derivation process begins could be important aspects to efficiently derive ESC lines. In the present study, an approach consisting in the adhesion of a chimeric E-cadherin (E-cad-Fc) to the blastomere surface was devised to recreate the signaling produced by native E-cadherin between neighboring blastomeres inside the embryo. By this approach, the division rate of 1/8 blastomeres increased from 44.6% to 88.8% and a short exposure of 24 h to the E-cad-Fc produced an ESC derivation efficiency of 33.6%, significantly higher than the 2.2% obtained from the control group without E-cad-Fc. By contrast, a longer exposure to the same chimeric protein resulted in higher proportions of trophoblastic vesicles. Thus, we establish an important role of E-cadherin-mediated adherens junctions in promoting both the division of single 1/8 blastomeres and the efficiency of the ESC derivation process.

Keywords Adherens junctions · ESC · Mouse embryos · Single blastomeres · TSC · Uvomorulin

Introduction

Embryonic stem cells (ESC) are traditionally derived from the inner cell mass (ICM) of blastocysts [1]. However, ethical issues associated with the destruction of human embryos during this process have led to alternative methods, such as the derivation of ESC from single blastomeres. Different attempts have been done in order to efficiently derive ESC from isolated blastomeres [2–5] but, although a bulk of information has been obtained from these studies, there are still some aspects, such as events that occur during the preimplantational development, that need to be addressed in order to improve the derivation efficiency of the lines.

The mouse embryo undergoes the first differentiating event during the preimplantational development when the trophectoderm (TE) epithelium and the inner cell mass (ICM) are formed in the blastocyst. Morphological changes, produced until the blastocyst stage is reached, are dependent on the intercellular junctions between blastomeres. At early cleavage stages (2- and 4-cell) blastomeres are connected by simple membrane apposition while specialized intercellular junctions such as gap junctions, adherens junctions, tight junctions and desmosomes appear from the 8-cell stage onwards in order to form the blastocyst [6]. All of these junctions are involved in multiple morphoregulatory processes such as communication, adhesion, differentiation, signalling and proliferation [7], which are crucial in the differentiation of the ICM and TE in the blastocyst.

Adherens junctions are first structured at the blastomere membrane of embryos at the 8-cell stage and are mediated

S. González · E. Ibáñez · J. Santaló (✉)
Departament de Biologia Cel·lular, Fisiologia i Immunologia,
Facultat de Biociències, Universitat Autònoma de Barcelona,
08193 Bellaterra, Spain
e-mail: Josep.Santaló@uab.cat

S. González
e-mail: Sheyla.Gonzalez@uab.cat

E. Ibáñez
e-mail: Elena.Ibanez@uab.cat

by E-cadherin, the epithelial counterpart of a glycoprotein family (cadherins) which regulates cell-adhesion in a calcium-dependent manner [8]. E-cadherin has a signaling role complementary to its adhesion capacity, which is involved in multiple processes such as the establishment of tissue limits, metastasis, tissue reorganizations, cell migration, cell differentiation and proliferation [7]. In early mouse embryogenesis, E-cadherin is involved in the compaction at the morula stage and in the transition from morula to blastocyst stage [9]. Particularly, E-cadherin is crucial in inducing the polarization of the compacted morula in order to form a functional and fully polarized TE [10].

The importance of intercellular junctions in ESC derivation efficiency and maintenance is well established; it has been shown that spontaneous differentiation of mouse ESC is associated with a downregulation of the surface E-cadherin mediated by inhibitory molecules, gelatinase activity and cell motility [11–14]. Furthermore, E-cadherin has been demonstrated to be required for LIF-dependent self-renewal of mouse ESC [15]. Regulative mechanisms underlying the importance of E-cadherin-mediated junctions in the establishment and maintenance of human and mouse ESC have been recently described [16–18]. Signaling pathways controlling proliferation, cell fate and differentiation in mouse ESC and early embryos are less well known, but a clear connexion has been established between the adhesion-mediated signaling of E-cadherin and the Wnt pathway in controlling such processes through the adaptor protein β -catenin, a common factor between the two pathways [19, 20]. Therefore, different signaling pathways coexist in ESC and early embryos and their function depends on the cell environment.

Previous studies performed in our laboratory on the derivation of mouse ESC from isolated blastomeres at different developmental stages revealed very low establishment rates when a single blastomere from an 8-cell stage embryo (1/8) was used. Compared to its counterparts with a higher number of blastomeres (2/8, 3/8 and 4/8 groups), the 1/8 group exhibited low rates of blastomere division when seeded onto the feeder cell monolayer at the beginning of the derivation process [21]. In view of these results, the low division rate of 1/8 blastomeres could be related to the lack of direct contact with neighbouring blastomeres. As previously mentioned, E-cadherin is involved in modulating proliferation and, in addition, it is important in signaling at the 8-cell stage. Thus, it might be a good candidate to investigate in order to determine its relationship with the low division capacity of 1/8 blastomeres and therefore, the low ESC derivation rate.

The aim of the present study was to assess the importance of E-cadherin-mediated adherens junctions in the derivation efficiency of mouse ESC lines from single

blastomeres. To this aim, an approach consisting in the adhesion of a chimeric E-cadherin to the surface of 1/8 blastomeres was devised, to recreate the signalling produced by native E-cadherin between neighbouring blastomeres inside the embryo. The effect of this approach on the rate of division of 1/8 blastomeres and on the efficiency of the ESC derivation process was determined.

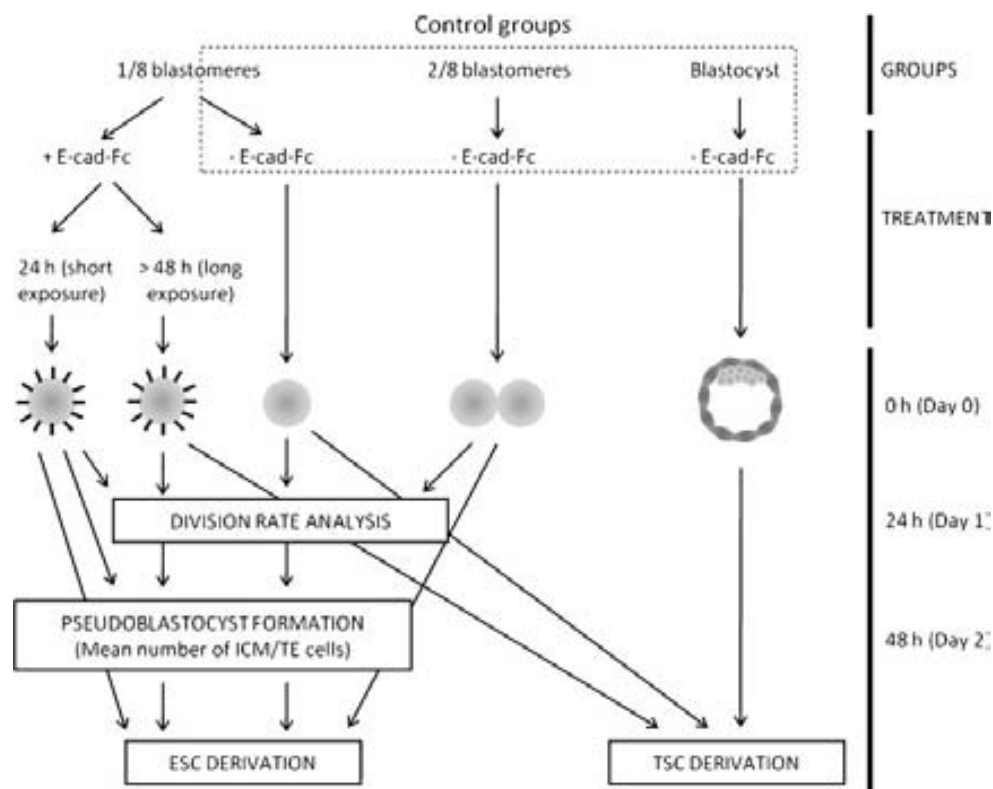
Material and Methods

Experimental Design

To determine the influence of E-cadherin-mediated adherens junctions on ESC derivation from isolated 1/8 blastomeres, a chimeric E-cadherin (E-cad-Fc), consisting in the extracellular domain of mouse E-cadherin (amino acids 1-709) and the human IgG1 Fc domain, was used to recreate the signaling process exerted by native E-cadherin between neighbouring blastomeres. In preliminary experiments, the adhesion of E-cad-Fc to the blastomere surface was checked by immunofluorescence. Because E-cadherin-mediated cell adhesion is dependent on the presence of the calcium ion, the adhesion of E-cad-Fc was performed in a DMEM standard medium containing calcium. As a negative control, a calcium- and magnesium-free PBS solution was used. The specificity of the binding was also tested by removing E-cad-Fc from the blastomere surface by incubating the blastomeres in a calcium- and magnesium-free PBS solution. It is important to note that the use of the chimeric protein allowed us to distinguish it from the endogenous mouse E-cadherin by using antibodies against the Fc human IgG1 domain. To further confirm the specific interaction between E-cad-Fc and native E-cadherin, the distribution of native E-cadherin was assessed by direct labelling with an anti-mouse E-cadherin antibody.

ESC derivation experiments in the presence of E-cad-Fc were carried out in two series (Fig. 1). In the first series of experiments, 1/8 blastomeres ($n=100$) were cultured in ESC culture conditions in the presence of E-cad-Fc to assess its effect on the division capacity of the single blastomeres and on the ESC derivation efficiency. After 48 h, E-cad-Fc was passively removed by diluting it through successive changes of fresh medium every 2 days (long exposure). In the second set of experiments, 1/8 blastomeres ($n=125$) were cultured in ESC culture conditions but, in this case, E-cad-Fc was actively removed 24 h after blastomeres were seeded onto the feeder cell monolayer (short exposure). This second set of experiments was designed to determine whether the effect of E-cad-Fc could be restricted to the first 24 h and, hence, increase the

Fig. 1 Schematic representation of groups and treatments performed in the experiments



division rate while avoiding the differentiating event to TE observed in the first series of experiments with a long exposure to E-cad-Fc. As control groups for both sets of experiments, 1/8 blastomeres ($n=222$) and 2/8 blastomeres ($n=30$) without E-cad-Fc were used.

In all derivation experiments, structures resembling blastocysts (hereafter referred as pseudoblastocysts) were observed on the second day of culture. The mean number of ICM, TE and total cells in pseudoblastocysts derived from experiments with E-cad-Fc ($n=25$) and in control pseudoblastocysts ($n=50$) was estimated by immunofluorescence (Oct4 for ICM and Cdx2 for TE).

Finally, 1/8 blastomeres ($n=30$) subjected to a long exposure to E-cad-Fc were cultured in trophoblast stem cells (TSC) derivation conditions in order to confirm whether this long exposure to E-cad-Fc had a differentiating effect to TE. 1/8 blastomeres ($n=25$) and blastocysts ($n=25$) cultured in TSC conditions without E-cad-Fc were used as controls in this experiment.

ESC and TSC lines obtained in this study were characterized by immunofluorescence through the expression of pluripotency markers (Oct4, Sox2 and Nanog for ESC, and Cdx2 for TSC). Moreover, the *in vitro* differentiation potential of the ESC lines derived was confirmed by immunofluorescence through the expression of the neuroepithelial stem cell protein (Nestin, ectodermal layer), alpha-fetoprotein (AFP, endodermal layer) and α -smooth muscle actin (α -SMA, mesodermal layer).

Feeder Cells Culture

STO mouse embryo fibroblasts (ECACC) were inactivated by a treatment with mitomycin C (Invitrogen) during 3 h at a concentration of 10 $\mu\text{g/ml}$ in order to produce feeder cells [22]. To plate the feeder cells, Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (Invitrogen) supplemented with 15% fetal calf serum (FCS) (Invitrogen) was used.

Embryo Collection and Blastomere Isolation

Embryos collected from female 129/Sv mice mated with male C57Bl/6 mice were used [1]. Prior to mating, females were subjected to a superovulation process by intraperitoneal injection of 5 iu of pregnant mare serum gonadotrophin (PMSG) (Intervet) followed by 5 iu of human chorionic gonadotrophin (hCG) (Farma-Lepori) 48 h after the first injection. Embryos at the 2-cell stage were obtained 48 h after the hCG injection by flushing the oviducts with HEPES-buffered KSOM and were cultured in KSOM (EmbryoMax; Millipore) at 37°C under 5% CO₂ until 8-cell and blastocyst stages were reached.

Groups of 1 or 2 blastomeres from 8-cell stage embryos (1/8 and 2/8 groups, respectively) were isolated by micromanipulation in a PBS solution [23]. Briefly, the zona pellucida was disrupted with a 10 μm drilling micropipette containing Tyrode's acid solution and individual blastomeres were aspirated with a 20 μm diameter micropi-

pette. All blastomeres of the 8-cell stage embryos were used to avoid a bias on results due to possible differences in blastomere commitment at this stage.

Detection of E-cad-Fc Adhesion to the Blastomere Surface by Immunofluorescence

Groups of 1/8 blastomeres were incubated with 1.5 $\mu\text{g/ml}$ of E-cad-Fc (Sigma-Aldrich) during 2 h in a 20 μl drop inside a non-adherent polypropylene plate (Nunc). E-cad-Fc was diluted in standard DMEM medium with calcium to facilitate its adhesion to the blastomere surface. Afterwards, blastomeres were washed 3 times in DMEM during 5 min, fixed in 4% paraformaldehyde (Sigma) during 15 min, washed again 3 more times and incubated with a 1:20 dilution of a monoclonal mouse anti-human IgG1 secondary antibody FITC-conjugated (Invitrogen) during 2 h. Finally, samples were washed again in DMEM and stained with Hoechst 33258 (Invitrogen) at 10 $\mu\text{g/ml}$ as a nuclear counterstain.

The same protocol was used to analyse the presence of E-cad-Fc on the blastomere surface after the first change of medium performed at 48 h in the first set of experiments (long exposure).

To remove E-cad-Fc off the blastomere surface within the 24 h in the second set of experiments (short exposure), blastomeres were washed 3 times in a calcium- and magnesium-free PBS solution supplemented with 150 mM EDTA. Afterwards, blastomeres were incubated with the secondary antibody mentioned above to verify the complete withdrawal of E-cad-Fc.

Samples were examined with an epifluorescence microscope Olympus Bx60 and an image capture and analyzing system (Software Genus, 3.0 version).

Detection of Native E-Cadherin on the Blastomere Surface by Immunofluorescence

Native E-cadherin on the surface of blastomeres at the 8-cell stage (isolated or inside the embryo) was labelled using an anti-mouse E-cadherin antibody (Table 1). Isolated blastomeres or embryos were fixed in 4% paraformaldehyde during 15 min. Blocking and permeabilization was performed overnight in a PBS solution containing 0.5% Triton X-100 (Sigma), 3% goat serum (Sigma) and 0.2% sodium azide (Sigma). Incubation with the primary antibody was done overnight at 4°C and detection with the corresponding secondary antibody (Table 1) was performed during 2 h at room temperature. Samples were washed with block solution before and after incubation with antibodies. Finally, samples were stained with Hoechst 33258 (Invitrogen) at 10 $\mu\text{g/ml}$ as a nuclear counterstain and examined with an epifluorescence microscope Olympus Bx60 and an image capture and analyzing system (Software Genus, 3.0 version).

Establishment of Stem Cell Lines and Exposure to E-cad-Fc

ESC lines were derived from 1/8 and 2/8 blastomeres using a defined culture medium [5, 21]. Briefly, isolated blastomeres were seeded onto a feeder cell monolayer cultured in 50 μl drops contained in a 60 mm Petri dish

Table 1 Primary and secondary antibodies used for cell characterization

| Primary antibody | Dilution | Reference | Secondary antibody | Concentration | Reference | Cell type stained |
|--------------------------------------|----------|--------------------|--|--------------------|--------------------------|-----------------------------|
| Rabbit monoclonal anti-E-cadherin | 1:500 | Abcam ab40772 | Goat anti-rabbit IgG Alexa Fluor 594 | 6 $\mu\text{g/ml}$ | Molecular Probes A-11037 | Blastomeres 8-cell stage |
| Mouse monoclonal anti-Oct4 | 1:50 | Santa Cruz sc-5279 | Chicken anti-mouse IgG Alexa Fluor 488 | 6 $\mu\text{g/ml}$ | Molecular Probes A-21200 | ESC colonies |
| Rabbit polyclonal anti-Oct4 | 1:1500 | Santa Cruz sc-9081 | Goat anti-rabbit IgG Alexa Fluor 594 | 6 $\mu\text{g/ml}$ | Molecular Probes A-11037 | ICM cells |
| Rabbit polyclonal anti-Nanog | 1:200 | Abcam ab21603 | Goat anti-rabbit IgG Alexa Fluor 594 | 6 $\mu\text{g/ml}$ | Molecular Probes A-11037 | ESC colonies |
| Rabbit polyclonal anti-Sox2 | 1:200 | Millipore AB5603 | Goat anti-rabbit IgG Alexa Fluor 594 | 6 $\mu\text{g/ml}$ | Molecular Probes A-11037 | ESC colonies |
| Mouse monoclonal anti-Cdx2 | 1:100 | BioGenex MU392A-UC | Chicken anti-mouse IgG Alexa Fluor 488 | 6 $\mu\text{g/ml}$ | Molecular Probes A-21200 | TSC colonies/ TE cells |
| Rabbit polyclonal anti-Nestin | 1:250 | Abcam ab5968 | Goat anti-rabbit IgG Alexa Fluor 594 | 6 $\mu\text{g/ml}$ | Molecular Probes A-11037 | Differentiated ESC colonies |
| Rabbit polyclonal anti-AFP | 1:400 | Dako A0008 | Goat anti-rabbit IgG Alexa Fluor 594 | 6 $\mu\text{g/ml}$ | Molecular Probes A-11037 | Differentiated ESC colonies |
| Mouse monoclonal anti- α -SMA | 1:400 | Sigma A5228 | Chicken anti-mouse IgG Alexa Fluor 488 | 6 $\mu\text{g/ml}$ | Molecular Probes A-21200 | Differentiated ESC colonies |

with ESC derivation DMEM medium supplemented with 100 μ M 2- β -mercaptoethanol (Invitrogen), 1 mM L-glutamine (Invitrogen), 1X non essential aminoacids (Invitrogen), 10³ units/ml leukemia inhibitory factor (LIF; Millipore), 20% Knockout Serum Replacement (KSR; Invitrogen) and 0.1 mg/ml adrenocorticotrophic hormone (ACTH; Sigma-Aldrich).

In the derivation of ESC lines from 1/8 blastomeres, E-cad-Fc at a concentration of 1.5 μ g/ml was added to the culture medium before 1/8 blastomeres were seeded and, as previously mentioned, it was passively removed after the first 48 h in the first set of experiments (long E-cad-Fc exposure) or actively removed at 24 h in experiments with short exposure to E-cad-Fc by the aforementioned means. Control 1/8 and 2/8 blastomeres were cultured in E-cad-Fc-free ESC derivation medium.

TSC lines were established following the protocol described by Tanaka (2006) [24]. Briefly, 1/8 blastomeres or blastocysts were seeded onto a feeder cell monolayer in 50 μ l drops in a 60 mm Petri dish with TSC establishment RPMI1640 medium (LabClinics) supplemented with 20% FCS, 2 mM L-glutamine, 100 μ M 2- β -mercaptoethanol and 1 mM sodium pyruvate (Sigma-Aldrich). Moreover, the TSC establishment culture medium contained variable amounts of heparin (1–1.8 μ g/ml; Sigma-Aldrich) and fibroblast growth factor 4 (25–45 ng/ml; FGF4; Pepro-Tech) depending on the derivation step.

In the derivation of TSC lines from 1/8 blastomeres, E-cad-Fc at a concentration of 1.5 μ g/ml was added to the culture medium before 1/8 blastomeres were seeded. E-cad-Fc was not passively removed until the third day of culture when all outgrowths were attached to the feeder cells and the culture medium was changed following the protocol of Tanaka (2006) [24]. TSC lines were also derived from blastocysts, as a positive control for the derivation in TSC conditions, and from 1/8 blastomeres in the absence of E-cad-Fc, as a negative control.

Stem Cell Lines Characterization and Immunostaining of Pseudoblastocysts

Stem cell colonies were first selected based on their morphology. ESC colonies present a defined morphology at the edge and have round cells. TSC colonies, by contrast, present a non-defined morphology at the edge and have flattened cells.

Later, pluripotency of the selected ESC- or TSC-like colonies was confirmed by immunofluorescence, using specific markers Oct4, Nanog and Sox2 for ESC, and Cdx2 for TSC (Table 1). Stem cell colonies were washed 3 times in PBS, fixed in 4% paraformaldehyde during 15 min and washed again 3 times in PBS. Blocking and permeabilization was performed in the same block solution used for

native E-cadherin detection, during 30 min. Incubation with primary antibodies was done overnight at 4°C. Then they were washed 3 times in PBS and incubated with the corresponding secondary antibody (Table 1) during 2 h at room temperature. Finally, samples were washed again in PBS and stained with Hoechst 33258 at 10 μ g/ml as a nuclear counterstain.

Pseudoblastocysts were harvested on day 2 and immunostained in order to determine the mean number of ICM and TE cells. ICM cells were detected by Oct4 marker and TE cells by Cdx2 marker. The immunostaining protocol followed was the same used for the stem cell colonies except that pseudoblastocysts were washed with block solution instead of PBS and that permeabilization was performed overnight.

Samples were examined with an epifluorescence microscope Olympus Bx60 and an image capture and analyzing system (Software Genus, 3.0 version).

In Vitro Differentiation of Embryonic Stem Cell Lines

To further confirm the pluripotency of the ESC lines derived, they were subjected to differentiating culture conditions to produce cells of the three germ layers: ectoderm, endoderm and mesoderm. First, ESC lines were subcultured to gelatin pre-coated dishes (Sigma) in the absence of feeder cells and LIF. Moreover, the KSR of the culture medium was replaced with FCS to favor differentiation. Culture medium was replaced every two days and after a period of 7 days, the lines were fixed for immunofluorescence analysis.

Characterization of Embryonic Stem Cell Lines Differentiated in Vitro

In vitro differentiated ESC lines were characterized by immunofluorescence for the detection of specific markers of the three germ layers such as Nestin (ectoderm), AFP (endoderm) and α -SMA (mesoderm). Primary and secondary antibodies used are detailed in Table 1. ESC lines were also immunostained with Oct4 marker in addition to each marker of differentiation to detect not fully differentiated cells and, finally, stained with Hoechst 33258 as a nuclear counterstain. The immunofluorescence protocol was the same used for the characterization of the undifferentiated ESC lines.

Statistical Analysis

Results were statistically analysed by χ^2 and Fisher exact test for proportions and Student's *t*-test for mean comparisons. Values with a $P < 0.05$ were considered statistically significant.

Results

E-cad-Fc Adhesion to the Blastomere Surface

E-cad-Fc adhered to the blastomere surface when the incubation was performed in a non-adherent polypropylene plate since this avoids compound binding to the dish and the E-cad-Fc is free to adhere to the blastomere surface. This association was observed after 2 h of incubation with the blastomere, only when E-cad-Fc was diluted in calcium containing DMEM medium unlike to what happened when E-cad-Fc was diluted in a calcium- and magnesium-free PBS solution supplemented with EDTA (Fig. 2b and d).

The pattern observed after E-cad-Fc was adhered to the blastomere surface was a dotted, foci-like labelling pattern most frequently homogenously distributed throughout the surface (Fig. 2b), suggesting that native E-cadherin was uniformly redistributed along the entire surface of the blastomere after its isolation from the embryo. However, some blastomeres presented a localised area where E-cad-Fc foci were more concentrated, suggesting that it was the area where the initial neighbouring blastomeres established contact inside the embryo. This distribution was further confirmed by a direct labelling of the native E-cadherin (Fig. 2i and j).

Similarly, the presence of E-cad-Fc after the first 48 h, when the change of the medium is produced, was checked by immunofluorescence in the pseudoblastocysts formed on day 2. Some foci on the blastomeres surface were found indicating that the change of the medium did not produce a complete withdrawal of E-cad-Fc in the first set of experiments with a long exposure to E-cad-Fc (Fig. 2f).

Finally, incubation in a calcium- and magnesium-free PBS solution of those blastomeres exposed during 24 h to E-cad-Fc clearly removed the E-cad-Fc signal detected by immunostaining, confirming the complete withdrawal of the E-cad-Fc (Fig. 2h). All these results corroborate the specificity of E-cad-Fc binding to the blastomere surface.

Effect of a Long Exposure to E-cad-Fc on ESC Derivation Efficiency

The percentage of blastomere division (Fig. 3a) after 24 h of culture with E-cad-Fc was 67% (Table 2), a value significantly higher ($p=0.0003$) than that of 1/8 control groups cultured without E-cad-Fc (44.6%), although significantly lower ($p<0.0001$) than the one from 2/8 control group in which the two blastomeres connect through native E-cadherin-mediated junctions (100%). Despite the increased rate of division, only 1 ESC line (1%) was obtained from 1/8 blastomeres exposed to E-cad-Fc. This derivation efficiency is similar to that obtained for the 1/8 control group without E-cad-Fc in the culture medium, in which

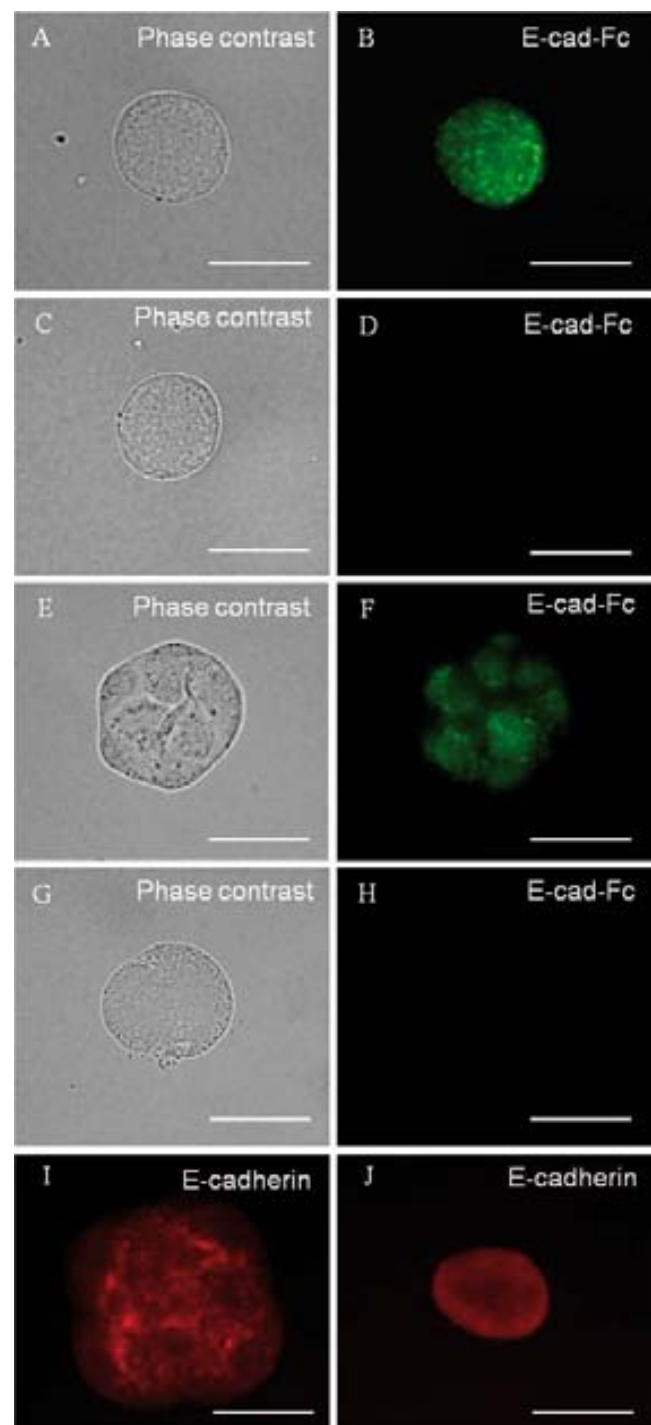


Fig. 2 Immunofluorescence detection of E-cad-Fc adhesion to the blastomere surface and native E-cadherin. **a–b** 1/8 blastomere incubated with E-cad-Fc for 2 h in calcium-containing DMEM medium. **c–d** 1/8 blastomere incubated with E-cad-Fc for 2 h in calcium- and magnesium-free PBS. **e–f** Pseudoblastocyst formed on day 2 of culture from 1/8 blastomeres subjected to a long exposure to E-cad-Fc. **g–h** 1/8 blastomere exposed to E-cad-Fc for 24 h and washed with calcium- and magnesium-free PBS supplemented with EDTA. **i** Native E-cadherin distributed throughout blastomeres surface and concentrated at blastomeres contact regions from an 8-cell stage embryo. **j** Native E-cadherin homogeneously distributed on the surface of an isolated blastomere from an 8-cell stage embryo. Scale bar: 30 μm

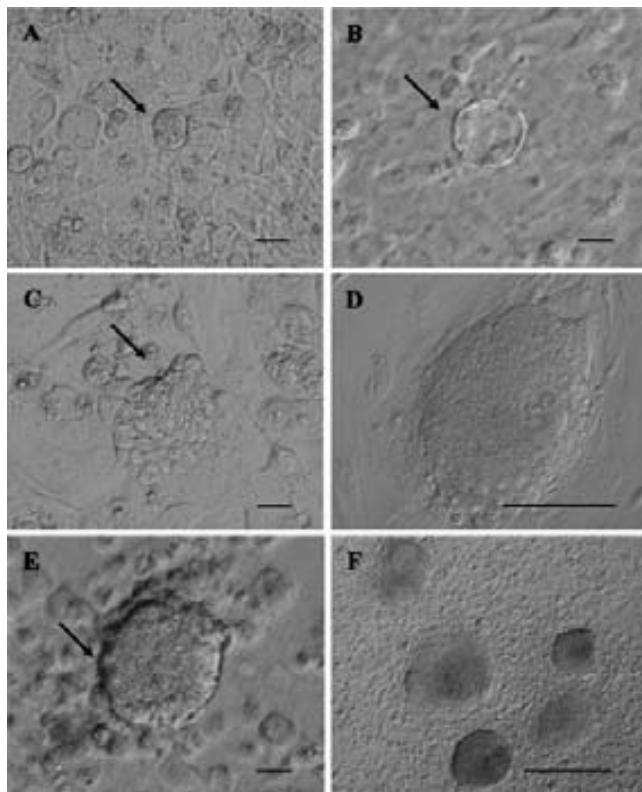


Fig. 3 Images of ESC and TSC lines establishment from 1/8 blastomeres. **a** First division of a 1/8 blastomere. **b** Pseudoblastocyst formed on the second day of culture. **c** TSC-like outgrowth. **d** TSC colony. **e** ESC-like outgrowth. **f** ESC colonies. Scale bar **a–c** and **e**: 30 μm ; scale bar **d**: 100 μm ; scale bar **f**: 200 μm

only 5 ESC lines (2.2%) could be derived, and significantly lower ($p=0.0001$) than that of the 2/8 control group (23.3%). Thus, the increase of the division rate in the group of 1/8 blastomeres in contact with E-cad-Fc for more than 48 h does not directly improve the efficiency of the ESC derivation process.

On day 2 of culture, pseudoblastocysts (Fig. 3b) formed from both 1/8 blastomeres cultured with E-cad-Fc and control groups. Morphologically, most pseudoblastocysts derived from 1/8 blastomeres in contact with E-cad-Fc did not seem to contain ICM cells, unlike to their counterparts in the control group. In order to confirm the lack of ICM

cells, the mean number of ICM, TE and total cells of these pseudoblastocysts (Table 3) was determined by immunofluorescence (Fig. 4). When E-cad-Fc was passively removed from blastomeres surface, pseudoblastocysts showed a mean number of 2.1 ICM cells while 44% of them did not contain any ICM cell. The mean number of ICM cells in the control group without E-cad-Fc was 6.0 and just 10% of the pseudoblastocysts contained TE cells only. Comparisons between 1/8 blastomeres exposed to E-cad-Fc and the control group resulted to be significantly different ($p<0.0001$ for means comparison and $p=0.0018$ for percentage of pseudoblastocysts without ICM cells). Moreover, the mean number of total cells was significantly lower ($p=0.0005$) in those pseudoblastocysts obtained after exposure to E-cad-Fc when compared to controls, suggesting that a long exposure to E-cad-Fc has a negative effect on ICM cells proliferation.

On day 3 of culture, after pseudoblastocysts attached to the feeder cells, outgrowths with a TSC-like morphology were observed in the culture (Fig. 3c). In particular, blastomeres cultured in the presence of E-cad-Fc produced 22% of TSC-like outgrowths (Table 2) and although this value did not significantly differ from the production of ESC-like outgrowths in the same group (14%), it resulted to be significantly higher ($p<0.0001$) than the percentage of TSC-like outgrowths found in the control group without E-cad-Fc (3.6%). Moreover, TSC-like outgrowths were positive for Cdx2 marker as suspected from the morphology of the pseudoblastocysts they came from (those containing TE cells only or with few ICM cells) (Fig. 4). Thus, long exposure of blastomeres to E-cad-Fc produces an increased percentage of TSC-like outgrowths.

Effect of a Short Exposure to E-cad-Fc on ESC Derivation Efficiency

In view of the results obtained with a long exposure to E-cad-Fc, a second set of experiments was designed in order to determine whether the effect of E-cad-Fc could be restricted to the first 24 h and, hence, increase the division rate of 1/8 blastomeres while avoiding the inhibition of ICM proliferation and the bias towards TSC derivation.

Table 2 Rates of first division and of ESC lines derivation

| Derivation group | n | % First division after 24 h (n) | % ESC-like outgrowths (n) | % TSC-like outgrowths (n) | % ESC lines (n) |
|--------------------------------|-----|---------------------------------|---------------------------|---------------------------|------------------------|
| Control (1/8) | 222 | 44.6 (99) ^a | 17.1 (38) ^a | 3.6 (8) ^a | 2.2 (5) ^a |
| Control (2/8) | 30 | 100 (30) ^b | 60.0 (18) ^b | 0.0 (0) ^a | 23.3 (7) ^b |
| E-cad-Fc long exposure (>48 h) | 100 | 67.0 (67) ^c | 14.0 (14) ^a | 22.0 (22) ^b | 1.0 (1) ^a |
| E-cad-Fc short exposure (24 h) | 125 | 88.8 (111) ^{bc} | 50.4 (63) ^b | 4.0 (5) ^a | 33.6 (42) ^b |

^{a–c}Values with different superscripts within the same column differ significantly

Table 3 Number of ICM and TE cells in pseudoblastocysts

| Derivation group | n | % Pseudoblastocysts without ICM cells (n) | Mean of ICM cells (\pm SEM) | Mean of TE cells (\pm SEM) | Mean of total cells (\pm SEM) |
|--------------------------------|----|---|--------------------------------|-------------------------------|----------------------------------|
| Control | 50 | 10 (5) ^b | 6.0 \pm 0.59 ^a | 14.0 \pm 0.52 ^a | 19.9 \pm 0.85 ^a |
| E-cad-Fc long exposure (>48 h) | 25 | 44 (11) ^a | 2.1 \pm 0.58 ^b | 13.1 \pm 0.63 ^a | 15.2 \pm 0.76 ^b |
| E-cad-Fc short exposure (24 h) | 25 | 4 (1) ^b | 6.4 \pm 0.66 ^a | 13.9 \pm 0.77 ^a | 20.4 \pm 0.94 ^a |

^{a-b} Values with different superscripts within the same column differ significantly

As in previous experiments, short exposure (24 h) to E-cad-Fc increased the percentage of 1/8 blastomeres division (88.8%) so that significant differences ($p < 0.0001$) were found compared to 1/8 control groups without E-cad-Fc (44.6%), but not to 2/8 control group (100%; Table 2).

The complete withdrawal of E-cad-Fc improved the production of ESC lines from 1/8 blastomeres and 42 ESC lines (33.6%) were derived (Figs. 3f and 5a). This ESC derivation rate was significantly higher ($p < 0.0001$) than the one found after a longer culture with E-cad-Fc (1%) and in 1/8 control groups without E-cad-Fc (2.2%), while resembling the ESC derivation rate obtained from the 2/8 control group (23.3%; Table 2). The confirmation by immunofluorescence of the in vitro differentiation of an ESC line towards cells of the three germ layers is shown in Fig. 5b.

Most of the pseudoblastocysts (96%) formed on day 2 after an active removal of E-cad-Fc exhibited an evident ICM, similar to pseudoblastocysts from the control group without contact with E-cad-Fc (90%). As in previous experiments, pseudoblastocysts were immunostained to determine the proportion of ICM and TE cells (Fig. 4). In this sense, pseudoblastocysts from the group with E-cad-Fc showed a mean number of 6.4 ICM cells while just 4% of these structures presented TE cells only. No significant differences were found between these data and the one from

the control group (Table 3). By contrast, comparisons with 1/8 blastomeres exposed to a passive withdrawal of E-cad-Fc revealed significant differences in both the percentage of pseudoblastocysts without ICM cells ($p = 0.0019$) and the mean number of ICM cells ($p < 0.0001$), indicating an increased number of ICM cells in pseudoblastocysts when E-cad-Fc was removed from the culture medium after 24 h. No significant differences between 1/8 blastomeres with E-cad-Fc in these experiments and the control group were found in the mean number of TE cells and in the mean number of total cells of the pseudoblastocysts (Table 3).

The production of ESC-like outgrowths in short exposure experiments was significantly higher ($p < 0.0001$) than the one of TSC-like after pseudoblastocysts attachment (Table 2) indicating an improvement in the production of ESC-like outgrowths with regards to long exposure experiments in which there was a passive withdrawal of E-cad-Fc. Further, in short exposure experiments differences with 1/8 control blastomeres were only detected in the number of ESC-like outgrowths ($p < 0.0001$) unlike what happened in previous experiments of long exposure to E-cad-Fc. Therefore, a short exposure to E-cad-Fc during 24 h increases the production of ESC-like outgrowths and, consequently, the efficiency of ESC lines derivation.

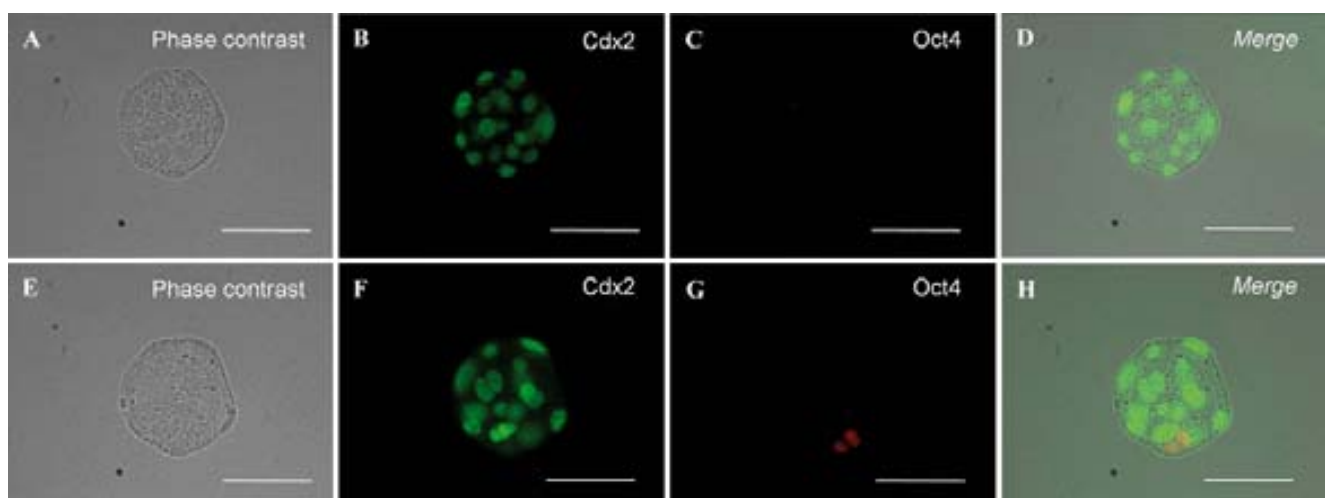


Fig. 4 Immunostaining of pseudoblastocysts without ICM cells (a–d) and containing ICM cells (e–h). Scale bar: 50 μ m

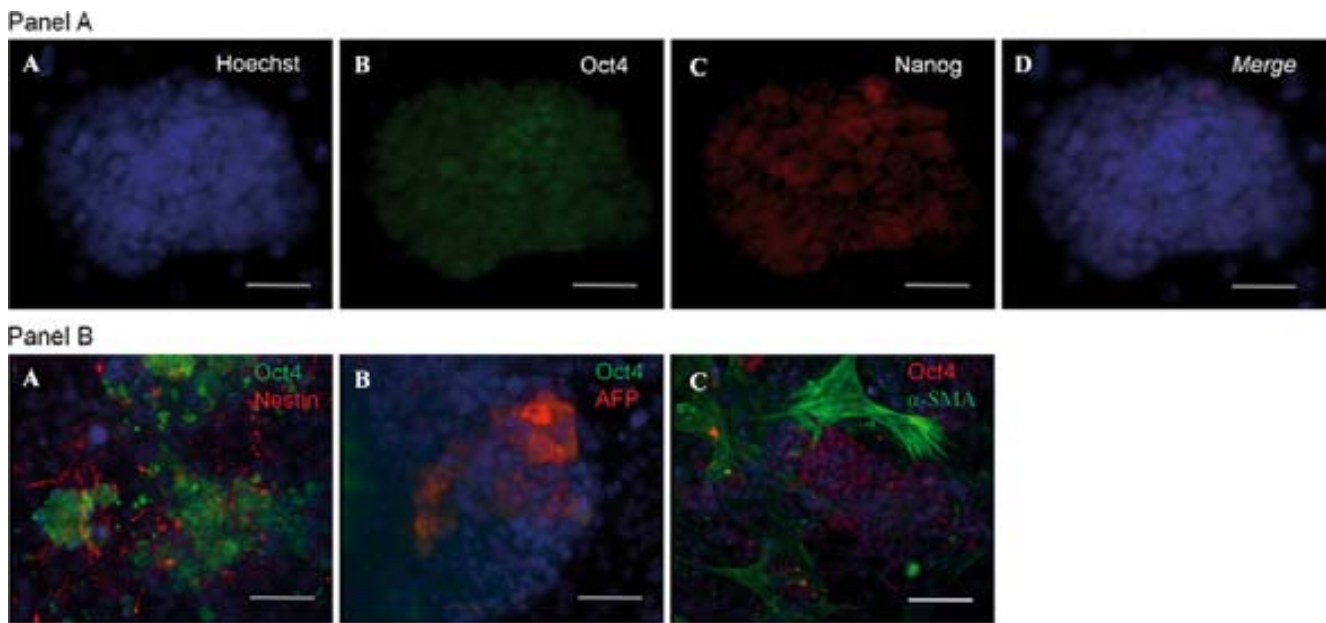


Fig. 5 a Immunostaining of an ESC colony showing expression of Oct4 (*B*, green) and Nanog (*C*, red) pluripotency markers. Scale bar: 50 μ m. **b** Immunostaining of an in vitro differentiated ESC line

showing the expression of Oct4 and Nestin (*A*), Oct4 and AFP (*B*) and Oct4 and α -SMA (*C*). Scale bar: 100 μ m

Establishment of TSC Lines After Culture with E-cad-Fc

TSC culture conditions were introduced in 1/8 groups exposed to E-cad-Fc (long exposure) exhibiting a TSC-like morphology on the third day of culture and 4 TSC lines (13.3%; Table 4) were obtained (Fig. 3d). Control 1/8 groups not exposed to E-cad-Fc were also cultured in TSC conditions and only 1 TSC line (4%) was derived. These results, although not statistically significant, suggest an increased capacity to establish TSC lines after a long exposure of the 1/8 blastomeres to E-cad-Fc. Moreover, the production of TSC lines from the group with E-cad-Fc (13.3%; Table 4) was compared with their respective production of ESC lines (1%; Table 2) and results revealed significant differences ($p=0.0101$) suggesting that E-cad-Fc in contact with 1/8 blastomeres during more than 24 h favours the production of TSC colonies over that of ESC colonies.

Blastocysts were cultured under TSC conditions as a positive control for the derivation conditions of TSC lines

(Fig. 6a–c) and an efficiency of 56% was obtained (Table 4), a value significantly higher ($p<0.0072$) than that obtained for 1/8 blastomeres with or without E-cad-Fc.

Therefore, 1/8 blastomeres exposed to E-cad-Fc during more than 24 h (long exposure) and cultured in TSC conditions produced TSC lines positive for Cdx2 marker more efficiently than ESC lines, although at lower rates than blastocysts under our conditions. It is important to note that TSC colonies formed from 1/8 blastomeres did not present a homogeneous expression of Cdx2 in the entire colony (Fig. 6d–f).

Discussion

The aim of the present study was to investigate the influence of the adhesion protein E-cadherin on the division capacity of single mouse blastomeres at the 8-cell stage. We wanted to elucidate whether an increased division potential could affect their ESC derivation efficiency.

Table 4 Derivation of TSC lines from the culture of 1/8 blastomeres with E-Cad-Fc

| Derivation group | n | % First division after 24 h (n) | % ESC-like outgrowths (n) | % TSC-like outgrowths (n) | % TSC lines (n) |
|--------------------------------|----|---------------------------------|---------------------------|---------------------------|------------------------|
| Control (1/8) | 25 | 68 (17) ^a | 0 (0) ^a | 24.0 (6) ^a | 4.0 (1) ^a |
| Control (blastocyst) | 25 | – | 0 (0) ^a | 92.0 (23) ^b | 56.0 (14) ^b |
| E-cad-Fc long exposure (>48 h) | 30 | 90 (27) ^a | 0 (0) ^a | 26.7 (8) ^a | 13.3 (4) ^a |

^{a–b}Values with different superscripts within the same column differ significantly

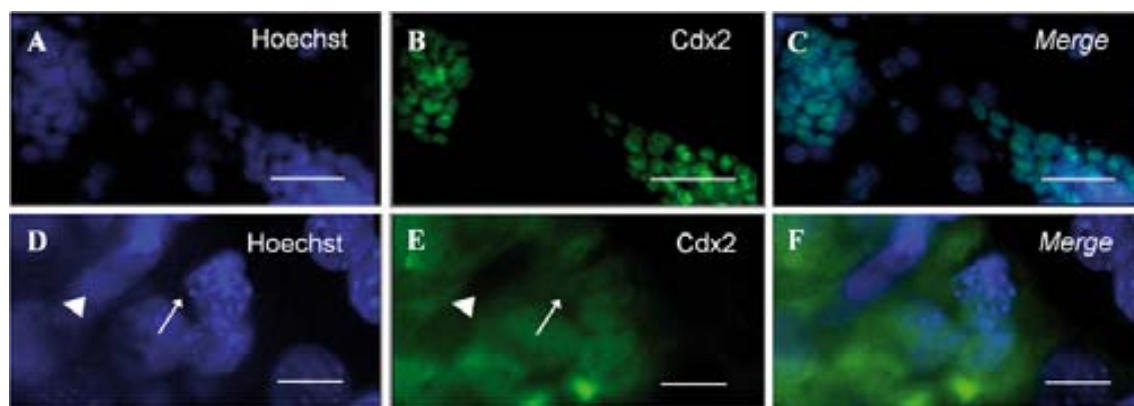


Fig. 6 Immunostaining of TSC colonies. **a–c** TSC lines derived from blastocysts showing a homogeneous expression of Cdx2 marker (**b**, green). Scale bar: 50 μm . **d–f** TSC lines derived from

1/8 blastomeres showing a variegated expression of Cdx2 marker (*arrow*: Cdx2 positive cells; *arrowhead*: Cdx2 negative cells). Scale bar: 10 μm

In our study, we adhered a chimeric E-cadherin (E-cad-Fc) to 1/8 blastomeres to simulate the signaling produced in vivo when two or more blastomeres connect by means of E-cadherin junctions at the 8-cell stage. The adhesion of E-cad-Fc to the blastomere surface was performed maintaining the E-cad-Fc during at least 2 h in contact with blastomeres, since there are consistent data indicating that cadherin-mediated adhesion proceeds from a weak to a strong state over a time of 1 h when it finally connects with the cytoskeleton [7]. The foci-like pattern found by immunofluorescence for the E-cad-Fc, the need of calcium to adhere E-cad-Fc, the complete withdrawal observed when these blastomeres were washed in a calcium- and magnesium-free PBS solution and the similar distribution of E-cad-Fc and native E-cadherin on blastomeres surface confirm the specificity of the adhesion of E-cad-Fc to the native E-cadherin of blastomeres in our experimental design.

E-cadherin is a cell-to-cell adhesion molecule with a central and crucial role during development [25]. Its ability to participate or to influence morphogenetic processes in the developing embryo such as cell proliferation, cell death, cell polarization and differentiation has been described. Particularly, with regards to proliferation, E-cadherin ensures that blastomeres find a partner to contact with and, hence, they proliferate and structure in tissues [7]. Our results from the culture of 1/8 blastomeres with E-cad-Fc during 24 h revealed an increased division capacity when compared to control groups cultured without E-cad-Fc under ESC derivation conditions. Moreover, we have succeeded in mimicking the division capacity of 2/8 blastomeres, which contact each other through native E-cadherin. Altogether, our data seem to indicate that E-cad-Fc increases the proliferating capacity of single blastomeres at the 8-cell stage during the first 24 h of culture, when blastomere cleavage occurs, probably by simulating adherens junctions and stimulating

the signaling produced between neighbouring blastomeres at this stage.

Experiments maintaining the E-cad-Fc in the culture medium (long exposure) revealed a decrease in the number of ICM cells in pseudoblastocysts with regards to the control group without E-cad-Fc, indicating that E-cad-Fc reduces the proliferation capacity of ICM cells at this stage. Polarization induced by residual E-cad-Fc in the culture medium may inhibit the formation of ICM cells without affecting the proliferation of TE cells. After these pseudoblastocysts obtained from 1/8 blastomeres attached to the feeder cells during the next 24 h, they formed a higher number of TSC-like outgrowths than of ESC-like outgrowths, and the percentage of TSC-like outgrowths produced was higher than that observed in the control 1/8 group. It is well known that E-cadherin confers a unique adhesion capacity to ensure the formation of the TE, the first epithelium in the embryo [10]. Free E-cad-Fc in the culture medium may adhere to the external and free surface of cells in the outgrowth thus inducing polarization and the formation of TSC-like cells, as occurs at the morula stage to form the TE. To confirm that TSC-like outgrowths were able to form TSC lines, they were cultured in TSC conditions and 4 TSC lines were derived. Again, the more efficient production of TSC lines with regards to the derivation of ESC lines in the same group suggests that a long exposure to E-cad-Fc is favouring the production of TE-like rather than ICM-like cells. The quality of the conditions used to derive TSC lines was confirmed by TSC derivation from blastocysts, and the efficiency obtained was similar to that previously described by other authors [26]. Thus, our experimental conditions for deriving TSC lines are good but the establishment of TSC lines from 1/8 blastomeres is less efficient than from blastocysts, as expected.

Experiments about a short exposure (24 h) to E-cad-Fc, by contrast, produced pseudoblastocysts with a mean number of ICM cells similar to control 1/8 blastomeres non-exposed to E-cad-Fc. Thus, a short exposure to E-cad-Fc does not result in a reduction in the proliferation capacity of ICM cells, as observed with a long exposure. Outgrowths formed in this group were mostly ESC-like, whereas the production of TSC-like outgrowths was almost eliminated. In this way, the ESC derivation efficiency increased to values similar to those obtained from 2/8 blastomeres and, resulted highly significant with regards to control 1/8 blastomeres without E-cad-Fc and with a long exposure to E-cad-Fc. Changes in the distribution of E-cad-Fc depending on the time E-cad-Fc is in contact with 1/8 blastomeres could explain differences in the ESC derivation efficiencies found in experiments about short and long exposure to E-cad-Fc. It is well known that E-cadherin is associated with the maintenance of the undifferentiated state in mouse and human ESC, so that downregulation of the surface E-cadherin leads to the differentiation of mouse ESC [11, 13, 14]. Particularly, E-cadherin distribution has been shown to be crucial in such processes. Li et al. (2010) showed that E-cadherin is highly and homogeneously expressed on the cells surface of the undifferentiated colonies in contrast to differentiated colonies, indicating that a uniform distribution of E-cadherin on the cells conforming the ESC colonies contributes to maintain pluripotency and avoids differentiation [12]. Combining these data with our results, suggests that early treatment with E-cad-Fc during only the first 24 h could enhance the probability of first dividing blastomeres to have an ICM-committed phenotype thus assuring that these blastomeres have a higher potential to form ESC-like cells during the process of ESC derivation. It is well known that in embryos from 8-cell stage onwards, inner blastomeres in the embryo present a homogeneous distribution of E-cadherin on their surface while outer blastomeres present E-cadherin restricted to areas of contact with other blastomeres. Hence, inner blastomeres are committed to become ICM cells while outer blastomeres form TE cells at the blastocyst stage [27]. Thus, E-cad-Fc uniformly distributed thorough the surface of blastomeres during the first 24 h could be promoting the production of ICM-committed blastomeres which are more prone to produce ESC lines. By contrast, 1/8 control blastomeres despite producing pseudoblastocysts with the same mean number of ICM cells, could not be committed enough to produce ESC-like cells in the process of ESC derivation. Probably, long exposure to E-cad-Fc produced significantly lower percentages of ESC lines due to the fact that residual E-cad-Fc in the culture medium induces a continuous effect of polarization that is translated in a high proportion of TSC-like cells and, hence, in a low ESC derivation efficiency.

The association between the adhesive signaling of E-cadherin and Wnt signaling has been proposed through an intermediary protein, β -catenin, which can regulate both cell adhesion and gene expression [19, 28]. Wnt signaling regulates genes which are involved in proliferation and differentiation during development and in adult tissues. Willert et al. (1998) proposed that Wnt signaling has a direct effect on cell adhesion so that E-cadherin could inactivate Wnt signaling by recruiting the soluble cytoplasmic pool of available β -catenin [29]. Moreover, it is well known that Wnt signaling may suppress differentiation in early embryos and ESC and that β -catenin in Wnt signaling is also involved in the transcription of genes that control proliferation such as c-myc, which positively regulates G1/S transition [20]. Pooling all these data together with our results suggests that the adhesion of chimeric E-cad-Fc to the blastomere surface may promote the activation of the E-cadherin pathway by sequestering the β -catenin pool available for the Wnt pathway and therefore inducing the consequent downregulation of the Wnt signaling. Despite this, a low level of activation of Wnt signaling may persist since during the first 24 h in contact with E-cad-Fc blastomeres are induced to increase their percentage of division probably by a positive regulation of genes involved in G1/S transition.

Overall, we can conclude from our study that the division rate of single blastomeres at the 8-cell stage can be increased by culturing them with E-cad-Fc during 24 h at the beginning of the derivation process. Under these conditions, the efficiency of the derivation process from one single blastomere can be improved and resemble the one obtained when starting from two blastomeres, which are connected through native E-cadherin junctions. Therefore, establishment of ESC lines from isolated blastomeres not only depends on the embryo volume from which derivation has started but on the initial conditions of the signaling between neighbouring blastomeres as we previously suggested [21].

Finally, given that 1/8 single blastomeres incubated with E-cad-Fc during 24 h can yield an ESC derivation efficiency of 33.6%, it is tempting to speculate that by using this novel experimental approach, if confirmed by other authors, a decompacted 8-cell stage embryo could theoretically produce an ESC line with an efficiency that could reach 96% ($p=1-(0.664)^8$). This potential ESC derivation efficiency is higher than the best obtained from a single blastocyst (88%) described until now [5].

Acknowledgements This work received financial support from the Spanish *Ministerio de Educación y Ciencia* (MEC) projects BIO 2005-04341 and BIO2006-11792, the *Generalitat de Catalunya* DGR project #2009SGR-00282 and MEC FPU fellowship AP2006-02038. We thank Marc Puigerver and Jonatan Lucas for their technical assistance.

Conflicts of interest The authors declare no potential conflicts of interest.

References

1. 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*, *94*(11), 5709–5712.
2. Chung, Y., Klimanskaya, I., Becker, S., et al. (2006). Embryonic and extraembryonic stem cell lines derived from single mouse blastomeres. *Nature*. doi:10.1038/nature04277.
3. Chung, Y., Klimanskaya, I., Becker, S., et al. (2008). Human embryonic stem cell lines generated without embryo destruction. *Cell Stem Cell*. doi:10.1016/j.stem.2007.12.013.
4. Klimanskaya, I., Chung, Y., Becker, S., Lu, S. J., & Lanza, R. (2006). Human embryonic stem cell lines derived from single blastomeres. *Nature*. doi:10.1038/nature05142.
5. Wakayama, S., Hikichi, T., Suetsugu, R., et al. (2007). Efficient establishment of mouse embryonic stem cell lines from single blastomeres and polar bodies. *Stem Cells*. doi:10.1634/stemcells.2006-0615.
6. Fleming, T. P., Javed, Q., Collins, J., & Hay, M. (1993). Biogenesis of structural intercellular junctions during cleavage in the mouse embryo. *Journal of Cell Science Supplement*, *17*, 119–125.
7. Steinberg, M. S., & McNutt, P. M. (1999). Cadherins and their connections: adhesion junctions have broader functions. *Current Opinion in Cell Biology*. doi:10.1016/S0955-0674(99)00027-7.
8. Clayton, L., Stinchcombe, S. V., & Johnson, M. H. (1993). Cell surface localisation and stability of uvomorulin during early mouse development. *Zygote*. doi:10.1017/S0967199400001660.
9. Riethmacher, D., Brinkmann, V., & Birchmeier, C. (1995). A targeted mutation in the mouse E-cadherin gene results in defective preimplantation development. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *92*(3), 855–859.
10. Kan, N. G., Stemmler, M. P., Junghans, D., et al. (2007). Gene replacement reveals a specific role for E-cadherin in the formation of a functional trophoblast. *Development*. doi:10.1242/dev.02722.
11. Chou, Y. F., Chen, H. H., Eijpe, M., et al. (2008). The growth factor environment defines distinct pluripotent ground states in novel blastocyst-derived stem cells. *Cell*. doi:10.1016/j.cell.2008.08.035.
12. Li, Z., Qiu, D., & Sridharan, I. (2010). Spatially resolved quantification of E-cadherin on target hES cells. *The Journal of Physical Chemistry B*. doi:10.1021/jp906737q.
13. Spencer, H. L., Eastham, A. M., Merry, C. L., et al. (2007). E-cadherin inhibits cell surface localization of the pro-migratory 5T4 oncofetal antigen in mouse embryonic stem cells. *Molecular Biology of the Cell*. doi:10.1091/mbc.E06-09-0875.
14. Xu, Y., Zhu, X., & Hahm, H. S. (2010). Revealing a core signaling regulatory mechanism for pluripotent stem cell survival and self-renewal by small molecules. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. doi:10.1073/pnas.1002024107.
15. Soncin, F., Mohamet, L., Eckardt, D., et al. (2009). Abrogation of E-cadherin-mediated cell-cell contact in mouse embryonic stem cells results in reversible LIF-independent self-renewal. *Stem Cells*. doi:10.1002/stem.134.
16. Xu, Y., Zhu, X., Hahm, H. S., et al. (2010). Revealing a core signaling regulatory mechanism for pluripotent stem cell survival and self-renewal by small molecules. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. doi:10.1073/pnas.1002024107.
17. Chen, G., Hou, Z., Gulbranson, D. R., & Thomson, J. A. (2010). Actin-myosin contractility is responsible for the reduced viability of dissociated human embryonic stem cells. *Cell Stem Cell*. doi:10.1016/j.stem.2010.06.017.
18. Ohgushi, M., Matsumura, M., Eiraku, M., et al. (2010). Molecular pathway and cell state responsible for dissociation-induced apoptosis in human pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell*. doi:10.1016/j.stem.2010.06.018.
19. Brembeck, F. H., Rosario, M., & Birchmeier, W. (2006). Balancing cell adhesion and Wnt signaling, the key role of beta-catenin. *Current Opinion in Genetics & Development*. doi:10.1016/j.gde.2005.12.007.
20. Sineva, G. S., & Pospelov, V. A. (2010). Inhibition of GSK3beta enhances both adhesive and signaling activities of beta-catenin in mouse embryonic stem cells. *Biology of the Cell*. doi:10.1042/BC20100016.
21. González, S., Ibañez, E., & Santaló, J. (2010). Establishment of mouse embryonic stem cells from isolated blastomeres and whole embryos using three derivation methods. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*. doi:10.1007/s10815-010-9473-9.
22. Martin, G. R., & Evans, M. J. (1975). Differentiation of clonal lines of teratocarcinoma cells: formation of embryoid bodies in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *72*(4), 1441–1445.
23. Handyside, A. H., Pattinson, J. K., Penketh, R. J., Delhanty, J. D., Winston, R. M., & Tuddenham, E. G. (1989). Biopsy of human preimplantation embryos and sexing by DNA amplification. *Lancet*. doi:10.1016/S0140-6736(89)91723-6.
24. Tanaka, S. (2006). *Derivation and culture of mouse trophoblast stem cells in vitro*. *Methods in Molecular Biology. Embryonic stem cell protocols* (pp. 35–44). Humana Press.
25. Vleminckx, K., & Kemler, R. (1999). Cadherins and tissue formation: integrating adhesion and signaling. *Bioessays*, *21*(3), 211–220.
26. Rossant, J. (2001). Stem cells from the Mammalian blastocyst. *Stem Cells*. doi:10.1634/stemcells.19-6-477.
27. Vestweber, D., Gossler, A., Boller, K., & Kemler, R. (1987). Expression and distribution of cell adhesion molecule uvomorulin in mouse preimplantation embryos. *Developmental Biology*. doi:10.1016/0012-1606(87)90498-2.
28. Bienz, M. (2005). Beta-Catenin: a pivot between cell adhesion and Wnt signalling. *Current Biology*. doi:10.1016/j.cub.2004.12.058.
29. Willert, K., & Nusse, R. (1998). Beta-catenin: a key mediator of Wnt signaling. *Current Opinion in Genetics & Development*. doi:10.1016/S0959-437X(98)80068-3.

Influence of early fate decisions at the 2-cell stage on the derivation of mouse embryonic stem cells lines

Enviat a *Stem Cell Research*

Sheyla González · Elena Ibáñez · Josep Santaló

Factor d'impacte (2009): 3.368

ARTICLE III



Influence of early fate decisions at the 2-cell stage on the derivation of mouse embryonic stem cell lines

Sheyla González, Elena Ibáñez and Josep Santaló*

Departament de Biologia Cel·lular, Fisiologia i Immunologia. Facultat de Biociències. Universitat Autònoma de Barcelona. 08193 Bellaterra. Spain.

Sheyla.Gonzalez@uab.cat; Elena.Ibanez@uab.cat; Josep.Santaló@uab.cat

*Corresponding author. E-mail address: Josep.Santaló@uab.cat; telephone: +34 93 581 27 75; fax: +34 93 581 22 95

Abstract

The first event of differentiation in mammalian embryogenesis is the segregation of the inner cell mass and trophectoderm lineages in the blastocyst. Cellular and molecular events related to this process are still a controversial issue. During years it was thought that first allocation of blastomeres before the blastocyst stage was done in the late 8-cell stage with the formation of inner and outer cells. Lately, many studies have pointed out that individual blastomeres at the 4-cell stage differ in their developmental properties according to their position within the embryo. In this report, we wanted to elucidate whether these early decisions influence the production of mouse embryonic stem cell lines, so that a selective isolation of blastomeres at the 4-cell stage to derive the lines could improve the efficiency of the derivation process. Results from blastomere tracking experiments support the idea of a different developmental potential of blastomeres within the 4-cell stage embryo. However, we also show a high plasticity in the developmental pattern of blastomeres once isolated from the embryo, thus making all 4-cell stage blastomeres equally competent to derive ESC lines.

Keywords. Embryonic stem cells; isolated blastomeres; blastomere fate; lineage tracing.

1. Introduction

Some studies have suggested an entirely symmetrical pattern in early preimplantational development of the mouse [1,2,3]. According to this model, the embryo would be formed by equivalent cells dividing in a random orientation, and differences in the developmental potential of blastomeres would first appear at the 8-cell stage with the formation of inner and outer cells. In this sense, the blastocyst cavity would form at a random position, so the embryonic-abembryonic axis would not be predetermined at early cleavage stages.

Despite this, some evidences have pointed out to an opposite view. As early as in the oocyte, polarity could exist due to the organization of maternal transcripts in the ooplasm, location of the polar body and sperm entry site. Moreover, a predetermination in blastomere allocation to the embryonic or abembryonic part of the blastocyst is thought to be present at early cleavage development and influenced by cell-cell adhesion, receptors and cytokines of key signaling pathways, developmentally regulated transcription factors, epigenetics and orientation of cleavage planes [4].

Studies in lower species could be a good model to study a premature polarity in oocytes and embryos and to elucidate embryological rules in mammals. It is known that blastomeres are highly committed in some lower species such as *Caenorhabditis elegans* [5,6], *Xenopus laevis* [1,7] and *Drosophila melanogaster* [8], in which early polarity is influenced by transient maternal transcripts in the oocyte or long-lived transcripts in the embryo and cleavage planes which regulate the formation of different cellular lineages. However, in other species, blastomeres have an early equal developmental potential and they respond to signals of differentiation in later cleavage development.

Studies on mouse and human embryos suggested that the first event towards inner cell mass (ICM) and trophectoderm (TE) differentiation begins at the late 8-cell stage with the formation of inner and outer cells guided by the establishment of cell-cell contacts (tight and adherens junctions), segregation of proteins to the apical and basolateral membranes and, finally, the generation of symmetric and asymmetric divisions [9]. Despite this, many reports in mammals, mostly on mouse and human, indicate evidence of polarity in oocytes and early embryos related to the first and second cleavages [4]. Embryo genome activation is thought to take place between one and four cleavage divisions but genes regulating polarity in oocytes are less known. Gene expression is regulated by both active and repressive mechanisms and these processes could imply epigenetic changes in the chromatin structure. Moreover, DNA duplication favours the binding of transcription factors

to DNA and some of them could induce blastomeres to be committed to the ICM or TE in the blastocyst depending on early or late cell division.

More recently, special interest has been focused on the influence of cleavage planes in early developmental stages. It is well known that the embryonic-abembryonic axis of the blastocyst correlates with the animal-vegetal axis of the zygote, so blastocyst axis could be related to early cleavage patterning [10-15]. It has been described that the first embryonic division predicts the blastocyst axis in most of the embryos [12,14-17] and that it occurs meridionally, within 30° of the second polar body position [15]. Moreover, the order of second cleavage divisions from 2- to 4-cell stage is also thought to guide polarisation of the blastocyst. In mice, the most common pattern of division (80%) is the one in which one 2-cell blastomere divides meridionally and the other divides equatorially (ME and EM embryos) [18]. On this basis, Piotrowska and Zernicka-Goetz [15] demonstrated that the orientation of the embryonic-abembryonic axis of the blastocyst is only determined at early cleavage stages when the first 2-cell blastomere divides meridionally and the second does equatorially (ME embryos). In this case, they have observed that the early dividing blastomere in a meridional orientation tends to contribute to the embryonic part of the blastocyst (ICM) and the later dividing equatorially, to the abembryonic part (TE). On the contrary, if the first 2-cell blastomere divides equatorially, it has the same probability to contribute to ICM or TE of the blastocyst. In embryos with 2-cell blastomeres dividing in the same orientation (EE and MM embryos), they did not observe any correlation.

The influence of the timing and orientation of the cleavage plane on early cell fate predetermination at the 2-cell stage has been supported by molecular experiments on the expression profile of key transcriptional factors such as CDX2 [19], the transcriptional kinetics of OCT4 [20] and differential epigenetic marks at the 4-cell stage [21,22]. It has been proposed that such molecular changes are regulated by signaling pathways and microRNAs which can act in early and late embryonic stages in order to guide or consolidate cellular mechanisms [23,24,25].

Furthermore, evidence about differences in the developmental potential of single blastomeres at the 4-cell stage has been reported in studies about chimera formation [26,27] and derivation of human and mouse embryonic stem cell (ESC) lines [28,29]. Tarkowski et al. [26] showed that only 2 out of 4 blastomeres at 4-cell stage contribute to the embryo proper and Piotrowska et al. [27] observed that early meridionally dividing blastomeres at the 4-cell stage have higher chances to develop to term in experiments about chimera formation. Regarding the derivation of ESC lines, despite Van de Velde et al. [30] showed that all four single blastomeres of a 4-cell stage human embryo can produce pseudoblastocysts containing ICM and TE, Geens

et al. [29] reported the derivation of human ESC lines from only one blastomere of a 4-cell human embryo. Moreover, Lorthongpanich et al. [28] could not produce any mouse ESC line from single blastomeres at the 4-cell stage. Thus, the individual potential of blastomeres at the 4-cell stage, either inside the embryo or isolated, is something that needs to be further investigated.

The aim of the present study was to determine whether blastomeres from 4-cell stage embryos of the F1 (129/Sv x C57Bl/6) strain have a different developmental potential within the embryo and to analyse if this early predetermination influences the derivation efficiency of mouse ESC lines from isolated blastomeres at this stage. In this sense, the selective use of blastomeres at the 4-cell stage that would be later allocated to the ICM of the blastocyst could increase the derivation efficiency of process. Moreover, ESC lines could be a model to study the mechanisms underlying pluripotency if these early fate decisions are translated to the derivation of ESC lines. We present a preliminary study that, for the first time, transfers the differences in the allocation of blastomeres from early embryos according to the timing and orientation of cleavage planes, to the ESC field. For this purpose, mouse ESC lines have been derived from first and second dividing blastomeres of 2-cell stage embryos to elucidate differences in the ESC derivation efficiency depending on the cleavage timing. Moreover, the ESC derivation efficiency from the first 2-cell dividing blastomere in an equatorial or meridional orientation has been compared. Finally, all isolated blastomeres from 4-cell stage embryos have been allowed to develop into a pseudoblastocyst to observe differences in the proportion of ICM and TE cells.

2. Results

2.1. Lineage tracing experiments

DiI labeling experiments were performed to elucidate whether 4-cell blastomeres from 129/Sv x C57Bl/6 F1 mouse embryos exhibit a bias to be allocated to either the embryonic or abembryonic part of the blastocyst depending on the timing and the cleavage plane orientation (equatorial or meridional) at the 2-cell stage. Blastomeres of interest were the non-dyed ones resulting from the first dividing blastomere at the 2-cell stage. Blastocysts derived from the first dividing blastomeres at the 2-cell stage in an equatorial orientation (2/3E) are designated as E blastocysts whereas the ones derived from a meridional division (2/3M) are designated as M blastocysts. Examples of dyed labeled 2/3E and M blastomeres and blastocysts are shown in Figure 1 Panel A.

By recreating the lineage tracing method described by Piotrowska et al. [12] we have found a reduced viability of labeled embryos of this strain since only 51.38% of the embryos survived after the first 24-48 h (Table 1). Despite all cultured blastocysts appeared to be of similar size, after immunostaining with the TE marker CDX2 and counterstaining with Hoechst (Figure 1 Panel B), 46 (82.14%) of the E and M blastocysts contained a mean number of ICM, TE and total cells similar to control blastocysts (Table 1) and similar to data described by other authors [31], thus evidencing that the dye produced a reduction in the division capacity of some labeled blastomeres. This reduction in the division capacity was also evidenced by a restricted distribution of the red dye in one or few blastomeres of the blastocyst, making these blastocysts easily recognizable to be excluded from the analysis. According to this, we considered that blastocysts suitable to be evaluated must have a similar mean number of ICM, TE and total cells as control blastocysts and a scattered distribution of the red dye, indicating that the DiI had not stopped the division capacity of the labeled blastomere. Therefore, after analysing the distribution of the red dye in evaluable blastocysts immunostained with CDX2 marker, 2/3E blastomeres were allocated to the ICM in 13.64% of the blastocysts, 50% to the TE and 36.36% to both ICM and TE. By contrast, 2/3M blastomeres were allocated to the ICM of 37.50% of the blastocysts, 16.67% to the TE and 45.83% to both ICM and TE (Table 1). These data revealed statistical significant differences between dyed blastomeres allocated to the ICM and TE only in E blastocysts ($p=0.0217$), indicating a predisposition of 2/3E blastomeres to be allocated to the abembryonic part of the blastocyst. By contrast, in M blastocysts, no significant differences were found when comparing the allocation to ICM or TE of the dyed blastomeres, despite the percentage of blastomeres allocated to the ICM was higher than the one to the TE.

2.2. Influence of the cleavage plane orientation on the production of mouse ESC lines

Mouse ESC lines were derived from isolated blastomeres at early 3- and 4-cell stages to determine whether early embryonic decisions influence ESC derivation efficiency (Table 2). First, we wished to elucidate whether the first dividing blastomere at the 2-cell stage yields higher derivation efficiencies than the second one. Comparisons between different number of isolated blastomeres at the same embryonic stage (1/3 vs 2/3 blastomeres at the 3-cell stage and 1/4 vs 2/4 at the 4-cell stage) were done to assess whether blastomere communication or the remaining embryo volume has any effect on the contribution of blastomeres from the same embryonic stage to the embryonic and abembryonic part of the blastocyst. Whole 4-cell stage embryos were used as a control group.

All blastomeres in the ESC derivation medium developed into a pseudoblastocyst in 3-4 days (Figure 2A, E and I). ESC lines were established from all derivation groups with an efficiency ranging from 8.3% to 54.0% (Table 2). Figure 2 shows examples of the establishment of ESC lines in culture from 2/3E (Figure 2A-D), 2/3M (Figure 2E-H) and 2/4 (Figure 2I-L) derivation groups. Some ESC lines positive for pluripotency markers detected by immunofluorescence are illustrated in Figure 3 Panel A.

Comparisons between derivation groups with an equal number of isolated blastomeres but a different embryonic stage (1/3 vs 1/4 and 2/3 vs 2/4), revealed similar efficiencies of ESC derivation, showing that 3- and 4-cell stages are equally efficient to produce ESC lines when they are established from isolated blastomeres and that first and second dividing blastomeres at the 2-cell stage also produce similar ESC derivation efficiencies (Table 2). Similarly, comparisons between derivation groups which differ in the number of isolated blastomeres but share the same embryonic stage (1/3 vs. 2/3, 1/4 vs. 2/4, 1/4 vs. 4/4 and 2/4 vs. 4/4) showed equivalent derivation efficiencies, except for 1/4 vs. 4/4 ($p=0.0085$) (Table 2). Thus, differences exist in ESC derivation rates depending on the number of isolated blastomeres used to start the derivation process, but only when the proportion of the embryo volume used is a quarter at the 4-cell stage.

Next, we wanted to determine whether the first dividing blastomere at the 2-cell stage in an equatorial (2/3E) or meridional (2/3M) orientation produced different ESC derivation efficiencies, as seem to occur with blastomere destination during normal preimplantational development. If this was true, mouse ESC derivation efficiency could be increased by selective blastomere removal.

No statistical significant differences in the ESC derivation efficiency from 2/3E or 2/3M blastomeres were found (Table 2), indicating that differences found in normal preimplantational development related to the

orientation of the first dividing blastomere at the 2-cell stage are not translated to the process of ESC derivation from isolated blastomeres.

2.3. In vitro differentiation experiments

In vitro differentiation experiments were performed to further test pluripotency of the ESC lines derived and to ascertain whether the ESC lines showed differences in their differentiation potential depending on the derivation groups from which they originate (Figure 3 Panel B). These experiments were performed in one representative ESC line from each derivation group analysed. Results showed no differences in the expression of differentiation markers of cells of the three germ layers (Nestin of ectoderm, AFP of endoderm and α -SMA of mesoderm) indicating a similar capacity to differentiate in vitro to cells of early stages of differentiation.

2.4. Individual developmental potential of isolated blastomeres at the 4-cell stage depending on the timing and orientation of the first cleavage plane

Once isolated from the embryo and cultured in KSOM EmbryoMax® medium, 2/3E, 2/3M and 2/4 blastomeres (Figure 4A-D) developed into a pseudoblastocyst at 72 h (Figure 4E-F) and, at this point, they were fixed to be processed for immunostaining and evaluate differences in the mean number of ICM and TE cells depending on the timing and the orientation of the cleavage plane (Table 3). With this approach, we wanted to elucidate whether isolated 2/3E, 2/3M and 2/4 blastomeres follow the same trend as blastomeres inside the embryo in terms of blastomere allocation to ICM or TE lineage or, otherwise, they follow another developmental pattern and results correlate with those found for the ESC derivation.

Immunostaining for the detection of OCT4 and CDX2 markers confirmed the presence of ICM and TE cells, respectively, in all pseudoblastocysts formed from the three groups of blastomeres (Figure 5). Comparisons between pseudoblastocysts from 2/3E, 2/3M and 2/4 blastomeres revealed no significant differences in the mean number of ICM or TE cells (Table 3), indicating that blastomeres are not preferentially allocated to the ICM or TE depending neither on their cleavage timing (early or late dividing 2-cell blastomeres) nor on the orientation of the cleavage plane of the first 2-cell dividing blastomere.

3. Discussion

In this study, we aimed to assess the relationship between the production of ESC lines from single blastomeres and blastomere preferential allocation to the ICM or TE in the blastocyst according to the timing and orientation of cleavage divisions at the 2-cell stage.

ESC lines are typically derived from the ICM of the blastocyst [32,33], however, during years many groups have tried to derive them from earlier embryonic stages, as blastomeres are considered more totipotent than blastocyst cells, so they could have a higher potential to produce ESC. On the other hand, many reports have correlated the orientation of cleavage division at early embryonic stages with the future allocation or commitment of blastomeres to the ICM or TE lineages. Thereby, it has been suggested that the first blastomere at the 2-cell stage dividing in a meridional orientation tends to contribute to the embryonic part of the blastocyst [21,27]. If this is the case, this blastomere should provide a higher efficiency of ESC derivation than the other 2-cell blastomere.

Experiments on blastomere tracking performed in our study evidenced that blastomeres from 129/Sv x C57Bl/6 F1 strain seem to be more sensitive to DiI labeling treatment as reported by Piotrowska et al. [12] in C57Bl/6 x CBA F1 embryos. 2/3E blastomeres were preferentially allocated to the TE whereas 2/3M blastomeres did not exhibit a tendency for a preferential allocation in the blastocyst, despite the percentage of cells in the ICM was higher than in the TE. As previously mentioned, Piotrowska and co-workers [27] reported an early form of allocation of blastomeres in C57Bl/6 x CBA F1 blastocysts. Although our results do not show the same trend for 2/3M blastomeres to be allocated to the embryonic part of the blastocyst, these differences may be attributed to the strain used. Support to this hypothesis of a developmental bias at early cleavage stages has been provided by molecular experiments. In these studies, it has been shown that in 4-cell mouse ME and EM embryos in which the developmental pattern is predictable, first dividing blastomeres coming from an equatorial division tend to express higher levels of CDX2 transcription factor, specific of TE cells in the blastocyst [19]. Moreover, first dividing blastomeres from a meridional division, exhibiting higher methylation levels in H3 arginine, are preferentially allocated to the ICM. CARM1, which is the methyltransferase responsible for this methylation, maintains blastomere pluripotency by activating pluripotency genes such as *Sox2* and *Nanog* [21,22]. Regarding the kinetic behaviour of OCT4, it has been described that blastomeres with highly immobile fraction of nuclear OCT4 tend to undergo asymmetric divisions so they contribute significantly more cells to the ICM [20]. It must be interesting to further study

whether OCT4 kinetics correlates with molecular studies on CDX2 transcriptional profile and epigenetic modifications and its relationship with the timing and orientation of cleavage divisions at the 2-cell stage.

Establishment of ESC lines performed in our study revealed no significant differences when analyzing the effect of the cell number in the same embryonic stage (1/3 vs 2/3 and 1/4 vs 2/4) indicating that differences in terms of cell volume and/or cell communication are not relevant enough to produce differences in the efficiency of ESC derivation at these stages. By contrast, the comparison 1/4 vs 4/4 produced differences in the derivation capacity, showing that the increase in the cell volume in this case is important enough to produce differences in the ESC derivation efficiency. Earlier studies on the analysis of the developmental potential of 1/4 and 1/8 blastomeres in the pre- and postimplantational development suggested that a minimum number of ICM cells (probably greater than 3) in blastocysts is required for successful postimplantation embryonic development [34,35]. In this sense, the lower the number of isolated blastomeres, the lower the chance to produce an ESC line. Our previous results [36,37] suggested an influence of the cell-cell communication on the ESC derivation capacity when starting from isolated blastomeres at the 8-cell stage. However, this effect can not be detected at earlier stages, such as the 4-cell stage, according to the results of the present study. It is well known that cell-cell communication at early stages is mediated by simple apposition between blastomeres' membranes (non-specific intercellular junctions) since specific intercellular junctions such as gap or adherents junctions are formed at the late 8-cell stage [38], so such communication should not be a crucial aspect in the ESC derivation at the 4-cell stage and may be established after few divisions. Moreover, no significant differences were found neither in the ESC derivation efficiency from early and late dividing blastomeres at the 2-cell stage nor from the first dividing isolated blastomere at the 2-cell stage, either in an equatorial or meridional cleavage plane. Thus, differences seen in the developmental potential of 2/3E and 2/3M blastomeres during preimplantational development are not translated to the process of ESC derivation.

The lack of correlation between ESC derivation efficiency and both the moment when the cleavage at 2-cell stage occurs and the cleavage plane orientation could be related to the isolation of blastomeres prior to the derivation of the lines. It is well known that the developmental program is so flexible that blastomere fate can be changed when subjected to experimental manipulation such as isolation from the embryo or blastomere reaggregation, situations that disturb blastomere environment (niche) inside the embryo. Individual potential of blastomeres inside the embryo depends on morphological, molecular and epigenetic changes which play a central role at specific moments of the preimplantational development [9,39]. Once a single blastomere is

removed from the embryo, morphological aspects such as position of blastomeres and cell-cell contacts are disturbed, so it is possible that the isolated blastomere has the plasticity to readdress its developmental program by entering a transient moment of high totipotency that could favor ESC derivation. But blastomere fate, as previously mentioned, is also guided by molecular aspects such as transcription factors and epigenetic marks. If these molecular footprints remained stable in the isolated blastomere, i.e. a predominant expression of characteristic ICM or TE transcription factors or non-modified epigenetic marks, they would continue guiding the isolated blastomeres to their initial fate inside the embryo.

Our findings show no differences when deriving ESC from 2/3E, 2/3M and 2/4 blastomeres, suggesting that the developmental program related to early blastomere fate is highly flexible. The change in the developmental potential of early blastomeres once isolated from the embryo could be due to various reasons. First, morphological aspects of the developmental program at early stages could have higher relevance once blastomeres are isolated from the embryo so that the remaining molecular marks were not decisive enough to direct blastomere fate. Second, isolated blastomeres could alter their molecular profile by erasing epigenetic marks or by a redistribution of “animal” and “vegetal” components so that isolated blastomeres are equally prone to go to either ICM or TE. Third, later aggregation of isolated blastomeres in terms of position and cell-cell contact, once they have begun to proliferate to form the pseudoblastocyst or the outgrowth, could redirect the developmental program of the isolated blastomeres. In this sense, it would be logical to find a similar efficiency of ESC-like outgrowths or ESC lines production from 2/3 and 2/4 blastomeres, regardless of their cleavage plane orientation or the embryonic stage (3- or 4-cell stage), as shown in our results.

We wanted to further analyse differences between ESC lines derived from these groups of blastomeres by the *in vitro* differentiation experiments. We did not detect differences regarding to the expression of differentiation markers since all ESC lines analysed showed expression of early differentiation markers to cells of the three germ layers. Further analysis such as chimeric contribution and germline transmission of the ESC lines will be of interest to address possible differences between ESC lines derived from these groups of blastomeres. Immunostaining of pseudoblastocysts, based on the expression of a stem cell marker, was performed to determine whether each isolated blastomere was equally able to form a visible ICM and, thus, produce an ESC line. Data obtained from our study further confirmed the aforementioned results about ESC derivation since 2/3E, 2/3M and 2/4 blastomeres showed equal competence to form ICM cells, the cell lineage that will give rise to ESC lines, and, moreover, pseudoblastocysts formed contained a similar mean number of ICM and TE cells. These results are consistent since all of these groups developed into a pseudoblastocyst

starting from the same number of isolated blastomeres and they are derived from embryos at equivalent developmental stages, 3 and 4-cell stages, since such embryos originate from an asynchrony of cleavage divisions at the 2-cell stage to give rise to 4-cell stage embryos. Our results do not agree with those reported by Lorthongpanich et al. [28] as they observed that not all single blastomeres from 2- and 4-cell stages of outbred CD-1 mouse embryos were able to form ICM cells. This discordance between both studies could be due to the use of a different mouse strain since it is well known that the inbred mouse strain 129/Sv provides the highest efficiencies of ESC derivation [40,41], thus being the most commonly used strain to derive mouse ESC lines. Moreover, unlike in our study, Lorthongpanich et al. [28] used SOX2 as an ICM and stem cell marker. Despite SOX2 is expressed in a similar manner as OCT4 in these cells, OCT4 expression is thought to be higher in ICM cells [42]. Differences in expression and detection thresholds of both pluripotency makers in the ICM of pseudoblastocysts may also explain differences found between both studies. Despite this, our data are in concordance with the study reported by Piotrowska et al. [27] in which they propose that all 4-cell blastomeres can have full developmental potential although they differ in their individual developmental properties within the embryo.

Our study further shows that not all pseudoblastocysts, despite having ICM cells, are able to produce an ESC line, so the presence of ICM cells does not guarantee the derivation of an ESC line. In this sense, differences in the competence of blastomeres to produce ESC lines could arise during the process of ESC derivation. Thus, we suggest that the analysis of the presence of ICM cells in pseudoblastocysts originated from the same number of isolated blastomeres at the same embryonic stage based on the expression of ESC markers is not an accurate method to analyse the different capability of these blastomeres to produce an ESC line.

4. Conclusions

Experiments on blastomere tracking showed that 2/3E blastomeres were preferentially allocated to the TE whereas descendants of 2/3M blastomeres did not exhibit a clear tendency for a preferential allocation in the blastocyst. Despite this, experiments on derivation of mouse ESC lines and immunostaining of ICM and TE cells in the pseudoblastocysts showed that differences in the timing and orientation of cleavage divisions in 2-cell stage embryos during normal preimplantation development are not translated to differences in blastomere fate once they are isolated from the original embryo. Thus, all blastomeres collected at the 4-cell stage have equal chances to produce an ESC line due to the high plasticity they exhibit once isolated from the embryo.

5. Material and Methods

5.1. Embryo collection

Mouse embryos were collected from F1 (129/Sv x C57Bl/6) females [33]. Prior to mating, females were induced to superovulate by intraperitoneal injection of 5 IU of pregnant mare serum gonadotrophin (PMSG; Intervet, Alcobendas, Madrid, Spain) followed by 5 IU of human chorionic gonadotrophin (hCG; Farma-Lepori, Barcelona, Spain) 48 h later. Embryos at the 2-cell stage were collected 48 h after the hCG injection by flushing the oviducts with HEPES-buffered KSOM medium and cultured in KSOM EmbryoMax® medium (Millipore, Madrid, Spain) at 37°C under 5% CO₂ until 3- and 4-cell stages were reached.

5.2. Blastomere labeling

In blastomere tracking experiments, undivided blastomeres from a 3-cell stage embryo were labeled with a fluorescent dye, DiI (Molecular Probes, Prat de Llobregat, Barcelona, Spain), following the protocol described by Piotrowska et al. [12], a non-invasive method that avoids blastomere injection and does not disturb the order of division. In this sense, blastomeres of interest were the ones resulting from the first dividing blastomere at the 2-cell stage which were not labeled with the red dye. This analysis was performed in this way due to the easiness of labeling a single non-divided blastomere at the 3-cell stage instead of labeling two blastomeres. Briefly, DiI was dissolved in virgin olive oil at 65°C during 15 min to make a 2 mg/ml concentrated solution. The lipophilic dye was absorbed by the blastomere by pressing the tip of a 5.5 µm human ICSI micropipette (Cook, Barcelona, Spain) against the blastomere membrane after making a hole in the zona pellucida of the embryos. After dye labeling, embryos were cultured in KSOM EmbryoMax® medium and classified according to the orientation of the cleavage plane (equatorial or meridional) of the first dividing blastomere until the blastocyst stage. Non-labeled embryos at the 2-cell stage were also cultured in KSOM EmbryoMax® medium until the blastocyst stage as a control group for the dye-labeled embryos. Labeled embryos were first analysed using an inverted microscope (Olympus IX71, Barcelona, Spain) fitted with a specific filter for Cy3 to evaluate the blastocyst rate and the distribution of dyed and non-dyed cells. Digital images were acquired with a camera (DP-20; Olympus, Barcelona, Spain) on Cell A software (Olympus, Barcelona, Spain).

Later, immunofluorescence for the detection of the TE marker CDX2 was performed as a complementary method to analyse in more depth the distribution of the red dye and to examine differences in number of ICM, TE and total cells between control and labeled blastocysts. Blastocysts were fixed during 15 min in 4%

paraformaldehyde (Sigma-Aldrich, Madrid, Spain) and incubated overnight at 4°C in a block solution containing 0.5% Triton X-100 (Sigma-Aldrich, Madrid, Spain), 3% goat serum (Sigma-Aldrich, Madrid, Spain) and 0.2% sodium azide (Sigma-Aldrich, Madrid, Spain) in a PBS solution. Incubation with a mouse monoclonal CDX2 primary antibody (1:100; BioGenex MU392A-UC, Barcelona, Spain) was also performed overnight at 4°C and then, a chicken anti-mouse Alexa Fluor 488 secondary antibody (Molecular Probes A-21200, Prat de Llobregat, Barcelona, Spain) was added at 6 µg/ml for 2 h at room temperature. Samples were washed in block solution after incubation with either primary or secondary antibodies. Finally, Hoechst 33258 (Invitrogen, Prat de Llobregat, Barcelona, Spain) at 10 µg/ml was used as a nuclear counterstain. Afterwards, little pressure was exerted on the samples to make a 2D projection of the blastocyst's cells to ease cell counting, avoiding the use of a confocal microscope or the disaggregation of cells. Samples were examined with an epifluorescence microscope Olympus Bx41 and an image capture and analyzing system (Isis software 5.3.3 version; Metasystems, Barcelona Spain).

5.3. Blastomere isolation

Groups of 1 and 2 blastomeres from 3- and 4-cell stage embryos (1/3-2/3 and 1/4-2/4 blastomeres, respectively) were isolated by micromanipulation in a PBS solution [43]. The zona pellucida was disrupted with a 10 µm drilling micropipette containing Tyrode's acid solution and individual blastomeres were aspirated with a 30 µm diameter micropipette.

5.4. Preparation of feeder cells

Prior to experiments of ESC derivation, STO mouse embryo fibroblasts (ECACC, Salisbury, UK) were inactivated with 10 µg/ml mitomycin C (Invitrogen, Prat de Llobregat, Barcelona, Spain) during 3 h to produce feeder cells [44]. The feeder cells were cultured in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM; Invitrogen, Prat de Llobregat, Barcelona, Spain) supplemented with 15% fetal calf serum (FCS; Invitrogen, Prat de Llobregat, Barcelona, Spain).

5.5. Establishment of ESC lines

ESC lines were derived following the protocol described by Wakayama et al. [41]. Briefly, isolated blastomeres and whole 4-cell stage embryos were seeded in 50 µl culture drops coated with feeder cells and cultured in a defined DMEM medium supplemented with 100 µM 2-β-mercaptoethanol (Invitrogen, Prat de

Llobregat, Barcelona, Spain), 1 mM L-glutamine (Invitrogen, Prat de Llobregat, Barcelona, Spain), 1X non-essential aminoacids (Invitrogen, Prat de Llobregat, Barcelona, Spain), 10^3 units/ml leukemia inhibitory factor (LIF; Millipore, Madrid, Spain), 20% Knockout Serum Replacement (KSR; Invitrogen, Prat de Llobregat, Barcelona, Spain) and 0.1 mg/ml adrenocorticotropic hormone (ACTH; Sigma-Aldrich, Madrid, Spain). Blastomeres or embryos were kept in culture until outgrowths of embryonic cells were observed. From this point, ESC-like clumps were subcultured approximately during seven passages until ESC lines were considered to be definitively established by morphological criteria of the colonies.

5.6. ESC lines characterization

ESC lines were characterized following two criteria. First, colonies were selected based on their morphology. Rounded cells inside a well-defined colony at the edge without visible differentiated cells were classified as ESC-like. Later, ESC-like colonies with this morphology were immunostained with primary antibodies such as rabbit polyclonal anti-NANOG (1:200; Abcam ab21603, Cambridge, UK), mouse monoclonal anti-OCT4 (1:50; SantaCruz sc-5279, Heidelberg, Germany) and a rabbit polyclonal anti-SOX2 (1:200; Millipore AB5603, Madrid, Spain) to assess pluripotency. The immunofluorescence protocol followed was the same described for CDX2 detection in blastocysts, except that permeabilization in block solution was performed during 30 min and washes were done using a 1X PBS solution instead of block solution. Secondary antibodies used were chicken anti-mouse IgG Alexa Fluor 488 and goat anti-rabbit IgG Alexa Fluor 594 (Molecular Probes, Prat de Llobregat, Barcelona, Spain). Samples were analysed with an epifluorescence microscope Olympus BX41 and an image capture and analyzing system (Isis software 5.3.3 version; Metasystems, Barcelona, Spain).

Only immunofluorescence-confirmed ESC lines were considered for the calculation of ESC derivation rates.

5.7. In vitro differentiation

ESC lines derived were subjected to differentiating culture conditions to produce differentiated cells of the three germ layers (ectoderm, endoderm and mesoderm) with the aim of further confirming pluripotency and differences in the differentiation capacity among ESC lines depending on their origin. Briefly, undifferentiated ESC lines were passaged to a LIF- and feeder-free dish pre-coated with gelatin (Sigma-Aldrich, Madrid, Spain) and the KSR was replaced with FCS to favor differentiation. The culture medium was replaced every two days and, after one week approximately, the lines were fixed for immunofluorescence analysis.

5.8. Characterization of in vitro differentiated ESCs

In vitro differentiated ESC lines were characterized through the expression of markers of the three germ layers. The primary antibodies used for the detection of these markers were the rabbit polyclonal anti-NESTIN (neuroepithelial stem cell protein; 1:250 Abcam ab5968, Cambridge, UK) of the ectodermal layer, the rabbit polyclonal anti-AFP (alpha-fetoprotein; 1:400 Dako A0008, Sant Cugat del Vallès, Barcelona, Spain) of the endodermal layer and the chicken monoclonal anti- α -SMA (α -smooth muscle actin; 1:400 Sigma-Aldrich A5228, Madrid, Spain) of the mesodermal layer. Secondary antibodies used were chicken anti-mouse IgG Alexa Fluor 488 and goat anti-rabbit IgG Alexa Fluor 594. The immunofluorescence protocol followed was the same as in the characterization of the undifferentiated ESC lines.

5.9. Pseudoblastocyst analysis

Two blastomeres from a 3-cell stage embryo dividing equatorially (2/3E) and meridionally (2/3M) and two blastomeres from a 4-cell stage embryo (2/4) derived from the second 2-cell stage division were cultured in KSOM EmbryoMax® medium at the same time until pseudoblastocysts were formed at 72 h. At this point, pseudoblastocysts were fixed and immunostained for OCT4 and CDX2 markers to analyse the mean number of ICM and TE cells, respectively. Immunofluorescence protocol was exactly the same as the one used for blastocysts but after the incubation with the secondary antibody for the detection of CDX2, a second incubation with a rabbit polyclonal anti-OCT4 antibody (1:50; SantaCruz sc-9081, Heidelberg, Germany) during 1 h and 30 min was performed at room temperature. The detection with the corresponding anti-rabbit secondary antibody at 6 μ g/ml was done during 30 min at room temperature. Afterwards, little pressure was exerted on the samples to make a 2D projection of the pseudoblastocyst's cells to ease cell counting and they were analysed with an epifluorescence microscope Olympus BX41 and an image capture and analyzing system (Isis software 5.3.3 version; Metasystems, Madrid, Spain).

5.10. Statistical analysis

Data were analysed using χ^2 and Fisher exact test for proportions and Student's t-test for mean comparisons using the GraphPad InStat™ program (La Jolla, California, USA). Values with a $P < 0.05$ were considered statistically significant.

6. Acknowledgements

We thank Marc Puigcerver and Jonatan Lucas for their technical assistance and Dra. Gloria Calderón for kindly providing micromanipulation material.

7. Funding source

This work received financial support from the Spanish *Ministerio de Educación y Ciencia* (MEC) projects BIO2006-11792, the *Generalitat de Catalunya* DGR project #2009SGR-00282 and MEC FPU fellowship AP2006-02038.

8. Declaration of interest

Authors declare no financial or other potential conflict of interest.

9. References

- [1] J.B. Gurdon, The generation of diversity and pattern in animal development, *Cell*. 68 (1992) 185-199.
- [2] V.B. Alarcon, Y. Marikawa, Deviation of the blastocyst axis from the first cleavage plane does not affect the quality of mouse postimplantation development, *Biol. Reprod.* 69 (2003) 1208-1212.
- [3] N. Motosugi, T. Bauer, Z. Polanski, D. Solter, T. Hiiragi, Polarity of the mouse embryo is established at blastocyst and is not prepatterned, *Genes Dev.* 19 (2005) 1081-1092.
- [4] R.G. Edwards, H.K. Beard, Oocyte polarity and cell determination in early mammalian embryos, *Mol. Hum. Reprod.* 3 (1997) 863-905.
- [5] B. Goldstein, Cell contacts orient some cell division axes in the *Caenorhabditis elegans* embryo, *J. Cell Biol.* 129 (1995) 1071-1080.
- [6] J.L. Watts, B. Etemad-Moghadam, S. Guo, L. Boyd, B.W. Draper, C.C. Mello, J.R. Priess, K.J. Kemphues, Par-6, a gene involved in the establishment of asymmetry in early *C. elegans* embryos, mediates the asymmetric localization of PAR-3, *Development*. 122 (1996) 3133-3140.
- [7] R. Schnabel, Pattern formation: Regional specification in the early *C. elegans* embryo, *Bioessays*. 18 (1996) 591-594.
- [8] W.M. Deng, D. Zhao, K. Rothwell, M. Bownes, Analysis of P[gal4] insertion lines of *Drosophila melanogaster* as a route to identifying genes important in the follicle cells during oogenesis, *Mol. Hum. Reprod.* 3 (1997) 853-862.
- [9] Y. Yamanaka, A. Ralston, R.O. Stephenson, J. Rossant, Cell and molecular regulation of the mouse blastocyst, *Dev. Dyn.* 235 (2006) 2301-2314.
- [10] R.L. Gardner, The early blastocyst is bilaterally symmetrical and its axis of symmetry is aligned with the animal-vegetal axis of the zygote in the mouse, *Development*. 124 (1997) 289-301.
- [11] M.A. Ciemerych, D. Mesnard, M. Zernicka-Goetz, Animal and vegetal poles of the mouse egg predict the polarity of the embryonic axis, yet are nonessential for development, *Development*. 127 (2000) 3467-3474.
- [12] K. Piotrowska, F. Wianny, R.A. Pedersen, M. Zernicka-Goetz, Blastomeres arising from the first cleavage division have distinguishable fates in normal mouse development, *Development*. 128 (2001) 3739-3748.
- [13] M. Zernicka-Goetz, Patterning of the embryo: The first spatial decisions in the life of a mouse, *Development*. 129 (2002) 815-829.

- [14] T. Fujimori, Y. Kurotaki, J. Miyazaki, Y. Nabeshima, Analysis of cell lineage in two- and four-cell mouse embryos, *Development*. 130 (2003) 5113-5122.
- [15] K. Piotrowska-Nitsche, M. Zernicka-Goetz, Spatial arrangement of individual 4-cell stage blastomeres and the order in which they are generated correlate with blastocyst pattern in the mouse embryo, *Mech. Dev.* 122 (2005) 487-500.
- [16] R.L. Gardner, Specification of embryonic axes begins before cleavage in normal mouse development, *Development*. 128 (2001) 839-847.
- [17] K. Piotrowska, M. Zernicka-Goetz, Role for sperm in spatial patterning of the early mouse embryo, *Nature*. 409 (2001) 517-521.
- [18] R.L. Gardner, Experimental analysis of second cleavage in the mouse, *Hum. Reprod.* 17 (2002) 3178-3189.
- [19] A. Jedrusik, D.E. Parfitt, G. Guo, M. Skamagki, J.B. Grabarek, M.H. Johnson, P. Robson, M. Zernicka-Goetz, Role of Cdx2 and cell polarity in cell allocation and specification of trophectoderm and inner cell mass in the mouse embryo, *Genes Dev.* 22 (2008) 2692-2706.
- [20] N. Plachta, T. Bollenbach, S. Pease, S.E. Fraser, P. Pantazis, Oct4 kinetics predict cell lineage patterning in the early mammalian embryo, *Nat. Cell. Biol.* 13 (2011) 117-123.
- [21] M.E. Torres-Padilla, D.E. Parfitt, T. Kouzarides, M. Zernicka-Goetz, Histone arginine methylation regulates pluripotency in the early mouse embryo, *Nature*. 445 (2007) 214-218.
- [22] M.E. Torres-Padilla, Cell identity in the preimplantation mammalian embryo: An epigenetic perspective from the mouse, *Hum. Reprod.* 23 (2008) 1246-1252.
- [23] Y. Kurotaki, K. Hatta, K. Nakao, Y. Nabeshima, T. Fujimori, Blastocyst axis is specified independently of early cell lineage but aligns with the ZP shape, *Science*. 316 (2007) 719-723.
- [24] L. Chen, D. Wang, Z. Wu, L. Ma, G.Q. Daley, Molecular basis of the first cell fate determination in mouse embryogenesis, *Cell Res.* (2010) 982-993.
- [25] M. Zernicka-Goetz, S.A. Morris, A.W. Bruce, Making a firm decision: multifaceted regulation of cell fate in the early mouse embryo, *Nat. Genet.* 10 (2009) 467-477.
- [26] A.K. Tarkowski, W. Ozdzinski, R. Czolowska, How many blastomeres of the 4-cell embryo contribute cells to the mouse body? *Int. J. Dev. Biol.* 45 (2001) 811-816.
- [27] K. Piotrowska-Nitsche, A. Perea-Gomez, S. Haraguchi, M. Zernicka-Goetz, Four-cell stage mouse blastomeres have different developmental properties, *Development*. 132 (2005) 479-490.

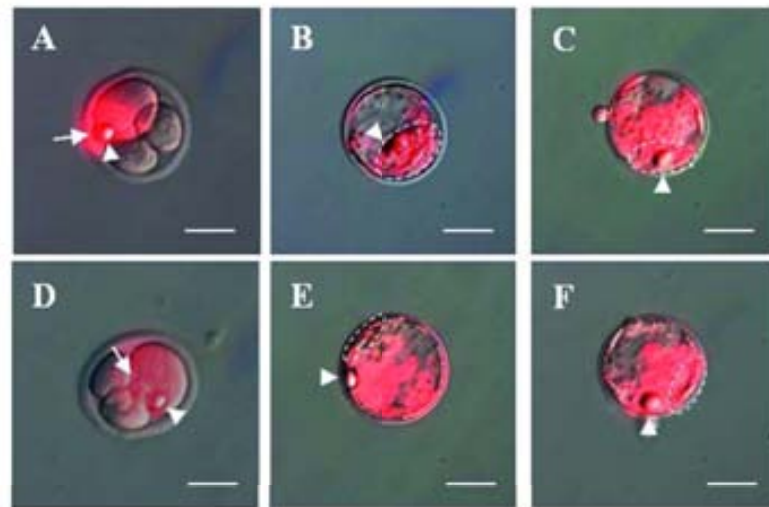
- [28] C. Lorthongpanich, S.H. Yang, K. Piotrowska-Nitsche, R. Parnpai, A.W. Chan, Development of single mouse blastomeres into blastocysts, outgrowths and the establishment of embryonic stem cells, *Reproduction*. 135 (2008) 805-813.
- [29] M. Geens, I. Mateizel, K. Sermon, M. De Rycke, C. Spits, G. Cauffman, P. Devroey, H. Tournaye, I. Liebaers, H. Van de Velde, Human embryonic stem cell lines derived from single blastomeres of two 4-cell stage embryos, *Hum. Reprod.* 24 (2009) 2709-2717.
- [30] H. Van de Velde, G. Cauffman, H. Tournaye, P. Devroey, I. Liebaers, The four blastomeres of a 4-cell stage human embryo are able to develop individually into blastocysts with inner cell mass and trophectoderm, *Hum. Reprod.* 23 (2008) 1742-1747.
- [31] K. Wang, S. Sengupta, L. Magnani, C.A. Wilson, R.W. Henry, J.G. Knott, Brg1 is required for Cdx2-mediated repression of Oct4 expression in mouse blastocysts, *PLoS One*. 5 (2010) e10622.
- [32] R.L. Williams, D.J. Hilton, S. Pease, T.A. Willson, C.L. Stewart, D.P. Gearing, E.F. Wagner, D. Metcalf, N.A. Nicola, N.M. Gough, Myeloid leukaemia inhibitory factor maintains the developmental potential of embryonic stem cells, *Nature*. 336 (1988) 684-687.
- [33] F.A. Brook, R.L. Gardner, The origin and efficient derivation of embryonic stem cells in the mouse, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94 (1997) 5709-5712.
- [34] J. Rossant, Postimplantation development of blastomeres isolated from 4- and 8-cell mouse eggs, *J. Embryol. Exp. Morphol.* 36 (1976) 283-290.
- [35] M.H. Snow, The immediate postimplantation development of tetraploid mouse blastocysts, *J. Embryol. Exp. Morphol.* 35 (1976) 81-86.
- [36] S. Gonzalez, E. Ibanez, J. Santalo, Establishment of mouse embryonic stem cells from isolated blastomeres and whole embryos using three derivation methods, *J. Assist. Reprod. Genet.* (2010) 671-682.
- [37] S. Gonzalez, E. Ibanez, J. Santalo, Influence of E-cadherin-mediated cell adhesion on mouse embryonic stem cells derivation from isolated blastomeres, *Stem Cell. Rev.* (2010) DOI 10.1007/s12015-010-9221-7 (in press).
- [38] T.P. Fleming, Q. Javed, J. Collins, M. Hay, Biogenesis of structural intercellular junctions during cleavage in the mouse embryo, *J. Cell Sci. Suppl.* 17 (1993) 119-125.
- [39] Y. Marikawa, V.B. Alarcon, Establishment of trophectoderm and inner cell mass lineages in the mouse embryo, *Mol. Reprod. Dev.* 76 (2009) 1019-1032.

- [40] P.J. Tesar, Derivation of germ-line-competent embryonic stem cell lines from preblastocyst mouse embryos, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102 (2005) 8239-8244.
- [41] S. Wakayama, T. Hikichi, R. Suetsugu, Y. Sakaide, H.T. Bui, E. Mizutani, T. Wakayama, Efficient establishment of mouse embryonic stem cell lines from single blastomeres and polar bodies, *Stem Cells.* 25 (2007) 986-993.
- [42] S. Koestenbauer, N.H. Zech, H. Juch, P. Vanderzwalmen, L. Schoonjans, G. Dohr, Embryonic stem cells: Similarities and differences between human and murine embryonic stem cells, *Am. J. Reprod. Immunol.* 55 (2006) 169-180.
- [43] A.H. Handyside, J.K. Pattinson, R.J. Penketh, J.D. Delhanty, R.M. Winston, E.G. Tuddenham, Biopsy of human preimplantation embryos and sexing by DNA amplification, *Lancet.* 1 (1989) 347-349.
- [44] G.R. Martin, M.J. Evans, Differentiation of clonal lines of teratocarcinoma cells: Formation of embryoid bodies in vitro, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 72 (1975) 1441-1445.

10. Figures

Figure 1. Panel A. DiI labeling experiments in 3-cell stage embryos dividing in an equatorial (A-C) or meridional orientation (D-F). A. Labeled undivided blastomere labeled from a 3-cell stage embryo dividing in an equatorial orientation. B. Blastocyst with the ICM preferentially labeled (TE fate). C. Equivalent proportion of labeled ICM and TE cells. D. Labeled undivided blastomere from a 3-cell stage embryo dividing in a meridional orientation. E. Blastocyst with the TE preferentially labeled (ICM fate). F. Equivalent proportion of labeled ICM and TE cells. Arrows indicate polar bodies position (Pb out of focus). Arrowheads point to oil droplets remaining in the embryos after dye labeling. ICM of blastocysts are marked with a dotted circle. Panel B. DiI labeled (red) blastocysts immunostained with CDX2 marker (green) and counterstained with Hoechst (blue). A. Red labeling preferentially distributed in the ICM (TE fate). B. Red labeling preferentially distributed in the TE (ICM fate). C. Equivalent proportion of labeled ICM and TE cells. D. Control blastocyst not labeled with DiI immunostained with the ICM marker OCT4 (red). Scale bar: 50 μ m.

Panel A



Panel B

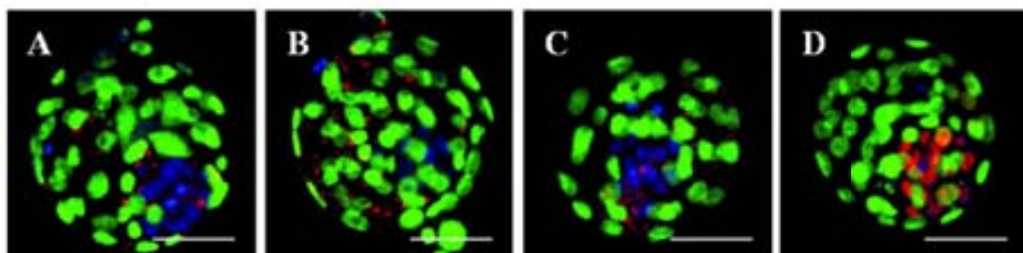


Figure 2. ESC derivation process from 2/3E (A-D), 2/3M (E-H) and 2/4 blastomeres (I-L). A, E, I. Pseudoblastocysts formed at 72 h onto the feeder cell monolayer. B, F, J. 7-day outgrowths. C, G, K. 20-day ESC-like colonies. D, H, L. ESC lines. Scale bar: 100 μ m.

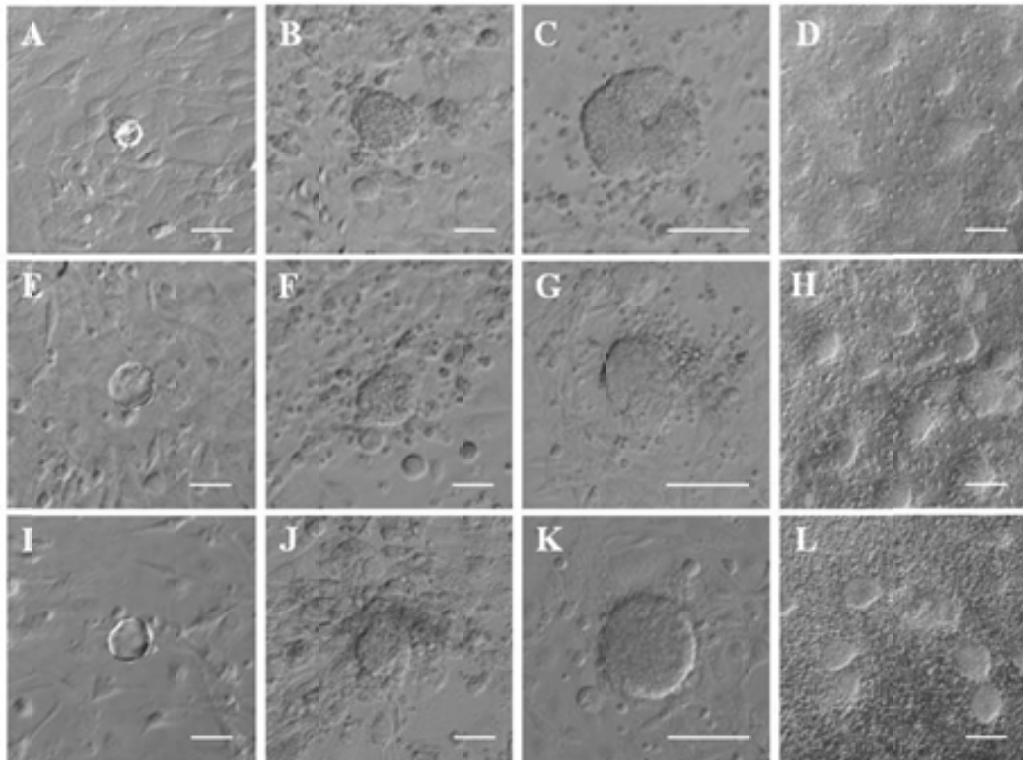
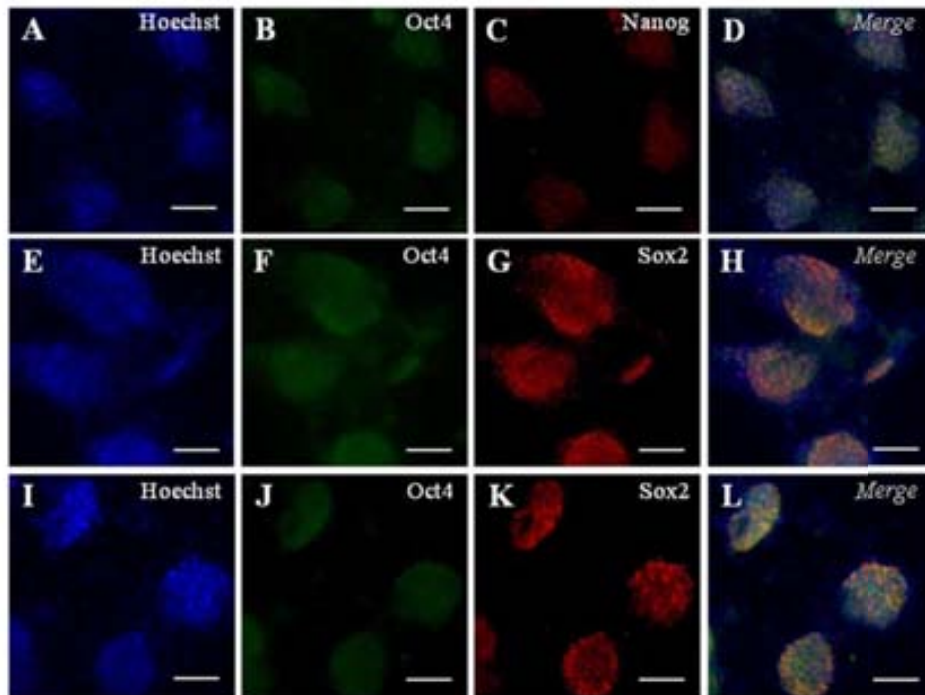


Figure 3. Panel A. Immunofluorescence detection of pluripotency markers in ESC lines derived from 2/3E (A-D), 2/3M (E-H) and 2/4 blastomeres (I-L). A, E, I. Hoechst counterstaining. B, F, J. ESC lines positive for OCT4 pluripotency marker. C, G, K. ESC lines positive for NANOG or SOX2 pluripotency markers. D, H, L. Merge images. Panel B. Immunostaining of an in vitro differentiated ESC line from 2/4 blastomeres showing the expression of OCT4 and Nestin (A), OCT4 and AFP (B) and OCT4 and α -SMA (C). Scale bar: 100 μ m.

Panel A



Panel B

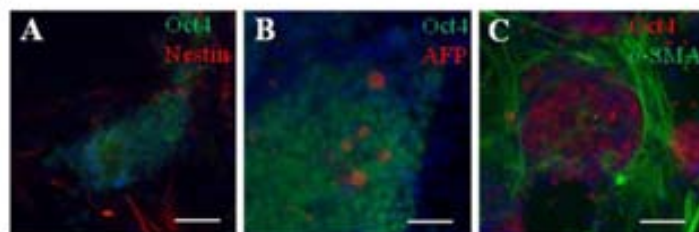


Figure 4. Pseudoblastocyst formation from 2/3E, 2/3M and 2/4 blastomeres. A. 2-cell blastomeres divided in an equatorial orientation in a 3-cell stage embryo. B. 2-cell blastomeres divided in a meridional orientation in a 3-cell stage embryo. C. First dividing 2-cell stage blastomeres from a 3-cell stage embryo (2/3). D. Second dividing 2-cell stage blastomeres inside the zona pellucida (2/4). E. Pseudoblastocyst from 2/3 blastomeres. F. Pseudoblastocyst from 2/4 blastomeres inside the zona pellucida. Arrowheads indicate polar body position. Arrows point to ICM. Scale bar: 50 μ m.

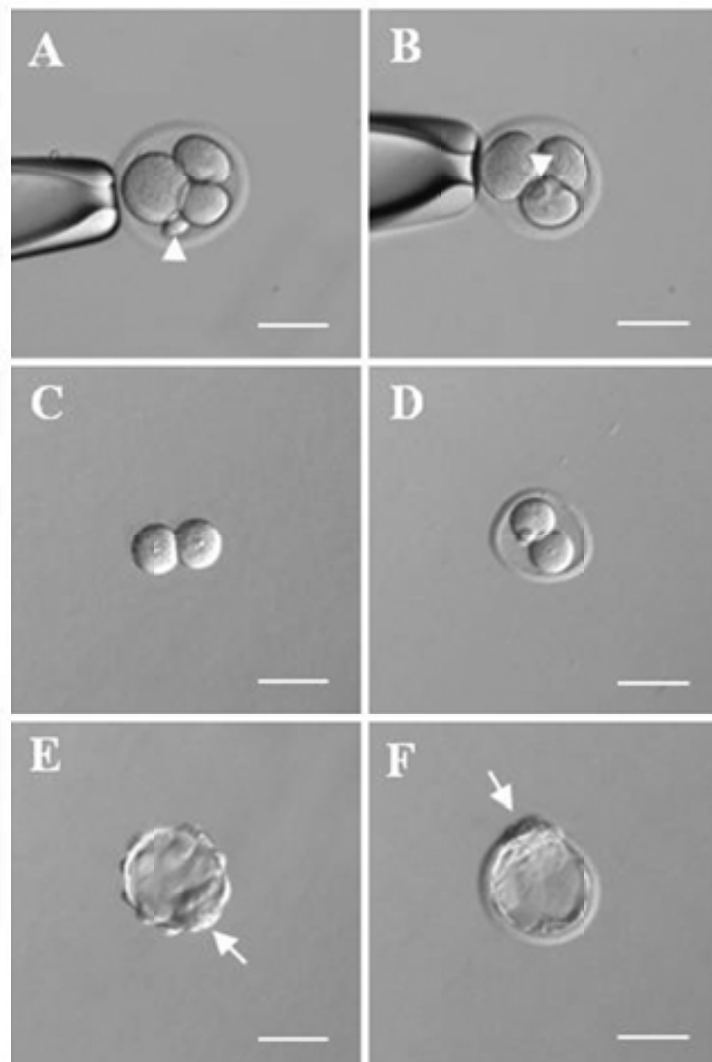
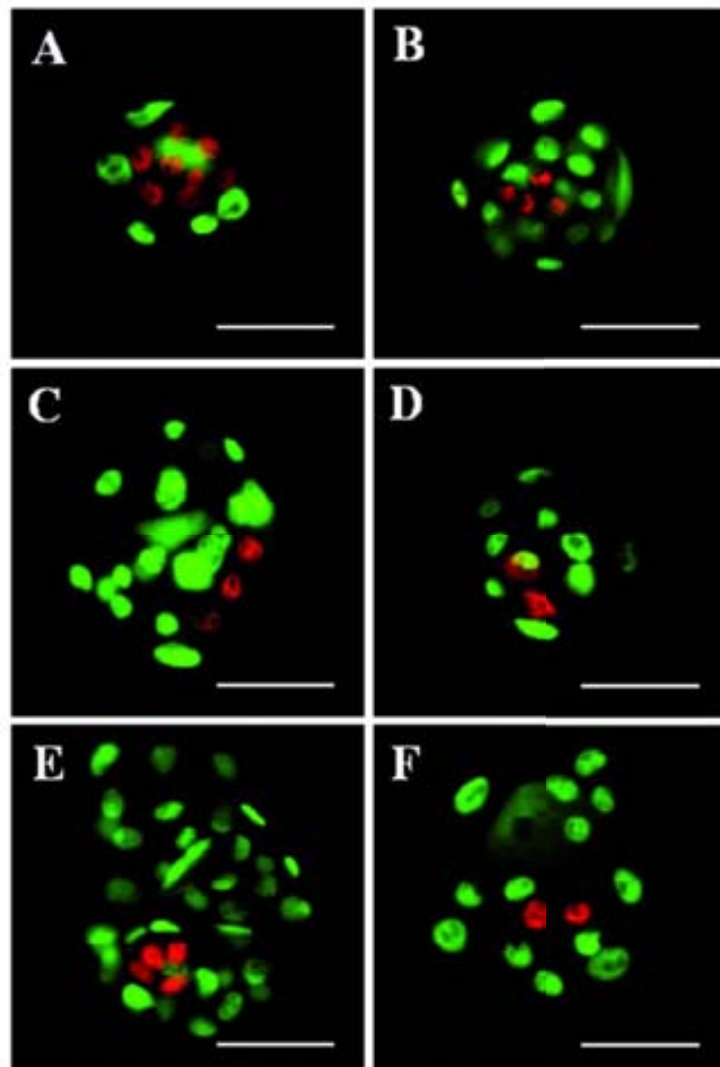


Figure 5. Immunostaining of pseudoblastocyst for the detection of the ICM (OCT4, red) and TE (CDX2, green). A-B. Pseudoblastocysts from 2/3E blastomeres. C-D. Pseudoblastocysts from 2/3M blastomeres. E-F. Pseudoblastocysts from 2/4 blastomeres. Scale bar: 50 μ m.



11. Tables

Table 1. Distribution of the red DiI in 129/Sv x C57Bl/6 F1 mouse blastocysts according to the orientation of the division plane.

| Embryo groups | n | % labeled survived embryos (n) | n analysed blastocysts | % ICM fate (n) | % TE fate (n) | % ICM and TE fate (n) | Mean of ICM cells (\pm SEM) | Mean of TE cells (\pm SEM) | Mean of total cells (\pm SEM) |
|-----------------------------|-----|--------------------------------|------------------------|-----------------------|------------------------|------------------------|--------------------------------|-------------------------------|----------------------------------|
| Control 2-cell | 10 | - | 10 | - | - | - | 13.0 (\pm 0.68) | 42.7 (\pm 1.81) | 55.7 (\pm 2.27) |
| Labeled 3-cell (equatorial) | 109 | 51.4 (56) | 22 | 13.6 (3) ^a | 50.0 (11) ^b | 36.4 (8) ^{ab} | 13.7 (\pm 0.71) | 35.8 (\pm 2.61) | 49.54 (\pm 2.35) |
| Labeled 3-cell (meridional) | | | 24 | 37.5 (9) ^a | 16.7 (4) ^a | 45.8 (11) ^a | 12.9 (\pm 0.68) | 36.3 (\pm 1.92) | 49.29 (\pm 1.92) |

^{a,b} Values with different superscripts within the same row differ significantly ($p < 0.05$). For means comparison, values within the same column do not differ significantly.

Table 2. Mouse embryonic stem cell derivation efficiency from different number of isolated blastomeres, embryonic stage and orientation of the cleavage plane.

| Derivation group | n | % outgrowths (n) | % ESC lines derived and positive for pluripotency markers (n) |
|------------------|-----|-------------------------|---|
| 1/3 | 38 | 71.0 (27) ^a | 10.5 (4) ^{ab} |
| 1/4 | 36 | 69.3 (23) ^a | 8.3 (3) ^{ab} |
| 2/3 (E + M) | 104 | 86.5 (90) ^b | 18.3 (19) ^{bc} |
| 2/3E | 34 | 88.6 (31) ^b | 17.6 (6) ^{bc} |
| 2/3M | 41 | 90.2 (37) ^b | 14.6 (6) ^{ab} |
| 2/4 | 112 | 92.0 (103) ^b | 20.5 (23) ^{bc} |
| 4/4 | 76 | 92.1 (70) ^b | 54.0 (24) ^c |

^{a,b,c} Values with different superscripts within the same column differ significantly ($p < 0.05$).

Table 3. Analysis of the mean number of ICM, TE and total cells in mouse pseudoblastocysts derived from 2/3E, 2/3M and 2/4 blastomeres.

| Blastomere group | n | Mean number ICM cells (\pm SEM) | Mean number TE cells (\pm SEM) | Mean number total cells (\pm SEM) |
|------------------|----|---------------------------------------|--------------------------------------|---|
| 2/3E | 37 | 4.9 (\pm 0.36) | 14.6 (\pm 1.41) | 19.5 (\pm 1.59) |
| 2/3M | 41 | 4.7 (\pm 0.34) | 17.7 (\pm 1.13) | 22.4 (\pm 1.31) |
| 2/4 | 64 | 5.2 (\pm 0.34) | 17.4 (\pm 1.13) | 22.3 (\pm 1.29) |

Values within the same column do not differ significantly.

DISCUSSIÓ GENERAL

El procés de derivació de línies d'ESCs depèn de tota una sèrie de factors relacionats tant amb el desenvolupament preimplantacional com amb el propi procés d'establiment de les línies. L'estudi d'aquests factors representa un aspecte molt important per tal d'optimitzar la metodologia de derivació i d'aquesta manera incrementar l'eficiència de producció de les línies d'ESCs, ja que fins al moment, i malgrat l'increment en el nombre de línies derivades, les freqüències d'establiment continuen sent moderades. A més, atès que l'estat pluripotent *in vivo* és breu, la derivació de cèl·lules pluripotents *in vitro*, concretament de les ESCs, permetria tenir un model d'estudi dels mecanismes mitjançant els quals es manté aquest estat i les possibles diferències pel que fa a la pluripotència entre els estadis del desenvolupament embrionari preimplantacional.

La present tesi doctoral es centra en l'anàlisi de l'eficiència de derivació de mESCs a partir de blastòmers aïllats procedents del estadis embrionaris de 4 i 8 cèl·lules. S'ha determinat la importància de diferents paràmetres relacionats amb aquests estadis per tal d'incrementar l'eficiència d'establiment de les línies de mESCs. Concretament, s'ha analitzat la influència que tenen el nombre de cèl·lules aïllades, el volum cel·lular, l'estadi embrionari, el mètode de derivació emprat, les unions intercel·lulars en estadi de 8 cèl·lules i, finalment, la predeterminació primerenca en el destí dels blastòmers en estadi de 4 cèl·lules. La derivació de mESCs també s'ha fet a partir dels estadis embrionaris de mòrula i blastocist com a controls en l'anàlisi de la influència de l'estadi embrionari i també com a representats d'estadis embrionaris tardans del desenvolupament embrionari preimplantacional.

L'estudi de la influència dels factors esmentats ens ha permès determinar, d'entre els estadis embrionaris de 4 i 8 cèl·lules analitzats, quin és el que ens aporta una millor eficiència d'establiment i amb quines condicions concretes de derivació hem de procedir per tal d'augmentar l'eficiència de producció de mESCs a partir de blastòmers aïllats, sense comprometre la viabilitat de l'embrió original a partir del qual se'n deriven les línies. Aquest aspecte és d'especial interès en el camp de la derivació de línies de hESCs, ja que permetria obtenir línies d'ESCs específiques de pacients amb una elevada predisposició a patir determinades malalties típicament d'origen genètic i, així, poder aplicar tractaments futurs de medicina regenerativa sense el rebuig immunitari que comportaria un al·lotransplantament. Així, aquests estudis de derivació en el model murí constituïrien un avenç en ciència bàsica amb una futura aplicabilitat en la producció de línies de hESCs específiques de pacient. De fet, la derivació d'iPSCs representa un gran avenç en la generació d'aquestes cèl·lules específiques de pacient per a possibles malalties que requereixin d'un transplantament. Però les iPSCs es classifiquen com a un subtipus de

cèl·lules pluripotents, diferents de les ESCs, com a conseqüència de les divergències trobades entre ambdós tipus cel·lulars arrel de nombrosos estudis. En aquest sentit, s'ha vist que les iPSCs humanes i de ratolí mostren un patró d'expressió diferent al de les ESCs, però que tendeixen a assemblar-se més després d'un període llarg en cultiu (Chin *et al.*, 2009). Les iPSCs humanes tenen un perfil global de metilació del genoma en les illes CpG molt similar però no idèntic al de les ESCs, de forma que alguns gens no són reprogramats i d'altres ho fan de forma incorrecta (Doi *et al.*, 2009). A més, s'ha vist que les iPSCs mostren una eficiència de diferenciació més baixa i que aquestes cèl·lules diferenciades mostren una taxa d'expansió menor, un increment d'apoptosi i una senescència prematura (Feng *et al.*, 2010). Per tots els motius exposats, abans que les línies d'iPSCs es puguin aplicar en medicina regenerativa és necessari trobar la causa i el grau d'aquestes anomalies, i si tenen el seu origen en la utilització de diferents metodologies de reprogramació o si pel contrari és intrínsec a la biologia d'aquestes cèl·lules. Per tant, sembla que de moment les ESCs són les millors candidates per tal de generar cèl·lules específiques de pacient per a tractaments futurs de medicina regenerativa i, per tant, cal continuar avançant en el seu estudi.

L'estudi del mètode de derivació més eficient en termes de producció de mESCs, analitzat en tots els estadis embrionaris descrits i també a partir de diferent nombre de blastòmers aïllats en la present tesi doctoral, va mostrar que l'eficiència d'establiment de les línies de mESCs era més elevada utilitzant el mètode de derivació en un medi de cultiu definit. En aquest mètode, el medi de cultiu és suplementat amb KSR, que aporta unes condicions de cultiu més definides, evitant així la presència de FCS que conté nombrosos factors de creixement i citoquines que podrien induir la diferenciació espontània de les mESCs (Bryja *et al.*, 2006; Lee *et al.*, 2006; Wakayama *et al.*, 2007). A més, a partir de la comparació de les tres estratègies de derivació descrites, es va determinar que l'adhesió inicial dels blastòmers o embrions al substrat de derivació, analitzat en el mètode de derivació amb una adhesió prèvia al substrat, no incrementava l'eficiència de derivació de les línies sinó que era el contacte inicial dels blastòmers amb la monocapa de fibroblasts inactivats en co-cultiu el que era necessari en l'establiment de les línies. El mètode de derivació amb una adhesió prèvia al substrat, a més, comporta un increment en la manipulació embrionària respecte als altres dos mètodes, que podria dificultar la derivació de les mESCs. Aquestes afirmacions provenen de la comparació del mètode clàssic o estàndard de derivació amb el mètode d'adhesió prèvia al substrat, que comparteixen les mateixes condicions de cultiu i que indica que el contacte inicial amb la monocapa de MEFs afavoreix que els embrions o blastòmers aïllats s'enganxin, evitant la diferenciació espontània cap a cèl·lules trofoblàstiques en aquestes condicions de cultiu en particular. En el mètode de derivació en un medi de cultiu

definit, en canvi, s'ha observat que la majoria de grups de derivació no s'enganxen a la monocapa de MEFs fins que no assoleixen l'estadi de pseudoblastocist. Per tant, en aquest cas no es pot afirmar que el contacte directe inicial amb les MEFs sigui crucial per incrementar l'eficiència de derivació, ja que aquest mètode és el que ha aportat la major producció de línies de mESCs. Així, per tots els motius esmentats, sembla que les condicions de cultiu representen un aspecte molt més important a l'hora d'augmentar l'eficiència d'establiment de les línies i que estaria per sobre de la influència del contacte inicial amb la monocapa de MEFs.

La influència del nombre de blastòmers i/o del volum cel·lular amb què es comença el procés de derivació es pot relacionar amb dos aspectes diferents. En primer lloc, el fet de tenir un nombre de blastòmers superior a un per iniciar el procés de derivació implica l'existència de contactes o unions específiques entre blastòmers, en funció de l'estadi embrionari dels blastòmers amb què s'inicia el procés. Aquests contactes entre blastòmers mitjançant una simple aposició de membranes o a través d'unions intercel·lulars específiques implicaria un flux d'informació entre blastòmers de manera que n'asseguraria la proliferació i, a més, la posició d'un blastòmer respecte un altre o la distribució de les unions en la superfície cel·lular en funció del nombre de blastòmers adjacents pot suposar un redireccionament del destí del blastòmer cap la formació de cèl·lules del tipus ICM o TE. En segon lloc, un nombre més elevat de blastòmers implica una major probabilitat d'agafar-ne amb una predeterminació més definida a formar cèl·lules de la ICM. Finalment, la combinació d'ambdós factors en grups de derivació amb més blastòmers aïllats farà que els pseudoblastocists que se'n derivin continguin més cèl·lules de la ICM. Aquest increment en el nombre de cèl·lules de la ICM afavorirà la derivació de línies de mESCs.

En relació amb la influència dels contactes i la comunicació entre blastòmers en el procés de derivació de mESCs, és important tenir en compte que el nombre de blastòmers aïllats i el volum embrionari són dos aspectes dissociables en l'anàlisi de la influència d'aquest paràmetre en l'eficiència del procés. Dades procedents dels nostres experiments pel que fa a la comparació de grups de derivació combinant un major o menor nombre de blastòmers aïllats o volum embrionari han aportat dades sobre la importància de la comunicació entre blastòmers i la influència d'aquests en l'establiment de línies de mESCs. En aquest sentit, s'ha vist que un increment del volum cel·lular però no del nombre de blastòmers aïllats no aporta un increment en l'eficiència de derivació de mESCs. Aquest raonament prové de la comparació dels grups de derivació de 1/4 vs. 1/8 i 2/4 vs. 2/8, que pels tres mètodes de derivació han mostrat una eficiència d'establiment de línies equivalent. En canvi, un increment en el nombre de blastòmers aïllats partint d'un mateix

volum embrionari sí aporta una major producció de línies d'ESCs. Aquest fet s'ha demostrat a través de les comparacions dels grups de derivació 1/4 vs. 2/8 i 2/4 vs. 4/8 en la majoria dels mètodes de derivació provats. Així, sembla que l'existència de contactes i comunicació entre els blastòmers afavoriria la derivació de mESCs. Aquest raonament s'ha vist reforçat, a més, a través de l'addició de la proteïna química E-cad-Fc al cultiu de blastòmers únics aïllats en estadi de 8 cèl·lules (1/8). Mentre que l'eficiència d'establiment a partir del grup de derivació de 1/4 no ha superat el 12%, el grup de 1/8 en presència d'E-cad-Fc, que simularia els contactes entre blastòmers germans, ha aportat una eficiència del 33.6%, indicant novament la importància de la comunicació i els contactes entre blastòmers per tal d'incrementar l'eficiència del procés de derivació de mESCs. Malgrat totes aquestes dades, en aquestes comparacions també intervé un altre factor com és la influència de l'estadi embrionari a partir del qual s'inicia la derivació, per tant, cal analitzar la influència d'aquests contactes dins d'un mateix estadi embrionari.

Una explicació sobre la influència dels contactes entre blastòmers en l'eficiència de derivació de les línies de mESCs prové del recent descobriment de la via de senyalització *Hippo* en l'especificació del TE dels embrions preimplantacionals de ratolí (Nishioka *et al.*, 2009). La via de senyalització *Hippo* s'activa en resposta al contacte cel·lular mitjançant les unions adherents amb E-cadherina, de manera que la proteïna Lats fosforila YAP1, coactivador de Tead4, i YAP1 és exclòs del nucli. Com a conseqüència, Tead4 es manté inactiu i no activa la transcripció de CDX2. S'ha vist que el grau de contacte entre els blastòmers pot influir la senyalització a través d'aquesta via *Hippo*. En aquest sentit, els contactes intercel·lulars a través d'E-cadherina homogenis per tota la superfície promouen l'activació de la via *Hippo* que condueix a una davallada en els nivells de CDX2 i, com a conseqüència, aquests blastòmers interns es localitzaran en la ICM del blastocist. En canvi, en els blastòmers externs que presenten una distribució heterogènia d'aquests contactes, YAP1 desfosforilat pot activar la transcripció de CDX2 juntament amb Tead4, dirigint d'aquesta manera el destí cel·lular cap a la formació de TE. L'existència d'aquesta via podria explicar per què els blastòmers procedents de l'estadi de 8 cèl·lules amb una distribució simètrica d'E-cadherina, similar a la que s'aconsegueix en afegir-la experimentalment, proporcionen un increment en l'eficiència de derivació de mESCs.

Estudis realitzats en aquesta tesi doctoral demostren que la utilització d'un nombre diferent de blastòmers aïllats procedents d'un mateix estadi embrionari es tradueix directament en l'eficiència d'establiment de les línies de mESCs. La utilització de 1 o 2 blastòmers aïllats en estadi de 4 cèl·lules no va mostrar diferències en l'eficiència de derivació de les línies en cap del tres mètodes de derivació comparats. En canvi, en estadi de 8 cèl·lules, la màxima eficiència de

derivació s'observà amb la utilització de 3 o 4 blastòmers aïllats en els mètodes estàndard i de cultiu en medi definit. No es van trobar resultats concloents pel que fa al mètode de derivació amb una adhesió prèvia al substrat. Així, sembla que a mesura que s'augmenta el nombre de blastòmers aïllats dins el mateix estadi embrionari, la tendència és cap a un increment en l'eficiència de derivació de les línies de mESCs. Tal com s'ha comentat anteriorment, el fet de partir d'un nombre més gran de blastòmers implica l'existència de contactes i una major probabilitat de que algun d'aquests blastòmers tingui un destí dirigit cap a la formació de la ICM, a la vegada que també els pseudoblastocists derivats d'aquests blastòmers aïllats contindran més cèl·lules de la ICM i, per tant, un potencial major de produir línies de mESCs. Així, dins d'un mateix estadi embrionari, els contactes entre blastòmers també influeixen la derivació de mESCs.

El potencial de diferenciació dels blastòmers aïllats i el nombre de cèl·lules de la ICM que contenen els pseudoblastocists que se'n deriven són dos aspectes que estan íntimament lligats amb la capacitat de derivació d'ESCs a partir de blastòmers aïllats d'estadis embrionaris diferents. Així, blastòmers més primerencs en estadi de 2-4 cèl·lules es consideren totipotents, ja que sembla que encara retenen un ampli potencial per tal de formar tots els tipus cel·lulars de les tres làmines embrionàries, a banda de teixit extraembrionari. Per contra, els blastòmers de l'estadi de 8 cèl·lules es consideren pluripotents i, per tant, retenen un potencial de diferenciació més reduït. Segons això, els blastòmers de l'estadi de 4 cèl·lules haurien de produir una major eficiència de producció de línies de mESCs (Tesar, 2005; Wakayama *et al.*, 2007). Per altra banda, els blastòmers d'estadis embrionaris més tardans tenen cèl·lules amb un fenotip més semblant al de les cèl·lules de la ICM del blastocist, de manera que aquest podria ser un altre aspecte que afavoriria la producció d'ESCs. Pel que respecta al nombre de cèl·lules de la ICM en els pseudoblastocists originats a partir dels blastòmers aïllats, se sap que el nombre de divisions embrionàries que es produeixen fins a la formació del blastocist és un fenomen ben programat. Prova d'això és que la compactació embrionària s'assoleix al cap d'unes hores d'haver-se produït la fecundació en funció de l'espècie (Edwards i Beard, 1997), independentment de l'estadi embrionari del què provenguin els blastòmers aïllats. En aquest sentit, els blastòmers aïllats procedents de l'estadi de 4 cèl·lules arriben a l'estadi de pseudoblastocist amb un major nombre de cèl·lules de la ICM que no els que provenen de l'estadi de 8 cèl·lules. Així, encara és un aspecte de controvèrsia el fet de si els blastòmers aïllats procedents d'estadis embrionaris més primerencs aporten una major eficiència d'establiment de línies d'ESCs degut a la totipotencialitat dels blastòmers i a la major quantitat de cèl·lules de la ICM que poden acumular fins assolir l'estadi de blastocist, o si pel contrari, un fenotip més definit cap a cèl·lules del tipus ICM en els

blastòmers aïllats d'estadis embrionaris més tardans és més rellevant a l'hora de derivar les línies de mESCs. Aquesta última qüestió es discutirà detalladament més endavant.

Continuant amb l'eficiència de derivació de mESCs a partir de blastòmers aïllats d'estadis embrionaris diferents, la utilització d'un mateix nombre de blastòmers aïllats d'estadis embrionaris diferents (1/4 vs 1/8 i 2/4 vs 2/8) no va revelar diferències en l'eficiència de derivació de mESCs, tal com s'ha indicat anteriorment, malgrat que els percentatges de derivació van ser variables segons el mètode de derivació emprat. Per tant, la influència de l'estadi embrionari va ser difícil d'analitzar a partir dels blastòmers aïllats. Potser els blastòmers un cop aïllats tenen una major plasticitat i, per tant, un potencial de diferenciació major (Cockburn i Rossant, 2010) que pot amagar les diferències pel que fa a la producció de línies de mESCs a partir d'estadis embrionaris diferents. En aïllar 2 blastòmers, en canvi, la influència de l'estadi embrionari es podria analitzar amb una major fidelitat degut a que la plasticitat dels blastòmers no seria tan elevada com a conseqüència de les unions intercel·lulars. En aquest cas, semblaria lògic pensar que els blastòmers d'ambdós estadis produirien mESCs amb una eficiència que dependria de la posició que ocupessin dins l'embrió i, per tant, de la predeterminació en el destí cap a ICM o TE que tinguessin, de manera que l'aïllament d'una o altra parella de blastòmers tindria conseqüències en l'eficiència de derivació de les línies de mESCs.

L'estudi de la influència que té l'estadi embrionari en l'eficiència de derivació de línies d'ESCs es pot analitzar amb més fidelitat fent servir embrions sencers, ja que el nombre de blastòmers utilitzats no és un factor limitant i, per tant, la importància de l'estadi es pot analitzar més acuradament. En aquest cas no es té en compte la viabilitat de l'embrió a partir del qual se'n deriven les línies, ja que aquest s'utilitza en la seva totalitat. Aquesta aproximació és important a nivell experimental però no seria tan interessant de cara a una possible aplicabilitat en el camp de la medicina regenerativa, ja que no es podrien produir ESCs específiques de pacient sinó que aquestes ESCs passarien a formar part d'un banc de línies i només s'utilitzarien en cas de trobar un pacient histològicament compatible. Resultats derivats dels nostres experiments indiquen una major eficiència de derivació a partir d'estadis embrionaris posteriors a la compactació embrionària, per tant, a partir de la mòrula i el blastocist. Aquestes dades es poden relacionar amb la qüestió de si és millor tenir blastòmers amb un potencial major (totipotents) o si pel contrari un fenotip més definit cap a cèl·lules de la ICM aportaria un increment en la producció de línies d'ESCs. Les nostres dades apunten a que blastòmers amb un destí més marcat cap a cèl·lules de la ICM són les que produirien una major eficiència de derivació de mESCs.

Les línies d'ESCs poden presentar propietats específiques en funció del seu origen, és a dir, segons l'estadi embrionari a partir del qual s'han derivat. D'aquí l'interès en l'establiment de línies d'ESCs a partir d'estadis embrionaris diferents per tal d'estudiar les regles que dicten l'estat pluripotent dins de cadascun d'aquests estadis del desenvolupament preimplantacional. En la present tesi doctoral es proposa que els estadis embrionaris postcompactacionals i, per tant, més propers a la formació del blastocist, aporten un increment en l'eficiència de derivació de línies de mESCs com a conseqüència de l'establiment d'un patró transcripcional i epigenètic més estable que no el que s'observa en els blastòmers d'estadis embrionaris primerencs.

Pel que respecta a l'expressió de marcadors de pluripotència durant el desenvolupament embrionari preimplantacional, se sap que l'expressió d'OCT4 no mostra una variabilitat entre els blastòmers de l'embrió al llarg del desenvolupament, però la seva restricció en la ICM del blastocist es creu que podria constituir un fet clau en l'increment de l'eficiència de derivació de hESCs (Chen *et al.*, 2009). En canvi, l'expressió de CDX2 i Nanog presenta una distribució molt més variable en els blastòmers durant el desenvolupament preimplantacional (Dietrich i Hiiragi, 2007). La variabilitat en l'expressió de CDX2 correlaciona amb la separació dels blastòmers en la part externa i interna de l'embrió. En canvi, la distribució heterogènia de Nanog és independent de la localització interna o externa dels blastòmers, de manera que la seva sobreexpressió en determinats blastòmers no seria indicatiu del seu destí cap a la ICM del blastocist. Per tant, abans dels estadis de mòrula i blastocist el perfil transcripcional dels blastòmers és molt variable, i aquest s'homogeneïtza a mesura que incrementa el nombre de divisions simètriques i asimètriques. Aquestes divisions conduiran a la localització de més blastòmers a una posició determinada dins l'embrió, i com a conseqüència els blastòmers més propers compartiran un ambient comú determinat que farà que les poblacions cel·lulars es defineixin cada vegada més. L'increment en l'expressió de Nanog en les cèl·lules de la ICM podria augmentar l'eficiència de derivació d'ESCs. Per contra, Galan i col·laboradors (2010) van observar diferències en l'expressió de diferents gens en comparar blastòmers aïllats, cèl·lules de la ICM i del TE que indicaren una expressió gènica diferencial en els blastòmers i en el blastocist. Concretament van veure que l'expressió de la telomerasa, pròpia de cèl·lules immortalitzades, i del gen *c-Myc*, que presenta un efecte activador de la telomerasa, estaven sobreexpressats en els blastòmers respecte a les cèl·lules de la ICM. Així, sembla lògic pensar que en aquest cas els blastòmers d'estadis embrionaris previs al blastocist aportarien una eficiència de derivació major que el blastocist.

Pel que fa al perfil epigenètic dels blastòmers durant el desenvolupament embrionari preimplantacional, se sap que al llarg del desenvolupament es produeix una desmetilació

progressiva del genoma fins a l'estadi de mòrula i en l'estadi de blastocist es torna a produir una metilació *de novo* molt més acusada en la ICM del ratolí que en el TE i que, novament, dona lloc a dues poblacions cel·lulars ben diferenciades. Existeixen altres modificacions epigenètiques que també diferencien les cèl·lules de la ICM i el TE un cop assolit l'estadi de blastocist. Així, en l'estadi de blastocist les marques epigenètiques establertes caracteritzen dues poblacions cel·lulars ben diferenciades que podria fer que aquest estadi proporcionés eficiències de derivació de mESCs més elevades com a conseqüència d'aquest estat pluripotent més definit pel que fa a l'epigenètica. Malgrat això, se sap que existeixen marques epigenètiques característiques en estadis embrionaris primerencs que podrien guiar el destí dels descendents d'aquests blastòmers ja en estadis primerencs del desenvolupament (Torres-Padilla *et al.*, 2007).

A més, s'ha vist que existeixen altres factors importants en l'eficiència de derivació d'ESCs a partir d'estadis embrionaris diferents. Concretament, el cultiu de la ICM provoca una davallada en la generació de cèl·lules trofoblàstiques generades per diferenciació espontània (Johnson i McConnell, 2004). Per tant, seria lògic pensar que la ICM aporta un augment en l'eficiència de derivació respecte a altres estadis embrionaris. A banda, també es creu que les vies de senyalització podrien jugar un paper important com a conseqüència de l'establiment de poblacions cel·lulars que ocupen una posició fixa en l'embrió un cop assolits els estadis de mòrula i blastocist i que faria que aquests blastòmers rebessin una senyalització concreta en funció d'aquesta posició.

Així, per tots els motius exposats, sembla que la ICM del blastocist constitueix la màxima representació de la pluripotència de l'embrió preimplantacional i, per tant, tindria sentit pensar que a mesura que els blastòmers adquireixen un fenotip més semblant al de la ICM, amb un perfil transcripcional i epigenètic més fixat, l'eficiència de derivació de les línies d'ESCs incrementa.

Malgrat tot això, i tal com s'ha apuntat anteriorment, actualment se sap que els blastòmers individuals procedents d'un mateix estadi embrionari poden mostrar potencials de diferenciació diferents entre ells. Aquest fet és especialment rellevant en l'estadi embrionari de 4 cèl·lules, que durant molts anys s'havia considerat com totipotent pel que fa al potencial de cadascun dels blastòmers que el constitueixen. Així, aquests blastòmers procedents de l'estadi de 4 cèl·lules podrien tenir una predeterminació primerenca en el seu destí cap al TE o la ICM del blastocist (Piotrowska *et al.*, 2001; Piotrowska i Zernicka-Goetz, 2001 i 2005; Gardner, 2002; Fujimori *et al.*, 2003). Aquestes observacions s'han reforçat a través d'estudis que demostren que aquests blastòmers tenen un perfil transcripcional i epigenètic diferent (Torres-Padilla *et al.*, 2007;

Jedrusik *et al.*, 2008 i 2010; Pachta *et al.*, 2011). Nosaltres hem corroborat que el destí dels blastòmers dins l'embrió en estadi de 4 cèl·lules podria estar prefixat i, per tant, es podria predir la seva localització final en la ICM o el TE del blastocist. Degut a l'interès de derivar línies d'ESCs a partir de blastòmers aïllats d'estadis embrionaris primerencs, resulta molt important determinar si l'aïllament d'un blastòmer concret de l'embrió pot incrementar l'eficiència del procés de derivació. Tal com s'havia proposat anteriorment (Van de Velde *et al.*, 2008; Cockburn i Rossant, 2010), els nostres experiments han posat de manifest que l'aïllament dels blastòmers en estadi de 4 cèl·lules provoca un redireccionament del destí dels blastòmers, de manera que aquests tindrien la capacitat de contribuir a la ICM o el TE d'igual manera. Així, els blastòmers aïllats de l'embrió de ratolí en estadi de 4 cèl·lules mostren una gran plasticitat en el seu potencial de diferenciació, de manera que l'aïllament d'un blastòmer concret de l'embrió no representa una millora per tal d'incrementar l'eficiència d'establiment de línies de mESCs.

En aquest sentit, se sap que l'ambient que comparteixen els blastòmers estructurats dins l'embrió constitueix un factor clau i decisiu en el seu patró de desenvolupament. En estadi de 4 cèl·lules, els blastòmers contacten mitjançant una simple aposició de membranes, de manera que encara no presenten unions específiques (Fleming *et al.*, 1993). La plasticitat en el patró de desenvolupament dels blastòmers com a conseqüència de l'aïllament podria estar íntimament lligada a l'establiment d'unions específiques entre blastòmers en estadis embrionaris posteriors, de forma que l'aïllament pot tenir conseqüències en l'establiment de les unions intercel·lulars següents. Un cop els blastòmers aïllats han fet la primera divisió, l'estructuració de les unions intercel·lulars, concretament les formades per E-cadherina, es produirà d'una forma diferent a la distribució original en l'embrió, de tal manera que les unions formades *de novo* poden ser el desencadenant en la redirecció del destí d'aquests blastòmers aïllats.

Aquest efecte de posició i la influència que constitueixen les unions en la predeterminació del destí dels blastòmers també s'ha comprovat a través dels experiments realitzats sobre la influència de les unions amb E-cadherina en la derivació de les ESCs. És ben conegut que els blastòmers interiors de l'embrió en estadi de 8 cèl·lules tardà i en la mòrula, que presenten una distribució uniforme d'E-cadherina en la seva superfície, estan destinats a formar part de la ICM del blastocist (Vestweber *et al.*, 1987; Nishioka *et al.*, 2009). A més, a través de les dades provinents dels nostres experiments hem confirmat la implicació de l'E-cadherina en la proliferació dels blastòmers en estadi de 8 cèl·lules, tal com s'havia apuntat anteriorment (Steinberg i McNutt, 1999). En aquest sentit, amb la unió de la proteïna quimèrica E-cad-Fc als blastòmers únics aïllats en estadi de 8 cèl·lules hem afavorit que aquests blastòmers experimentin

un increment en la taxa de divisió i que adquireixin una distribució homogènia d'E-cadherina per tota la superfície, determinant així que tinguin un fenotip tipus ICM. Aquest fet correlaciona amb l'estudi de la predeterminació del destí dels blastòmers en estadi de 4 cèl·lules en què sembla que només els blastòmers dins l'embrió tenen el seu destí prefixat. En canvi, quan s'aïllen, el patró de desenvolupament es reajusta. L'E-cad-Fc indica als blastòmers una posició fictícia que ocuparien si estiguessin estructurats formant part de l'interior de l'embrió.

En resum, les unions intercel·lulars específiques determinen que els blastòmers ocupin una posició definida dins l'embrió. Aquesta posició i els contactes que s'estableixen amb els blastòmers adjacents és un aspecte important en la determinació del destí final en l'estadi de blastocist. D'aquesta manera, la predeterminació primerenca del destí dels blastòmers en estadi de 4 cèl·lules pot ser un preludi del que succeirà més tard en el desenvolupament. Els factors que determinen que només alguns blastòmers en estadi de 4 cèl·lules mantinguin un potencial major i, per tant, que es localitzin en la futura ICM del blastocist, poden fer que aquests blastòmers tinguin un paper concret en l'estadi embrionari posterior. En aquest sentit, l'aïllament en estadi de 4 cèl·lules distorsionaria el patró normal de desenvolupament de manera que els blastòmers aïllats un cop dividits, que es trobarien en un estadi equivalent al de 8 cèl·lules, no seguirien el mateix patró, ja que s'haurien esborrat les directrius que guien el destí durant el desenvolupament embrionari normal.

L'anàlisi global dels estudis fets en la present tesi doctoral ha permès clarificar alguns aspectes importants a tenir en compte en el procés de derivació de mESCs a partir de blastòmers aïllats en estadi de 4 i 8 cèl·lules. Una visió global ens permet afirmar que, sota les nostres condicions, l'aproximació més òptima per tal de derivar les línies de mESCs amb la màxima eficiència de derivació i sense comprometre la viabilitat de l'embrió a partir del qual se'n deriven, seria la utilització d'un únic blastòmer aïllat en estadi de 8 cèl·lules utilitzant l'aproximació descrita en l'article II consistent en la unió de la proteïna quimèrica E-cad-Fc i utilitzant el mètode de cultiu en un medi definit. Utilitzant aquesta aproximació aconseguim reduir al màxim el nombre de blastòmers aïllats de l'embrió original, de manera que aquest seria totalment viable després de la biòpsia tal com indiquen els nombrosos estudis fets sobre PGD (Goossens *et al.*, 2008). La introducció de la proteïna quimèrica al medi durant una exposició de 24 h incrementa la proliferació dels blastòmers sense alterar les condicions de cultiu, de manera que estem potenciant la utilització d'un únic blastòmer, a la vegada que reafirmen la importància de les unions adherents formades per E-cadherina en la derivació de les mESCs (Spencer *et al.*, 2007 i 2011; Chou *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2010). Pel que respecta a la utilització d'embrions en estadi de 8

cèl·lules, s'està potenciant la utilització d'estadis embrionaris primerencs degut a la major totipotencialitat dels blastòmers (Tesar, 2005; Wakayama *et al.*, 2007). Malgrat això, nosaltres hem demostrat que, sota les nostres condicions, els estadis posteriors a la compactació proporcionen una eficiència de derivació major, per tant, proposem que blastòmers amb un fenotip més definit cap a cèl·lules de la ICM tenen una probabilitat més elevada de donar lloc a una línia de mESCs.

Per tant, la derivació de línies de mESCs a partir de blastòmers únics aïllats en estadi de 8 cèl·lules utilitzant l'aproximació de la proteïna quimèrica de l'E-cadherina, descrita en la present tesi doctoral, representa un avenç en la derivació a partir de blastòmers aïllats (33.6% d'eficiència). A més, utilitzant aquest mètode, es pot especular que la derivació a partir d'un embrió descompactat en estadi de 8 cèl·lules podria produir, teòricament, una eficiència de derivació de mESCs del 96% [$p=1-(0.664)^8$], fins i tot més elevada que la major eficiència de derivació a partir de blastocists descrita fins ara (88%). En aquest sentit, sembla més atractiva la idea de derivar línies de mESCs a partir de blastòmers aïllats quan es tracti d'incrementar l'eficiència de derivació d'embrions, que per les seves característiques, siguin especialment valuosos.

CONCLUSIONS

A partir dels treballs realitzats sobre l'anàlisi d'alguns dels aspectes que poden influir en el procés de derivació de les línies de mESCs, i en relació amb els objectius proposats en la present tesi doctoral, se'n poden extreure les següents conclusions:

1. Existeixen diferències en l'eficiència de derivació de les mESCs en funció del mètode d'establiment emprat. S'ha confirmat que el mètode de cultiu en medi definit és el que aporta una major eficiència d'establiment, tant a partir d'embrions sencers com de blastòmers aïllats. El mètode d'adhesió prèvia al substrat, en canvi, ha mostrat ser el menys eficient.
 - 2.1. El nombre de blastòmers aïllats i/o volum embrionari emprat en la derivació de línies de mESCs és un factor determinant en l'eficiència del procés. No s'han identificat diferències en emprar 1 o 2 blastòmers aïllats en estadi de 4 cèl·lules en cap dels tres mètodes testats. En canvi, l'estadi de 8 cèl·lules mostra una major variabilitat en funció del nombre de blastòmers aïllats i del mètode de derivació emprat. En aquest sentit, l'aïllament de 3 i 4 blastòmers a l'estadi de 8 cèl·lules aporta la màxima eficiència de derivació per als mètodes estàndard i de cultiu definit, però aquesta tendència no s'ha vist en el mètode d'adhesió prèvia al substrat.
 - 2.2. El volum embrionari i el nombre de blastòmers aïllats són dos aspectes dissociables en l'anàlisi de l'eficiència de derivació de mESCs i aporten informació sobre la importància de la comunicació en el procés. Així, un increment del volum embrionari però no del nombre de blastòmers aïllats no té una implicació directa en la eficiència de derivació. En canvi, un increment en el nombre de blastòmers però no en el volum incrementa l'eficiència d'establiment de les línies, molt probablement com a conseqüència de la comunicació entre blastòmers.
3. L'estadi embrionari a partir del qual es deriven les línies de mESCs influeix en l'eficiència del procés. Pels tres mètodes de derivació comparats, l'eficiència del procés incrementa a mesura que avança el desenvolupament embrionari. Concretament, els estadis embrionaris posteriors a la compactació embrionària (mòrula i blastocist) aporten una eficiència d'establiment més elevada que els estadis previs a la compactació (4 i 8 cèl·lules), probablement degut a que presenten un fenotip més semblant al de les cèl·lules de la ICM.

- 4.1. Les unions adherents amb E-cadherina són importants en el procés de derivació de línies de mESCs a partir d'un blastòmer aïllat en estadi de 8 cèl·lules, confirmant la importància de la comunicació entre blastòmers en els processos de derivació d'aquestes cèl·lules. La proteïna quimèrica E-cad-Fc, unida a la superfície dels blastòmers únics en estadi de 8 cèl·lules durant una exposició de 24 h, incrementa el percentatge de divisió d'aquests blastòmers i l'eficiència de derivació, molt probablement com a conseqüència de la predeterminació a formar part de la ICM induïda per la distribució homogènia de la E-cad-Fc en la superfície del blastòmer.
- 4.2. Una exposició perllongada dels blastòmers únics aïllats en estadi de 8 cèl·lules de ratolí a la proteïna quimèrica E-cad-Fc produeix un increment en la producció de petites colònies de tipus TSC, molt probablement com a conseqüència de la polarització induïda per la proteïna quimèrica. Aquest fet es tradueix en un increment en la producció de línies establertes de TSCs quan els blastòmers s'exposen a condicions adequades per a la derivació d'aquestes cèl·lules.
5. Els blastòmers procedents de l'estadi de 2 cèl·lules de ratolí presenten una predeterminació primerenca en el destí cap a la ICM o el TE del blastocist en funció de la temporalitat i l'orientació dels plans de divisió embrionaris. En canvi, un cop aïllats, els blastòmers mostren una gran plasticitat en el seu potencial de diferenciació, de manera que tots es desenvolupen en pseudoblastocists que contenen cèl·lules tant de la ICM com del TE i produeixen línies de mESCs amb la mateixa eficiència, independentment de la posició dins l'embrió. Aquestes dades també reforcen la importància de la comunicació entre blastòmers pel que fa a l'establiment de línies de mESCs a partir de blastòmers aïllats.

ANNEXES

Annex I. Protocols de treball

PROTOCOLS DE TREBALL

1. TÈCNiques GENERALS

1.1. Obtenció i cultiu d'embrions (Brook i Gardner, 1997)

- Les femelles de la soca 129/Sv es sotmeten a un procés de superovulació mitjançant la injecció intraperitoneal de 5 iu de l'hormona PMSG (anàloga a la FSH; Intervet) seguit de 5 iu de hCG (anàloga a la LH; Farma-Lepori) 48 h més tard. La soca 129/Sv en creuaments purs o amb altres soques és la que ofereix un major rendiment en termes d'eficiència d'establiment de línies de mESCs (Batlle-Morera *et al.*, 2008).
- Immediatament després de l'hormona hCG, es col·loquen les femelles en grups de dos amb un mascle de la soca C57Bl/6 per tal que es produeixi la còpula i, per tant, la fecundació.
- Al cap de 48 h es sacrifiquen les femelles per dislocació cervical i s'obtenen els embrions en estadi 2 cèl·lules mitjançant la perfusió dels oviductes amb medi de manipulació KSOM (Biggers *et al.*, 2000) amb Hapes (KSOM-H; vegeu composició a l'annex II) .
- Els embrions en estadi de 2 cèl·lules es deixen en cultiu en medi EmbryoMax® KSOM (Millipore, cat# MR-106-D) a l'incubador a 37°C i 5% de CO₂ fins a assolir els estadis embrionaris de 4 i 8 cèl·lules, mòrula i blastocist en funció de l'experimental a realitzar.

1.2. Aïllament de blastòmers mitjançant biòpsia embrionària (Handyside *et al.*, 1989)

- Mitjançant micromanipulació, es fa un forat a la ZP de l'embrió amb una solució àcida de Tyrode (vegeu composició a l'annex II) dispensada amb una pipeta de 10 µm de diàmetre (*drilling pipette*).
- Un cop fet el forat a la ZP, els blastòmers es retiren mitjançant una pipeta de biòpsia embrionària de 30 o 20 µm de diàmetre en funció de si els blastòmers provenen d'un embrió en estadi de 4 o 8 cèl·lules, respectivament (**Figura 1**), i carregada amb PBS (Invitrogen, cat# 10010-056) amb un 1% d'albumina sèrica bovina (BSA; Sigma-Aldrich, cat# A4378) i 50 mM d'EDTA (Sigma-Aldrich, cat# E-6511) per tal d'afeblir les unions entre blastòmers.

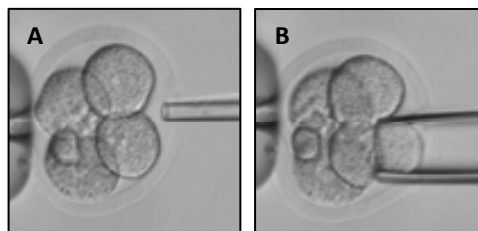


Figura 1. Imatges d'una biòpsia embrionària a l'estadi de 4 cèl·lules. A. Perforació de la ZP amb la solució àcida de Tyrode. B. Retirada d'un dels blastòmers.

1.3. Inactivació de fibroblasts embrionaris de ratolí per a la producció de MEFs (Ware i Axelrad, 1972; Martin i Evans, 1975)

- Els fibroblasts embrionaris de ratolí de la línia cel·lular establerta STO s'inactiven mitjançant un tractament amb mitomicina C (Invitrogen, cat# M4287) que és un agent alquilant que produeix unions creuades de les cadenes complementàries del DNA inhibint, així, la síntesi de DNA i provocant una aturada en fase S del cicle cel·lular. La mitomicina C s'afegeix al cultiu semiconfluent de fibroblasts en flascons de cultiu de 75 cm² de superfície (Nunc, cat# 156499) a la concentració de 10 µg/ml i s'incuba durant 3 h a 37°C i 5% CO₂.
- Una vegada inactivats, els fibroblasts es renten 3 vegades amb solució salina HBSS (Invitrogen, cat# E15-815), es dissocia el cultiu amb tripsina-EDTA (Labclinics, cat# L11-003) al 1% i es sembren en plaques a una densitat de 1.5 x 10⁵ cèl·lules/ml (vegeu apartat 1.5 de tècniques generals) o es congelen fins la seva utilització (apartat 1.4 de tècniques generals).

1.4. Congelació de MEFs i mESCs

- La suspensió cel·lular obtinguda mitjançant tripsinització es resuspèn en una solució de congelació formada per un 90% de FCS (Invitrogen, cat# A15-101) i 10% del crioprotector DMSO (Dimetilsulfòxid; Fluka, cat# 41640) a una concentració 2 x 10⁶ cèl·lules/ml a cada criotub.
- Es segueix un protocol de congelació ràpida, tot introduint les cèl·lules en un congelador a -80°C utilitzant un criocontenedor amb isopropanol que disminueix la temperatura a una taxa de 1°C/minut fins assolir la temperatura de -80°C.
- Finalment, s'introdueixen en un tanc amb nitrogen líquid a -196°C per al seu emmagatzematge.

1.5. Cultiu de les MEFs

- Prèviament, les plaques de cultiu es recobreixen amb gelatina de pell de porc (Fluka, cat# 48724) al 0.2% i s'introdueix un volum variable de medi de cultiu DMEM estàndard (Gibco, cat# 32430) suplementat amb 15% de FCS, en funció del tipus de placa de cultiu a emprar (vegeu composició a l'annex II).
- Una vegada descongelades en un bany a 37°C, les MEFs se sembren a una concentració de 1.5 x 10⁵ cèl·lules/ml en plaques multipou de 16 mm de diàmetre de pou (Nunc, cat# 176740), per al mètode de derivació clàssic o estàndard i per al mètode d'adhesió prèvia al substrat, o en microgotetes de 50 µl contingudes en plaques de 60 mm de diàmetre (Nunc, cat# 150288) i recobertes amb oli de parafina (Sigma-Aldrich, cat# M8410) per al mètode de derivació en un medi de cultiu definit (aquests mètodes de derivació es descriuen en detall als protocols de l'apartat Experimental I). Dos dies després de la sembra de les MEFs ja es poden utilitzar com a co-cultiu de les mESCs.

1.6. Caracterització de les línies de mESCs

1.6.1. Caracterització morfològica

- S'observa la morfologia de les colònies de mESCs en cultiu. Aquestes colònies han de presentar una morfologia arrodonida, amb volum i amb uns límits ben definits sense evidència de cèl·lules diferenciades al voltant de la colònia (**Figura 2**). A més, les cèl·lules individuals que constitueixen la colònia han de ser petites i amb una morfologia arrodonida. Les línies que presenten colònies amb una morfologia típica de colònia de mESCs en cultiu s'anomenen colònies tipus ESC o *ESC-like*.

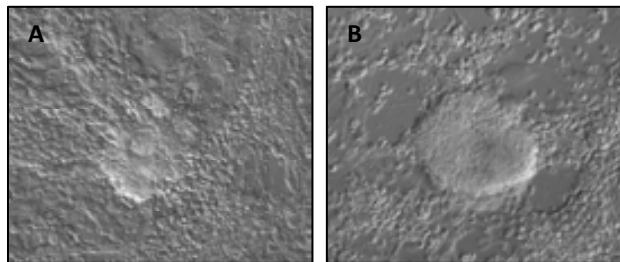


Figura 2. Imatges de colònies de mESCs. A. Imatges d'una colònia de mESCs amb cèl·lules provinents de diferenciació espontània al voltant. B. Colònia de mESCs amb els límits ben definits sense diferenciació aparent.

1.6.2. Detecció de marcadors de pluripotència per immunofluorescència

Nota 1

La caracterització molecular de les línies de mESCs es va dur a terme a través de la tècnica d'immunofluorescència per a la detecció dels marcadors nuclears de pluripotència NANOG, OCT4 i SOX2. Els controls negatius emprats en les línies d'ESCs van ser CDX2, marcador nuclear del TE, i SSEA3, marcador de membrana que només es pot detectar en les hESCs i no en les mESCs. Per a aquests marcadors es van emprar embrions com a control positiu a fi de determinar-ne la funcionalitat.

- Les línies de mESCs es fixen en paraformaldehid al 4% (Sigma-Aldrich, cat# 19200) durant 15 min.
- El bloqueig i la permeabilització es realitza durant 30 min en una solució de PBS que conté Tritó X-100 (Sigma-Aldrich, cat# X-100) al 0.5%, 3% de sèrum de cabra (Sigma-Aldrich, cat# G9023) i 0.2% d'azida sòdica (Sigma-Aldrich, cat# S2002).
- Posteriorment, s'incuben les mESCs amb els diferents anticossos primaris tota una nit a 4°C a les dilucions esmentades a la **Taula 1**.
- Es fan 3 rentats amb PBS de 5 min cadascun.
- S'incuben les mESCs amb l'anticòs secundari corresponent durant 2 h a temperatura ambient (**Taula 1**).
- Es fan 3 rentats amb PBS de 5 min cadascun.

- Es realitza el muntatge de la mostra emprant Hoechst 33258 (Invitrogen, cat# H3569) a la concentració de 10 µg/ml con a tinció nuclear de contrast.
- Les preparacions s'observen en un microscopi d'epifluorescència Olympus Bx41 equipat amb filtres específics i un sistema de captura i anàlisi d'imatges *Isis software* versió 5.3.3 (Metasystems).

1.6.3. Diferenciació *in vitro* i detecció de marcadors de diferenciació primerencs de les tres làmines embrionàries per immunofluorescència

Nota 2

Algunes de les línies de mESCs derivades es van sotmetre a condicions de cultiu de diferenciació per tal de determinar si eren capaces de produir cèl·lules de les tres làmines embrionàries, ectoderma, endoderma i mesoderma. Concretament en l'experimental I (article I), es van triar línies de mESCs representatives de les condicions de cultiu utilitzades en cada mètode de derivació. La caracterització molecular de les línies diferenciades es va dur a terme a través de la tècnica d'immunofluorescència per a la detecció del marcador neuroepitelial d'ectoderma (Nestin), l'alfa-fetoproteïna d'endoderma (AFP) i l'actina de musculatura llisa mesodèrmica (α -SMA).

- Les línies de mESCs es depriven de la suplementació de LIF (Millipore, cat# ESG1106) en el medi de cultiu i de la monocapa de MEFs i s'introdueix FCS per tal d'afavorir la diferenciació espontània (**Figura 3**). El medi de cultiu es substitueix cada 2 dies.
- Al cap de 7 dies, les línies són fixades en paraformaldehid al 4% durant 15 min per tal de ser caracteritzades per immunofluorescència.
- S'incuben les línies amb els anticossos especificats a la **Taula 1**, tot seguint el mateix protocol d'immunofluorescència descrit per a la detecció de marcadors de pluripotència en les línies de mESCs indiferenciades.

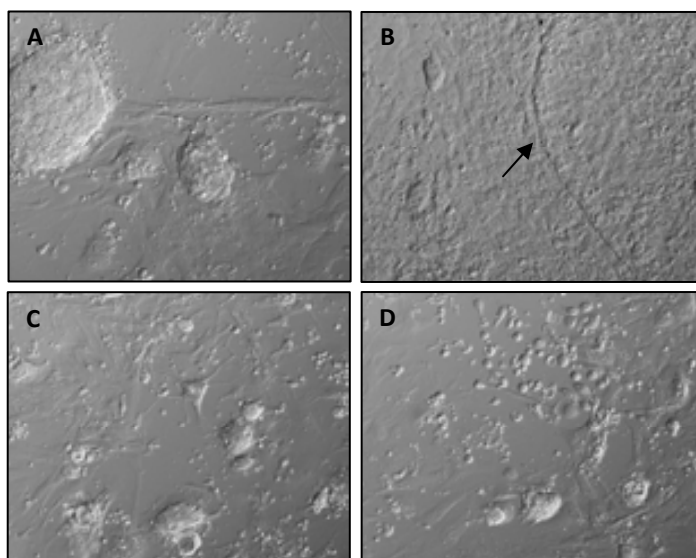


Figura 3. Diferenciació espontània de mESCs. A. Colònia de mESCs amb cèl·lules diferenciades al voltant. B. La fletxa indica el límit entre dos tipus cel·lulars diferenciats. C i D. Cèl·lules diferenciades amb diverses morfologies.

Taula 1. Anticossos primaris i secundaris utilitzats per immunofluorescència.

| Anticòs primari | Dilució | Referència | Anticòs secundari | Concentració | Referència | Tipus de cèl·lula marcada |
|---|---------|---------------------|--|--------------|--------------------------|----------------------------------|
| Pluripotència | | | | | | |
| IgG monoclonal de ratolí anti-Oct4 | 1:50 | Santa Cruz sc-5279 | anti-IgG de ratolí Alexa Fluor 488 (gallina) | 6 µg/ml | Molecular Probes A-21200 | mESCs |
| IgG policlonal de conill anti-Nanog | 1:200 | Abcam ab21603 | anti-IgG de conill Alexa Fluor 594 (cabra) | 6 µg/ml | Molecular Probes A-11037 | mESCs |
| IgG policlonal de conill anti-Sox2 | 1:200 | Millipore AB5603 | anti-IgG de conill Alexa Fluor 594 (cabra) | 6 µg/ml | Molecular Probes A-11037 | mESCs |
| IgG policlonal de conill anti-Oct4 | 1:1500 | Santa Cruz sc-9081 | anti-IgG de conill Alexa Fluor 594 (cabra) | 6 µg/ml | Molecular Probes A-11037 | ICM |
| Diferenciació | | | | | | |
| IgG policlonal de conill anti-Nestin | 1:250 | Abcam ab5968 | anti-IgG de conill Alexa Fluor 594 (cabra) | 6 µg/ml | Molecular Probes A-11037 | mESCs diferenciades |
| IgG policlonal de conill anti-AFP | 1:400 | Dako A0008 | anti-IgG de conill Alexa Fluor 594 (cabra) | 6 µg/ml | Molecular Probes A-11037 | mESCs diferenciades |
| IgG monoclonal de ratolí anti-α-SMA | 1:400 | Sigma-Aldrich A5228 | anti-IgG de ratolí Alexa Fluor 488 (gallina) | 6 µg/ml | Molecular Probes A-21200 | mESCs diferenciades |
| Embrions/mTSCs | | | | | | |
| IgG monoclonal de ratolí anti-Cdx2 | 1:100 | BioGenex MU392A-UC | anti-IgG de ratolí Alexa Fluor 488 (gallina) | 6 µg/ml | Molecular Probes A-21200 | mTSCs/TE/mESCs (control negatiu) |
| IgG monoclonal de conill anti-E-cadherina | 1:500 | Abcam ab40772 | anti-IgG de conill Alexa Fluor 594 (cabra) | 6 µg/ml | Molecular Probes A-11037 | Blastòmers estadi 8 cèl·lules |
| IgM monoclonal de rata anti-SSEA3 | 1:20 | Millipore MAB4303 | Anti-IgM de rata Alexa Fluor 488 (cabra) | 6 µg/ml | Molecular Probes A-21212 | Embrions/mESCs (control negatiu) |

1.7. Anàlisi estadística

- Els resultats de derivació de línies de mESCs es van analitzar estadísticament a partir de les línies positives en la caracterització de marcadors de pluripotència per immunofluorescència utilitzant el test de la χ^2 o el test exacte de Fisher. Per a la comparació de mitjanes, en canvi, es va fer servir el test de la t de Student. El programa utilitzat per a aquestes anàlisis va ser GraphPad Instat™. Els valors amb $p < 0.05$ es van considerar estadísticament significatius.

2. EXPERIMENTAL I (ARTICLE I): DERIVACIÓ mESCs A PARTIR DE BLASTÒMERES AÏLLATS I EMBRIONS SENCERS COMPARANT TRES MÈTODES DE DERIVACIÓ DESCRITS

2.1. Establiment de línies de mESCs

Nota 3

L'establiment de les línies de mESCs es va dur a terme a partir de blastòmers aïllats dels estadis embrionaris de 4 i 8 cèl·lules i a partir d'embrions sencers en estadi de 4 i 8 cèl·lules, mòrula i blastocist. Es van comparar tres mètodes de derivació diferents que combinen variacions en la composició del medi de cultiu i en la tècnica d'establiment de les línies. Aquests tres mètodes de derivació són el mètode de derivació clàssic o estàndard, el mètode de derivació amb una adhesió prèvia al substrat i el mètode de derivació en un medi de cultiu definit

2.1.1. Mètode de derivació clàssic o estàndard

- Se sembren els blastòmers aïllats o embrions sencers individualment sobre una monocapa de MEFs en plaques de 4 pous de 16 mm de diàmetre que contenen medi DMEM estàndard suplementat amb 100 μ M de 2- β -mercaptoetanol (Invitrogen, cat# 31350-010), 1 mM de L-glutamina (Invitrogen, cat# 25030), 1X d'aminoàcids no essencials (Invitrogen, cat# M11-003), 10³ unitats/ml de LIF i 15% de FCS (vegeu composició a l'annex II).
- Els blastòmers aïllats o embrions sencers es mantenen en cultiu a 37°C en una atmosfera al 5% de CO₂ fins a la formació d'una petita colònia o *outgrowth* cap al setè dia de cultiu, moment en què es procedeix a realitzar el primer subcultiu (**Figura 4**).
- El medi de cultiu es substitueix cada 2 dies.

2.1.2. Mètode de derivació amb una adhesió prèvia al substrat

- Inicialment, s'incuben els blastòmers aïllats o embrions sencers en una gota de 20 μ l de medi DMEM sense proteïnes durant 15 min en plaques de 4 pous de 16 mm de diàmetre per tal de facilitar la seva adhesió al substrat. En aquest mètode de derivació es va fer servir el mateix medi de cultiu que en el mètode anterior.
- Passats aquests 15 min, s'introdueix la suspensió de MEFs, tot dispensant-la molt suaument per tal de no desenganxar els blastòmers o embrions adherits a la placa.
- Els blastòmers aïllats o embrions es mantenen en cultiu a 37°C en una atmosfera al 5% de CO₂ fins a la formació de l'*outgrowth* (**Figura 4**).
- El medi de cultiu es substitueix cada 2 dies.

2.1.3. Mètode de derivació en un medi de cultiu definit

- Se sembren els blastòmers aïllats o embrions sencers sobre una monocapa de MEFs en gotes de 50 μ l contingudes en una placa de 60 mm de diàmetre. El medi de cultiu emprat va ser un medi definit

i, per tant, que no conté FCS sinó un 20% de KSR (Gibco, cat# 10828) i l'hormona ACTH (Sigma-Aldrich, cat# A0298) a una concentració de 0.1 mg/ml (vegeu composició a l'annex II).

- Els blastòmers aïllats o embrions sencers es mantenen en cultiu a 37°C en una atmosfera al 5% de CO₂ fins a la formació de l'*outgrowth* (Figura 4).
- El medi de cultiu es substitueix cada dia mentre el cultiu es duu a terme en les gotes de 50 µl. Un cop els *outgrowths* creixen i es transfereixen a les plaques de 4 pous, esmentades anteriorment, el medi es substitueix cada 2 dies.

Nota 4

Al mètode estàndard i d'adhesió prèvia al substrat, els blastòmers aïllats o embrions sencers s'enganxaven a la monocapa de MEFs durant les primeres 24 h i començaven a proliferar per tal de formar la petita colònia de tipus ESC o *ESC-like outgrowth*. Al mètode de cultiu definit, en canvi, un cop se sembraven els blastòmers aïllats o embrions sencers, aquests es desenvolupaven fins a un estadi equivalent al blastocist (pseudoblastocist), i posteriorment s'enganxaven a la monocapa de MEFs on es produïa la proliferació de les cèl·lules de la ICM a partir de les quals se'n derivaven les mESCs.

2.2. Expansió de les línies de mESCs (Figura 4)

- Les petites colònies de tipus ESC o *ESC-like outgrowths* d'aproximadament 50 µm de diàmetre, que es formen aproximadament a partir del setè dia de cultiu, es desenganxen mecànicament amb una nansa fabricada a partir d'una pipeta Pasteur estirada a la flama i es sembren en una nova monocapa de MEFs.
- Al cap de 2 setmanes aproximadament, les colònies de tipus ESC d'aproximadament 200 µm de diàmetre es subcultiven a través d'un protocol que combina l'estratègia mecànica de disgregació amb l'enzimàtica, ja que en etapes primerenques d'establiment de les línies una exposició enzimàtica o disgregació excessiva redueix la viabilitat de les cèl·lules tipus ESC. Així, les colònies es tornen a desenganxar de la monocapa de MEFs amb una nansa i es traslladen a una gota de tripsina-EDTA on es tallen en diferents fragments d'entre 50-200 cèl·lules.
- Amb l'ajuda d'una pipeta Pasteur estirada a la flama, es pipetegen els fragments tallats per tal de disgregar-los en fragments encara més petits i augmentar-ne el seu nombre.
- Posteriorment, l'efecte de la tripsina es neutralitza amb el doble de volum de medi de cultiu de les mESCs i tota la suspensió cel·lular es sembla en una nova placa de MEFs (Robertson, 1987). Un cop disgregades les colònies, i al cap d'uns dies de creixement en cultiu, es poden observar petites colònies de mida variable en funció de si provenen de fragments més o menys grans.
- Al cap d'aproximadament una setmana més en cultiu, les colònies es disgreguen per un mètode de dissociació global de tot el cultiu, de manera que en aquesta etapa interessa disgregar al màxim el cultiu per augmentar la població cel·lular, ja que les cèl·lules ara ja no són tan sensibles al

tractament enzimàtic (Watanabe *et al.*, 2007). En aquesta fase, normalment el subcultiu es duu a terme utilitzant diferents tipus d'enzims. El més emprat és la tripsina, que és un enzim potent que permet una ràpida disgregació del cultiu.

Nota 5

Als nostres experiments vam observar que en aquesta etapa d'establiment de les línies de mESCs, les cèl·lules encara eren molt sensibles a una tripsinització global del cultiu, de manera que la població cel·lular es reduïa molt després del subcultiu. Així, vam optar per aplicar un mètode de disgregació molt més suau que s'utilitza en el subcultiu de moltes línies de hESCs, ja que aquestes són molt més sensibles a la tripsinització que les mESCs. Aquest mètode consisteix en la utilització d'un inhibidor de la via Rho-ROCK que se sap que està implicada en l'augment d'apoptosi post-disgregació de les línies de hESCs. Malgrat que la implicació d'aquesta via no està tant clara en les mESCs, aquest mètode ens va permetre expandir les nostres línies de mESCs més eficientment.

- En el mètode de disgregació on està implicada la via Rho-ROCK, en primer lloc es realitza una incubació de 1 h amb un inhibidor de la quinasa ROCK associada a Rho, Y-27632 (Calbiochem, cat# 688001).
- Posteriorment, s'incuba el cultiu de colònies tipus ESC amb una solució de dissociació (Sigma-Aldrich, cat# C5914) i es segueix aquesta dissociació sota el microscopi, fins que s'observa un canvi en la morfologia de les colònies. Una vegada hem aconseguit el nivell de dissociació desitjat, la solució de dissociació s'inactiva amb un 90% de medi de cultiu DMEM. Finalment, els fragments cel·lulars o cèl·lules úniques es traslladen a una nova monocapa de MEFs.
- El subcultiu de les línies es realitza fins a 7 vegades, moment en què es considera que les línies de mESCs ja estan establertes i preparades per a la seva posterior caracterització.

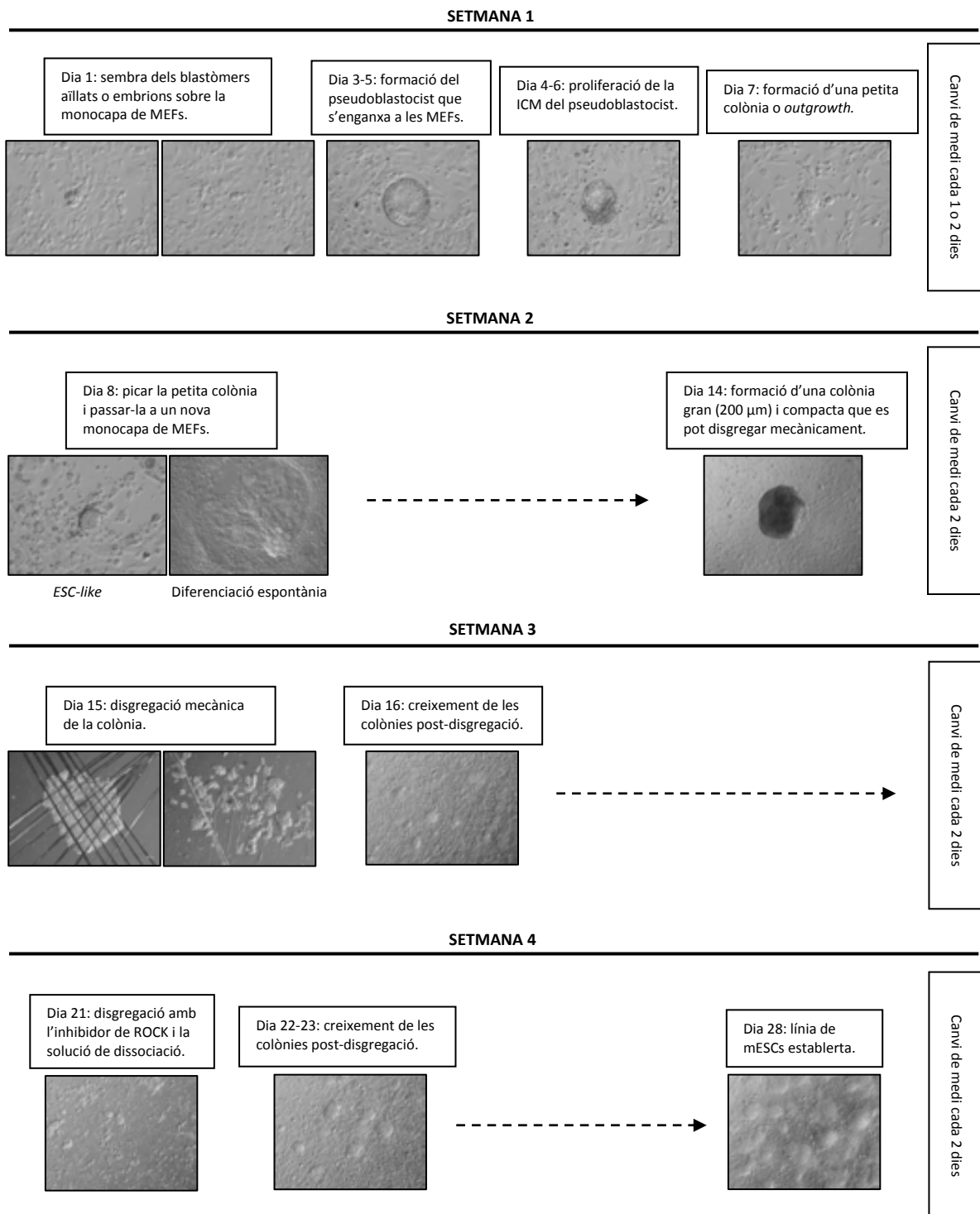


Figura 4. Diagrama del procés d'establiment i expansió d'una línia de mESCs.

3. EXPERIMENTAL II (ARTICLE II): INFLUÈNCIA DE LES UNIONS ADHERENTS AMB E-CADHERINA EN L'EFICIÈNCIA DE DERIVACIÓ DE mESCs

3.1. Unió i detecció d'una E-cadherina quimèrica

Nota 6

Per tal de determinar la influència de les unions adherents formades per la proteïna d'adhesió E-cadherina en la derivació de línies de mESCs, una E-cadherina quimèrica (E-cad-Fc) formada pel domini extracel·lular de l'E-cadherina (aminoàcids 1-709) i el domini Fc de la IgG1 humana va ser adherida a la superfície de blastòmers únics aïllats d'embrions en estadi de 8 cèl·lules (1/8) per tal de simular la senyalització que es produeix en aquest estadi embrionari quan dos o més blastòmers estan en contacte a través d'aquest tipus d'unions.

- Els blastòmers únics aïllats en estadi de 8 cèl·lules (1/8) s'incuben amb l'E-cad-Fc (Sigma-Aldrich, cat# E2153) a la concentració de 1.5 µg/ml durant 2 h en una gota de 20 µl continguda en una placa no adherent de polipropilè (Rubilabor, cat# 200201). L'E-cad-Fc es dilueix en DMEM estàndard amb calci per tal de facilitar la seva adhesió a la superfície del blastòmer.
- Es renten els blastòmers 3 vegades en DMEM durant 5 min.
- Es fixen en paraformaldehid al 4% durant 15 min.
- Es fan 3 rentats més de 5 min.
- S'incuben els blastòmers amb un anticòs monoclonal de ratolí contra la IgG1 humana conjugat amb FITC (Invitrogen, cat# 05-3311) a la dilució de 1:20 durant 2 h.
- Finalment, les mostres es tenyeixen amb el colorant de contrast nuclear Hoechst 33258 a la concentració de 10 µg/ml.
- Per a la retirada de l'E-cad-Fc del blastòmer a les 24 h de la seva adhesió, els blastòmers es renten 3 vegades durant 5 min en una solució de PBS lliure de calci i magnesi i suplementat amb 150 mM d'EDTA. Posteriorment, s'incuben amb l'anticòs anti-IgG1 humana per tal de verificar la completa retirada de l'E-cad-Fc.
- Totes les mostres s'analitzen en un microscopi d'epifluorescència Olympus Bx41 equipat amb un sistema de captura i anàlisi d'imatges *Isis software* versió 5.3.3 (Metasystems).

3.2. Immunodetecció de l'E-cadherina en embrions en estadi de 8 cèl·lules

- Els blastòmers aïllats o embrions es fixen en paraformaldehid al 4% durant 15 min.
- El bloqueig i la permeabilització es realitza de la mateixa manera descrita en l'apartat 1.6 de tècniques generals, però en aquest cas durant tota la nit.
- La incubació amb l'anticòs primari anti-E-cadherina també es realitza durant tota una nit a 4°C i la detecció amb l'anticòs secundari corresponent durant 2 h a temperatura ambient (**Taula 1**).

- Els blastòmers aïllats o embrions es renten 3 vegades durant 10 min en solució de bloqueig després de cada incubació amb els anticossos.
- Finalment, les mostres es tenyeixen amb Hoechst 33258 a la concentració de 10 µg/ml com a tinció nuclear de contrast i s'examinen en un microscopi d'epifluorescència Olympus Bx41 equipat amb un sistema de captura i anàlisi d'imatges *Isis software* versió 5.3.3 (Metasystems).

3.3. Immunodetecció i anàlisi de la mitjana de cèl·lules de la ICM i del TE en pseudoblastocists formats a partir de blastòmers únics aïllats en estadi de 8 cèl·lules

- Els pseudoblastocists formats en cultiu a partir dels blastòmers del grup de 1/8 es fixen en paraformaldehid al 4% durant 15 min.
- S'incuben durant tota una nit a 4°C en la solució de bloqueig i permeabilització (punt 1.6 de l'apartat de tècniques generals).
- La incubació amb l'anticòs primari contra CDX2 es realitza durant tota una nit a 4°C i la seva detecció es fa mitjançant la incubació amb l'anticòs secundari corresponent durant 2 h a temperatura ambient (**Taula 1**).
- Es realitzen 3 rentats de 10 min cadascun en solució de bloqueig i permeabilització després de la incubació amb cada anticòs.
- Posteriorment, es realitza una segona incubació amb l'anticòs primari anti-OCT4 durant 1 h 30 min, i s'incuba amb l'anticòs secundari corresponent durant 30 min a temperatura ambient (**Taula 1**).
- Es realitzen 3 rentats de 10 min cadascun en solució de bloqueig i permeabilització.
- Les mostres s'analitzen en un microscopi d'epifluorescència Olympus Bx41 i un sistema de captura i anàlisi d'imatges *Isis software* versió 5.3.3 (Metasystems).

3.4. Establiment de línies de mESCs en presència de l'E-cad-Fc

- L'E-cad-Fc s'afegeix al medi de cultiu a la concentració de 1.5 µg/ml per tal de derivar les línies de mESCs a partir del grup de 1/8.
- L'E-cad-Fc es retirada activament a les 24 h (curta exposició), tal com s'ha explicat a l'apartat 3.1, o es deixa actuar durant una exposició perllongada.

3.5. Derivació i caracterització de TSCs de ratolí en presència de l'E-cad-Fc

- Se sembren les MEFs en gotes de 50 µl contingudes en una placa de Petri de 60 mm de diàmetre amb medi RPMI1640 (Labclinics, cat# 21875-034) suplementat amb 20% FCS, 1 mM de L-glutamina, 100 µM de 2-β-mercaptoetanol i 1 mM de piruvat sòdic (Sigma-Aldrich, cat# P4562). A aquest medi li direm medi TS (vegeu annex II).
- Just abans de la sembra dels blastòmers aïllats del grup de 1/8 i els blastocists, es canvia el medi de cultiu de les MEFs per medi fresc que ara, a més, conté 25 ng/ml de FGF4 (Pepro-Tech, cat# 100-31) i 1 µg/ml d'heparina (Sigma-Aldrich, cat# H3149). A aquest medi li direm medi TS + F4H (vegeu

annex II). La derivació de les línies de TSCs de ratolí (mTSCs) s'ha fet seguint el protocol descrit per Tanaka (2006).

- Se sembren els blastòmers aïllats o blastocists individualment en les gotes que contenen la monocapa de MEFs.
- Un cop els blastòmers o embrions s'han enganxat a la monocapa de MEFs, es torna a canviar el medi de cultiu per medi TS + F4H fresc.
- Un cop la colònia assoleix un diàmetre d'aproximadament uns 200 µm, es realitza una incubació de 5 min en una gota de tripsina-EDTA i es talla en fragments de diferents mides. Posteriorment, els fragments es transfereixen a una nova monocapa de MEFs mitjançant una nansa i es cultiva en medi format per un 30% de medi TS, un 70 % de medi TS condicionat pels factors de les MEFs i FGF4 i heparina a la concentració de 45 ng/ml i 1.8 µg/ml, respectivament (medi 70CM + 1.8X F4H; vegeu annex II).
- Al cap de 8 h i un cop els fragments s'han enganxat a la monocapa de MEFs, es canvia el medi de cultiu per medi fresc com el d'abans, però en aquest cas suplementat amb FGF4 i heparina a la concentració de 37.5 ng/ml i 1.5 µg/ml, respectivament (medi 70CM + 1.5X F4H; vegeu annex II).
- Entre 10-12 dies, comencen a aparèixer colònies de diferent mida, aplanades, amb cèl·lules de morfologia epitelial i uns límits més o menys definits (**Figura 5**). Arribat aquest punt, el cultiu es disgrega amb tripsina-EDTA i els fragments cel·lulars o cèl·lules úniques se sembren en una nova monocapa de MEFs amb medi de cultiu TS + 1.5X F4H format per medi TS suplementat amb FGF4 i heparina a la concentració de 37.5 ng/ml i 1.5 µg/ml, respectivament (vegeu annex II).
- Una vegada tenim establerta una línia de mTSCs, aquesta es cultiva en medi TS.
- L'E-cad-Fc en els grups problema s'afegeix al medi de cultiu a la concentració de 1.5 µg/ml i es retira passivament del cultiu a les 72 h, moment en què tots els *outgrowths* s'han enganxat a la monocapa de MEFs i el medi de cultiu és substituït per medi fresc tal com s'indica en el protocol descrit per Tanaka (2006).
- Les línies de mTSCs establertes es caracteritzen a través de la detecció del marcador CDX2 del TE per immunofluorescència, seguint el mateix protocol que per a les línies de mESCs (apartat 1.6 de tècniques generals).



Figura 5. Imatge d'una colònia de mTSCs. A la imatge s'il·lustra la morfologia típica de colònia de mTSCs, aplanada i amb els marges no tan definits en comparació amb les colònies de mESCs.

4. EXPERIMENTAL III (ARTICLE III): INFLUÈNCIA DE LES DECISIONS PRIMERENQUES DELS BLASTÒMERS EN ESTADI DE 4 CÈL·LULES PEL QUE FA AL DESTÍ CAP A LA ICM O EL TE EN L'EFICIÈNCIA DE DERIVACIÓ DE mESCs

4.1. Marcatge de blastòmers amb un colorant fluorescent

Nota 7

La tinció de blastòmers amb colorants vitals fluorescents és de gran utilitat per tal de fer un seguiment d'aquests al llarg de les divisions embrionàries del desenvolupament preimplantacional i analitzar la distribució dels descendents d'aquests blastòmers en la ICM o el TE del futur blastocist. Concretament, al nostre estudi es va tenir el blastòmer encara no dividit d'embrions en estadi de 3 cèl·lules amb un colorant lipofílic fluorescent de color vermell seguint el protocol descrit per Piotrowska *et al.* (2001) que representa un mètode no invasiu que evita la injecció del colorant dins el blastòmer i no pertorba l'ordre de les divisions embrionàries, incrementat així la viabilitat embrionària post-injecció. Aquest mètode de seguiment cel·lular ens permet determinar si l'orientació del pla de divisió, equatorial o meridional, del primer blastòmer que es divideix en estadi de 2 cèl·lules predetermina una localització preferencial en la ICM o el TE del blastocist. Així, el blastòmers d'interès en aquest estudi seran els no marcats amb el colorant.

- El colorant lipofílic Dil (Molecular Probes, cat# D282) es dissol en oli d'oliva verge a la temperatura de 65°C durant 15 min a una concentració de 2 mg/ml.
- El marcatge del blastòmer es realitza mitjançant tècniques de micromanipulació, pressionant la punta d'una pipeta de microinjecció d'injecció espermàtica intracitoplasmàtica (ICSI) humana de 5.5 µm de diàmetre (Cook, cat# K-MPIP-3335) contra la membrana del blastòmer, un cop fet un forat en la ZP de l'embrió per punció amb la mateixa pipeta. Un vegada el colorant lipofílic contacta amb la membrana del blastòmer, aquest és absorbit i progressivament tota la superfície del blastòmer queda marcada amb el colorant (**Figura 6**).
- Posteriorment al marcatge amb el colorant i a l'anàlisi de la orientació del pla de divisió, els blastòmers es cultiven en medi EmbryoMax® KSOM fins a l'estadi de blastocist. Tanmateix, embrions no marcats amb el colorant en estadi de 2 cèl·lules es cultiven en medi EmbryoMax® KSOM fins a l'estadi de blastocist com a grup control per valorar la viabilitat dels embrions marcats.
- Els embrions marcats amb el colorant es valoren en un microscopi de fluorescència invertit Olympus IX71 amb un filtre específic per al fluorocrom vermell Cy3 per tal d'avaluar la proporció d'embrions en estadi de blastocist i la distribució de cèl·lules marcades i no marcades en els mateixos. Les imatges digitals s'obtenen amb una càmera DP-20 (Olympus) i el *software* Cell A (Olympus).
- Finalment, els blastocists es processen per a la detecció del marcador CDX2 del TE per immunofluorescència. El protocol a seguir en aquest cas va ser el mateix que per la detecció de CDX2 en els pseudoblastocists (apartat 3.3 de l'experimental II).

- Les mostres processades per immunofluorescència s'examinen en un microscopi d'epifluorescència Olympus BX41. Les imatges s'obtenen amb un sistema de captura i anàlisi *Isis software* versió 5.3.3 (Metasystems).

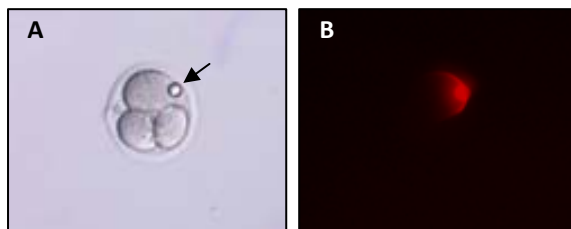


Figura 6. Embrió en estadi de 3 cèl·lules marcat amb el colorant lipofílic vermell DiI. A. Imatge d'un embrió en estadi de 3 cèl·lules on la fletxa indica la gota d'oli amb el colorant lipofílic que roman dins l'espai perivitel·lí, un cop aquest colorant es posa en contacte amb la membrana del blastòmer. B. Imatge de fluorescència del mateix embrió on s'observa com el colorant s'absorbeix progressivament fins marcar tota la membrana del blastòmer.

4.2. Establiment de línies de mESCs a partir de blastòmers aïllats en estadi de 4 cèl·lules

Nota 8

La derivació de línies de mESCs en aquesta part de l'experimental es va dur a terme a partir dels grups de derivació indicats en l'apartat de resultats i discussió (article III), per tal de determinar si la temporalitat i el pla d'orientació de les dues divisions embrionàries en estadi de 2 cèl·lules, que predetermina la localització d'uns blastòmers concrets a la ICM, també influeix en la derivació de línies de mESCs a partir de blastòmers aïllats en estadi de 4 cèl·lules.

- Les línies de mESCs es van derivar seguint el mètode de derivació en medi de cultiu definit a partir de blastòmers aïllats en estadi de 4 cèl·lules descrit a l'apartat 2.1.3 de l'experimental I.

4.3. Immunodetecció i anàlisi de la proporció de cèl·lules de la ICM i del TE en pseudoblastocists formats a partir de blastòmers aïllats en estadi de 4 cèl·lules

- Els blastòmers procedents de la primera divisió en estadi de 2 cèl·lules, en orientació equatorial (2/3E) i meridional (2/3M), i els de la segona divisió (2/4) es cultiven en medi EmbryoMax® KSOM fins que es desenvolupen en pseudoblastocists al cap de 72 h en cultiu.
- Aquests pseudoblastocists es processen per immunofluorescència per tal de detectar la presència dels marcadors OCT4 i CDX2 de la ICM i el TE, respectivament. El protocol d'immunofluorescència a seguir és el mateix que l'emprat per als pseudoblastocists de l'apartat 3.3 de l'experimental II.

Annex II. Composició dels medis de cultiu i solucions

COMPOSICIÓ DELS MEDIS DE CULTIU I SOLUCIONS

1. MEDI KSOM-H DE MANIPULACIÓ EMBRIONÀRIAPreparació del *stock* 1 (2X)

| Components | Referència | Concentració/Volum |
|---|----------------------------|--------------------|
| NaCl | Sigma-Aldrich cat# S7653 | 95 mM |
| KCl | Fluka cat# 60128 | 2.5 mM |
| KH ₂ PO ₄ | Sigma-Aldrich cat# P5655 | 0.35 mM |
| MgSO ₄ 7H ₂ O | Sigma-Aldrich cat# M1880 | 0.2 mM |
| Lactat sòdic 50% | Merck cat# 6522 | 10 mM |
| Piruvat sòdic | Sigma-Aldrich cat# P4562 | 0.2 mM |
| D-Glucosa | Sigma-Aldrich cat# G6152 | 0.2 mM |
| 4 Na EDTA | Sigma-Aldrich cat# E6511 | 0.01 mM |
| Penicil·lina | Laboratorios ERN 1milió UI | 0.16 mM |
| Sulfat d'estreptomicina | Laboratorios Reig Jofré | 0.03 mM |
| H ₂ O tridestil·lada estèril | Sigma-Aldrich cat# W1503 | 250 ml |

El *stock* 1 es filtra, es fan alíquotes de 10 ml i es guarda a la temperatura de -20°C un màxim de dos mesos.

Preparació del *stock* 2 (100X)

| Components | Referència | Concentració/Volum |
|---|--------------------------|--------------------|
| CaCl ₂ · 2H ₂ O | Sigma-Aldrich cat# C7902 | 1.7 mM |
| H ₂ O tridestil·lada estèril | Sigma-Aldrich cat# W1503 | 10 ml |

El *stock* 2 es filtra i es guarda a la temperatura de 4°C un màxim de dos mesos.

Preparació del *stock* 3 (4X)

| Components | Referència | Concentració/Volum |
|---|--------------------------|--------------------|
| NaHCO ₃ | Merck cat# 6329 | 21 mM |
| H ₂ O tridestil·lada estèril | Sigma-Aldrich cat# W1503 | 10 ml |

El *stock* 3 es filtra i es guarda a la temperatura de 4°C un màxim d'una setmana.

Preparació del *stock* 4 (100X)

| Components | Referència | Concentració/Volum |
|---|--------------------------|-----------------------|
| Roig de fenol | Fluka cat# 77650 | 10 ⁻³ g/ml |
| H ₂ O tridestil·lada estèril | Sigma-Aldrich cat# W1503 | 10 ml |

El *stock* 4 es filtra i es guarda a la temperatura de 4°C un màxim de dos mesos.

Preparació del medi KSOM-H a partir de les solucions *stock*

| Components | Referència | Concentració/Volum |
|---|--------------------------|--------------------|
| H ₂ O tridestil·lada estèril | Sigma-Aldrich cat# W1503 | 4.033 ml |
| Solució stock 1 | --- | 5 ml |
| Solució stock 2 | --- | 0.417 ml |
| Solució stock 3 | --- | 0.1 ml |
| Aminoàcids essencials 50X | Gibco cat# 11130-036 | 0.1 ml |
| Aminoàcids no essencials 100X | Gibco cat# 11140-035 | 0.1 ml |
| Hepes 1M | PAA cat# S11-001 | 0.2 ml |
| Solució stock 4 | --- | 0.1 ml |
| BSA | Sigma-Aldrich cat# A4378 | 4 mg/ml |
| Volum total | --- | 10 ml |

Es filtra i s'ajusta el pH entre 7.1 i 7.5. Finalment, es guarda a 4°C durant un màxim d'una setmana.

2. MEDIS DE CULTIU DE MANTENIMENT DE LES MEFs I D'ESTABLIMENT DE mESCs

| Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM; Gibco cat# 32430) pH 7.2 | Referència i concentració | MEFs | mESCs (mètode 1)* | mESCs (mètode 2)* | mESCs (mètode 3)* |
|--|--|------|-------------------|-------------------|-------------------|
| 2- β -mercaptoetanol | Invitrogen cat# 31350-010; 100 μ M | - | + | + | + |
| L-glutamina | Invitrogen cat# 25030; 1 mM | + | + | + | + |
| Aminoàcids no essencials | Gibco cat# 11140-035; 1X | - | + | + | + |
| FCS | Invitrogen cat# A15-101; 15% | + | + | + | - |
| LIF | Millipore cat# ESG1106; 10 ³ U/ml | - | + | + | + |
| KSR | Gibco cat# 10828; 20% | - | - | - | + |
| ACTH | Sigma-Aldrich cat# A0298; 0.1 mg/ml | - | - | - | + |

*Mètode 1: clàssic o estàndard; mètode 2: d'adhesió prèvia al substrat; mètode 3: de cultiu en medi definit.

3. MEDIS DE CULTIU DE TSCs

Medi TS

| RPMI1640 (Labclinics cat# 21875-034) pH 7.2 | Referència | Concentració |
|---|---------------------------|--------------|
| FCS | Invitrogen cat# A15-101 | 20% |
| 2- β -mercaptoetanol | Invitrogen cat# 31350-010 | 100 μ M |
| L-glutamina | Invitrogen cat# 25030 | 2 mM |
| Piruvat sòdic | Sigma-Aldrich cat# P4562 | 1 mM |

Medi TS + F4H

| RPMI1640 (Labclinics cat# 21875-034) | Referència | Concentració |
|---|---------------------------|---------------------|
| FCS | Invitrogen cat# A15-101 | 20% |
| 2-β-mercaptoetanol | Invitrogen cat# 31350-010 | 100 µM |
| L-glutamina | Invitrogen cat# 25030 | 2 mM |
| Piruvat sòdic | Sigma-Aldrich cat# P4562 | 1 mM |
| Heparina 1000X | Sigma-Aldrich cat# H3149 | 1 µg/ml |
| FGF4 1000X | Pepero-Tech cat# 100-31 | 25 ng/ml |

Medi TS + 1.5X F4H

| RPMI1640 (Labclinics cat# 21875-034) | Referència | Concentració |
|---|---------------------------|---------------------|
| FCS | Invitrogen cat# A15-101 | 20% |
| 2-β-mercaptoetanol | Invitrogen cat# 31350-010 | 100 µM |
| L-glutamina | Invitrogen cat# 25030 | 2 mM |
| Piruvat sòdic | Sigma-Aldrich cat# P4562 | 1 mM |
| Heparina 1000X | Sigma-Aldrich cat# H3149 | 1.5 µg/ml |
| FGF4 1000X | Pepero-Tech cat# 100-31 | 37.5 ng/ml |

Medi 70CM + 1.5X F4H

| RPMI1640 (Labclinics cat# 21875-034) | Referència | Concentració |
|--|--------------------------|---------------------|
| Medi TS | --- | 30% |
| Medi TS condicionat per factors de les MEFs | --- | 70% |
| Heparina 1000X | Sigma-Aldrich cat# H3149 | 1.5 µg/ml |
| FGF4 1000X | Pepero-Tech cat# 100-31 | 37.5 ng/ml |

Medi 70CM + 1.8X F4H

| RPMI 1640 (Labclinics cat# 21875-034) | Referència | Concentració |
|--|--------------------------|---------------------|
| Medi TS | --- | 30% |
| Medi TS condicionat per factors de les MEFs | --- | 70% |
| Heparina 1000X | Sigma-Aldrich cat# H3149 | 1.8 µg/ml |
| FGF4 1000X | Pepero-Tech cat# 100-31 | 45 ng/ml |

4. SOLUCIÓ ÀCIDA DE TYRODE

| Components | Referència | Concentració/Volum |
|--|--------------------------|---------------------------|
| NaCl | Sigma-Aldrich cat# S7653 | 136 mM |
| KCl | Fluka cat# 60128 | 5 mM |
| MgCl₂ | Sigma-Aldrich cat# M2670 | 0.98 mM |
| CaCl₂ · 2H₂O | Sigma-Aldrich cat# C7902 | 2 mM |
| NaH₂PO₄ | Sigma-Aldrich cat# S0751 | 0.36 mM |
| NaHCO₃ | Merck cat# 6329 | 1.19 mM |
| D-Glucosa | Sigma-Aldrich cat# G6152 | 5.5 mM |
| H₂O tridestil·lada estèril | Sigma-Aldrich cat# W1503 | 1 L |

S'ajusta el pH a 2.5, es filtra i es guarda a -20°C en alíquotes del volum desitjat.

BIBLIOGRAFIA

A

Alarcon VB & 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.

Amit M, Shariki C, Margulets V & Itskovitz-Eldor J 2004 Feeder layer- and serum-free culture of human embryonic stem cells. *Biology of reproduction* **70** 837-845.

Arnold SJ & Robertson EJ 2009 Making a commitment: cell lineage allocation and axis patterning in the early mouse embryo. *Nature reviews. Molecular cell biology* **10** 91-103.

B

Battle-Morera L, Smith A & Nichols J 2008 Parameters influencing derivation of embryonic stem cells from murine embryos. *Genesis* **46** 758-767.

Bienz M 2005 β -Catenin: a pivot between cell adhesion and Wnt signalling. *Current biology: CB* **15** R64-7.

Biggers JD, McGinnis LK & Raffin M 2000 Amino acids and preimplantation development of the mouse in protein-free potassium simplex optimized medium. *Biology of reproduction* **63** 281-293.

Bischoff M, Parfitt DE & Zernicka-Goetz M 2008 Formation of the embryonic-abembryonic axis of the mouse blastocyst: relationships between orientation of early cleavage divisions and pattern of symmetric/asymmetric divisions. *Development* **135** 953-962.

Bongso A & Richards M 2004 History and perspective of stem cell research. *Best practice & research. Clinical obstetrics & gynaecology* **18** 827-842.

Brons IG, Smithers LE, Trotter MW, Rugg-Gunn P, Sun B, Chuva de Sousa Lopes SM, Howlett SK, Clarkson A, Ahrlund-Richter L, Pedersen RA & Vallier L 2007 Derivation of pluripotent epiblast stem cells from mammalian embryos. *Nature* **448** 191-195.

Brook FA & Gardner RL 1997 The origin and efficient derivation of embryonic stem cells in the mouse. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **94** 5709-5712.

Bryder D, Rossi DJ & Weissman IL 2006 Hematopoietic stem cells: the paradigmatic tissue-specific stem cell. *The American journal of pathology* **169** 338-346.

Bryja V, Bonilla S, Cajanek L, Parish CL, Schwartz CM, Luo Y, Rao MS & Arenas E 2006 An efficient method for the derivation of mouse embryonic stem cells. *Stem cells* **24** 844-849.

Burdon T, Stracey C, Chambers I, Nichols J & Smith A 1999 Suppression of SHP-2 and ERK signalling promotes self-renewal of mouse embryonic stem cells. *Developmental biology* **210** 30-43.

C

Cavaleri F & Scholer H 2009 Molecular bases of pluripotency. In *Essentials of stem cell biology*, edn 2. Canada: Academic Press Elsevier.

Chambers I, Colby D, Robertson M, Nichols J, Lee S, Tweedie S & Smith A 2003 Functional expression cloning of Nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells. *Cell* **113** 643-655.

Chambers I 2004 The molecular basis of pluripotency in mouse embryonic stem cells. *Cloning and stem cells* **6** 386-391.

Chavez SL, Meneses JJ, Nguyen HN, Kim SK & Pera RA 2008 Characterization of six new human embryonic stem cell lines (HSF7, -8, -9, -10, -12, and -13) derived under minimal-animal component conditions. *Stem cells and development* **17** 535-546.

Chazaud C, Yamanaka Y, Pawson T & Rossant J 2006 Early lineage segregation between epiblast and primitive endoderm in mouse blastocysts through the Grb2-MAPK pathway. *Developmental cell* **10** 615-624.

Chen AE & Melton DA 2007 Derivation of human embryonic stem cells by immunosurgery. *Journal of visualized experiments: JoVE* (**10**) 574.

Chen AE, Egli D, Niakan K, Deng J, Akutsu H, Yamaki M, Cowan C, Fitz-Gerald C, Zhang K, Melton DA & Eggan K 2009 Optimal timing of inner cell mass isolation increases the efficiency of human embryonic stem cell derivation and allows generation of sibling cell lines. *Cell stem cell* **4** 103-106.

Chen G, Hou Z, Gulbranson DR & Thomson JA 2010 Actin-myosin contractility is responsible for the reduced viability of dissociated human embryonic stem cells. *Cell stem cell* **7** 240-248.

Chen L & Daley GQ 2008 Molecular basis of pluripotency. *Human molecular genetics* **17** R23-7.

Chen L, Wang D, Wu Z, Ma L & Daley GQ 2010 Molecular basis of the first cell fate determination in mouse embryogenesis. *Cell research* **20** 982-993.

Chin MH, Mason MJ, Xie W, Volinia S, Singer M, Peterson C, Ambartsumyan G, Aimiwu O, Richter L, Zhang J, Khvorostov I, Ott V, Grunstein M, Lavon N, Benvenisty N, Croce CM, Clark AT, Baxter T, Pyle AD,

Teitell MA, Pelegrini M, Plath K & Lowry WE 2009 Induced pluripotent stem cells and embryonic stem cells are distinguished by gene expression signatures. *Cell stem cell* **5** 111-123.

Chou YF, Chen HH, Eijpe M, Yabuuchi A, Chenoweth JG, Tesar P, Lu J, McKay RD & Geijsen N 2008 The growth factor environment defines distinct pluripotent ground states in novel blastocyst-derived stem cells. *Cell* **135** 449-461.

Chung Y, Klimanskaya I, Becker S, Marh J, Lu SJ, Johnson J, Meisner L & Lanza R 2006 Embryonic and extraembryonic stem cell lines derived from single mouse blastomeres. *Nature* **439** 216-219.

Chung Y, Klimanskaya I, Becker S, Li T, Maserati M, Lu SJ, Zdravkovic T, Ilic D, Genbacev O, Fisher S, Krtolica A & Lanza R 2008 Human embryonic stem cell lines generated without embryo destruction. *Cell stem cell* **2** 113-117.

Ciemerych MA, Mesnard D & Zernicka-Goetz M 2000 Animal and vegetal poles of the mouse egg predict the polarity of the embryonic axis, yet are nonessential for development. *Development* **127** 3467-3474.

Clayton L, Stinchcombe SV & Johnson MH 1993 Cell surface localisation and stability of uvomorulin during early mouse development. *Zygote* **1** 333-344.

Cockburn K & Rossant J 2010 Making the blastocyst: lessons from the mouse. *The Journal of clinical investigation* **120** 995-1003.

Conrad S, Renninger M, Hennenlotter J, Wiesner T, Just L, Bonin M, Aicher W, Buhring HJ, Mattheus U, Mack A, Wagner HJ, Minger S, Matzkies M, Reppel M, Hescheler J, Sievert KD, Stenzl A & Skutella T 2008 Generation of pluripotent stem cells from adult human testis. *Nature* **456** 344-349.

D

Daheron L, Opitz SL, Zaehres H, Lensch MW, Andrews PW, Itskovitz-Eldor J & Daley GQ 2004 LIF/STAT3 signaling fails to maintain self-renewal of human embryonic stem cells. *Stem cells* **22** 770-778.

De Sousa PA, Valdimarsson G, Nicholson BJ & Kidder GM 1993 Connexin trafficking and the control of gap junction assembly in mouse preimplantation embryos. *Development* **117** 1355-1367.

Dean W, Santos F, Stojkovic M, Zakhartchenko V, Walter J, Wolf E & Reik W 2001 Conservation of methylation reprogramming in mammalian development: aberrant reprogramming in cloned embryos. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98** 13734-13738.

Delhaise F, Bralio V, Schuurbiens N & Dessy F 1996 Establishment of an embryonic stem cell line from 8-cell stage mouse embryos. *European journal of morphology* **34** 237-243.

Deng WM, Zhao D, Rothwell K & Bownes M 1997 Analysis of P[gal4] insertion lines of *Drosophila melanogaster* as a route to identifying genes important in the follicle cells during oogenesis. *Molecular human reproduction* **3** 853-862.

Dietrich JE & Hiiragi T 2007 Stochastic patterning in the mouse pre-implantation embryo. *Development* **134** 4219-4231.

Doi A, Park IH, Wen B, Murakami P, Aryee MJ, Irizarry R, Herb B, Ladd-Acosta C, Rho J, Loewer S, Miller J, Schlaeger T, Daley GQ & Feinberg AP 2009 Differential methylation of tissue- and cancer-specific CpG island shores distinguishes human induced pluripotent stem cells, embryonic stem cells and fibroblasts. *Nature genetics* **41** 1350-1353.

E

Edwards RG & Beard HK 1997 Oocyte polarity and cell determination in early mammalian embryos. *Molecular human reproduction* **3** 863-905.

Eistetter HR 1989 Pluripotent Embryonal Stem Cell Lines Can Be Established from Disaggregated Mouse Morulae. *Development, Growth & Differentiation* **31** 275-282.

Etienne-Manneville S & Hall A 2002 Rho GTPases in cell biology. *Nature* **420** 629-635.

Evans MJ & Kaufman MH 1981 Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* **292** 154-156.

F

Farthing CR, Ficiz G, Ng RK, Chan CF, Andrews S, Dean W, Hemberger M & Reik W 2008 Global mapping of DNA methylation in mouse promoters reveals epigenetic reprogramming of pluripotency genes. *PLoS genetics* **4** e1000116.

Feng Q, Lu SJ, Klimanskaya I, Gomes I, Kim D, Chung Y, Honig GR, Kim KS & Lanza R 2010 Hemangioblastic derivatives from human induced pluripotent stem cells exhibit limited expansion and early senescence. *Stem cell* **28** 704-712.

Fleming TP, Javed Q, Collins J & Hay M 1993 Biogenesis of structural intercellular junctions during cleavage in the mouse embryo. *Journal of cell science. Supplement* **17** 119-125.

Fleming TP, Ghassemifar MR & Sheth B 2000 Junctional complexes in the early mammalian embryo. *Seminars in reproductive medicine* **18** 185-193.

Fujimori T, Kurotaki Y, Miyazaki J & Nabeshima Y 2003 Analysis of cell lineage in two- and four-cell mouse embryos. *Development* **130** 5113-5122.

Fulka H, Mrazek M, Tepla O & Fulka J Jr 2004 DNA methylation pattern in human zygotes and developing embryos. *Reproduction* **128** 703-708.

G

Galan A, Montaner D, Poo ME, Valbuena D, Ruiz V, Aguilar C, Dopazo J & Simon C 2010 Functional genomics of 5- to 8-cell stage human embryos by blastomere single-cell cDNA analysis. *PLoS one* **5** e13615.

Garbutt CL, Johnson MH & George MA 1987 When and how does cell division order influence cell allocation to the inner cell mass of the mouse blastocyst? *Development* **100** 325-332.

Gardner RL & Rossant J 1979 Investigation of the fate of 4-5 day post-coitum mouse inner cell mass cells by blastocyst injection. *Journal of embryology and experimental morphology* **52** 141-152.

Gardner RL 1982 Investigation of cell lineage and differentiation in the extraembryonic endoderm of the mouse embryo. *Journal of embryology and experimental morphology* **68** 175-198.

Gardner RL 1984 An in situ cell marker for clonal analysis of development of the extraembryonic endoderm in the mouse. *Journal of embryology and experimental morphology* **80** 251-288.

Gardner RL 1997 The early blastocyst is bilaterally symmetrical and its axis of symmetry is aligned with the animal-vegetal axis of the zygote in the mouse. *Development* **124** 289-301.

Gardner RL 2001 Specification of embryonic axes begins before cleavage in normal mouse development. *Development* **128** 839-847.

Gardner RL 2002 Experimental analysis of second cleavage in the mouse. *Human reproduction* **17** 3178-3189.

Gearing DP, Gough NM, King JA, Hilton DJ, Nicola NA, Simpson RJ, Nice EC, Kelso A & Metcalf D 1987 Molecular cloning and expression of cDNA encoding a murine myeloid leukaemia inhibitory factor (LIF). *The EMBO journal* **6** 3995-4002.

Geens M, Mateizel I, Sermon K, De Rycke M, Spits C, Cauffman G, Devroey P, Tournaye H, Liebaers I & Van de Velde H 2009 Human embryonic stem cell lines derived from single blastomeres of two 4-cell stage embryos. *Human reproduction* **24** 2709-2717.

Gerhart J, Danilchik M, Doniach T, Roberts S, Rowning B & Stewart R 1989 Cortical rotation of the *Xenopus* egg: consequences for the anteroposterior pattern of embryonic dorsal development. *Development. Supplement* **107** 37-51.

Goldstein B 1995 Cell contacts orient some cell division axes in the *Caenorhabditis elegans* embryo. *The Journal of cell biology* **129** 1071-1080.

Goldstein B & Hird SN 1996 Specification of the anteroposterior axis in *Caenorhabditis elegans*. *Development* **122** 1467-1474.

Goossens V, De Rycke M, De Vos A, Staessen C, Michiels A, Verpoest W, Van Steirteghem A, Bertrand C, Liebaers I, Devroey P & Sermon K 2008 Diagnostic efficiency, embryonic development and clinical outcome after the biopsy of one or two blastomeres for preimplantation genetic diagnosis. *Human reproduction* **23** 481-492.

Graham CF & Deussen ZA 1978 Features of cell lineage in preimplantation mouse development. *Journal of embryology and experimental morphology* **48** 53-72.

Graves KH & Moreadith RW 1993 Derivation and characterization of putative pluripotential embryonic stem cells from preimplantation rabbit embryos. *Molecular reproduction and development* **36** 424-433.

Gulyas BJ 1975 The dependence of annulate lamellae formation on the nucleus in parthenogenetic rabbit eggs. *Cell and tissue research* **162** 475-481.

Gurdon JB 1992 The generation of diversity and pattern in animal development. *Cell* **68** 185-199.

H

Handyside AH, Pattinson JK, Penketh RJ, Delhanty JD, Winston RM & Tuddenham EG 1989 Biopsy of human preimplantation embryos and sexing by DNA amplification. *Lancet* **1** 347-349.

Hardy K, Warner A, Winston RM & Becker DL 1996 Expression of intercellular junctions during preimplantation development of the human embryo. *Molecular human reproduction* **2** 621-632.

Hemberger M & Dean W 2007 Epigenetic arbitration of cell fate decisions: tipping the bias. *Developmental cell* **12** 176-178.

Henckel A, Toth S & Arnaud P 2007 Early mouse embryo development: could epigenetics influence cell fate determination? *BioEssays: news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* **29** 520-524.

Hiiragi T & Solter D 2004 First cleavage plane of the mouse egg is not predetermined but defined by the topology of the two apposing pronuclei. *Nature* **430** 360-364.

Hogan B, Beddington R, Costantini F & Lacy E 1994 *Manipulating the mouse embryo: a laboratory manual*, edn 2. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Horie M, Ito A, Kiyohara T, Kawabe Y & Kamihira M 2010 E-cadherin gene-engineered feeder systems for supporting undifferentiated growth of mouse embryonic stem cells. *Journal of bioscience and bioengineering* **110** 582-587.

Houghton FD 2005 Role of gap junctions during early embryo development. *Reproduction* **129** 129-135.

Hovatta O, Mikkola M, Gertow K, Stromberg AM, Inzunza J, Hreinsson J, Rozell B, Blennow E, Andang M & Ahrlund-Richter L 2003 A culture system using human foreskin fibroblasts as feeder cells allows production of human embryonic stem cells. *Human reproduction* **18** 1404-1409.

Humphrey RK, Beattie GM, Lopez AD, Bucay N, King CC, Firpo MT, Rose-John S & Hayek A 2004 Maintenance of pluripotency in human embryonic stem cells is STAT3 independent. *Stem cells* **22** 522-530.

I

Ivanova N, Dobrin R, Lu R, Kotenko I, Levorse J, DeCoste C, Schafer X, Lun Y & Lemischka IR 2006 Dissecting self-renewal in stem cells with RNA interference. *Nature* **442** 533-538.

J

Jedrusik A, Parfitt DE, Guo G, Skamagki M, Grabarek JB, Johnson MH, Robson P & Zernicka-Goetz M 2008 Role of Cdx2 and cell polarity in cell allocation and specification of trophectoderm and inner cell mass in the mouse embryo. *Genes & development* **22** 2692-2706.

Jedrusik A, Bruce AW, Tan MH, Leong DE, Skamagki M, Yao M & Zernicka-Goetz M 2010 Maternally and zygotically provided Cdx2 have novel and critical roles for early development of the mouse embryo. *Developmental biology* **344** 66-78.

Ji YZ, Bomsel M, Jouannet P & Wolf JP 1997 Modifications of the human oocyte plasma membrane protein pattern during preovulatory maturation. *Molecular reproduction and development* **47** 120-126.

Jirmanova L, Afanassieff M, Gobert-Gosse S, Markossian S & Savatier P 2002 Differential contributions of ERK and PI3-kinase to the regulation of cyclin D1 expression and to the control of the G1/S transition in mouse embryonic stem cells. *Oncogene* **21** 5515-5528.

Johnson MH & Ziemek CA 1981 The foundation of two distinct cell lineages within the mouse morula. *Cell* **24** 71-80.

Johnson MH & McConnell JM 2004 Lineage allocation and cell polarity during mouse embryogenesis. *Seminars in cell & developmental biology* **15** 583-597.

K

Kahan BW & Ephrussi B 1970 Developmental potentialities of clonal in vitro cultures of mouse testicular teratoma. *Journal of the National Cancer Institute* **44** 1015-1036.

Kan NG, Stemmler MP, Junghans D, Kanzler B, de Vries WN, Dominis M & Kemler R 2007 Gene replacement reveals a specific role for E-cadherin in the formation of a functional trophectoderm. *Development* **134** 31-41.

Kanellopoulou C, Muljo SA, Kung AL, Ganesan S, Drapkin R, Jenuwein T, Livingston DM & Rajewsky K 2005 Dicer-deficient mouse embryonic stem cells are defective in differentiation and centromeric silencing. *Genes & development* **19** 489-501.

Kelly SJ 1977 Studies of the developmental potential of 4- and 8-cell stage mouse blastomeres. *The Journal of experimental zoology* **200** 365-376.

Kelly SJ, Mulnard JG & Graham CF 1978 Cell division and cell allocation in early mouse development. *Journal of embryology and experimental morphology* **48** 37-51.

Kidder GM & Winterhager E 2001 Intercellular communication in preimplantation development: the role of gap junctions. *Frontiers in bioscience: a journal and virtual library* **6** D731-736.

Kielman MF, Rindapaa M, Gaspar C, van Poppel N, Breukel C, van Leeuwen S, Taketo MM, Roberts S, Smits R & Fodde R 2002 Apc modulates embryonic stem-cell differentiation by controlling the dosage of beta-catenin signaling. *Nature genetics* **32** 594-605.

Klimanskaya I, Chung Y, Becker S, Lu SJ & Lanza R 2006 Human embryonic stem cell lines derived from single blastomeres. *Nature* **444** 481-485.

Kloosterman WP & Plasterk RH 2006 The diverse functions of microRNAs in animal development and disease. *Developmental cell* **11** 441-450.

Koivisto H, Hyvarinen M, Stromberg AM, Inzunza J, Matilainen E, Mikkola M, Hovatta O & Teerijoki H 2004 Cultures of human embryonic stem cells: serum replacement medium or serum-containing media and the effect of basic fibroblast growth factor. *Reproductive biomedicine online* **9** 330-337.

Kuijk EW, Chuva de Sousa Lopes SM, Geijsen N, Macklon N & Roelen BA 2011 The different shades of mammalian pluripotent stem cells. *Human reproduction update* **17** 254-271.

Kurotaki Y, Hatta K, Nakao K, Nabeshima Y & Fujimori T 2007 Blastocyst axis is specified independently of early cell lineage but aligns with the ZP shape. *Science* **316** 719-723.

L

Lee ST, Oh SW, Kim DY, Han JY, Moon SY & Lim JM 2006 Serum replacement with a growth factor-free synthetic substance in culture medium contributes to effective establishment of mouse embryonic stem cells of various origins. *Fertility and sterility* **86** 1137-1145.

Lefort N, Perrier AL, Laabi Y, Varela C & Peschanski M 2009 Human embryonic stem cells and genomic instability. *Regenerative medicine* **4** 899-909.

Lensch MW, Daheron L & Schlaeger TM 2006 Pluripotent stem cells and their niches. *Stem cell reviews* **2** 185-201.

Li M, Zhang D, Hou Y, Jiao L, Zheng X & Wang WH 2003 Isolation and culture of embryonic stem cells from porcine blastocysts. *Molecular reproduction and development* **65** 429-434.

Li Z, Qiu D, Sridharan I, Qian X, Zhang H, Zhang C & Wang R 2010 Spatially resolved quantification of E-cadherin on target hES cells. *The journal of physical chemistry* **114** 2894-2900.

Lodish H, Berk A, Zipursky SL, Matsudaira P, Baltimore D & Darnell J 2000 Cell to cell Signaling: Hormones and Receptors. In *Molecular Cell Biology*, edn 4. New York: WH Freeman Press.

Lorthongpanich C, Yang SH, Piotrowska-Nitsche K, Parnpai R & Chan AW 2008 Development of single mouse blastomeres into blastocysts, outgrowths and the establishment of embryonic stem cells. *Reproduction* **135** 805-813.

M

Maherali N, Sridharan R, Xie W, Utikal J, Eminli S, Arnold K, Stadtfeld M, Yachechko R, Tchieu J, Jaenisch R, Plath K & Hochedlinger K 2007 Directly reprogrammed fibroblasts show global epigenetic remodeling and widespread tissue contribution. *Cell stem cell* **1** 55-70.

Maherali N & Hochedlinger K 2008 Guidelines and techniques for the generation of induced pluripotent stem cells. *Cell stem cell* **3** 595-605.

Margueron R, Trojer P & Reinberg D 2005 The key to development: interpreting the histone code? *Current opinion in genetics & development* **15** 163-176.

Martin GR & Evans MJ 1975 Differentiation of clonal lines of teratocarcinoma cells: formation of embryoid bodies in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **72** 1441-1445.

Martin GR 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 of the United States of America* **78** 7634-7638.

Matsuda T, Nakamura T, Nakao K, Arai T, Katsuki M, Heike T & Yokota T 1999 STAT3 activation is sufficient to maintain an undifferentiated state of mouse embryonic stem cells. *The EMBO journal* **18** 4261-4269.

Matsui Y, Zsebo K & Hogan BL 1992 Derivation of pluripotential embryonic stem cells from murine primordial germ cells in culture. *Cell* **70** 841-847.

Meissner A, Wernig M & Jaenisch R 2007 Direct reprogramming of genetically unmodified fibroblasts into pluripotent stem cells. *Nature biotechnology* **25** 1177-1181.

Meissner A, Mikkelsen TS, Gu H, Wernig M, Hanna J, Sivachenko A, Zhang X, Bernstein BE, Nusbaum C, Jaffe DB, Gnirke A, Jaenisch R & Lander ES 2008 Genome-scale DNA methylation maps of pluripotent and differentiated cells. *Nature* **454** 766-770.

Mitsui K, Tokuzawa Y, Itoh H, Segawa K, Murakami M, Takahashi K, Maruyama M, Maeda M & Yamanaka S 2003 The homeoprotein Nanog is required for maintenance of pluripotency in mouse epiblast and ES cells. *Cell* **113** 631-642.

Moore NW, Adams CE & Rowson LE 1968 Developmental potential of single blastomeres of the rabbit egg. *Journal of reproduction and fertility* **17** 527-531.

Motosugi N, Bauer T, Polanski Z, Solter D & Hiiragi T 2005 Polarity of the mouse embryo is established at blastocyst and is not prepatterned. *Genes & development* **19** 1081-1092.

Murchison EP, Partridge JF, Tam OH, Cheloufi S & Hannon GJ 2005 Characterization of Dicer-deficient murine embryonic stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102** 12135-12140.

N

Nagaoka M, Koshimizu U, Yuasa S, Hattori F, Chen H, Tanaka T, Okabe M, Fukuda K & Akaike T 2006 E-cadherin-coated plates maintain pluripotent ES cells without colony formation. *PLoS one* **1** e15.

Nakagawa M, Koyanagi M, Tanabe K, Takahashi K, Ichisaka T, Aoi T, Okita K, Mochiduki Y, Takizawa N & Yamanaka S 2008 Generation of induced pluripotent stem cells without Myc from mouse and human fibroblasts. *Nature biotechnology* **26** 101-106.

Nichols J, Davidson D, Taga T, Yoshida K, Chambers I & Smith A 1996 Complementary tissue-specific expression of LIF and LIF-receptor mRNAs in early mouse embryogenesis. *Mechanisms of development* **57** 123-131.

Nichols J, Zevnik B, Anastassiadis K, Niwa H, Klewe-Nebenius D, Chambers I, Scholer H & Smith A 1998 Formation of pluripotent stem cells in the mammalian embryo depends on the POU transcription factor Oct4. *Cell* **95** 379-391.

Nichols J, Chambers I, Taga T & Smith A 2001 Physiological rationale for responsiveness of mouse embryonic stem cells to gp130 cytokines. *Development* **128** 2333-2339.

Nichols J & Ying QL 2006 Derivation and propagation of embryonic stem cells in serum- and feeder-free culture. *Methods in molecular biology* **329** 91-98.

Nishioka N, Inoue K, Adachi K, Kiyonari H, Ota M, Ralston A, Yabuta N, Hirahara S, Stephenson RO, Ogonuki N, Makita R, Kurihara H, Morin-Kensicki EM, Nojima H, Rossant J, Nakao K, Niwa H & Sasaki H 2009 The Hippo signaling pathway components Lats and Yap pattern Tead4 activity to distinguish mouse trophectoderm from inner cell mass. *Developmental cell* **16** 398-410.

Niwa H, Burdon T, Chambers I & Smith A 1998 Self-renewal of pluripotent embryonic stem cells is mediated via activation of STAT3. *Genes & development* **12** 2048-2060.

Niwa H 2001 Molecular mechanism to maintain stem cell renewal of ES cells. *Cell structure and function* **26** 137-148.

Nothias JY, Majumder S, Kaneko KJ & DePamphilis ML 1995 Regulation of gene expression at the beginning of mammalian development. *The Journal of biological chemistry* **270** 22077-22080.

O

Ohgushi M, Matsumura M, Eiraku M, Murakami K, Aramaki T, Nishiyama A, Muguruma K, Nakano T, Suga H, Ueno M, Ishizaki T, Suemori H, Narumiya S, Niwa H & Sasai Y 2010 Molecular pathway and cell state responsible for dissociation-induced apoptosis in human pluripotent stem cells. *Cell stem cell* **7** 225-239.

Okita K & Yamanaka S 2006 Intracellular signaling pathways regulating pluripotency of embryonic stem cells. *Current stem cell research & therapy* **1** 103-111.

Okita K, Ichisaka T & Yamanaka S 2007 Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells. *Nature* **448** 313-317.

P

Paling NR, Wheadon H, Bone HK & Welham MJ 2004 Regulation of embryonic stem cell self-renewal by phosphoinositide 3-kinase-dependent signaling. *The Journal of biological chemistry* **279** 48063-48070.

Pannetier M & Feil R 2007 Epigenetic stability of embryonic stem cells and developmental potential. *Trends in biotechnology* **25** 556-562.

Park IH, Zhao R, West JA, Yabuuchi A, Huo H, Ince TA, Lerou PH, Lensch MW & Daley GQ 2008 Reprogramming of human somatic cells to pluripotency with defined factors. *Nature* **451** 141-146.

Pereira PS, Teixeira A, Pinho S, Ferreira P, Fernandes J, Oliveira C, Seruca R, Suriano G & Casares F 2006 E-cadherin missense mutations, associated with hereditary diffuse gastric cancer (HDGC) syndrome, display distinct invasive behaviors and genetic interactions with the Wnt and Notch pathways in Drosophila epithelia. *Human molecular genetics* **15** 1704-1712.

Pickering SJ, Johnson MH, Braude PR & Houlston E 1988 Cytoskeletal organization in fresh, aged and spontaneously activated human oocytes. *Human reproduction* **3** 978-989.

Piotrowska K, Wianny F, Pedersen RA & Zernicka-Goetz M 2001 Blastomeres arising from the first cleavage division have distinguishable fates in normal mouse development. *Development* **128** 3739-3748.

Piotrowska K & Zernicka-Goetz M 2001 Role for sperm in spatial patterning of the early mouse embryo. *Nature* **409** 517-521.

Piotrowska K & Zernicka-Goetz M 2002 Early patterning of the mouse embryo-contributions of sperm and egg. *Development* **129** 5803-5813.

Piotrowska-Nitsche K & Zernicka-Goetz M 2005 Spatial arrangement of individual 4-cell stage blastomeres and the order in which they are generated correlate with blastocyst pattern in the mouse embryo. *Mechanisms of development* **122** 487-500.

Piotrowska-Nitsche K, Perea-Gomez A, Haraguchi S & Zernicka-Goetz M 2005 Four-cell stage mouse blastomeres have different developmental properties. *Development* **132** 479-490.

Plachta N, Bollenbach T, Pease S, Fraser SE & Pantazis P 2011 Oct4 kinetics predict cell lineage patterning in the early mammalian embryo. *Nature cell biology* **13** 117-123.

Plusa B, Frankenberg S, Chalmers A, Hadjantonakis AK, Moore CA, Papalopulu N, Papaioannou VE, Glover DM & Zernicka-Goetz M 2005 Downregulation of Par3 and α PKC function directs cells towards the ICM in the preimplantation mouse embryo. *Journal of cell science* **118** 505-515.

R

Ralston A, Cox BJ, Nishioka N, Sasaki H, Chea E, Rugg-Gunn P, Guo G, Robson P, Draper JS & Rossant J 2010 Gata3 regulates trophoblast development downstream of Tead4 and in parallel to Cdx2. *Development* **137** 395-403.

Resnick JL, Bixler LS, Cheng L & Donovan PJ 1992 Long-term proliferation of mouse primordial germ cells in culture. *Nature* **359** 550-551.

Robertson EJ 1987 Embryo-derived stem cell lines. In *Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells. A Practical Approach*, edn 1. Oxford: IRL Press.

Rosenthal MD, Wishnow RM & Sato GH 1970 In vitro growth and differentiation of clonal populations of multipotential mouse cells derived from a transplantable testicular teratocarcinoma. *Journal of the National Cancer Institute* **44** 1001-1014.

Rossant J 1976 Postimplantation development of blastomeres isolated from 4- and 8-cell mouse eggs. *Journal of embryology and experimental morphology* **36** 283-290.

Rossant J 2008 Stem cells and early lineage development. *Cell* **132** 527-531.

S

Schnabel R 1996 Pattern formation: regional specification in the early *C. elegans* embryo. *BioEssays: news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* **18** 591-594.

Schramm RD & Paprocki AM 2004 In vitro development and cell allocation following aggregation of split embryos with tetraploid or developmentally asynchronous blastomeres in rhesus monkeys. *Cloning and stem cells* **6** 302-314.

Sineva GS & Pospelov VA 2010 Inhibition of GSK3 β enhances both adhesive and signalling activities of β -catenin in mouse embryonic stem cells. *Biology of the cell* **102** 549-560.

Smith AG, Heath JK, Donaldson DD, Wong GG, Moreau J, Stahl M & Rogers D 1988 Inhibition of pluripotential embryonic stem cell differentiation by purified polypeptides. *Nature* **336** 688-690.

Smith AG 2001 Embryo-derived stem cells: of mice and men. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* **17** 435-462.

Solter D & Knowles BB 1975 Immunosurgery of mouse blastocyst. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **72** 5099-5102.

Soncin F, Mohamet L, Eckardt D, Ritson S, Eastham AM, Bobola N, Russell A, Davies S, Kemler R, Merry CL & Ward CM 2009 Abrogation of E-cadherin-mediated cell-cell contact in mouse embryonic stem cells results in reversible LIF-independent self-renewal. *Stem cells* **27** 2069-2080.

Spencer HL, Eastham AM, Merry CL, Southgate TD, Perez-Campo F, Soncin F, Ritson S, Kemler R, Stern PL & Ward CM 2007 E-cadherin inhibits cell surface localization of the pro-migratory 5T4 oncofetal antigen in mouse embryonic stem cells. *Molecular biology of the cell* **18** 2838-2851.

Spencer H, Keramari M & Ward CM 2011 Using cadherin expression to assess spontaneous differentiation of embryonic stem cells. *Methods in molecular biology* **690** 81-94.

Spindle A 1982 Cell allocation in preimplantation mouse chimeras. *The Journal of experimental zoology* **219** 361-367.

Steinberg MS & McNutt PM 1999 Cadherins and their connections: adhesion junctions have broader functions. *Current opinion in cell biology* **11** 554-560.

Stojkovic P, Lako M, Stewart R, Przyborski S, Armstrong L, Evans J, Murdoch A, Strachan T & Stojkovic M 2005 An autogeneic feeder cell system that efficiently supports growth of undifferentiated human embryonic stem cells. *Stem cells* **23** 306-314.

Strelchenko N, Verlinsky O, Kukharenko V & Verlinsky Y 2004 Morula-derived human embryonic stem cells. *Reproductive biomedicine online* **9** 623-629.

Strom S, Inzunza J, Grinnemo KH, Holmberg K, Matilainen E, Stromberg AM, Blennow E & Hovatta O 2007 Mechanical isolation of the inner cell mass is effective in derivation of new human embryonic stem cell lines. *Human reproduction* **22** 3051-3058.

Sumi T, Fujimoto Y, Nakatsuji N & Suemori H 2004 STAT3 is dispensable for maintenance of self-renewal in nonhuman primate embryonic stem cells. *Stem cells* **22** 861-872.

Sun H, Lesche R, Li DM, Liliental J, Zhang H, Gao J, Gavrilova N, Mueller B, Liu X & Wu H 1999 PTEN modulates cell cycle progression and cell survival by regulating phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate and Akt/protein kinase B signaling pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96** 6199-6204.

Surani MA & Barton SC 1984 Spatial distribution of blastomeres is dependent on cell division order and interactions in mouse morulae. *Developmental biology* **102** 335-343.

Suwinska A, Czolowska R, Ozdzanski W & Tarkowski AK 2008 Blastomeres of the mouse embryo lose totipotency after the fifth cleavage division: expression of Cdx2 and Oct4 and developmental potential of inner and outer blastomeres of 16- and 32-cell embryos. *Developmental biology* **322** 133-144.

T

Takahashi K & Yamanaka S 2006 Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* **126** 663-676.

Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K & Yamanaka S 2007 Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* **131** 861-872.

Tanaka N, Takeuchi T, Neri QV, Sills ES & Palermo GD 2006 Laser-assisted blastocyst dissection and subsequent cultivation of embryonic stem cells in a serum/cell free culture system: applications and preliminary results in a murine model. *Journal of translational medicine* **4** 20.

Tanaka S 2006 Derivation and culture of mouse trophoblast stem cells in vitro. *Methods in molecular biology* **329** 35-44.

Tang F, Kaneda M, O'Carroll D, Hajkova P, Barton SC, Sun YA, Lee C, Tarakhovsky A, Lao K & Surani MA 2007 Maternal microRNAs are essential for mouse zygotic development. *Genes & development* **21** 644-648.

Tarin JJ & Cano A 1999 Do human concepti have the potential to enter into diapause? *Human reproduction* **14** 2434-2436.

Tarkowski AK & Wroblewska J 1967 Development of blastomeres of mouse eggs isolated at the 4- and 8-cell stage. *Journal of embryology and experimental morphology* **18** 155-180.

Tarkowski AK, Ozdzinski W & Czolowska R 2001 How many blastomeres of the 4-cell embryo contribute cells to the mouse body? *The International journal of developmental biology* **45** 811-816.

Tarkowski AK, Suwinska A, Czolowska R & Ozdzinski W 2010 Individual blastomeres of 16- and 32-cell mouse embryos are able to develop into fetuses and mice. *Developmental biology* **348** 190-198.

Tesar PJ 2005 Derivation of germ-line-competent embryonic stem cell lines from preblastocyst mouse embryos. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102** 8239-8244.

Tesar PJ, Chenoweth JG, Brook FA, Davies TJ, Evans EP, Mack DL, Gardner RL & McKay RD 2007 New cell lines from mouse epiblast share defining features with human embryonic stem cells. *Nature* **448** 196-199.

Thomson JA, Kalishman J, Golos TG, Durning M, Harris CP, Becker RA & Hearn JP 1995 Isolation of a primate embryonic stem cell line. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **92** 7844-7848.

Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS & Jones JM 1998 Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* **282** 1145-1147.

Thorsteinsdottir S 1992 Basement membrane and fibronectin matrix are distinct entities in the developing mouse blastocyst. *The Anatomical Record* **232** 141-149.

Todorova MG, Soria B & Quesada I 2008 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.

Tomida M, Yamamoto-Yamaguchi Y & Hozumi M 1984 Purification of a factor inducing differentiation of mouse myeloid leukemic M1 cells from conditioned medium of mouse fibroblast L929 cells. *The Journal of biological chemistry* **259** 10978-10982.

Torres-Padilla ME, Parfitt DE, Kouzarides T & Zernicka-Goetz M 2007 Histone arginine methylation regulates pluripotency in the early mouse embryo. *Nature* **445** 214-218.

Torres-Padilla ME 2008 Cell identity in the preimplantation mammalian embryo: an epigenetic perspective from the mouse. *Human reproduction* **23** 1246-1252.

Turetsky T, Aizenman E, Gil Y, Weinberg N, Shufaro Y, Revel A, Laufer N, Simon A, Abeliovich D & Reubinoff BE 2008 Laser-assisted derivation of human embryonic stem cell lines from IVF embryos after preimplantation genetic diagnosis. *Human reproduction* **23** 46-53.

V

Van de Velde H, Cauffman G, Tournaye H, Devroey P & Liebaers I 2008 The four blastomeres of a 4-cell stage human embryo are able to develop individually into blastocysts with inner cell mass and trophoctoderm. *Human reproduction* **23** 1742-1747.

van Roy F & Berx G 2008 The cell-cell adhesion molecule E-cadherin. *Cellular and molecular life sciences* **65** 3756-3788.

Veiga A, Calderon G, Barri PN & Coroleu B 1987 Pregnancy after the replacement of a frozen-thawed embryo with less than 50% intact blastomeres. *Human reproduction* **2** 321-323.

Veiga A, Santalo J, Vidal F, Calderon G, Gimenez C, Boada M, Egozcue J & Barri PN 1994 Twin pregnancy after preimplantation diagnosis for sex selection. *Human reproduction* **9** 2156-2159.

Vestweber D, Gossler A, Boller K & Kemler R 1987 Expression and distribution of cell adhesion molecule uvomorulin in mouse preimplantation embryos. *Developmental biology* **124** 451-456.

Vinot S, Le T, Ohno S, Pawson T, Maro B & Louvet-Vallee S 2005 Asymmetric distribution of PAR proteins in the mouse embryo begins at the 8-cell stage during compaction. *Developmental biology* **282** 307-319.

Viswanathan SR, Mermel CH, Lu J, Lu CW, Golub TR & Daley GQ 2009 microRNA expression during trophoctoderm specification. *PloS one* **4** e6143.

Vlemincx K & Kemler R 1999 Cadherins and tissue formation: integrating adhesion and signaling. *BioEssays: news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* **21** 211-220.

W

Wakayama S, Hikichi T, Suetsugu R, Sakaide Y, Bui HT, Mizutani E & Wakayama T 2007 Efficient establishment of mouse embryonic stem cell lines from single blastomeres and polar bodies. *Stem cells* **25** 986-993.

Wang G, Zhang H, Zhao Y, Li J, Cai J, Wang P, Meng S, Feng J, Miao C, Ding M, Li D & Deng H 2005 Noggin and bFGF cooperate to maintain the pluripotency of human embryonic stem cells in the absence of feeder layers. *Biochemical and biophysical research communications* **330** 934-942.

Wang J, Rao S, Chu J, Shen X, Levasseur DN, Theunissen TW & Orkin SH 2006 A protein interaction network for pluripotency of embryonic stem cells. *Nature* **444** 364-368.

Wang QT, Piotrowska K, Ciemerych MA, Milenkovic L, Scott MP, Davis RW & Zernicka-Goetz M 2004 A genome-wide study of gene activity reveals developmental signaling pathways in the preimplantation mouse embryo. *Developmental cell* **6** 133-144.

Ware LM & Axelrad AA 1972 Inherited resistance to N- and B-tropic murine leukemia viruses in vitro: evidence that congenic mouse strains SIM and SIM.R differ at the Fv-1 locus. *Virology* **50** 339-348.

Watanabe K, Ueno M, Kamiya D, Nishiyama A, Matsumura M, Wataya T, Takahashi JB, Nishikawa S, Nishikawa S, Muguruma K & Sasai Y 2007 A ROCK inhibitor permits survival of dissociated human embryonic stem cells. *Nature biotechnology* **25** 681-686.

Watts JL, Etemad-Moghadam B, Guo S, Boyd L, Draper BW, Mello CC, Priess JR & Kemphues KJ 1996 par-6, a gene involved in the establishment of asymmetry in early *C. elegans* embryos, mediates the asymmetric localization of PAR-3. *Development* **122** 3133-3140.

Wernig M, Meissner A, Foreman R, Brambrink T, Ku M, Hochedlinger K, Bernstein BE & Jaenisch R 2007 In vitro reprogramming of fibroblasts into a pluripotent ES-cell-like state. *Nature* **448** 318-324.

Willadsen SM 1981 The development capacity of blastomeres from 4- and 8-cell sheep embryos. *Journal of embryology and experimental morphology* **65** 165-172.

Willert K & Nusse R 1998 Beta-catenin: a key mediator of Wnt signaling. *Current opinion in genetics & development* **8** 95-102.

Williams RL, Hilton DJ, Pease S, Willson TA, Stewart CL, Gearing DP, Wagner EF, Metcalf D, Nicola NA & Gough NM 1988 Myeloid leukaemia inhibitory factor maintains the developmental potential of embryonic stem cells. *Nature* **336** 684-687.

Wobus AM & Boheler KR 2005 Embryonic stem cells: prospects for developmental biology and cell therapy. *Physiological Reviews* **85** 635-678.

Wong RC, Pebay A, Nguyen LT, Koh KL & Pera MF 2004 Presence of functional gap junctions in human embryonic stem cells. *Stem cells* **22** 883-889.

Wong RC, Dottori M, Koh KL, Nguyen LT, Pera MF & Pebay A 2006 Gap junctions modulate apoptosis and colony growth of human embryonic stem cells maintained in a serum-free system. *Biochemical and biophysical research communications* **344** 181-188.

Worsdorfer P, Maxeiner S, Markopoulos C, Kirfel G, Wulf V, Auth T, Urschel S, von Maltzahn J & Willecke K 2008 Connexin expression and functional analysis of gap junctional communication in mouse embryonic stem cells. *Stem cells* **26** 431-439.

Wu Q, Chen X, Zhang J, Loh YH, Low TY, Zhang W, Zhang W, Sze SK, Lim B & Ng HH 2006 Sall4 interacts with Nanog and co-occupies Nanog genomic sites in embryonic stem cells. *The Journal of biological chemistry* **281** 24090-24094.

X

Xu C, Inokuma MS, Denham J, Golds K, Kundu P, Gold JD & Carpenter MK 2001 Feeder-free growth of undifferentiated human embryonic stem cells. *Nature biotechnology* **19** 971-974.

Xu Y, Zhu X, Hahm HS, Wei W, Hao E, Hayek A & Ding S 2010 Revealing a core signaling regulatory mechanism for pluripotent stem cell survival and self-renewal by small molecules. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107** 8129-8134.

Y

Yamaguchi TP, Takada S, Yoshikawa Y, Wu N & McMahon AP 1999 T (Brachyury) is a direct target of Wnt3a during paraxial mesoderm specification. *Genes & development* **13** 3185-3190.

Yamanaka Y, Ralston A, Stephenson RO & Rossant J 2006 Cell and molecular regulation of the mouse blastocyst. *Developmental dynamics: an official publication of the American Association of Anatomists* **235** 2301-2314.

Yamauchi N, Kiessling AA & Cooper GM 1994 The Ras/Raf signaling pathway is required for progression of mouse embryos through the two-cell stage. *Molecular and cellular biology* **14** 6655-6662.

Ying QL, Nichols J, Chambers I & Smith A 2003 BMP induction of Id proteins suppresses differentiation and sustains embryonic stem cell self-renewal in collaboration with STAT3. *Cell* **115** 281-292.

Yoshida-Koide U, Matsuda T, Saikawa K, Nakanuma Y, Yokota T, Asashima M & Koide H 2004 Involvement of Ras in extraembryonic endoderm differentiation of embryonic stem cells. *Biochemical and biophysical research communications* **313** 475-481.

Yu J, Vodyanik MA, Smuga-Otto K, Antosiewicz-Bourget J, Frane JL, Tian S, Nie J, Jonsdottir GA, Ruotti V, Stewart R, Slukvin II & Thomson JA 2007 Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science* **318** 1917-1920.

Yuri S, Fujimura S, Nimura K, Takeda N, Toyooka Y, Fujimura Y, Aburatani H, Ura K, Koseki H, Niwa H & Nishinakamura R 2009 Sall4 is essential for stabilization, but not for pluripotency, of embryonic stem cells by repressing aberrant trophectoderm gene expression. *Stem cells* **27** 796-805.

Z

Zernicka-Goetz M, Morris SA & Bruce AW 2009 Making a firm decision: multifaceted regulation of cell fate in the early mouse embryo. *Nature genetics* **10** 467-477.

Zhang J, Tam WL, Tong GQ, Wu Q, Chan HY, Soh BS, Lou Y, Yang J, Ma Y, Chai L, Ng HH, Lufkin T, Robson P & Lim B 2006 Sall4 modulates embryonic stem cell pluripotency and early embryonic development by the transcriptional regulation of Pou5f1. *Nature cell biology* **8** 1114-1123.

Zhao XD, Han X, Chew JL, Liu J, Chiu KP, Choo A, Orlov YL, Sung WK, Shahab A, Kuznetsov VA, Bourque G, Oh S, Ruan Y, Ng HH & Wei CL 2007 Whole-genome mapping of histone H3 Lys4 and 27 trimethylations reveals distinct genomic compartments in human embryonic stem cells. *Cell stem cell* **1** 286-298.

AGRAÏMENTS

En la realització d'aquesta tesi doctoral han contribuït moltes persones, sense l'ajut professional i personal de les quals no hagués estat possible.

AGRAEIXO...

Al Josep Santaló i l'Elena Ibáñez, els meus directors de tesi, per confiar i donar-me l'oportunitat de participar en aquest projecte que tot just naixia en el grup. Pel suport professional, consells, les hores de correccions, la formació, les oportunitats, la dedicació, la confiança... per saber que sempre hi estaven i de ben segur sempre hi seran.

A la gent que en algun moment ha format o forma part del grup: al Nuno pel suport matxaca dels inicis, a la Irene, a l'Anna Mallol per fer-me sentir un exemple...

A les companyes matxaques i amigues amb les que hem solapat aquesta experiència: a la Mariona per ser la meua imatge especular (tu saps tot el que implica), a la Marta Farré per haver compartit tantes confidències i bons moments!, a la Lydia per no deixar de sorprendre'm cada dia amb el seu caràcter tan especial! A les que una "mica" més veteranes, no han sigut menys especials: la Marta Martín (per algun que altre bon consell), l'Assumpta (encara recordo els primers moments al despatx!), la Nerea (la companya *stem!*). A la resta de "nenes" que fa menys que heu arribat però que també heu "calat": la Laia Hernández (la nota divertida), l'Anna Godo. A la resta de gent de la Unitat pels moments que segur hem compartit, per l'ajut, converses, gestió d'algun tràmit, pràctiques, dinars, sopars, congressos, ... La Fanny, la Carme, l'Anna Genescà, la Laura, el Leo, el Joan, la Montse, la Dolors, la Pilar, la Gema, la Laia Mora, l'Aurora, la Cristina Camprubí, la Zaida, l'Ester, la Cristina Frías, el Jonatan, el Marc, la Sílvia, l'Òscar, la Marta Pladevall, el Sergi, la Judit, l'Eli, la Tània, el Dani, l'Albert, la Puri, la Cristina Luppino, la Laia Vergés i tots el que en algun moment han passat per la Unitat.

A l'ajut professional extern proporcionat en alguns moments de crisi i/o necessitat del món de les *stem cells* i de la reproducció en general.

A mis amigos de Ripollet de toda la vida i a la resta que us heu anat afegint, per l'interès, els consells, els moments de distracció...

Y como no, a mi familia, ¡sin vosotros sí que todo esto no hubiera sido posible! La ayuda y comprensión sin medida y a todos los niveles. A mis sobrinas, Marta Li y Júlia, la parte más tierna e inocente, que sin ser conscientes todavía, ¡cuantísimo me llenan y me han ayudado en determinados momentos! Al Carles per donar-me tot el que necessitava i estar en tots els moments.

Moltíssimes gràcies a tots!

TESI DOCTORAL

Sheyla González Garrido

Abril 2011