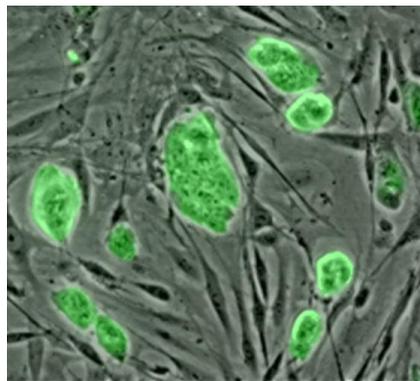


Tesina para optar por el grado de Licenciada en Ciencias Biológicas,  
Profundización en Biología Molecular.

---

## **Derivación de Células Madre Embrionarias (ESC) murinas como alternativa a su adquisición en otros laboratorios para uso en la producción de ratones genéticamente modificados.**



**Tali Korytnicki Grobert**

**Orientadora**  
Mag. Geraldine Schlapp

**Co-Orientadora**  
Dra. Martina Crispo

Unidad de Animales Transgénicos y de Experimentación  
Institut Pasteur de Montevideo

**Tribunal**  
Mag. Geraldine Schlapp  
Dr. Flavio Zolessi  
Dra. Mariela Bollati

**Enero 2014**

*“All cells come from cells. Every cell is born of a previous cell, which was born of a previous cell. Life comes from life.”*

*“Todas las células provienen de células. Cada célula nace de una célula previa, que nació de una célula previa. La vida proviene de la vida.”*

**John Green**

## Agradecimientos

A mi orientadora, Geraldine Schlapp por hacer posible este trabajo

A Martina Crispo, por abrirme las puertas del laboratorio

A Ana Paula Mulet y Pía Jacques, por contestar con paciencia todas mis preguntas

A mis compañeros de laboratorio, por su encantadora compañía

A Daniel Prieto, por tanto ánimo y tantos consejos imprescindibles

A mis amigos y familia –especialmente a Matías-, por su apoyo incondicional.

# Tabla de contenido

Resumen .....	6
Abreviaturas.....	8
Introducción.....	9
Células Madre .....	9
Células Madre Embrionarias .....	10
Derivación y condiciones de cultivo de ESC.....	12
Adquisición de líneas de ESC y su uso en la Unidad de Animales Transgénicos y de Experimentación .....	14
El factor de transcripción Oct4 .....	16
Objetivos .....	17
Objetivo general.....	17
Objetivos específicos .....	17
Materiales y Métodos .....	18
Reactivos .....	18
Metodología.....	19
Animales.....	19
Superovulación de ratones donantes de embriones* .....	20
Recuperación de embriones .....	20
Preparación de placas de cultivo .....	22
Expansión de las ESC.....	23
Análisis de imágenes .....	23
1. Protocolo basado en separación mecánica del cúmulo de células derivadas del ICM, de las células subyacentes derivadas del trofotodermo. ....	24
Recuperación de embriones .....	24

Cultivo de embriones .....	24
Modelado tridimensional de espacio de trabajo para diseño de capilar de manipulación.....	25
Cultivo y expansión de ESC .....	25
2. Protocolo basado en el crecimiento diferencial de ESC frente a células derivadas del trofotodermo.....	27
Recuperación de embriones .....	27
Cultivo de embriones .....	27
Cultivo y expansión de ESC .....	27
3. Protocolo con inmunocirugía y utilización de medio N2B27+“2i” .....	29
Remoción de la zona pelúcida .....	29
Inmunocirugía .....	29
Cultivo de epiblastos y células madre.....	31
Diseño de un protocolo para evidenciar el carácter pluripotente de un cultivo de células.....	31
Resultados y discusión .....	34
Recuperación de embriones .....	34
Cultivo de embriones <i>in vitro</i> .....	35
Remoción de zona pelúcida .....	37
1. Protocolo basado en separación mecánica del cúmulo de células derivadas del ICM, de las células subyacentes derivadas del trofotodermo. ....	39
2. Protocolo basado en el crecimiento diferencial de ESC frente a células derivadas del trofotodermo.....	43
3. Protocolo basado en inmunocirugía y utilización de medio N2B27+“2i” .....	47
Dificultades generales.....	51
Diseño de protocolo de caracterización .....	52
Conclusiones y perspectivas .....	54
Apéndice .....	55
Referencias bibliográficas .....	57

# Resumen

Las células madre embrionarias (ESC) tienen la capacidad de auto-replicarse manteniendo la pluripotencia y a su vez la habilidad de diferenciarse en diversos tipos celulares, incluyendo la línea germinal. El aislamiento y la manipulación genética de las ESC murinas representa uno de los logros más importantes en el campo de la biología del desarrollo de mamíferos ya que éstas se utilizan extensamente en investigaciones biomédicas, son el principal modelo para el estudio del desarrollo temprano de mamíferos y son utilizadas para la generación de modelos animales genéticamente modificados, principalmente de tipo *knock-out* para genes de interés. La Unidad de Animales Transgénicos y de Experimentación (UATE) del Institut Pasteur de Montevideo donde se realizó este trabajo, se especializa en la producción de ratones (*Mus musculus*) modificados genéticamente, por diversas técnicas, entre ellas la inyección de ESC en blastocistos. Actualmente la UATE utiliza ESC adquiridas de otros laboratorios, repositorios o empresas, pero la posibilidad de derivar ESC propias en la unidad tendría muchas potenciales ventajas. La ventaja principal reside en la posibilidad de contar con líneas de ESC de bajo número de pasajes, lo que mejoraría la eficacia en la producción de animales transgénicos que transmiten la modificación genética a la línea germinal. Además supone una reducción en los costos y la posibilidad de generar diferentes líneas de ESC a partir de los animales que se crían en el bioterio. El objetivo general de esta tesina fue evaluar la opción de derivar ESC murinas *de novo* a partir de blastocistos de una línea transgénica Oct4-GFP, como alternativa a la adquisición de las mismas de otros laboratorios, y poner a punto una herramienta para lograr evidenciar la pluripotencia de un cultivo para su identificación como ESC. Se probaron tres protocolos diferentes de derivación de ESC *de novo*: (a) basado en separación mecánica del cúmulo de células derivadas del macizo celular interno (ICM), de las células subyacentes derivadas del trofotodermo, (b) basado en el crecimiento diferencial de ESC frente a células derivadas del trofotodermo y (c) basado en inmunocirugía y utilización de medio N2B27+“2i”. Ninguno de los

protocolos fue efectivo en lograr la derivación de ESC, sin embargo se alcanzó un mayor avance empleando el protocolo basado en el crecimiento diferencial de ESC frente a células derivadas del trofectodermo. Se obtuvo un cultivo de células pluripotentes (Oct4-GFP positivas) aisladas, pero las mismas se diferenciaron luego del primer pasaje por lo que no fue posible continuar su expansión y establecer una línea de ESC. Este procedimiento no pudo entonces ser considerado como una alternativa al uso de ESC adquiridas de repositorios. A pesar de ello, dados los resultados obtenidos con el protocolo basado en el crecimiento diferencial de ESC frente a células derivadas del trofectodermo, se propone continuar trabajando para poner a punto las etapas finales del mismo, ajustando las condiciones de disgregación con tripsina y mejorando la calidad de los fibroblastos embrionarios murinos (MEF). En perspectiva, ya se dispone de un protocolo de evaluación del carácter pluripotente de las ESC puesto a punto. Esto nos permite contar con una herramienta – además del marcador Oct4-GFP– para la caracterización de las células antes de ser utilizadas para la producción de animales genéticamente modificados. Una vez que las células derivadas muestren la expresión de dichos genes se podrá realizar el conteo de cromosomas correspondiente, y finalmente un ensayo de quimeras como prueba determinante de la pluripotencia.

# Abreviaturas

En la mayoría de casos se toman las siglas del inglés para su mejor identificación en la literatura científica.

DIC: contraste diferencial de fase, del inglés Differential Interference Contrast.

Dpc: días post-coito.

ESC: células madre embrionarias, del inglés embryonic stem cells.

FBS: suero fetal bovino, del inglés fetal bovine serum.

GFP: proteína verde fluorescente, del inglés green fluorescent protein.

ICM: macizo celular interno, del inglés inner cell mass.

LIF: factor inhibidor de leucemia, del inglés leukemia inhibitory factor.

MEF: fibroblastos embrionarios murinos, del inglés murine embryonic fibroblasts.

NEAA: aminoácidos no esenciales, del inglés non essential amino acids.

P48: placa de 48 pocillos.

P96: placa de 96 pocillos.

UATE: Unidad de Animales Transgénicos y de Experimentación.

ZP: zona pelúcida.

# Introducción

## Células Madre

Las células madre se definen por dos características principales: poseer la capacidad de auto-replicarse manteniendo la pluripotencia y a su vez la habilidad de diferenciarse en diversos tipos celulares, incluyendo la línea germinal (Evans & Kaufman, 1981; Martin, 1981). Esto significa que cuando una célula madre se divide tiene el potencial de permanecer como célula madre o convertirse en una célula con una función más especializada (Stem Cell Basics, 2009).

Durante el desarrollo temprano de un organismo, las divisiones celulares son simétricas, es decir que cada célula se divide para dar lugar a dos células hijas con el mismo potencial (células pluripotentes). Luego, aparecen las divisiones asimétricas, donde las células hijas resultantes de la división son diferentes entre sí, una retiene el potencial de su progenitora y otra pasa a un estado de mayor diferenciación (Kocher, 2004). Existen pues distintos grados de potencial de diferenciación, los cuales se esquematizan en la tabla 1.

**Tabla 1.** Distintos potenciales de diferenciación celular. Las células con los potenciales de diferenciación subrayados y destacados corresponden a células madre.

Potencial de diferenciación	Tipos celulares en los que puede diferenciarse	Ejemplo de célula
<b><u>Totipotente</u></b>	Todos los tipos celulares	Cigoto y blastómeras
<b><u>Pluripotente</u></b>	Solamente células somáticas*	Células del ICM y sub-cultivadas
<b><u>Multipotente</u></b>	Muchos tipos celulares de un linaje	Células madre hematopoyéticas
<b><u>Oligopotente</u></b>	Ciertos tipos celulares de un linaje	Células madre vasculares
Unipotente	Sólo un tipo celular	Precursor mieloide
Potencial nulo	Ya no se dividen	Eritrocitos

ICM: macizo celular interno. \*Se excluye a las células que forman las membranas extraembrionarias. Modificado de Kochar, 2004.

## Células Madre Embrionarias

Las células madre embrionarias, como su nombre lo sugiere, derivan de embriones, en particular de embriones de mamíferos (Stem cell basics, 2009). Para la derivación de ESC pueden utilizarse como sustrato embriones de distintos estadios, desde cigotos hasta blastocistos eclosionados, blastómeras aisladas y también ICMs aislados de embriones en estadios tempranos (Brook & Gardner, 1997; Lee

*et al.*, 2012a). Se ha probado que en condiciones apropiadas, estas pueden auto-replicarse *in vitro* sin límites (Evans & Kaufman, 1981; Martin, 1981; Thomson *et al.*, 1998).

Su principal característica es la pluripotencia, pero también poseen otras características que las hacen peculiares. Tienen un tamaño aproximado de 8  $\mu\text{m}$  (Zwaka & Thomson, 2003) y crecen en colonias con una morfología característica -bordes lisos y refringentes, habitualmente sobre una capa sustentadora (ver Derivación y condiciones de cultivo de ESC).

El aislamiento y la manipulación genética de las ESC murinas representa uno de los logros más importantes en el campo de la biología del desarrollo de mamíferos. Se utilizan extensamente en investigaciones biomédicas, son el principal modelo para el estudio del desarrollo temprano de mamíferos (Nichols & Smith, 2011), así como son utilizadas para la generación de modelos animales genéticamente modificados, principalmente de tipo *knock-out* y *knock-in* para genes de interés.

Las ESC pueden microinyectarse en un embrión temprano e integrarse al ICM del mismo, colonizando muchos tejidos incluyendo la línea germinal y dando lugar a individuos quiméricos, es decir, individuos que se componen de células que tienen dos orígenes genéticos distintos (McLaren, 1976; Bradley *et al.*, 1984). A su vez, las ESC pueden ser modificadas genéticamente *in vitro*, por ejemplo por recombinación homóloga. De este modo, mediante la inyección de ESC es posible obtener animales que portan una alteración genética específica, los cuales pueden ser utilizados para estudiar la función del gen modificado en el contexto de un organismo entero *in vivo* (Gossler *et al.*, 1986; Robertson *et al.*, 1986). Esta es una de las principales herramientas para la generación de ratones *knock-out* y *knock-in*.

## Derivación y condiciones de cultivo de ESC

Las ESC se aislaron por primera vez en 1981 utilizando un medio de cultivo conteniendo suero fetal bovino (FBS), sobre una monocapa de MEF mitóticamente inactivados (Martin, 1981), que han sido desde entonces los componentes protagonistas de las condiciones tradicionales de cultivo de ESC. La derivación de ESC resulta muy compleja ya que son células extremadamente sensibles a las condiciones de cultivo y tienen a su vez muchos requerimientos, por lo que muchas variables influyen en la efectividad y eficiencia del proceso. Debido a esto, se han desarrollado distintos protocolos con variaciones que permiten facilitar el procedimiento y/o aumentar la eficacia.

La utilización de FBS sustenta el crecimiento de las células madre y se ha reportado en protocolos donde la derivación de ESC fue exitosa. A pesar de esto, al ser un producto biológico que no puede ser definido bioquímicamente y cuya composición difiere enormemente entre lotes, su uso aporta mucha variabilidad al proceso de derivación. Por este motivo se han desarrollado medios alternativos para evitar el uso de FBS principalmente durante la derivación, como el denominado N2B27 (Goldsborough *et al.*, 1998; Ying & Smith, 2003; Nichols & Ying, 2006), compuesto por el suplemento N2 (insulina, transferrina, progesterona, putrescina, selenito de sodio y albúmina sérica bovina) y los medios Neurobasal y B27, que puede ser preparado en el laboratorio o se puede obtener en su fórmula comercial ESGRO (Millipore, SF002-100). Otra alternativa de medio específico libre de suero para la derivación de ESC en ausencia de FBS es el medio KSR a base de KnockOut™ Serum replacement (Gibco, 10828-028).

Para que las células se mantengan indiferenciadas, tradicionalmente se utiliza una capa sustentadora, del inglés *feeder-layer*, compuesta por células que pueden ser tanto MEF como células estromales de la línea celular STO (Nagy *et al.*, 2003). El uso de *feeder-layer*, tiene un importante efecto en los procesos de derivación y mantenimiento de las ESC que se debe principalmente a los factores de crecimiento que secreta, entre ellos el factor inhibidor de leucemia (LIF), factor de

crecimiento de fibroblastos (FGF-2), factor de crecimiento transformante  $\beta$ 2 (TGF- $\beta$ 2), proteínas de la matriz extracelular, activina, Wnts y antagonistas de proteínas morfogenéticas óseas (BMPs) (Alitalo *et al.*, 1982; Moscatelli *et al.*, 1986; Hirofumi & Nakatsuji, 1987; Chen *et al.*, 2006; Prowse *et al.*, 2007). Sin embargo, existen actualmente protocolos de derivación y cultivo de ESC que prescindan del uso de *feeder-layer*, adicionando el LIF e inhibidores específicos de vías de diferenciación (ver más adelante “2i”) (Ying *et al.*, 2008).

Uno de los descubrimientos más importantes para el mantenimiento óptimo de las ESC en cultivo, fue el uso de LIF (Smith *et al.*, 1988; Williams *et al.*, 1988). El LIF es una citoquina multifuncional de la familia de las interleuquinas 6 (IL-6) que se une a un complejo en la superficie de la célula compuesto por el receptor LIF, LIFR $\beta$  y la molécula transmembrana gp130, resultando en la activación de la transcripción de STAT-3, que es esencial para la inhibición de la diferenciación de ESC murinas (Smith *et al.*, 1988; Niwa *et al.*, 1998; Matsuda *et al.*, 1999). Este factor puede ser adquirido comercialmente como LIF (Sigma, L5158) o puede ser producido y purificado a partir de cultivos de células transfectadas con el gen de LIF (Nagy *et al.*, 2003).

Además de estos refinamientos de las condiciones de derivación, se incorporó el uso de pequeñas moléculas inhibitoras de las vías de señalización, GSK3 y MEK, denominadas en conjunto “2i”, que están involucradas en la diferenciación celular y ayudan a mantener la pluripotencia de las ESC en ausencia de suero (Ying *et al.*, 2008).

Existen numerosos protocolos de derivación de ESC que combinan distintas condiciones de cultivo de las mencionadas anteriormente, que parten de embriones de distintos estadios o blastómeras aisladas; algunos de ellos plantean el aislamiento de las células del ICM mediante microdissección o inmunocirugía y otros se basan en el crecimiento diferencial de ESC frente a células derivadas del trofotodermo.

## Adquisición de líneas de ESC y su uso en la Unidad de Animales Transgénicos y de Experimentación

Existen diversas formas de obtener líneas de ESC para el trabajo en el laboratorio: (a) se pueden solicitar líneas de ESC en otros laboratorios o plataformas donde ya han sido establecidas y caracterizadas ; (b) es posible adquirirlas en empresas comerciales como Jackson Laboratory, Mirimus, Thermo Scientific, etc., o de repositorios tales como Knock Out Mouse Repository (KOMP) de la Universidad Davies de California, EEUU; European Conditional Mouse Mutagenesis Program (EUCOMM), de la comunidad europea; entre otros; o (c) se pueden derivar *de novo* en el laboratorio.

Actualmente existe en el mercado una amplia disponibilidad de ESC con diversos fondos genéticos – siendo los más comunes aquellas de la cepa 129-, y con diversas modificaciones genéticas. Cada criovial de ESC tiene un costo aproximado de U\$D 1200\* –en los que el número de células varía entre 2 y 4 millones aproximadamente según el proveedor-, y hay que tener en cuenta que se necesitan adquirir al menos dos crioviales de tres clones diferentes para asegurarse la obtención de quimeras. Además, se debe agregar el costo de envío que ronda los U\$D 300\*\*. Además del alto costo, otra gran desventaja es que al ser producidas y expandidas para su distribución y/o venta, son células que han pasado por un alto número de pasajes –entre 10 y 15 habitualmente-. Esto hace que la posibilidad de expandir estas células en el laboratorio sea reducida. Un inconveniente mayor es que el uso de ESC con alto número de pasajes reduce la eficiencia en la obtención de quimeras con capacidad de transmitir la modificación genética a la descendencia, ya que es más probable que una mayor cantidad de células presenten cariotipos anormales (por ganancia, pérdida o translocaciones cromosomales). Asimismo, algunos repositorios de ESC aseguran que sólo el 50% de las células de cada criovial tienen un cariotipo normal lo que tiene un impacto negativo en su uso en la producción

de quimeras. Existe la posibilidad de adquirir líneas con número de pasaje “ultra” bajo, pero en este caso el costo es de U\$D 1500.

Asimismo, es posible disponer de servicios de derivación de ESC *de novo* a partir de cepas particulares, lo cual tiene un costo base de aproximadamente U\$D 3000 y está disponible en ciertos laboratorios como por ejemplo en el Transgenical Animal Model Core de la Universidad de Michigan, EEUU.

La Unidad de Animales Transgénicos y de Experimentación (UATE) del Institut Pasteur de Montevideo (IPMon), se especializa en la producción de animales modificados genéticamente, principalmente ratones (*Mus musculus*), por diversas técnicas: microinyección de ADN en pronúcleos embrionarios, microinyección de lentivirus, transposones, y de ESC modificadas genéticamente, en embriones. Desde el año 2008 ha generado quimeras para diversos investigadores del país y de la región, empleando líneas de ESC cedidas por otros laboratorios o adquiridas en repositorios.

La posibilidad de derivar ESC propias en la unidad tendría varias potenciales ventajas. La ventaja principal reside en la posibilidad de contar con líneas de ESC de bajo número de pasajes, lo que mejoraría la eficacia en la producción de animales transgénicos que transmiten la modificación genética a la línea germinal. Además, si se cuenta con un protocolo de derivación puesto a punto, se podrían obtener ESC con diversos fondos genéticos según las necesidades, e incluso se podrían derivar células madre a partir de animales genéticamente modificados que se crían en el bioterio. Por último, cabe destacar que la derivación de estas células en el laboratorio podría resultar en un ahorro significativo de dinero, siendo los costos de derivación teóricos menores a los de la adquisición.

\*Precios para la compra de ESC para su uso en investigación, de los laboratorios mencionados anteriormente.

\*\*Precio promedio de envío de EEUU a Montevideo en condiciones apropiadas para el traslado de crioviales de células congeladas; desde otros países el costo puede ser superior.

## El factor de transcripción Oct4

Oct4 es un factor de transcripción codificado por el gen *Oct4* (Hans *et al.*, 1990), involucrado en el mantenimiento de la pluripotencia mediante activación y represión de genes vinculados a las vías de diferenciación (Pan *et al.*, 2002). La evaluación de las redes reguladoras que son responsables de la pluripotencia resulta clave en el estudio de las ESC. Señales extracelulares y segundos mensajeros inician cascadas de regulación al modular ciertos reguladores autónomos de las células como el factor de transcripción Oct4 y otros como Nanog y Sox2 (Boiani & Schöler, 2005). Las ESC expresan Oct4 mientras preservan su carácter pluripotente (Pesce *et al.*, 1998; Surani, 2001; Donovan & De Miguel, 2003).

En la UATE se cría una cepa murina de fondo genético C57BL/6J –cepa importada por la Dra. Mariela Bollati, investigadora a cargo de la Unidad de Biología Celular del IPMon- que posee el promotor del gen *Oct4* ligado al gen de la proteína verde fluorescente (GFP) como reportero, de manera que la actividad de Oct4 puede evidenciarse mediante visualización de fluorescencia de color verde.

La posibilidad de usar blastocistos de dicha cepa Oct4-GFP como material de partida para derivar ESC nos permitiría monitorear durante este proceso la pluripotencia de las células mediante la visualización de fluorescencia de color verde, así como también durante la expansión y el momento previo a la inyección de las mismas.

# Objetivos

## Objetivo general

El objetivo general de esta tesina fue evaluar la opción de derivar ESC murinas *de novo* a partir de blastocistos de una línea transgénica Oct4-GFP, como alternativa a la adquisición de las mismas de otros laboratorios, y poner a punto una herramienta para lograr evidenciar la pluripotencia de un cultivo para su identificación como ESC.

## Objetivos específicos

Como objetivos específicos se planteó:

1. Estudiar y ensayar tres protocolos diferentes de derivación de ESC *de novo*:
  - Protocolo basado en separación mecánica del cúmulo de células derivadas del ICM, de las células subyacentes derivadas del trofotodermo.
  - Protocolo basado en el crecimiento diferencial de ESC frente a células derivadas del trofotodermo.
  - Protocolo basado en inmunocirugía y utilización de medio N2B27+“2i”.
2. Evaluar diversas herramientas para evidenciar el carácter pluripotente de las células en cultivo y seleccionar la más apropiada.
3. Diseñar un protocolo para dicha herramienta y ponerlo a punto.

# Materiales y Métodos

## Reactivos

**Medio M16** (Sigma, M7292): Medio recomendado para el cultivo *in vitro* de embriones murinos en estadios previos a la implantación. Es una solución de tipo Krebs-Ringer, que contiene piruvato y lactato como fuente de energía ya que los embriones en estadios previos a la implantación no utilizan eficientemente la glucosa. Contiene  $\text{NaHCO}_3$  como buffer, cuyo pH a su vez es regulado por el  $\text{CO}_2$  (5%) presente en las estufas de incubación (Nagy *et al.*, 2003).

**Medio M2** (Sigma, M7167): Medio recomendado para la manipulación de embriones murinos en estadios previos a la implantación en atmósfera no controlada. M2 es un medio similar al M16, siendo la principal modificación la presencia de buffer HEPES.

**KSOM** (Millipore, MR-020P-5F): Medio comercial utilizado para el cultivo de embriones *in vitro*.

**Solución de ácido tyrodes** (Sigma, T1788): Solución ácida utilizada para la remoción de la zona pelúcida de los embriones.

**Medio ESC:** Medio estándar utilizado de rutina para cultivo de ESC. Compuesto por DMEM glutamax (Gibco, 10566-016), 15% de FBS (Gibco, 12657-029), LIF producido en el laboratorio,  $\beta$ -mercaptoetanol (Aldrich, M6250), aminoácidos no esenciales (NEAA) (Gibco, 11140-050) y penicilina-estreptomina (Gibco, 15140-122; opcional).

**Medio N2B27:** Medio libre de suero específico para aumentar la eficiencia en la derivación de ESC. Compuesto por DMEM, N2 (Gibco, 17502-048), Neurobasal Medium (Gibco, 21103-049), B27 (Gibco, 17504-044) y LIF.

**Inhibidor MEK** (Stemgent, 04-0006): Es un inhibidor selectivo no competitivo de MEK utilizado para aumentar la eficiencia en la derivación de ESC.

**Inhibidor GSK3** (Stemgent, 04-0004): Es un inhibidor selectivo no competitivo de GSK3 utilizado para aumentar la eficiencia en la derivación de ESC.

**Medio KSR**: Medio libre de suero específico para aumentar la eficiencia en la derivación de ESC. Compuesto por DMEM-KO (Gibco, 10829-018), KnockOut Serum Replacement (Gibco, 10828-028), LIF, NEAA,  $\beta$ -mercaptoetanol y penicilina-estreptomina (opcional).

**Suero anti-ratón de conejo** (Sigma, M5774): Reactivo de incubación primaria de la inmunocirugía. Se une a la superficie de las células del trofoblasto de los embriones.

**Complemento de suero de cobayo** (Sigma, S1639): Reactivo de incubación secundaria de la inmunocirugía.

**Solución de tripsina** (Sigma, T4799): Solución a base de tripsina, una proteasa de origen porcino con alto poder digestivo, utilizada para la disociación de células en cultivo.

## Metodología

### Animales

Los ratones utilizados fueron criados en el bioterio libre de patógenos específicos (SPF) de la UATE del Institut Pasteur de Montevideo. Los animales se alojaron en cajas de polipropileno, en estanterías ventiladas individualmente (Tecniplast, Milán, Italia), en habitaciones con presión positiva, con una temperatura de  $20 \pm 1$  °C, 40-60% de humedad relativa y ciclos de luz/oscuridad de 14/10 hs. Los protocolos utilizados cumplen con todos los requisitos locales e internacionales en materia de normativas en experimentación animal (Ley Nacional 18.611; Recomendaciones FELASA, 2000).

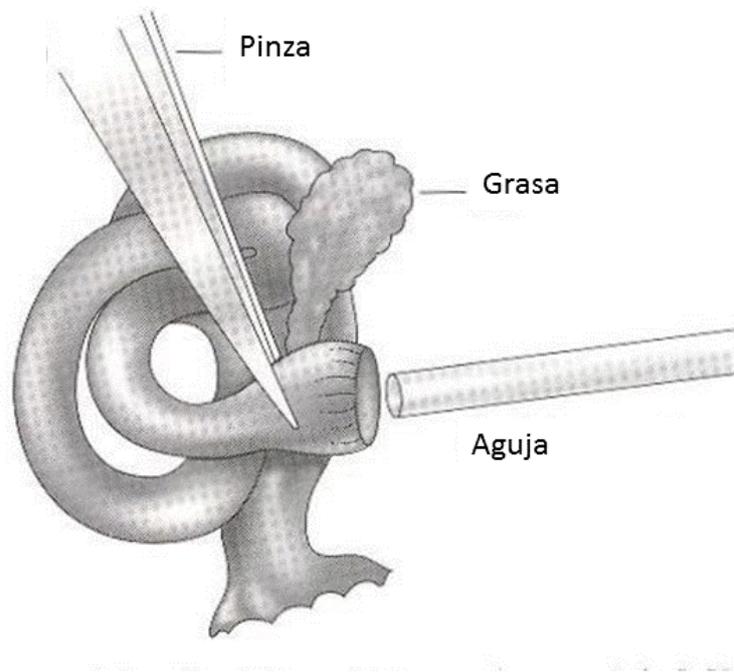
### Superovulación de ratones donantes de embriones\*

Con el fin de emplear una menor cantidad de animales y obtener una mayor cantidad de embriones por hembra, se empleó un protocolo de superovulación. Se utilizaron entre 6 y 8 hembras Oct4-GFP pre-púberes, de 3 semanas de edad, por réplica. Estas hembras donantes de embriones se superovularon con una dosis de 5 UI de gonadotropina coriónica equina (eCG, Novormon, Syntex, Buenos Aires, Argentina) por vía intraperitoneal, que posee efecto FSH y LH, con el objetivo de incrementar el reclutamiento folicular en el ovario. Cuarenta y seis horas después se les administró una dosis de 5 UI de gonadotropina coriónica humana (hCG, Ovusyn, Syntex) por vía intraperitoneal con efecto LH, con el objetivo de inducir la ovulación de manera sincronizada. Al momento de administrar la hCG, cada hembra fue apareada con un macho Oct4-GFP.

### Recuperación de embriones

Las hembras se sacrificaron por dislocación cervical o en cámara de CO<sub>2</sub> a los 2.5 dpc (días post-coito)\*. Luego, se realizó un lavado (*flushing*) de ambos oviductos bajo lupa estereoscópica, recuperando los embriones en una gota de medio con el pH regulado, M2 (ver reactivos). El procedimiento consiste en la disección de ambos oviductos, luego se ingresa la punta de una aguja de calibre muy pequeño (30G) -previamente limada para evitar rasgar el oviducto- a través del infundíbulo, y una vez dentro se instila medio M2 o PBS en el oviducto para recuperar los embriones por el extremo opuesto (Nagy *et al.*, 2003), como se esquematiza en la figura 1. A los 2.5 dpc, se espera encontrar embriones en estadio de ocho células mayormente, pero también pueden haber ovocitos sin fecundar, embriones con desarrollo retrasado o detenido y embriones degenerados. Para su identificación se utilizó al comienzo una guía de imágenes de embriones en los diferentes estadios (figura 2), hasta lograr hacerlo sin la misma. Esta guía también se utilizó para aprender a identificar los distintos estadios por los que transitan los embriones durante el desarrollo *in vitro* y para asimilar la observación de la zona pelúcida (ZP), que es la matriz extracelular densa que

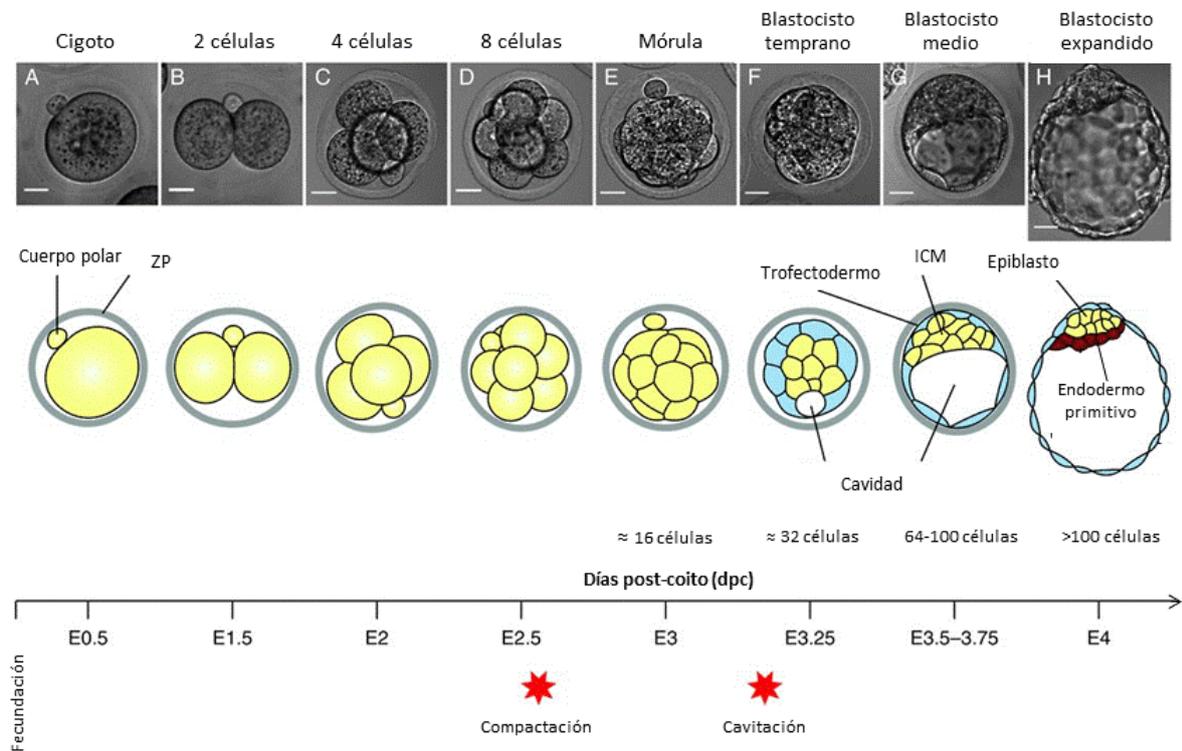
circunda los embriones de mamíferos hasta el momento de su eclosión (Gilbert, 2006). Los embriones se colocaron en placas de Petri de 35 mm en microgotas de medio KSOM, M16 o N2B27+”2i” según el protocolo (ver reactivos), bajo aceite mineral, y se incubaron a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub> en aire, durante 72 horas o hasta el estadio de blastocistos expandidos. Las condiciones de cultivo se mantuvieron durante todo el proceso.



**Figura 1.** Esquema de lavado de oviducto para la recuperación de embriones de 8 células. Modificado de Nagy *et al.*, 2003.

\*Inicialmente la manipulación de ratones la realizó Geraldine Schlapp, quien cuenta con la acreditación de la Comisión Nacional de Experimentación Animal (CNEA). Durante el curso de realización de esta tesina, Tali Korytnicki participó de un curso relativo a Uso y manejo de animales de experimentación (CHEA), donde adquirió conceptos teóricos y experiencia práctica para manipular los animales. De allí en más Korytnicki realizó estas manipulaciones.

La manipulación de los animales (superovulación) y la recuperación de embriones se realizaron de la misma manera en los tres protocolos que se detallarán a continuación.



**Figura 2.** Guía de imágenes para la identificación del estadio de embriones murinos; barra 20  $\mu\text{m}$ . Modificado de Saiz y Plusa, 2012.

### Preparación de placas de cultivo

Las placas en las que se cultivaron los blastocistos eclosionados fueron previamente gelatinizadas y sembradas con una capa de MEF mitóticamente inactivados con mitomicina C (excepto en el tercer protocolo donde se realiza un cultivo libre de MEF).

Para gelatinizar las placas se cubre la superficie de las mismas con el volumen indicado de gelatina 0,1%, se mantienen 30 minutos, y luego se aspira la solución. Todo el procedimiento se realiza en una cámara de flujo laminar vertical.

Sobre la placa gelatinizada se siembran los fibroblastos embrionarios de un pasaje temprano –de ser posible no más de 5 pasajes- para generar la *feeder-layer*, en una cantidad apropiada según la superficie.

### Expansión de las ESC

Una vez obtenidas las colonias de ESC mediante cualquiera de los protocolos, se pretendía expandir progresivamente las líneas celulares evaluando su pluripotencia mediante la visualización de la expresión del marcador Oct4 por fluorescencia. Dado que en ningún caso están reportados los tiempos exactos para realizar los pasajes sucesivos, para ello se toma en cuenta la experiencia previa en el cultivo y expansión de ESC derivadas en otros laboratorios. Se pretende obtener un número suficiente de células que permita realizar ensayos para caracterizarlas y generar un stock de células para uso del laboratorio.

### Análisis de imágenes

Las imágenes de los cultivos fueron tomadas en microscopio de epifluorescencia modelo *IX81 Olympus* con la técnica de contraste diferencial de fase (DIC) y analizadas utilizando el programa de acceso libre ImageJ versión 1.46 (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>), utilizando su guía de procesamiento de imágenes (Abramoff et al, 2004).

## **1. Protocolo basado en separación mecánica del cúmulo de células derivadas del ICM, de las células subyacentes derivadas del trofotodermo.**

Este protocolo es una adaptación del descrito en “Isolation and culture of blastocyst-derived stem cell lines” (Nagy *et al.*, 2003). La particularidad de este protocolo reside en cultivar los blastocistos eclosionados sobre MEF, para luego realizar una separación mecánica del cúmulo de células que crecen a partir del ICM, de las células del trofotodermo subyacentes, utilizando un capilar de vidrio. Este protocolo utiliza el medio de cultivo clásico para el cultivo de ESC (medio ESC).

### Recuperación de embriones

Se realizó una modificación de este protocolo original para la obtención de los embriones. El protocolo indica la obtención de los embriones 3.5 dpc (blastocistos), en el estadio de blastocistos tempranos, pero se decidió obtenerlos a los 2.5 dpc (8 células). Este cambio se justifica ya que esta técnica se realiza de manera rutinaria en el laboratorio y el desarrollo *in vitro* de los embriones obtenidos en dicho estadio es bueno, además, varios protocolos de derivación parten de embriones de 8 células.

### Cultivo de embriones

Los embriones obtenidos se cultivan en medio de cultivo M16 durante 3 días o hasta que alcanzan el estadio de blastocisto expandido. Luego se transfiriere cada embrión a un pocillo de una placa P96 gelatinizada\*, conteniendo MEF y medio ESC. Se considera que la superficie de los pocillos de la placa P96 es apropiada para el cultivo de blastocistos expandidos ya que la mayoría de los protocolos las utiliza.

\*Se utiliza la placa P96 en lugar de una placa de 10 mm como indica el protocolo, para esto se toman las precauciones necesarias en el diseño del capilar de manipulación.

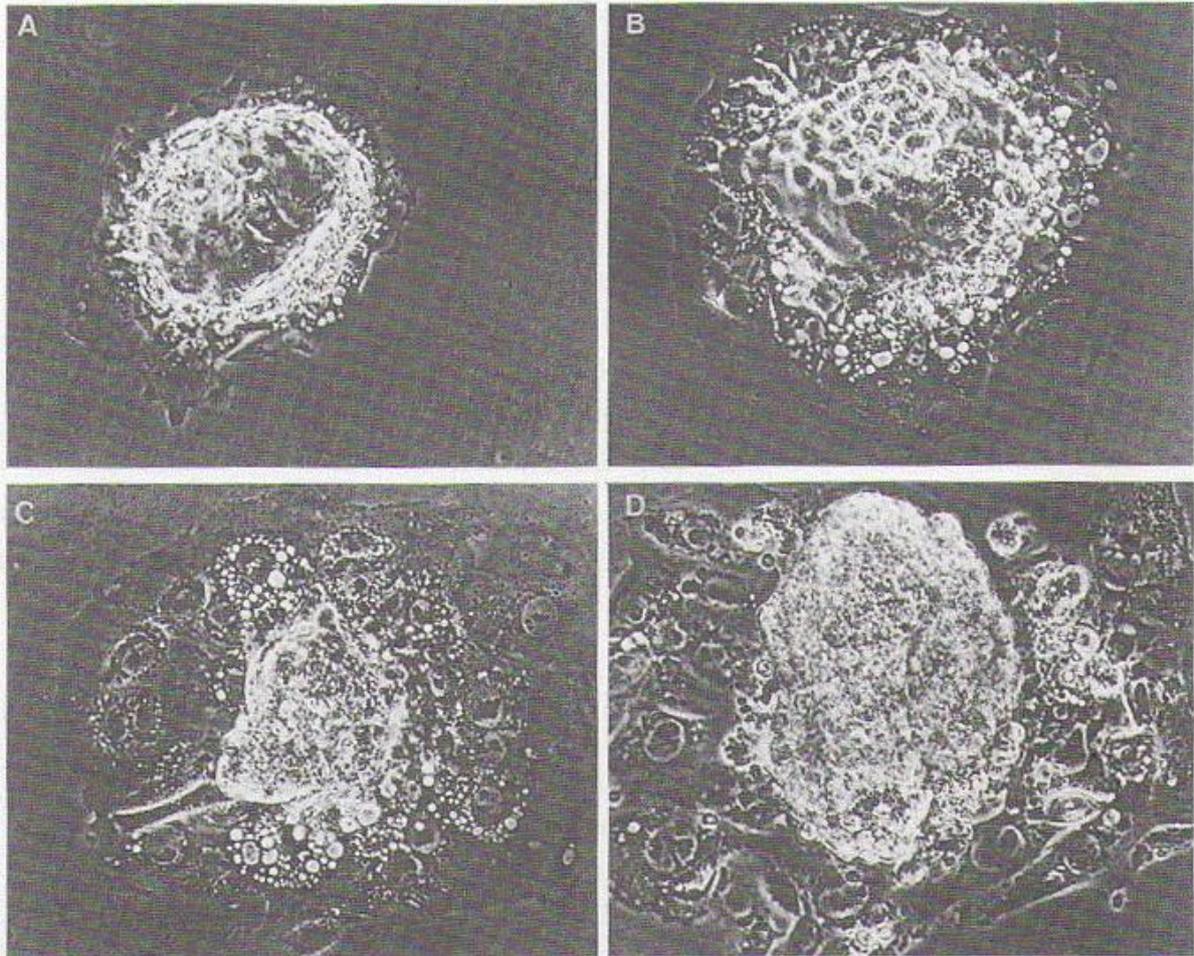
## Modelado tridimensional de espacio de trabajo para diseño de capilar de manipulación

Para resolver el diseño de los capilares de manipulación, se generó un modelo tridimensional del espacio de trabajo en el microscopio de epifluorescencia utilizando el programa de acceso libre SketchUp Make versión 13.0.4812 (<http://www.sketchup.com/products/sketchup-make>).

## Cultivo y expansión de ESC

Se cultivan los embriones en estadio de blastocistos expandidos en pocillos individuales de una placa P96 hasta que el ICM haya alcanzado un crecimiento similar al de la figura 3D, lo que normalmente lleva un tiempo de entre 4 y 5 días. En este paso se desprende este cúmulo de células de la capa subyacente de células del trofotodermo, utilizando un capilar, bajo lupa estereoscópica. Se seleccionan los cúmulos de células que no presenten células diferenciadas en sus capas más externas, porque son los que tienen más probabilidades de generar ESC. A partir de este momento todas las manipulaciones se realizan en cámara de flujo laminar vertical. Estos cúmulos se lavan dos veces en PBS libre de  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$  y luego se transfieren a una microgota de tripsina (25  $\mu\text{l}$ ). Se incuban entre 3 y 4 minutos y luego se disgregan con un capilar que contiene medio con suero para inhibir la tripsina. El diámetro de este capilar debe ser menor que el cúmulo. Lo recomendado es disgregarlo en grupos de 3 o 4 células, nunca en células individuales. Cada gota de medio conteniendo células disgregadas se transfiere a un pocillo de placa P96.

Se debe inspeccionar cada pocillo diariamente, aunque generalmente 2 días después aparecen colonias primarias de células, algunas de las cuales tendrán morfología de tipo ESC. Si este tipo de colonias dominan el pocillo, se comienza a expandir gradualmente el cultivo.



**Figura 3.** Cambios progresivos en la morfología de los blastocistos en cultivo. (A) 48 hs; (B) 72 hs; (C) 96 hs; (D) 120 hs. Cuando el cúmulo de células derivadas del ICM alcanza el tamaño y la forma que se ilustran en la imagen D, es el momento adecuado para su separación de las células subyacentes y su disgregación. (Nagy *et al.*, 2003).

## 2. Protocolo basado en el crecimiento diferencial de ESC frente a células derivadas del trofotodermo.

Este protocolo es una adaptación del descrito en Yang *et al.*, 2009. Para la adaptación del mismo se realizaron consultas vía correo electrónico a una de las autoras del mismo -Kathleen Banks, de la Universidad British Columbia, EEUU. La particularidad de este método reside en el uso de un medio de cultivo libre de suero, medio KSR, para aumentar la eficiencia de derivación.

### Recuperación de embriones

Al igual que en el protocolo 1, se realizó una modificación del protocolo original para la obtención de los embriones, realizando el *flushing* a los 2.5 dpc (8 células).

### Cultivo de embriones

Los embriones obtenidos se cultivan en KSOM durante 3 días. Luego se transfiere cada embrión a un pocillo de una placa P96 gelatinizada, conteniendo MEF y medio KSR. El tiempo de cultivo en este paso es de 7 a 9 días sin cambio de medio, con el menor movimiento posible de la placa. A partir de este momento todas las manipulaciones se realizan en cámara de flujo laminar vertical.

### Cultivo y expansión de ESC

Se evalúa el desarrollo del ICM y se seleccionan aquellos embriones que presentan un ICM bien desarrollado. Los embriones seleccionados se tratan con tripsina y se siembran cada uno en un pocillo de una placa P96 gelatinizada, conteniendo MEF y medio KSR. Cuatro días después, se comienza a cambiar el medio de cultivo por medio ESC progresivamente para que las células se adapten, en proporciones de 25%, 50% y 75%, incrementando cada día. Este cambio de medio se debe a que el medio KSR presenta ventajas para la derivación, pero no para el cultivo rutinario de ESC. El séptimo día a partir del pasaje a la placa P96 se trata cada pocillo con tripsina y se siembra

nuevamente en un pocillo nuevo del mismo tamaño con medio ESC, con cambio de medio diario. Luego de 2 o 3 días deberían poder identificarse pequeñas colonias primarias de células de tipo ESC en algunos pocillos. Una vez que se alcanza la confluencia, se realiza un pasaje en la proporción 1:3.

### 3. Protocolo con inmunocirugía y utilización de medio N2B27+“2i”

Este protocolo es una adaptación del protocolo descrito en Ying *et al.*, 2008. Presenta varias particularidades: a) el uso de inmunocirugía, técnica muy selectiva basada en el uso de anticuerpos, para separar el epiblasto de las células del trofotodermo; b) el uso de un medio libre de suero, N2B27; c) el agregado de inhibidores de diferenciación, “2i”, lo que supone un aumento en la eficiencia de derivación; y d) la derivación sin MEF, es decir directamente sobre gelatina.

#### Remoción de la zona pelúcida

Para la realización de la inmunocirugía es necesario que los embriones estén “desnudos” o sea, que no posean ZP. Aquellos que no hayan eclosionado naturalmente se separarán bajo microscopio para eliminar la ZP mediante una breve incubación con un medio acidificado a pH 2.5 o utilizando un protocolo más efectivo con una solución de ácido Tyrodes (Hogan *et al.*, 1986).

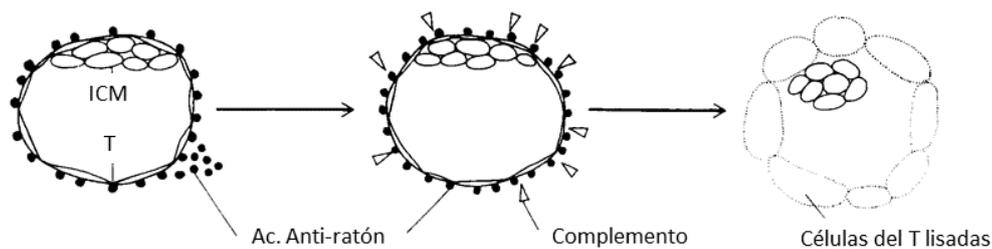
#### Inmunocirugía

La inmunocirugía es una técnica que permite aislar las células del ICM de aquéllas del trofotodermo. En los blastocistos expandidos y en los blastocistos eclosionados, el ICM se divide en hipoblasto, que dará lugar al endodermo extraembrionario, y epiblasto, que dará lugar a las tres capas germinales (Gilbert, 2006). Es a partir de estas células del epiblasto que se pretende derivar ESC.

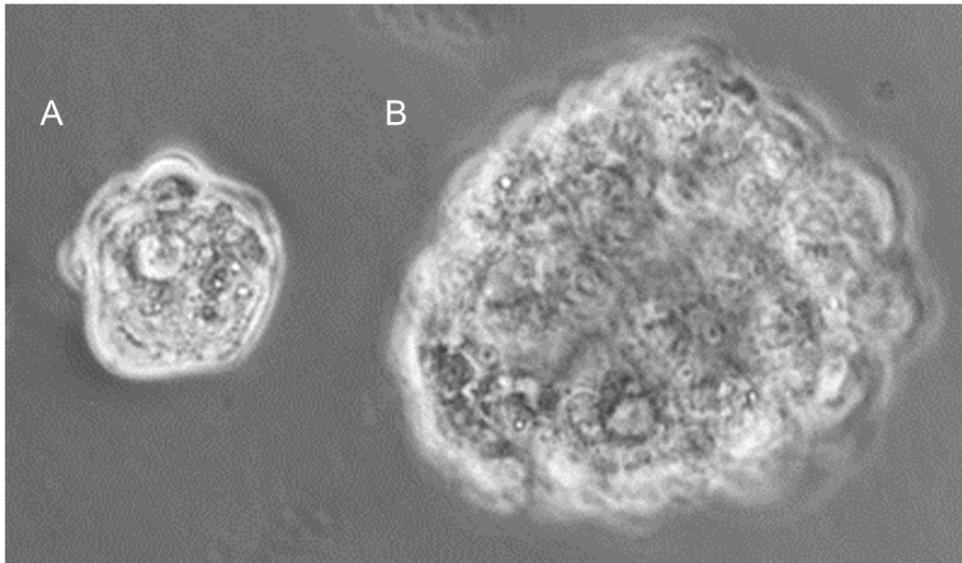
La técnica se basa en la incubación de los embriones desnudos con anticuerpos anti-ratón (generados en cobayo), que se unen específicamente a múltiples epítopes de ratón. En el caso de los embriones, los anticuerpos sólo se unen a las células del trofotodermo, ya que estas rodean al epiblasto y están unidas por uniones estrechas que no permiten que los anticuerpos pasen. Luego los embriones se incuban con complemento de cobayo, de este modo ante la presencia de los

inmunocomplejos se activa la vía clásica del complemento que dispara la producción de Convertasa de C3 y termina provocando la lisis de las células unidas a anticuerpos: las células del trofotodermo.

Para la inmunocirugía se procede a la incubación de los embriones en una gota de N2B27 con 20% de suero de conejo anti-ratón (Sigma) durante 1 hora. Se realizan tres lavados con el medio de cultivo utilizado y a continuación se incuban en una gota del mismo medio con 20% de complemento de suero de cobayo, durante 10 minutos, separándose el trofotodermo por disgregación mecánica mediante un capilar de vidrio para aislar los epiblastos. En la figura 4 se muestra una representación esquemática de la técnica. Los resultados esperados luego de la disgregación mecánica se pueden ver en la figura 5.



**Figura 4.** Representación esquemática de la técnica de inmunocirugía para aislar las células del macizo celular interno. Los blastocistos se incuban con suero de conejo conteniendo anticuerpos anti-ratón (Ac Anti-ratón, ●), se lavan con medio de cultivo y luego se exponen a complemento de cobayo (Complemento, Δ). Solamente se lisan las células del trofotodermo (T) ya que las células del macizo celular interno están protegidas de los anticuerpos por las uniones estrechas entre las células del trofotodermo. Imagen cedida por Sonia Pearson-White de la Escuela de Medicina, de la Universidad de Virginia, EEUU.



**Figura 5.** Separación del epiblasto usando inmunocirugía: (A) Epiblasto; (B) Células del trofoblasto. Imagen cedida por Jennifer Nichols, de Wellcome Trust Centre for Stem Cell Research, de la Universidad de Cambridge, Inglaterra.

### Cultivo de epiblastos y células madre

Cada epiblasto aislado se cultiva individualmente en un pocillo de una placa de 96 pocillos, previamente gelatinizada, con medio N2B27, durante tres días o hasta que el epiblasto alcance cinco veces su tamaño original. Luego, los epiblastos se disgregan con tripsina. A partir de este momento todas las manipulaciones se realizan en cámara de flujo laminar vertical.

Posteriormente se procede a expandir progresivamente las líneas celulares evaluando su pluripotencia mediante la visualización de la expresión del marcador Oct4 por fluorescencia. Dado que no están reportados los tiempos exactos para realizar los pasajes sucesivos, para ello se toma en cuenta la experiencia previa en el cultivo y expansión de ESC derivadas en otros laboratorios.

### **Diseño de un protocolo para evidenciar el carácter pluripotente de un cultivo de células**

Inicialmente se realizó un análisis de diferentes técnicas y ensayos que podrían utilizarse para poner a punto una herramienta de caracterización robusta de la pluripotencia.

Se diseñó un protocolo de RT-PCR para poder testear la expresión de genes responsables de la pluripotencia en las células derivadas. Los genes seleccionados fueron *Nanog* y *Sox2*. Como control positivo para validar el experimento se utilizó un gen de expresión constitutiva “Housekeeping”, escogiéndose el gen codificante para la Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) (Barber *et al.*, 2005). Se utilizaron cebadores específicos para cada gen, cuya efectividad para RT-PCR ha sido previamente reportada; las secuencias para *Nanog* y *Sox2* se tomaron del trabajo de Takahashi y Yamanaka, (2006), y para GAPDH, de Guiu *et al.*, 2013 (ver Apéndice).

Para probar la eficacia del método, se utilizaron dos líneas de ESC adquiridas: R1 y CK35. La evaluación de la morfología de las colonias de células en cultivo es el primer método de caracterización de ESC, pero además se requieren evidencias genéticas, como la evaluación de la expresión de genes de pluripotencia tales como *Nanog* y *Sox2*.

La extracción de ARN se realizó con el kit RNeasy Plus Mini Kit (Qiagen), en un área de trabajo previamente descontaminada con RNase AWAY™ (Thermo Scientific, 7002). La cuantificación del ARN se realizó utilizando el dispositivo Nanodrop 1000 (Thermo Scientific), en el cual a partir de 1 µL de muestra es posible obtener la concentración del ADN (utilizando la relación  $A_{260} = 1 \text{ OD}$ ,  $\text{ARN} = 40 \text{ µg/mL}$ ) y la pureza del mismo, expresada en la relación  $A_{260}/A_{280}$ . La mayoría de las proteínas presentan un máximo de absorbancia a 280 nm debido a la presencia de aminoácidos aromáticos, por tanto la relación  $A_{260}/A_{280}$  permite establecer que tan puro está el ácido nucleico extraído (la pureza se toma como aceptable si el cociente es mayor a 1,8).

La retrotranscripción se realizó con la enzima MMLV-RT (RevertAid, # EP0441, Fermentas), según las especificaciones del proveedor y utilizando OligodT como cebador para retrotranscribir exclusivamente ARN mensajero. Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en tubos de 0.2 mL, cada

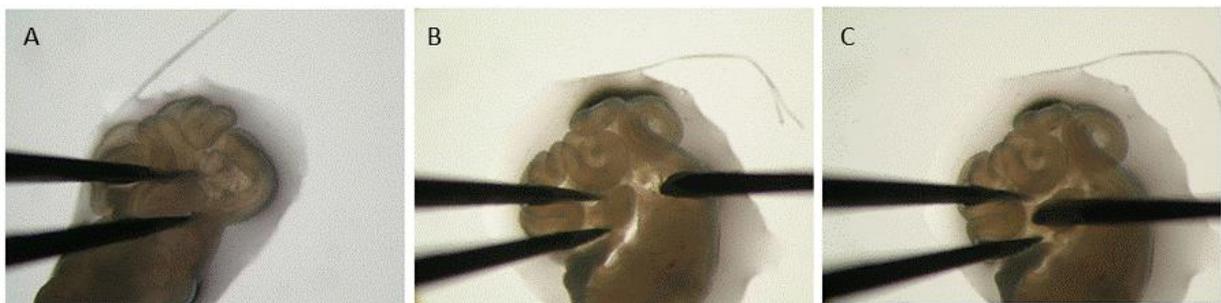
uno con 25  $\mu$ L totales conteniendo: 100 ng de ADN copia (de 1 a 3  $\mu$ L), 2.5  $\mu$ L de Buffer 10X, 0.75  $\mu$ L de  $MgCl_2$  50 mM, 1.25  $\mu$ L de cada cebador 10 mM, 0.5  $\mu$ L de dNTPs 10 mM , 0.1  $\mu$ L de Taq ADN polimerasa, y agua para PCR (Ambion) hasta completar el volumen final. La preparación de la mezcla para PCR se realizó en un área de trabajo previamente descontaminada con hipoclorito de sodio al 10%, EtOH al 70% y agua destilada. Las reacciones de PCR fueron realizadas en un termociclador MultiGene OptiMax, Labnet empleando el siguiente programa: desnaturalización inicial a 94°C por 5 minutos, seguida de 35 ciclos de: 94°C por 45 s, 60°C por 30 s y 72°C por 90 s. Por último, una extensión final a 72°C por 5 min.

Se evidenció el resultado de PCR mediante una electroforesis en gel de agarosa al 2%, utilizando el protocolo de Lee *et al.* (2012b). Para la determinación del tamaño de los amplicones se utilizó el marcador de peso molecular *100 bp DNA Ladder* (Invitrogen, 15628-019).

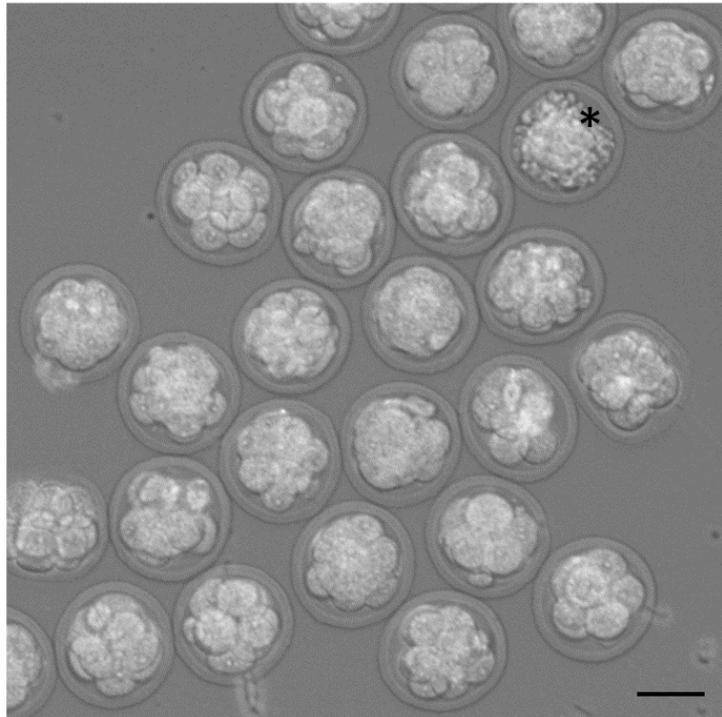
# Resultados y discusión

## Recuperación de embriones

La recuperación de embriones fue exitosa en la mayoría de las réplicas a pesar de ser un procedimiento complejo. Se muestra a continuación una secuencia de imágenes del proceso (figura 6) y una micrografía de embriones recuperados en una sesión (figura 7). En total se recuperaron 1726 embriones de 8 células durante el período de ejecución de esta tesis.



**Figura 6.** Secuencia de imágenes de lavado de oviducto para recuperación de embriones de 8 células. (A) Sujeción del infundíbulo con pinza relojero n° 5; (B) posicionamiento de la aguja 30 G con punta limada alineada a la abertura del infundíbulo; (C) aguja dentro del infundíbulo.



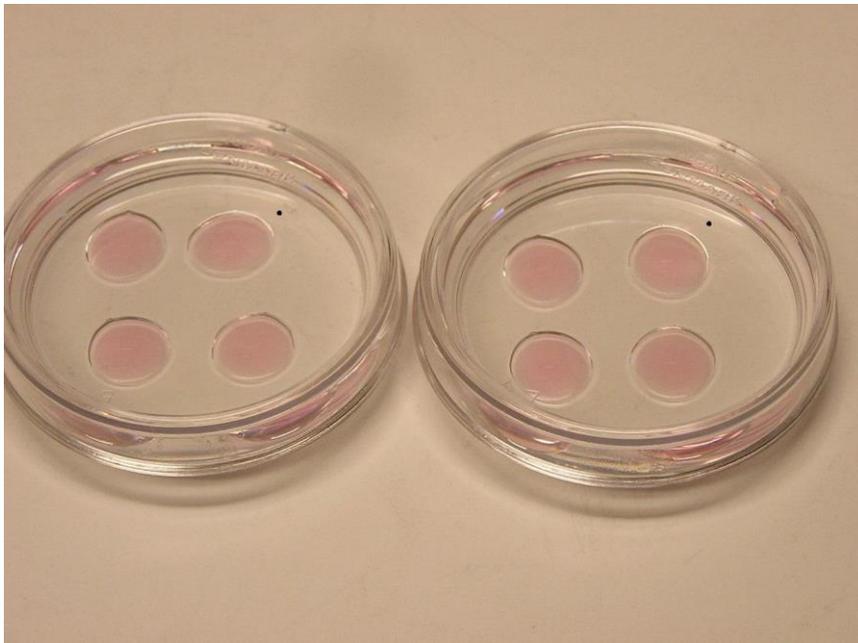
**Figura 7.** Embriones de 8 células recién recuperados. \*Embrión degenerado. Barra de escala: 50  $\mu\text{m}$ .

### **Cultivo de embriones *in vitro***

Los embriones recuperados del oviducto fueron cultivados en todos los casos en placas de Petri plásticas de 35 mm, preparadas con cuatro gotas de medio de cultivo, ya sea KSOM, M16 o N2B27 (según el protocolo a seguir) de 50  $\mu\text{l}$ , bajo aceite mineral para evitar la evaporación del medio, como se muestra en la figura 8.

La principal ventaja de este método de cultivo en pequeñas gotas es que la relación medio de cultivo/embrión es óptima, incrementando la concentración de factores de crecimiento y otras sustancias secretadas en el medio de cultivo, provocando que el mismo se condicione lo que beneficia el desarrollo. Por lo general se considera que la relación óptima de medio es de 1-2  $\mu\text{l}$  por embrión (Fujita *et al.*, 2006; Nagao *et al.*, 2008). Además, de esta manera se evita el desperdicio de

medio de cultivo que es muy costoso. Otras ventajas son la facilidad para ubicar a los embriones, ya que se concentran en el centro de las gotas, y la cómoda manipulación con capilar. Por otra parte, al utilizar poca cantidad de medio, hay que tener especial cuidado en retirar periódicamente los embriones que comienzan a degenerarse (ver asterisco en figura 7), ya que estos sufren muerte celular liberando proteínas tóxicas al medio -entre ellas distintas proteasas- (Alberts *et al.*, 2002) que afectan de manera negativa el desarrollo de los demás embriones. Es por esto que en todos los protocolos, los cultivos se observaron cada 24 horas y se retiraron los embriones degenerados.

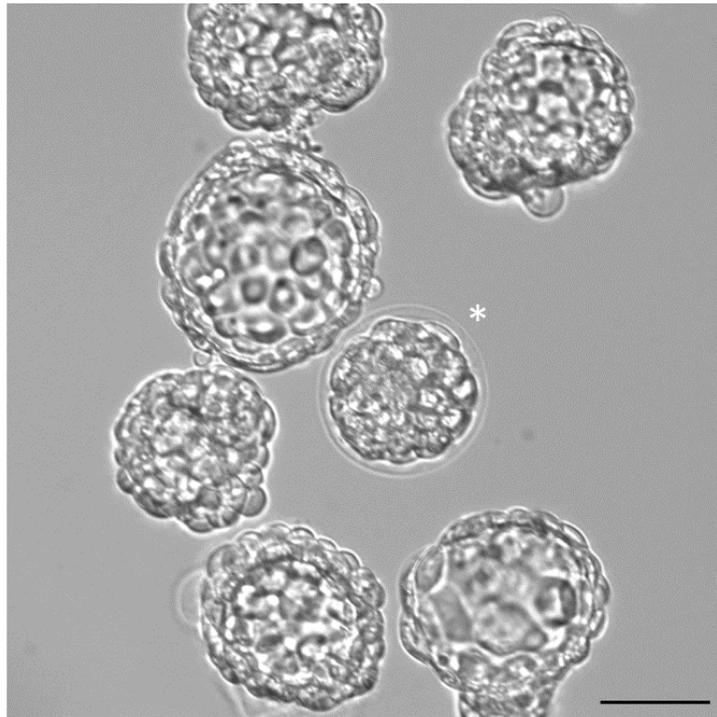


**Figura 8.** Placas de Petri de 35 mm con cuatro gotas de medio de cultivo M16 de 50  $\mu$ l, cubiertas con aceite mineral.

## Remoción de zona pelúcida

El protocolo de remoción de ZP es extremadamente nocivo para embriones que ya han eclosionado de la misma, por lo que es fundamental realizarlo exclusivamente en los que aún mantienen su ZP intacta. Se comenzó identificando la presencia o ausencia de ZP en los embriones bajo lupa esteresocópica (40x). Este aumento no permitió distinguir efectivamente los blastocistos que presentaban ZP de aquellos que no, por lo que en algunas sesiones, al aplicar el protocolo de remoción de ZP algunos blastocistos se dañaron y hubo que descartarlos. Como consecuencia se decidió realizar la clasificación de los mismos bajo microscopio a un aumento bajo (figura 9), con lo cual se logró disminuir considerablemente el error.

La eliminación de la ZP en la primera sesión de derivación se realizó con medio de cultivo ESC acidificado a pH 2,5. El proceso fue efectivo solamente en un 33,3% (20/60) de los embriones. Por este motivo, se realizó una búsqueda bibliográfica para mejorar este aspecto y se decidió emplear el protocolo de remoción de ZP con una solución de ácido Tyrodes (Hogan *et al.*, 1986). Se obtuvo una efectividad de 94,1% (64/68) en la siguiente sesión de derivación de embriones, por lo cual se estableció como método de rutina para la remoción de ZP.



**Figura 9.** Embriones luego de 72 horas de cultivo. Blastocistos eclosionados y (\*) blastocisto expandido con zona pelúcida.

Barra de escala: 100  $\mu$ m.

## 1. Protocolo basado en separación mecánica del cúmulo de células derivadas del ICM, de las células subyacentes derivadas del trofotodermo.

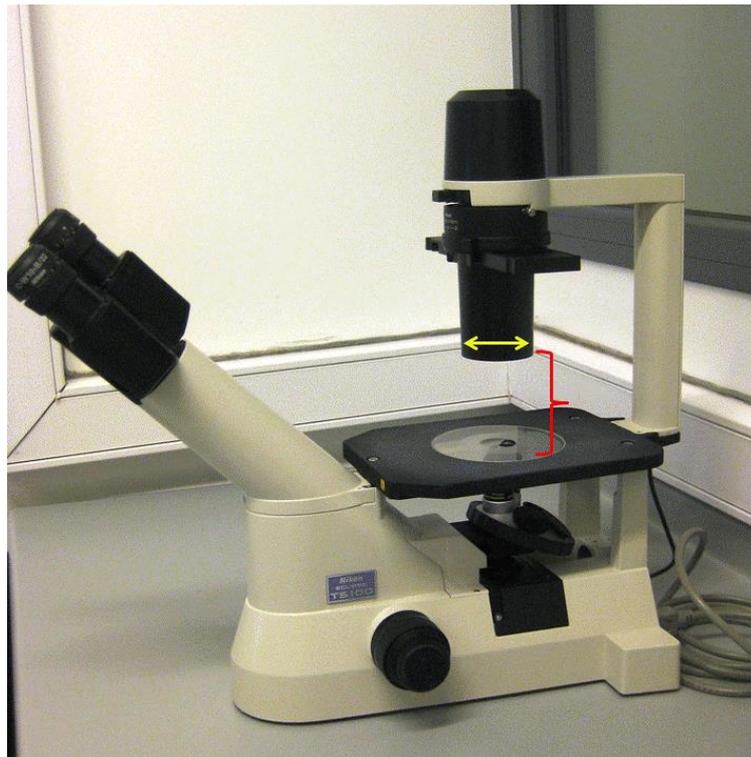
Se adaptó el protocolo basado en separación mecánica del cúmulo de células derivadas del ICM, de las células subyacentes derivadas del trofotodermo (Nagy, 2003) resultando en el esquema de trabajo que se puede ver en la tabla 2.

**Tabla 2.** Plan de trabajo para la derivación utilizando el protocolo basado en separación mecánica del cúmulo de células derivadas del ICM, de las células subyacentes derivadas del trofotodermo.

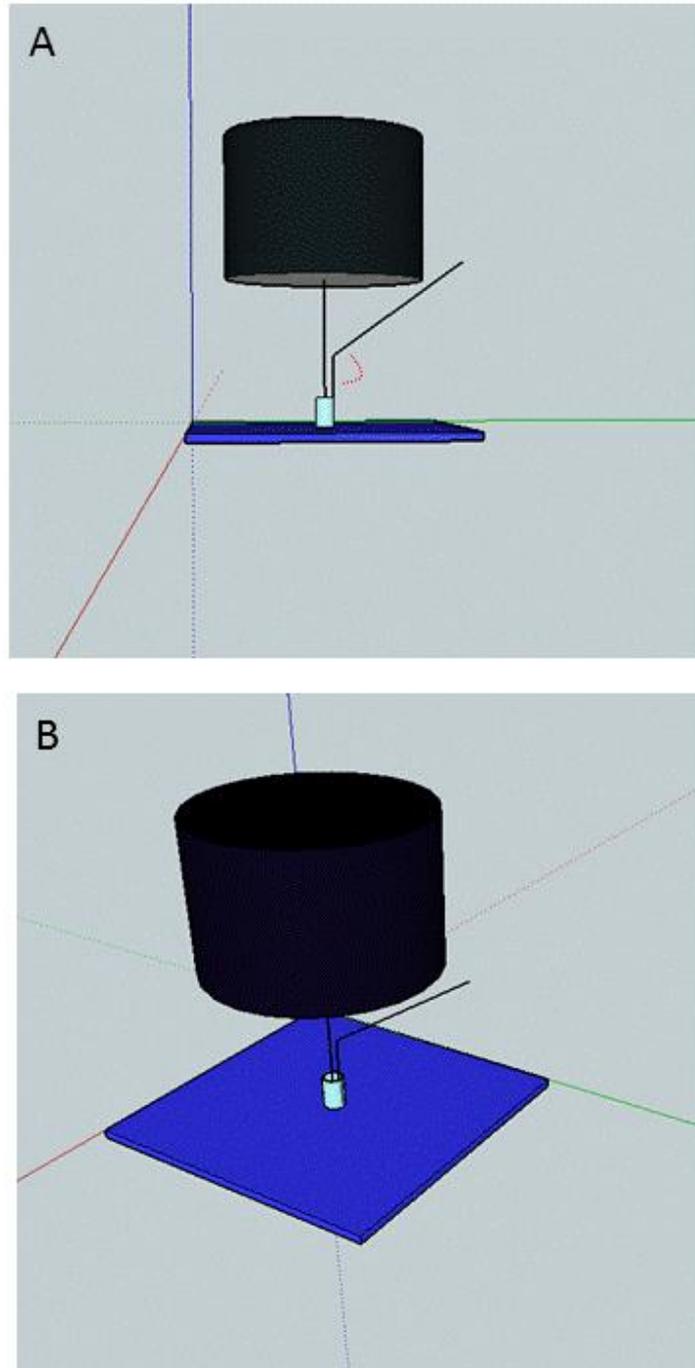
Día	Actividad	Resultados esperados
1	Recuperación de embriones de 8 células. Cultivo en M16.	Obtención de embriones de 8 células
3	Plaqueo de MEF mitomicinados en P96.	Obtención de un cultivo de MEF en monocapa, mitóticamente inactivados.
4	Remoción de ZP de blastocistos cuando sea necesario. Transferencia de embriones a P96 con MEF y medio ESC.	Obtención de un cultivo de blastocistos sin ZP en P96.
5-9	Observación diaria bajo microscopio.	Visualización de cúmulo de células derivadas del ICM.
10	Separación mecánica del cúmulo de células derivadas del ICM, de las células subyacentes derivadas del trofotodermo. Disgregación del cúmulo en microgota de tripsina . Cultivo en P96 con MEF sembrados en día 3.	Obtención de cúmulos de ICM y cultivo sobre MEF.
13	PASAJE 1: disgregación de los cúmulos derivados de ICM con tripsina. Transferencia de los cúmulos a una P48 (1:1).	Aparición de colonias de células de tipo ESC.
	Para los siguientes pasajes se debe observar la confluencia de la placa. Se realizan por lo general entre 48 y 72 horas.	Obtención de un cultivo de ESC.

Al sustituir las placas de 10 mm por pocillos individuales de P96, se generó un problema para la manipulación del cúmulo de células derivadas del ICM que crecían sobre el fondo de la placa ya que los capilares de rutina no acceden cómodamente al área. Para resolver este problema se procedió a diseñar un capilar con la medida y el ángulo adecuados para la manipulación.

Para esto se midió el espacio de trabajo teniendo en cuenta la distancia entre la platina -que es fija en el microscopio de luz invertido en el que se trabajó- y la fuente de luz, como se observa en la figura 10. Se calculó el espacio de trabajo con esta medida, el diámetro de la fuente de luz y la dimensión de la placa utilizando un esquema tridimensional (figura 11) como referencia. Para calcular el largo máximo del tramo recto del capilar se tuvo en cuenta su diámetro, y el ángulo del recorrido necesario para poder acceder a toda la superficie del fondo de la placa.

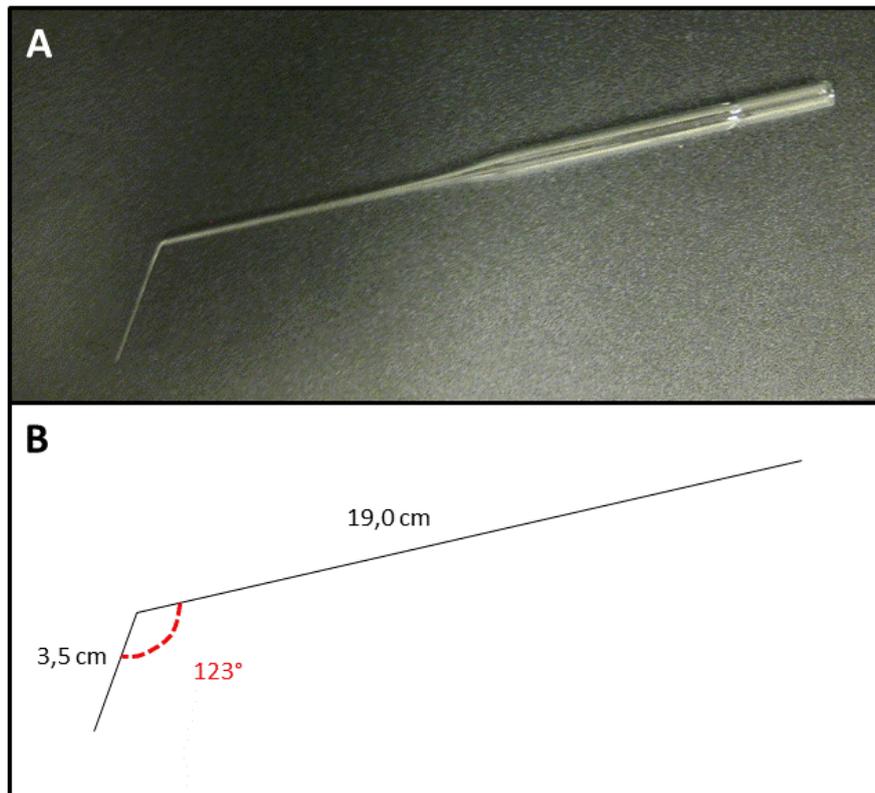


**Figura 10.** Fotografía de microscopio invertido de luz utilizado para la manipulación. Espacio parcial vertical de trabajo, distancia entre platina y fuente de luz (llave roja): 7,5 cm\*; diámetro de fuente de luz (doble-flecha amarilla): 5,5 cm.\* Se debe tener en cuenta el alto de la placa de cultivo (para P96: 1,5 cm), lo que resulta en una distancia total vertical de trabajo de 6,0 cm.



**Figura 11.** Esquema tridimensional construido para diseñar el capilar adecuado para manipular en el fondo del pocillo de la placa P96. (A) Vista frontal; (B) vista en perspectiva. En celeste se representa un pocillo colocado centralmente en la platina (prisma azul), sobre el que está representada la fuente de luz (cilindro negro). La línea vertical representa el eje central. Largo máximo del brazo terminal del capilar: 35 mm; largo mínimo del brazo largo: 9 mm. Línea punteada roja indica el ángulo óptimo del capilar: 125°.

Se logró construir artesanalmente capilares de acuerdo a las medidas estipuladas, estirando pipetas Pasteur de vidrio en mechero, con ayuda de una pinza y una medida de referencia del ángulo buscado. Los capilares contruidos (figura 12) fueron apropiados para manipular en el fondo de la placa cómodamente.



**Figura 12.** Capilar estirado a mechero, realizado según las medidas calculadas para manipular los embriones en el fondo de la placa de 96 pocillos. (A) Fotografía del capilar sobre fondo negro; (B) esquema a escala con medidas de brazo terminal de 3.5 cm, brazo largo 19.0 cm y ángulo de 123° cercano al óptimo (125°).

Se intentó separar el cúmulo de células derivadas del ICM mediante un golpe suave en la base del cúmulo y aspiración con el capilar, pero se despegaron ambos cúmulos (células derivadas del ICM más aquellas derivadas del trofotodermo) del fondo de la placa. Esto probablemente se debió a la falta de experiencia en la técnica de separación mecánica. Como tuvimos dificultades en esta etapa, no fue posible avanzar en las siguientes, por lo que este protocolo no fue satisfactorio para derivar células madre.

## 2. Protocolo basado en el crecimiento diferencial de ESC frente a células derivadas del trofotodermo.

Se adaptó el protocolo basado en el crecimiento diferencial de ESC frente a células derivadas del trofotodermo (Yang *et al.*, 2009) y se produjo el esquema de trabajo que se puede ver en la tabla 3.

**Tabla 3.** Plan de trabajo para el protocolo basado en el crecimiento diferencial de ESC frente a células derivadas del trofotodermo.

Día	Actividad	Resultados esperados
1	Recuperación de embriones de 8 células. Cultivo en M16	Obtención de embriones de 8 células.
3	Siembra de MEF mitomicinados en P96.	Obtención de un cultivo de MEF en monocapa, mitóticamente inactivados
4	Remoción de ZP de los blastocistos cuando sea necesario. Transferencia de embriones a P96 con MEF y medio KSR.	Obtención de cultivo de blastocistos sin ZP en P96.
5-10	Observación diaria bajo microscopio.	Visualización de cúmulo de células derivadas del ICM.
11	Disgregación del pocillo completo con tripsina, siembra en P96.	Obtención de un cultivo de células pluripotentes disgregadas.
12-17	Observación cada 3 días bajo microscopio.	Aparición de colonias de células de tipo ESC.
≈ 18	PASAJE 1. Transferencia 1:1 a placa P48.	Obtención de un cultivo de ESC poco denso.
	Para los siguientes pasajes se debe observar la confluencia de la placa. Entre 48 y 72 horas normalmente.	Obtención de un cultivo de ESC.

Este protocolo mostró buenos resultados aunque no se logró derivar ESC. Se logró obtener células pluripotentes (Oct4-GFP positivas) en un primer pasaje, pero el crecimiento de las colonias fue muy lento, y finalmente se diferenciaron luego del primer pasaje (figura 13).

El crecimiento de un cúmulo de células derivadas del ICM fue fácilmente evidenciable (A y B, figura 13) tal como se esperaba. Su crecimiento fue lento, lo que puede predecir un lento crecimiento de las futuras ESC derivadas de esta cepa de animales.

Luego de la disgregación con tripsina, no se logró identificar colonias de morfología tipo ESC en microscopía de campo claro. Sin embargo, cuando se observó el cultivo bajo fluorescencia, se evidenció gran cantidad de células individuales fluorescentes (C, figura 13), lo que indica que aún mantenían un elevado potencial de diferenciación. No se observó crecimiento de colonias, sino que éstas se mantuvieron como células individuales. A pesar de esto se realizó el intento de reactivar el crecimiento con un primer pasaje.

Tras el primer pasaje, se pudo evidenciar un grado de diferenciación significativo de las células fluorescentes por la adquisición de una morfología de tipo mesenquimal (D, figura 13). Estas se extendieron sobre la placa, aumentando la superficie de adhesión. A su vez la intensidad de emisión de fluorescencia disminuyó, lo sugiere una disminución de la transcripción del factor de transcripción Oct-4. Este fenotipo evidenció la pérdida gradual del potencial de diferenciación, por lo que las células se descartaron. Este problema pudo deberse a la calidad de los MEF utilizados, ya que estos y sus secreciones son un sustento fundamental para las ESC. Se observó que estas células presentaban una morfología atípica, con menor superficie de adherencia, y luego del primer pasaje perdieron su adherencia y se separaron de la gelatina, lo que indicó que no se encontraban en condiciones óptimas. Esto pudo deberse a que tenían un número de pasajes mayor al recomendado, se utilizaron MEF de pasaje 7 cuando lo recomendado es hasta 4. Los MEF se amplificaron durante 7 pasajes para obtener una cantidad mayor, expansión de rutina para los MEF

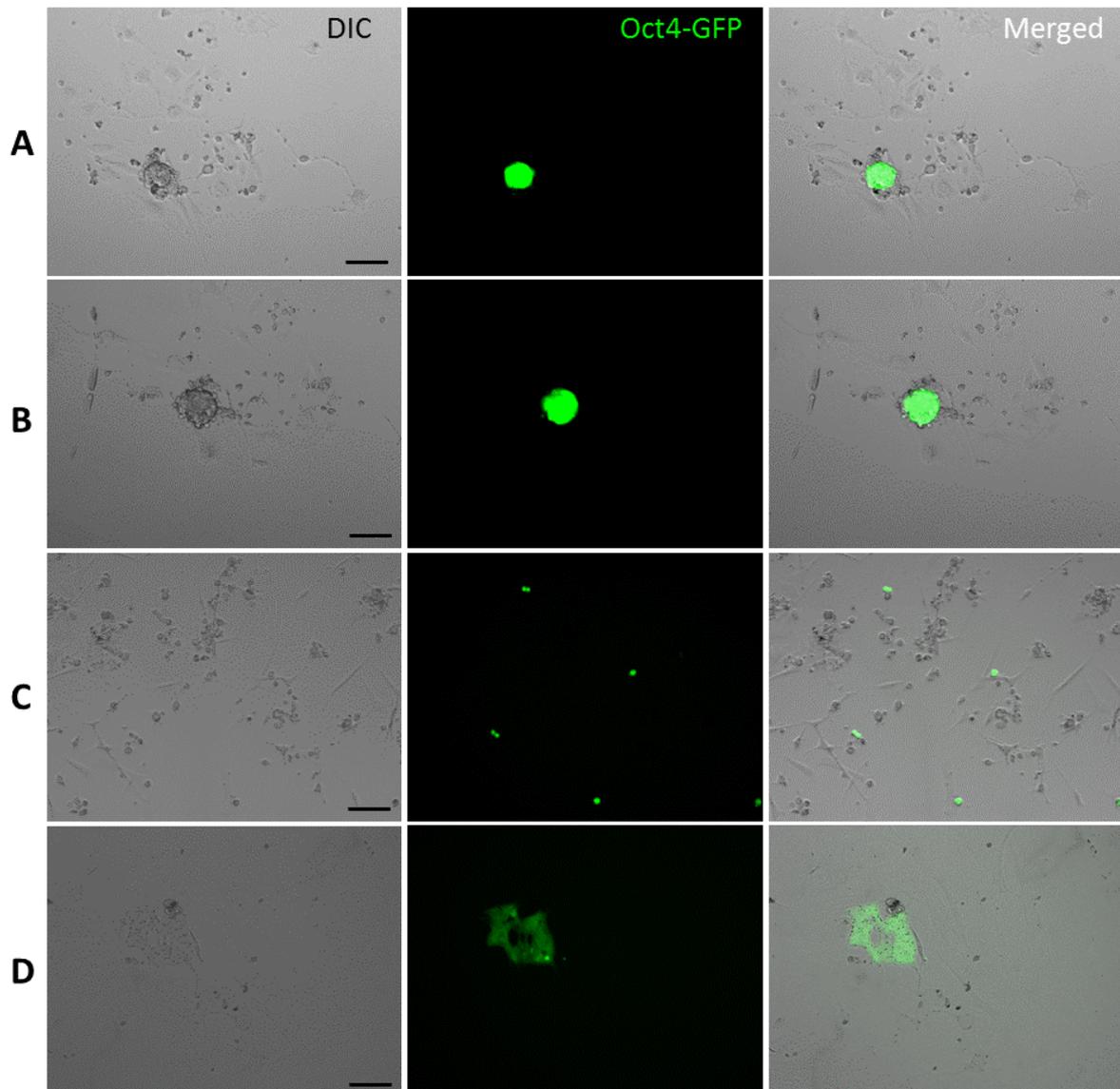
que sirven como capa sustentadora para el cultivo de ESC adquiridas de otros laboratorios. Podría ser que el proceso de derivación requiera una mayor cantidad y/o calidad de componentes suministrados por los MEF.

Por otro lado, el uso de LIF, producido en el laboratorio a partir de células transfectadas, puede haber influido en la diferenciación temprana de las células. Este LIF es utilizado de rutina para el cultivo de ESC adquiridas en otros laboratorios, con el que se han obtenido buenos resultados, pero puede que su calidad no sea suficientemente buena para la derivación de las células *de novo*. Asimismo, la actividad del LIF empleado no ha sido cuantificada y es posible que la cantidad que se empleó para la derivación no haya sido suficiente. Por estos motivos, si se continúa empleando LIF producido en el laboratorio debería cuantificarse previo a su uso en la derivación de ESC, o podría sustituirse por LIF comercial para optimizar las condiciones de cultivo.

Otro motivo por el cual puede haber sucedido la diferenciación temprana de las células, es el uso de tripsina para la disgregación celular. Quizás la tripsina utilizada tiene una actividad proteolítica muy elevada para la disgregación de células madre, o bien su inactivación no fue efectiva en la dilución que se realizó (como el medio utilizado es libre de suero, la tripsina se inactivó exclusivamente por dilución). Para mejorar este aspecto se podrían realizar dos cambios para futuros experimentos: (a) utilizar tripsina más diluida y (b) utilizar un inhibidor de tripsina como "Defined Trypsin Inhibitor" (Gibco, R-007-100).

Otro factor crucial es controlar el intervalo de tiempo entre pasajes, lo cual fue discutido en conjunto con Kathleen Banks, ya que no hay una receta única, sino que hay que conocer el ritmo de crecimiento de las células (que en las ESC es propio de cada línea) para detectar el mejor momento para su pasaje. Además, la relación de pasaje celular al momento de amplificar las células también es una decisión que reside en el criterio del investigador, que puede variar mucho entre 1:1 y 1:4 según la densidad aparente de células. Por esto, se cree que en futuros experimentos, la experiencia

ganada en estos ensayos servirá para gestionar mejor los tiempos de los pasajes, disminuyendo la probabilidad de diferenciación temprana de las células.



**Figura 13.** Secuencia de imágenes del protocolo basado en el crecimiento diferencial de ESC frente a células derivadas del trofotodermo. (A) 24 horas luego de la transferencia a P96; (B) 96 horas luego de la transferencia a P96; (C) 24 horas después de la disgregación con tripsina; (D) 24 horas después del primer pasaje. Barra de escala: 100  $\mu\text{m}$ .

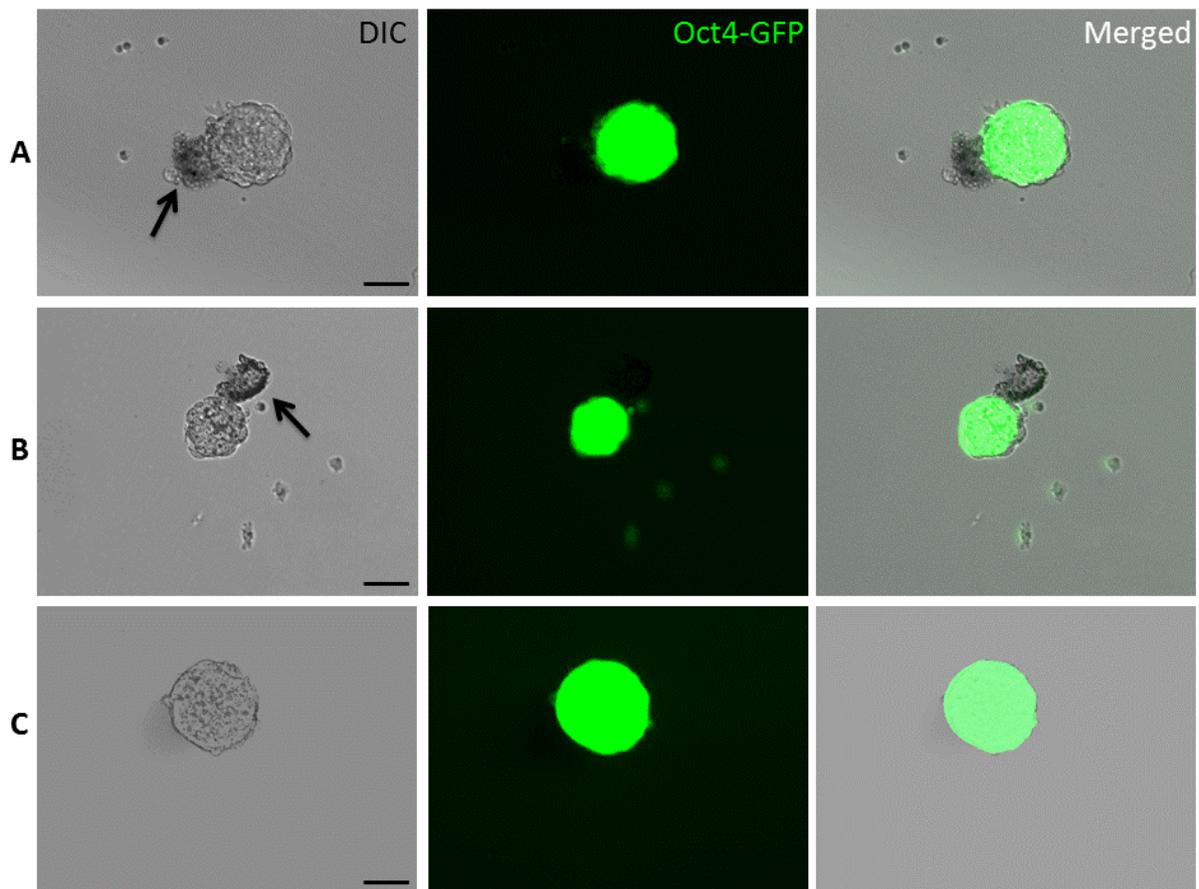
### 3. Protocolo basado en inmunocirugía y utilización de medio N2B27+"2i"

**Tabla 4.** Plan de trabajo para el protocolo que incorpora inmunocirugía y el uso de inhibidores de diferenciación.

Día	Actividad	Resultados esperados
1	Recuperación de embriones de 8 células. Cultivo en KSOM+"2i."	Obtención de embriones de 8 células.
3	Transferencia de embriones a medio N2B27+"2i".	Obtención de un cultivo de blastocistos en medio N2B27+"2i".
4	Remoción de ZP cuando sea necesario. Inmunocirugía. Cultivo de epiblastos en N2B27+"2i" en P96.	Obtención de epiblastos aislados por inmunocirugía.
5-9	Observación de los epiblastos en cultivo bajo microscopio.	Crecimiento de los epiblastos en cultivo, cuatro veces su tamaño.
10	Disgregación de los epiblastos con tripsina y transferencia 1:1 a P96.	Obtención de un cultivo de células pluripotentes disgregadas.
	Primer pasaje cuando se observan colonias de tipo ESC a P48. Para los siguientes pasajes se debe observar la confluencia de la placa, entre 48 y 72 horas normalmente.	Obtención de un cultivo de ESC.

El protocolo de inmunocirugía falló en las primeras dos réplicas. En ambas ocasiones resultó imposible separar completamente el epiblasto del trofotodermo (A y B, figura 14) incluso realizando muchísimas repeticiones de disgregación (subiendo y bajando los embriones en el capilar). Los epiblastos parcialmente aislados mostraron un crecimiento heterogéneo de un grupo de células derivadas del ICM en forma de esfera, que resultó positivo para Oct4-GFP, y otro grupo de células periféricas con menor crecimiento, que fue negativo para Oct4-GFP. La técnica fue puesta

a punto ajustando el tiempo de incubación con el complemento, pasando de 10 minutos en la primera réplica, a 14 minutos en la segunda y finalmente a 16 minutos en la tercera, tiempo que fue efectivo para aislar epiblastos limpios (C, figura 14). Se hizo el ajuste del protocolo fijando el tiempo de incubación a los 16 minutos.

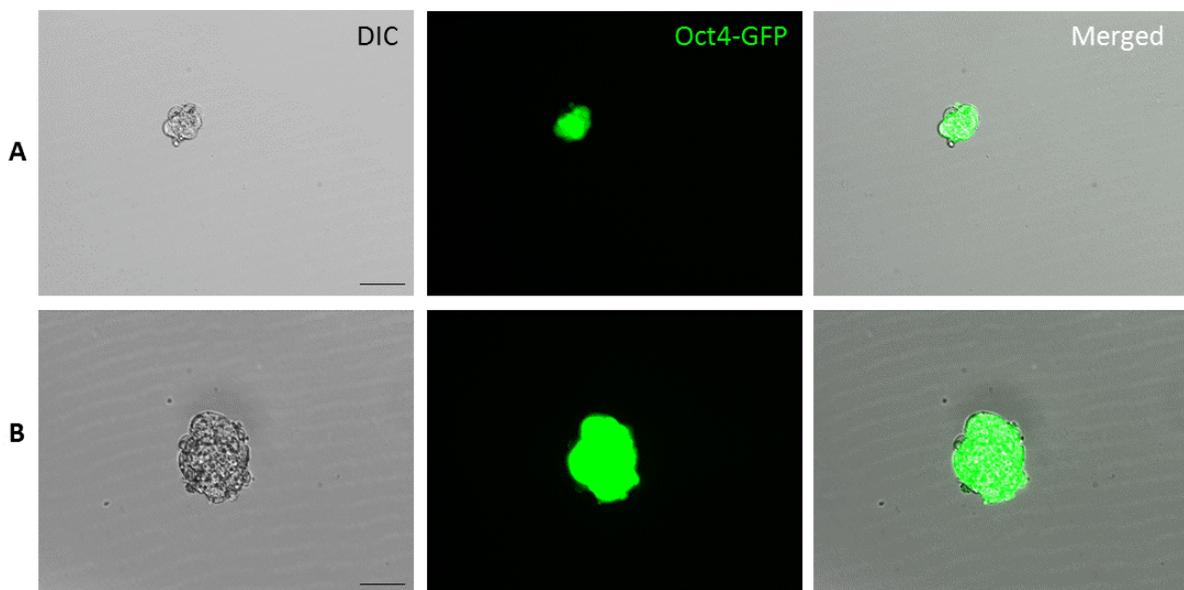


**Figura 14.** Epiblastos aislados parcial o totalmente por inmunocirugía 96 horas luego del procedimiento. (A) Epiblasto parcialmente aislado en la primera réplica; (B) epiblasto parcialmente aislado en la segunda réplica; (C) epiblasto aislado totalmente en la tercera réplica. Flecha indica células del trofotodermo sin aislar. Barra de escala: 100  $\mu$ m.

### Crecimiento de los epiblastos

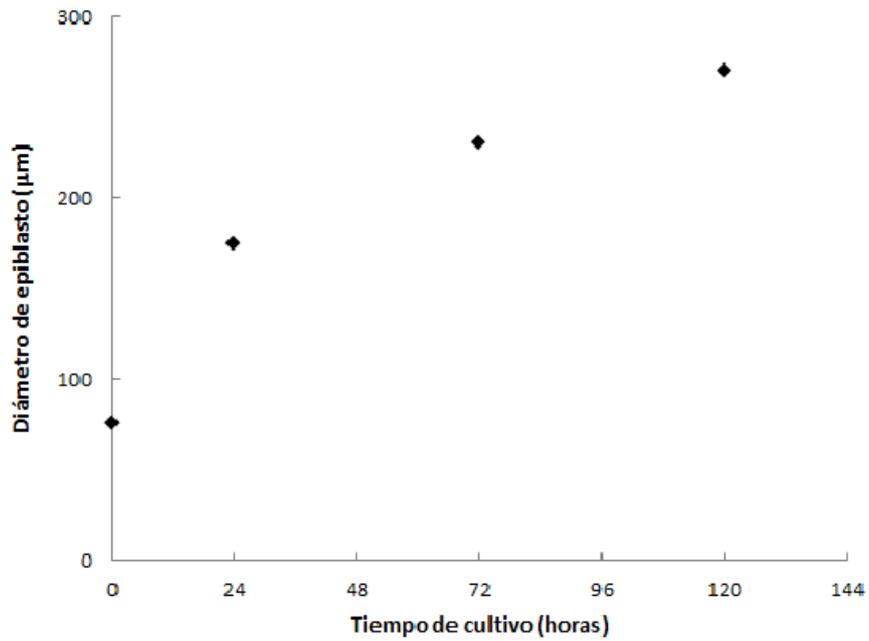
Los epiblastos aislados se cultivaron con éxito (figura 15), y sus células mantuvieron la pluripotencia (Oct4-GFP positivas). Se pudo registrar un aumento considerable en su diámetro (Figura 16). Se

evaluó el crecimiento de los epiblastos tomando medidas del diámetro de un solo epiblasto en cultivo (imágenes no mostradas) en representación del total. A pesar de perder representación de la variabilidad -que se sabe por observación es considerable- de todos modos se evalúa que es la mejor opción para disminuir el tiempo de permanencia de la placa fuera de la estufa, ya que no es recomendable para el desarrollo del cultivo que la temperatura disminuya o fluctúe demasiado (Freshney, 2010).



**Figura 15.** Epiblastos en cultivo sobre gelatina tras la inmunocirugía. (A) 25 hs; (B) 120 hs de cultivo luego de aislados. Barra de escala: 100  $\mu\text{m}$ .

Se esperaba que los epiblastos aumentaran entre 4 y 5 veces su tamaño inicial al momento de ser aislados. El epiblasto que se tomó como referencia, pasó de medir 75.5  $\mu\text{m}$  a 330  $\mu\text{m}$  tras 120 horas de cultivo, lo que superaba los 4 aumentos. Esto indicó que el crecimiento fue eficaz, y que el tiempo de cultivo y el de disgregación con tripsina se adecuaron a las indicaciones del protocolo original.



**Figura 16.** Tamaño de epiblasto representado por la medida del diámetro mayor ( $\mu\text{m}$ ) en función del tiempo de cultivo (horas).

Luego de la disgregación con tripsina no se llegaron a visualizar células con morfología de tipo ESC, sino más bien células aisladas irregulares. A su vez, estas células no fueron fluorescentes en ningún caso, por lo que no se consideraron células pluripotentes (imágenes no mostradas). Al igual que se discutió para el protocolo anterior, las condiciones de disgregación con tripsina podrían haber sido demasiado exigentes para éstas células, por lo que se podrían ajustar en cuanto a dilución de la tripsina, cantidad, tiempo de incubación y proceso de inactivación de la misma.

## Dificultades generales

La primera dificultad que surgió a lo largo del proceso fue la escasa disponibilidad de embriones de la cepa Oct4-GFP. Para continuar ensayando los protocolos de derivación cuando no existía disponibilidad, se realizaron algunas réplicas con embriones procedentes de animales con el mismo fondo genético pero sin alteración genética (*wild-type*). Esto permitió trabajar a un ritmo más estable.

Otro problema que surgió fue la contaminación de los cultivos. Al trabajar fuera de cámara de flujo en las primeras etapas de cultivo, debido a la necesidad de realizar las manipulaciones bajo microscopio, y a su vez el hecho de usar medio de cultivo sin antibiótico en las primeras 72 horas, los riesgos de contaminación fueron significativos. En cuanto se notó este problema se tomaron medidas para superarlo. La primera de ellas fue autoclavar los capilares de manipulación de embriones de a pequeños grupos, otra fue realizar todas las manipulaciones con la puerta de la sala de trabajo cerrada para evitar corrientes de aire que pudiesen transportar los agentes contaminantes, y la última fue la utilización de tapabocas. Estas medidas disminuyeron la tasa de contaminación pero no eliminaron el problema, por lo que en cada réplica se prestó especial atención durante los pasos más susceptibles de cada protocolo.

## Diseño de protocolo de caracterización

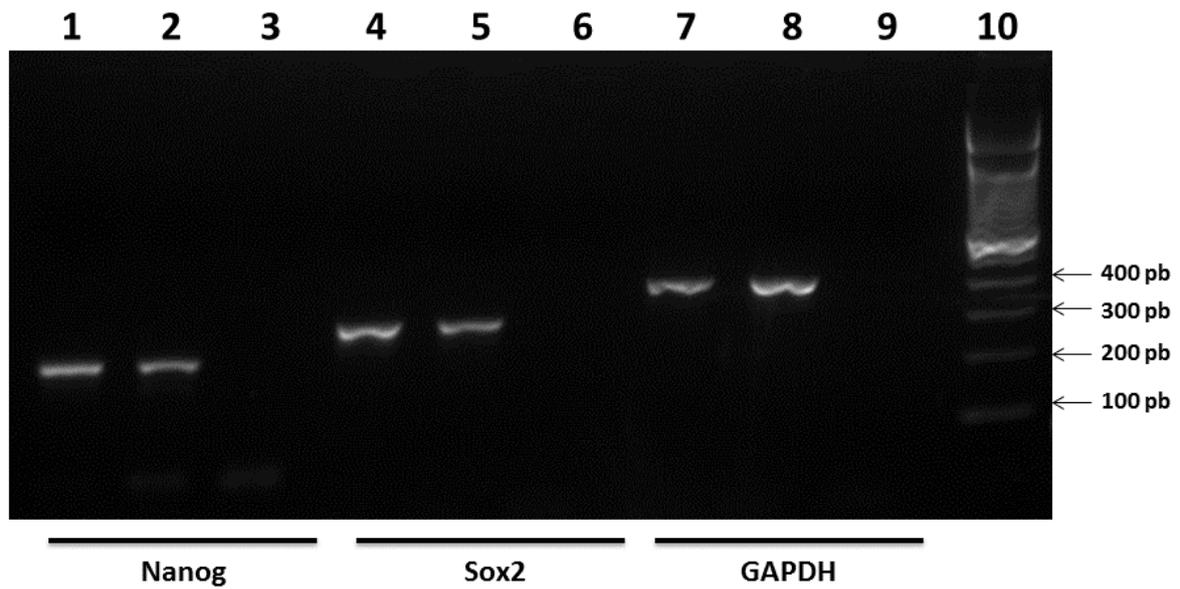
Para implementar una herramienta de caracterización robusta de la pluripotencia, primero se realizó un análisis de diferentes técnicas y ensayos que podrían ser utilizados. Las tres principales opciones que se evaluaron fueron la detección de proteínas características de la pluripotencia mediante anticuerpos específicos, la detección de la expresión de genes responsables de la pluripotencia mediante RT-PCR y la generación de teratomas –el cual consiste en evaluar la formación de teratomas, que son tumores con componentes celulares derivados de las tres capas germinales, a partir de ESC inyectadas mediante la vía subcutánea en un ratón-.

El ensayo de teratomas se descartó por su alta complejidad en el análisis de la presencia de células derivadas de las tres capas germinales y asimismo debido al principio de reemplazo de animales, uno de los principios de las “3 R’s” (Russell y Burch, 1959), siendo los otros reducción y refinamiento, ya que las otras herramientas posibles no implican el uso de animales.

Finalmente se decidió diseñar un protocolo de RT-PCR frente al uso de anticuerpos, debido a que la unidad cuenta con experiencia en la realización de ensayos de este tipo y principalmente porque el costo es significativamente más bajo, lo que hace que el ensayo sea más accesible.

Los resultados del ensayo de RT-PCR (figura 17) fueron válidos ya que tanto el control negativo como el control positivo se correspondieron con los resultados esperados. No se observó banda alguna en los controles negativos sin ADN, y se observó una banda de aproximadamente 400 pb para GAPDH (tamaño del amplicón: 393 pb) en ambas líneas de ESC testeadas.

El ensayo probó de forma eficaz la expresión de genes responsables de la pluripotencia, ya que se detectó la expresión de Nanog y de Sox2 en las dos líneas de ESC ensayadas (R1 y CK35). En el caso de Nanog se observó una banda cercana a los 200 pb y en el caso de Sox2 una banda de 300 pb aproximadamente, tal como se esperaba (amplicones de 223 y 297 pb, respectivamente).



**Figura 17.** Gel de agarosa 2%. Productos de amplificación por PCR: Nanog (1-3), Sox2 (4-6) y GAPDH (7-9). R1 (1,4,7); CK35 (2, 5, 8): control negativo sin ADN (3,6,9); ladder 100 pb (10) .

## Conclusiones y perspectivas

En este trabajo se probaron tres protocolos diferentes de derivación de ESC *de novo*. Aunque mediante ninguno de ellos se logró la derivación de ESC, se alcanzó un mayor avance empleando el protocolo basado en el crecimiento diferencial de ESC frente a células derivadas del trofotodermo, mediante el cual se logró obtener un cultivo con células pluripotentes (Oct4-GFP positivas) aisladas, pero no un cultivo de colonias de ESC.

Al no haber logrado la derivación de ESC, hasta el momento este procedimiento no puede considerarse como una alternativa al uso de ESC adquiridas de repositorios. A pesar de eso, y dados los resultados obtenidos con el protocolo basado en el crecimiento diferencial de ESC frente a células derivadas del trofotodermo, se propone continuar trabajando para poner a punto las etapas finales del mismo ajustando las condiciones de disgregación con tripsina y mejorando la calidad de los MEF.

En perspectiva, se continuará investigando en esta línea de trabajo dentro del proyecto “Derivación y caracterización de una línea de células madre embrionarias (ESC) murinas Oct4-GFP en ausencia de suero y de fibroblastos embrionarios murinos (MEF)” financiado con una beca de iniciación a la investigación de la Agencia Nacional de Innovación e Investigación (ANII) en el período agosto 2013-agosto 2014.

Por otra parte, se dispone de un protocolo de evaluación del carácter pluripotente de las ESC a derivar que es efectivo en un control de ESC adquiridas. Esto nos permite contar con una herramienta –además del marcador Oct4-GFP– para la caracterización de las células antes de ser utilizadas para la producción de animales genéticamente modificados. Luego de que las células derivadas muestren la expresión de dichos genes se procederá a realizar el conteo de cromosomas correspondiente, y finalmente un ensayo de generación de quimeras como prueba determinante de la pluripotencia.

# Apéndice

## **PBS:**

8,0 g Cloruro de sodio

0,2 g Cloruro de potasio

0,912 g Fosfato disódico anhidro

0,2 g Fosfato monopotásico

Csp 1L Agua destilada

## **Tripsina:**

0,25% tripsina

0,75% EDTA

## **Medios de cultivo (cada 100 ml)**

### **Medio para MEF:**

90 mL DMEM

10 mL FBS

### **Medio ESC clásico:**

82 mL DMEM

15 mL FBS

2 mL LIF

1 mL Penicilina-Estreptomicina

1 mL Aminoácidos no esenciales

100  $\mu$ L  $\beta$ -mercaptoetanol

**Medio N2B27:**

48 mL DMEM

0,5 mL N2

2 mL LIF

48 mL Neurobasal

1 mL B27

0,5 mL L-glutamina

**Medio KSR:**

83 mL DMEM KO

15 mL Serum Replacement

1 mL LIF

1 mL L-glutamina

1mL Aminoácidos no esenciales

25  $\mu$ L  $\beta$ -mercaptoetanol**Tabla 1.** Secuencia de pares de cebadores utilizados en la RT-PCR para los genes *Nanog*, *Sox2* y *GAPDH*.

Nombre	Secuencia 5'-3'	Tamaño del amplicón (pb)
Nanog F	CAGGTGTTTGAGGGTAGCTC	223
Nanog R	CGGTCATCATGGTACAGTC	
Sox2 F	TAGAGCTAGACTCCGGGCGATGA	297
Sox2 R	TTGCCTTAAACAAGACCACGAAA	
GAPDH F	TGTTCCACCCCAATGTGT	393
GAPDH R	TGTGAGGGAGATGCTCAGTG	

# Referencias bibliográficas

- Abramoff, M.D., Magalhaes, P.J., Ram, S.J. 2004. **Image Processing with ImageJ**. Biophotonics International, 11: 36-42.
- Alitalo, K., Kuismanen, E., Myllyla, R., Kiistala, U., Asko-Seljavaara, S., Vaheri, A. 1982. **Extracellular matrix proteins of human epidermal keratinocytes and feeder 3T3 cells**. J. Cell. Biol. 94:497–505.
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P. 2002. **Molecular Biology of the Cell**. 3<sup>ra</sup> edición. New York, Garland Science.
- Barber, R.D., Harmer, D.W., Coleman, R.A., Clark, B.J. 2005. **GAPDH as a housekeeping gene: analysis of GAPDH mRNA expression in a panel of 72 human tissues**. Physiol Genomics. 21: 389–395.
- Boiani, M., Schöler, H. M. 2005. **Regulatory networks in embryo-derived pluripotent stem cells**. Nat. Rev. Mol. Cell Bio. 6: 872-881.
- Bradley, A., Evans, M., Kaufman, H. M., Robertson, E. 1984. **Formation of germ-line chimeras from embryo-derived teratocarcinoma cell lines**. Nature 309: 255-256.
- Brook F.A., Gardner R.L. 1997. **The origin and efficient derivation of embryonic stem cells in the mouse**. PNAS. 94: 5709-5712.
- Buehr, M., Smith, A. 2003. **Genesis of embryonic stem cells**. Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci. 358: 1397–402.
- 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**. Dev. Biol. 210: 30–43.
- Chen, S., Choo, A., Chin, A., Oh, S.K. 2006. **TGF-beta2 allows pluripotent human embryonic stem cell proliferation on E6/E7 immortalized mouse embryonic fibroblasts**. J. Biotechnol. 122:341–361.
- Donovan, P. J., de Miguel, M. P. 2003. **Turning germ cells into stem cells**. Curr. Opin. Genet. Dev. 13: 463–471.
- Evans, M.J., Kaufman, M.H.† 1981. **Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos**. Nature. 292: 154–156.
- Freshney, I. 2010. **Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique and Specialized Applications**. Hoboken, N.J.: Wiley-Blackwell.
- Fujita, T., Umeki, H., Shimura, H., Kugumiya, K., Shiga, K. 2006. **Effect of group culture and embryo-culture conditioned medium on development of bovine embryos**. J. Reprod. Dev. 52:137–142.
- Gilbert, S.F. 2006. **Developmental Biology**. 8<sup>va</sup> edición. Sunderland, Sinauer Associates, Inc.

- Guiu, J., Shimizu, R., D'Altri, T., Fraser, S.T., Hatakeyama, J., Bresnick, E.H., Kageyama, R., Dzierzak, E., Yamamoto, M., Espinosa, L., Bigas, A. 2013. **Hes repressors are essential regulators of hematopoietic stem cell development downstream of Notch signaling.** *J. Exp. Med.* 210: 1 71-84.
- Goldsborough M.D., Tilkins M.L., Price P.J., Lobo-Alfonso J., Morrison J.R., Stevens ME, Meneses J, Pederson R, Koller R, Koller B, Latour A. 1998. **Serum-free culture of murine embryonic stem (ES) cells.** *Focus.* 20: 8-12.
- Gossler A., Doetschman T., Korn R., Serfling E., Kemler R. 1986. **Transgenesis by means of blastocyst-derived embryonic stem cell lines.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 83: 9065-9069.
- Handysidei, A. H., Barton, S. C. 1977. **Evaluation of the technique of immunosurgery for the isolation of inner cell masses from mouse blastocysts.** *J. Embryol. Exp. Morph.* 37: 217-226.
- Hirofumi, S., Nakatsuji, N. 1987. **Establishment of Embryo-derived Stem (ES) Cell Lines from Mouse Blastocysts: Effects of the Feeder Cell Layer.** *Develop. Growth and Differ.* 29: 133-139.
- Hogan, B., Costantini, F., Lacy, E. 1986. **Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory manual.** Plainview, Cold Spring Harbor Lab. Press.
- Hunter, S., Evans, M. 1999. **Non-surgical method for the induction of delayed implantation and recovery of viable blastocysts in rats and mice by the use of tamoxifen and Depo- Provera.** *Mol. Reprod. Dev.* 52: 29–32.
- Kawase, E., Suemori, H., Takahashi, N., Okazaki, K., Hashimoto, K., Nakatsuji, N. 1994. **Strain difference in establishment of mouse embryonic stem (ES) cell lines.** *Int. J. Dev. Biol.* 38: 385–390.
- Kochar P.G. 2004. **What Are Stem Cells?.** Disponible en <<http://www.csa.com/discoveryguides/stemcell/overview.php>> [Consulta 10 de agosto de 2013].
- Lee K.H., Chuang C.K., Guo S.F., Tu C.F.. 2012a. **Simple and efficient derivation of mouse embryonic stem cell lines using differentiation inhibitors or proliferation stimulators.** *Stem Cells Dev.* 21: 373-383.
- Lee, P. Y., Costumbrado, J., Hsu, C. Y., Kim, Y. H. 2012b. **Agarose Gel Electrophoresis for the Separation of DNA Fragments.** *J. Vis. Exp.* 62: 3791-3923.
- Manual Merck: **Murine Embryonic Stem Cell Culture.Procedures & Protocols.** 2012 EMD Millipore Corporation, Billerica, MA, USA.
- Martin, G. R. 1981. **Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned y teratocarcinoma stem cells.** *Dev. Biol. PNAS. USA.* 78: 7634-7638.
- Mather, J. P., Roberts, P. E. 1998. **Introduction to cell and tissue culture. Theory and technique.** New York, Plenum Press.
- Matsuda T, T Nakamura, K Nakao, T Arai, M Katsuki, T Heike and T Yokota. 1999. **STAT3 activation is sufficient to maintain an undifferentiated state of mouse embryonic stem cells.** *Embo. J.* 18: 4261–4269.

- McLaren A. 1976. **Mammalian Chimeras**. Cambridge, Cambridge Univ. Press.
- Moscatelli, D., Presta, M., Joseph-Silverstein, J., Rifkin, D.B. 1986. **Both normal and tumor cells produce basic fibroblast growth factor**. *J. Cell. Physiol.* 129:273–276.
- Nagao, Y., Iijima, R., Saeki, K. 2008. **Interaction between embryos and culture conditions during in vitro development of bovine early embryos**. *Zygote*. 16:127–133.
- Nagy, A., Gertsenstein, M., Vintersten, K., Behringer, R. 2003. **Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual**. 3<sup>ra</sup> edición. Nueva York: Cold Spring Harbor Lab. Press.
- Nichols J., Ying Q.L. 2006. **Derivation and propagation of embryonic stem cells in serum and feeder-free culture**. *Methods Mol. Biol.* 329: 91-98.
- Nichols, J., Chambers, I., Taga, T., Smith, A. 2001. **Physiological rationale for responsiveness of mouse embryonic stem cells to gp130 cytokines**. *Dev.* 128: 2333–2339.
- Nichols, J., Smith, A. 2011. **The origin and identity of embryonic stem cells**. *Dev.* 138: 3-8.
- Niwa, H., Burdon, T., Chambers, I., Smith, A. 1998. **Selfrenewal of pluripotent embryonic stem cells is mediated via activation of STAT3**. *Genes Dev.* 12: 2048–2060.
- Pan, G.J., Chang Z.Y., Schöler H.R., Pei D. 2002. **Stem cell pluripotency and transcription factor Oct4**. *Cell Res.* 12: 321-329.
- Pesce M, Wang X, Wolgemuth DJ, Schöler H. 1998. **Differential expression of the Oct-4 transcription factor during mouse germ cell differentiation**. *Mech. Dev.* 71: 89-98.
- Prowse, A.B., McQuade, L.R., Bryant, K.J., Marcal, H., Gray, P.P. 2007. **Identification of potential pluripotency determinants for human embryonic stem cells following proteomic analysis of human and mouse fibroblast conditioned media**. *J. Proteome Res.* 6: 3796–3807.
- Robertson E., Bradley A., Kuhlen M., Evans M. 1986. **Germ-line transmission of genes introduced into cultures pluripotential cells by retroviral vector**. *Nature.* 323: 445-448.
- Robertson, E. J. 1987. **Teratocarcinoma and Embryo-Derived Stem Cells: A Practical Approach**. Oxford, IRL Press.
- Russell, W.M.S., Burch, R.L. 1959. **The Principles of Humane Experimental Technique**. Londres, Methuen.
- Saiz, N., Plusa, B. 2012. **Early cell fate decisions in the mouse embryo**. *Reproduction* 145: 65-80.
- Schöler, H. R., Dressler, G. R., Balling, R., Rohdewohid, H., Gruss, P. 1990. **Oct-4: a germline-specific transcription factor mapping to the mouse t-complex**. *Embo. J.* 9: 2185-2195.
- Sell, S. (2004) **Stem Cell Handbook**, Humana Press.
- SketchUp Make**. 2013. Versión 13.0.4812. Trimble Navigation Limited. Patent 6,628,279.

Smith, A.G., Heath, J.K, Donaldson, D.D, Wong, G.G., Moreau, J., Stahl, M., Rogers, D. 1988. **Inhibition of pluripotential embryonic stem cell differentiation by purified polypeptides.** Nature. 336: 688–690.

Solter, D., Knowles, B. B. 1975. **Immunosurgery of mouse blastocyst.** Proc. Nat. Acad. Sci. USA 72: 5099-5102.

**Stem Cell Basics.** In **Stem Cell Information.** Bethesda, MD: National Institutes of Health, U.S. Department of Health and Human Services, 2009. Disponible en <<http://stemcells.nih.gov/info/basics/Pages/Default.aspx>> [Consulta 20 de noviembre de 2013].

Surani, M. A. 2001. **Reprogramming of genome function through epigenetic inheritance.** Nature. 414: 122-128.

Takahashi, K., Yamanaka, S. 2006. **Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors.** Cell 126, 4: 663-676.

Thomson, J. A., Itskovitz-Eldor, J., Shapiro, S. S., Waknitz, M. A., Swiergiel, J. J., Marshall, V. S. and Jones, J. M. 1998. **Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts.** Science. 282: 1145-1147.

Tremml, G., Singer, M., and Malavarca, R. 2008. **Culture of mouse embryonic stem cells.** Curr. Protoc. Stem Cell Biol. 1: 4-6.

Williams R.L., Hilton D.J., Pease, S., Willson, T.A., Stewart, C.L., Gearing, D.P., Wagner, E.F., Metcalf, D., Nicola, N.A., Gough, N.M. 1988. **Myeloid leukaemia inhibitory factor maintains the developmental potential of embryonic stem cells.** Nature. 336: 684–687.

Williams, R. L., Hilton, D. J., Pease, S., Willson, t. A., Stewart, C. L., Gearing, D. P., Wagner, E. F., Metcalf, D., Nicola, N.A., Gough, N. M. 1988. **Myeloid leukemia inhibitory factor maintains the developmental potential of embryonic stem cells.** Nature. 336: 684–687.

Yang, G.S., Banks, K.G., Bonaguro, R.J., Wilson, G., Dreolini, L., de Leeuw, C.N., Liu, L., Swanson, D.J., Goldowitz, D., Holt, R.A., Simpson, E.M.. 2009. **Next generation tools for high-throughput promoter and expression analysis employing single-copy knock-ins at the Hprt1 locus.** Genomics 93: 196–204.

Ying Q.L., Smith A.G.. 2003. **Defined conditions for neural commitment and differentiation.** Methods Enzymol. 365: 327-41.

Ying Q.L., Wray J., Nichols J., Batlle-Morera L., Doble B, Woodgett J., Cohen P., Smith A. 2008. **The ground state of embryonic stem cell self-renewal.** Nature. 453: 519-23.

Zwaka, T.P., Thomson, J. A. 2003. **Homologous recombination in human embryonic stem cells.** Nat. biotechnol. 21: 319–321.