



UNIVERSIDAD
POLITECNICA
DE VALENCIA



MASTER INTERUNIVERSITARIO EN MEJORA GENÉTICA

ANIMAL Y BIOTECNOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN

“Efecto de la E-cadherina y la vía de Wnt en la mejora de la derivación de células madre a partir de blastómeros aislados”

Tesis de Máster

Barcelona, Septiembre 2013

Marina Tomsic

Directores:

Josep Santaló Pedro

Elena Ibañez de Sans



INDICE:

Resumen:.....	3
Abstract:	4
1-Introducción:	5
2-Material y métodos:.....	10
Diseño experimental.....	10
Consideraciones éticas y autorización	11
Procedimientos	11
3-Resultados:	17
4-Discusión:.....	20
5-Conclusiones:	23
6-Agradecimientos:	24
7-Referencias:	25

RESUMEN:

La eficiencia de derivación de células madre embrionarias de ratón a partir de blastómeros aislados es todavía relativamente baja. En estudios previos realizados en nuestro laboratorio se observó que la eficiencia aumenta significativamente cuando se añade E-cadherina al proceso de derivación durante 24 h. Ésta actúa en las uniones adherentes y la incorporación exógena sirve para recrear la presencia de blastómeros vecinos.

El objetivo de éste estudio es determinar el mecanismo por el cual se consigue dicho incremento. En concreto se pretende evaluar si la acción de la E-cadherina se lleva a cabo mediante la inhibición de la vía de Wnt, al reclutar β -cateninas en la membrana celular e impedir así su translocación al núcleo, donde actúa como efectora de la vía de Wnt activando una serie de genes.

Para ello se utilizó un inhibidor de la vía canónica de Wnt, el IWR-1-endo, que actúa aumentando los niveles de axina, componente del complejo destructor de las β -cateninas.

Nuestros resultados indican que la mejora de la eficiencia con el uso de E-cadherina no parece realizarse a través de la vía de Wnt.

ABSTRACT:

Mouse embryonic stem cell derivation from isolated blastomeres still has a relatively low efficiency. Previous studies carried out in our laboratory showed that this efficiency increases when E-cadherin is added for 24 h during the derivation process. This protein acts at the cell adhesion level, recreating the presence of missing neighboring blastomeres.

The aim of this study is to determine the mechanism which induces this increase in the derivation efficiency. Specifically, it intends to evaluate whether the E-cadherin action is exerted through an inhibition of the Wnt canonical pathway by recruiting β -catenins at the membrane level. This would impair their translocation to the cell nucleus, where β -catenins acts as effectors of the Wnt pathway by activating different groups of genes.

To this aim, we used an inhibitor of the canonical Wnt pathway, IWR-1 endo, which acts by increasing axin levels, a protein that is part of the β -catenin destruction complex.

Our results indicate that the increase in the derivation efficiency obtained after using E-cadherin does not seem to be exerted through the Wnt canonical pathway.

1-INTRODUCCIÓN:

Las células madres embrionarias (ESC) son células indiferenciadas y pluripotentes. Poseen dos cualidades destacables: una es que pueden ser mantenidas en cultivo *in vitro* indefinidamente sin diferenciarse (*self renewal*) y la otra es que pueden diferenciarse a cualquiera de las tres láminas embrionarias (ectodermo, mesodermo y endodermo) bajo los estímulos adecuados. Esto constituye una gran promesa en medicina regenerativa ya que podrían sustituir o regenerar células, tejidos u órganos alterados, o no funcionales, y pueden tener aplicación en enfermedades como la diabetes mellitus, Parkinson, artritis y otras que hasta ahora no tienen tratamiento. Se utilizan así mismo como modelos para estudiar el desarrollo de enfermedades, diferentes vías de comunicación, probar fármacos y otras aproximaciones terapéuticas. Esto podría llevar a eliminar el uso de animales de experimentación para la realización de estos estudios, así como los problemas éticos y económicos que conlleva la utilización de los mismos.

Sin embargo, la eficiencia de derivación de ESC es aún baja, y falta estudiar muchos de los mecanismos celulares y moleculares por los que se mantienen o no en estado indiferenciado y cuáles son los pasos a seguir para diferenciarlas a tejidos concretos. Entre otros obstáculos se cuentan el lograr el crecimiento de órganos fuera del cuerpo, la integración de las células pluripotentes con los tejidos del huésped, el rechazo inmunitario y la formación de tumores (Wobus & Boheler, 2005).

Tradicionalmente las ESC se obtienen a partir de embriones enteros en la etapa de blastocisto, estadio que se caracteriza por presentar dos tipos celulares, el trofoblasto y la masa celular interna. De ésta última es de donde concretamente se suelen derivar (Evans & Martin, 1981; Brook & Gardner, 1997; Thomson *et al.*, 1998). El hacerlo a partir de blastómeros aislados, es decir, las células que componen al embrión en las primeras divisiones, tiene la ventaja de no destruir el embrión, ya que se sabe que aún retirando un

porcentaje del mismo, dentro de un margen razonable, no se afecta su viabilidad ni su capacidad implantatoria (Veiga *et al.*, 1994; Goossens *et al.*, 2008). Esto, en el caso del ser humano, tiene un valor ético y en el de otros mamíferos puede tener también un valor económico. La técnica que se utiliza es la misma que para el diagnóstico genético preimplantacional, que consiste en retirar una o más células del embrión en el estadio deseado, antes de la compactación. Sin embargo, varios estudios han mostrado que la eficiencia de derivación a partir de blastómeros aislados es todavía más baja que cuando se utilizan blastocistos (Chung *et al.*, 2006; Klimanskaya *et al.*, 2006, 2007; Wakayama *et al.*, 2007; Gonzalez *et al.*, 2010, 2011).

Por otro lado, el equilibrio que regula el mantenimiento de la pluripotencia *in vivo* e *in vitro* depende de varios mecanismos, entre ellos factores externos que actúan a través de las vías de señalización, factores de transcripción, microRNAs que modifican epigenéticamente el estado de la cromatina, la matriz extracelular y las uniones intercelulares (Lebkowski *et al.*, 2001; Lensch *et al.*, 2006; Okita & Yamanaka, 2006; Steinberg & McNutt, 1999).

Para comprender que sucede durante la derivación en estadios embrionarios tan tempranos se han estudiado diferentes vías de comunicación celular involucradas en el mantenimiento de la pluripotencia, en la proliferación y en la diferenciación de las ESC (LIF/gp130/STAT3—Bmp/Smad—Wnt/ β -catenina/TCF—Ras/Raf/Erk—PI3) así como pequeñas moléculas que actúan modulando las mismas (Yamanaka & Okita, 2006; Huang *et al.*, 2009; Sineva *et al.*, 2010; Gwak *et al.*, 2012; Van der Jeught *et al.*, 2013).

En estudios previos realizados en nuestro laboratorio se evaluó el porcentaje de derivación de ESC de ratón (mESC) a partir de embriones en diferentes estadios y con distintos medios de cultivo. En ellos se pudo observar que el porcentaje de líneas obtenidas es más alto en embriones postcompactación (mórula y blastocisto) y utilizando un medio definido descrito por Wakayama *et al.* en el año 2007, que incluye hormona adrenocorticotropa (ACTH) y sustituye el *Fetal Calf Serum* (FCS), de origen animal, por el *Knockout Serum Replacement* (KSR).

Uno de los resultados más relevantes descritos en este estudio fue que el porcentaje de derivación disminuía en los grupos de blastómeros únicos aislados en el estadio de 8 células (1/8) comparado con los grupos de 2/8, 3/8 y 4/8, lo que llevó a pensar que la proximidad con el blastómero vecino es importante para el desarrollo y mantenimiento de las líneas (Gonzalez *et al*, 2010).

Se sabe que las uniones intercelulares cumplen un rol en la comunicación, proliferación y diferenciación. La E-cadherina, una glicoproteína, es la encargada de formar uniones adherentes en presencia de calcio entre el estadio de 8 y 16 células, participando también en el comienzo de la compactación y en la transición de mórula a blastocisto. Por otro lado tiene una función de señalización en varios procesos como la reorganización de tejido y sus límites, en la metástasis, migración, diferenciación y proliferación celular (Steinberg & McNutt, 1999). Es una proteína transmembrana, cuyos dominios citosólicos reclutan varias moléculas incluyendo α -catenina, β -catenina y p120ctn (Kemler, 1993; Aberle, 1996).

Así, en un segundo estudio se utilizó una E-cadherina quimérica para recrear la acción de la E-cadherina nativa entre blastómeros vecinos dentro del embrión. Este experimento dio como resultado que el contacto del blastómero aislado con la proteína durante un período de 24 h aumentaba la tasa de división de los blastómeros así como también la tasa de derivación de ESC, con una eficiencia del 33,6% en comparación con el 2,2% obtenido con el mismo medio de cultivo sin tratamiento (González *et al.*, 2010, 2011).

En el presente estudio se pretende analizar de qué forma interviene la E-cadherina a esta mejora de la capacidad de división y de la eficiencia de derivación. Para ello planteamos la hipótesis de que sea la vía de Wnt la que pudiera intervenir en dicho proceso ya que ambas tienen como elemento común las β -cateninas, las cuales juegan un papel en la adhesión celular y en el control de la expresión de genes.

Se sabe que la unión a la E-cadherina disminuye el pool libre de β -catenina disponible para actuar a nivel nuclear (Willert & Nusse, 1998). Por otro lado es conocido que existe un balance en los niveles de β -catenina que regula el mantenimiento de la pluripotencia, como demuestran Lluís *et al.* (2008) en ESCs. Este grupo realizó un experimento con activadores de la vía de Wnt, utilizándolos en diferentes concentraciones y durante distintos períodos de tiempo y midiendo la concentración de β -catenina en el núcleo. Así pudieron observar que altos niveles de esta proteína parecen inhibir la reprogramación nuclear mientras que niveles bajos podrían inducirla.

La vía de señalización canónica de Wnt (Wnt/ β -catenina/TCF) consiste en una serie de proteínas que transmiten señales hacia el interior de la célula. Comienza con la unión en la membrana de proteínas ligando Wnt con un receptor de la familia Frizzled, que activan a su vez una fosfoproteína citoplasmática llamada Dishevelled. Ésta actúa aumentando los niveles de β -catenina, que luego es trasladada al núcleo donde se asocia con el factor de transcripción llamado TCF/LEF (Factor de transcripción de células T/Factor potenciador de linfocitos), activando la transcripción de genes responsables de proliferación y diferenciación celular. En esta vía se encuentra el oncogen c-myc, responsable del control de la proliferación y encargado de regular positivamente la transición G1/S (Sineva *et al.*, 2010). En ausencia de Wnt, las β -cateninas son rápidamente degradadas por un complejo formado por *adenomatous polyposis coli* (APC), axina, glicógeno sintetasa quinasa 3-beta (GSK3 β) y caseína quinasa (CKI) (Brembeck *et al.*, 2006; Gwack *et al.*, 2012).

Una de las formas más comunes de manipular esta vía de señalización en el laboratorio, ha sido a través de la inhibición de GSK3 β . En un comienzo se planteó que ésta inhibición mantenía la pluripotencia (Sato *et al.*, 2004). No obstante, en los últimos años pareciera ser que la activación promueve la diferenciación de las mESC a mesodermo (Gwak *et al.*, 2012; Singh *et al.*, 2012; Davidson *et al.*, 2012), induce su senescencia prematura y una pérdida de la función relacionada con el envejecimiento (Brack *et al.*, 2007; Liu *et al.*, 2007). Otros estudios sugieren que los efectos de la inhibición serían dosis

dependientes, de forma que a bajas concentraciones de inhibidores se promueve el *self-renewal* y a altas la diferenciación (Tsutsui *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2013).

Ante estos resultados inciertos, el objetivo de este trabajo es evaluar si esta mejora que se ha observado con el uso de E-cadherina en la eficiencia de derivación de las mESC se debe, por lo menos en parte, a su función de unirse a las β -cateninas e impedir que estas vayan al núcleo de la célula, donde actúan como transductores intracelulares de señales cuando es activada la cascada de la vía de Wnt. Para esto utilizamos una sustancia inhibidora de la respuesta de esta vía, el IWR-1-endo, que actúa estabilizando los niveles de axina, componente limitante del complejo destructor de β -cateninas, y aumentando los niveles de fosforilación de éstas últimas, requisito necesario para su degradación. Esta sustancia tiene la característica de que su efecto es reversible una vez retirado el contacto con la misma (Chen *et al.*, 2009). Si bien se ha descrito que IWR-1-endo puede estabilizar la axina uniéndose directamente a ella (Chen *et al.*, 2009), parece que su efecto podría estar también mediado por la inhibición de las tanquirasas 1 y 2, componentes del telómero con actividad poli(ADP-ribosa)polimerasa y que estimulan la poliubiquitinación y degradación de la axina (Huang *et al.*, 2009).

La hipótesis planteada, es pues, que en presencia de este inhibidor el nivel de β -cateninas disponibles para ir al núcleo sería menor, como en el caso de la unión con la E-cadherina, impidiendo así la activación de genes diana de la vía de Wnt (para una lista completa de genes se puede acceder a la página oficial de Wnt en http://www.stanford.edu/group/nusselab/cgi-bin/wnt/target_genes). De esta forma, en presencia de IWR-1-endo deberíamos observar un incremento en la eficiencia de derivación de las mESC a partir de blastómeros aislados similar a la observada en presencia de E-cadherina.

2-MATERIAL Y MÉTODOS:

Diseño experimental

En el presente estudio aislamos blastómeros a partir de embriones de ratón en el estadio de 8 células con el fin de comparar las tasas de derivación de mESC tras el tratamiento con E-cadherina e IWR-1-endo, que actúan a través de las vías de señalización celular antes descritas, y así observar su efecto sobre la eficiencia de derivación de mESC. Se establecieron tres grupos de trabajo:

-Grupo control negativo: Los blastómeros aislados no experimentaron ningún tratamiento previo al proceso de derivación.

-Grupo control positivo: Los blastómeros aislados fueron tratados con 1,5 µg/ml de E-cadherina durante 24 h.

-Grupo estudio: Los blastómeros aislados fueron tratados con 10 µM de IWR-1-endo durante 24 h.

Se determinó la tasa de división a las 24 h, de crecimiento de colonias iniciales (*outgrowth*) antes del primer pasaje (6-7 días) y de derivación de líneas de mESC, considerándose como líneas establecidas aquellas que llegaron al séptimo pasaje.

Las líneas obtenidas fueron caracterizadas por inmunofluorescencia para detectar la expresión de marcadores de pluripotencia (Oct4 y Sox2). También fueron diferenciadas espontáneamente *in vitro* y caracterizadas a su vez por inmunofluorescencia para detectar marcadores de las tres láminas embrionarias: nestina para ectodermo, actina de músculo liso (SMA) para mesodermo, y alfa-fetoproteína (AFP) para endodermo.

Consideraciones éticas y autorización

Los protocolos de trabajo utilizados en el presente estudio cuentan con la aprobación de la Comisión de Ética en Experimentación Animal y Humana de la Universitat Autònoma de Barcelona (CEEAH#1435) y con la autorización de la Generalitat de Catalunya (Departament de Medi Ambient i Habitatge #54067).

Procedimientos

Células *feeder* para co-cultivo:

La derivación de las mESC requiere de un co-cultivo con células nutrientes (*feeder cells*). Para producir estas células utilizamos fibroblastos embrionarios de ratón STO (ECACC, Salisbury, UK) inactivados con un tratamiento de mitomicina C (Invitrogen) durante 3 h a una concentración de 10 µg/ml. El medio de cultivo utilizado fue el Dubelcco modificado de Eagle (DMEM) (Invitrogen) suplementado con un 10% de FCS (Invitrogen).

Obtención de embriones:

Hembras de la cepa 129/sv fueron superovuladas con una inyección intraperitoneal de 5 UI de gonadotrofina de suero de yegua gestante (PMSG) (Intervet), análoga de la FSH, seguido a las 48 h por una inyección intraperitoneal de 5 UI de gonadotrofina coriónica humana (hCG) (Farma-Lepori), análoga de la LH. En este momento se incluyó un macho de la cepa C57Bl/6 por cada dos hembras para la monta natural. A las 48 h de la inyección de hCG se sacrificaron las hembras por dislocación cervical y se recuperaron los embriones a 2 células, mediante perfusión del oviducto con medio KSOM-H. Una vez recuperados se cultivaron en gotas de medio Embryomax (Millipore) recubiertas de aceite mineral para embriones (Sigma), a 37°C y 5% de CO₂ hasta alcanzar el estadio de 8 células.

Aislamiento de blastómeros:

Los blastómeros fueron aislados por micromanipulación en una solución tampón fosfato (PBS) libre de calcio y magnesio con un 1% de albúmina sérica bovina (BSA) en gotas de 30 μ l contenidas en una placa de Petri de 60 mm de diámetro, recubiertas de aceite mineral y sobre una platina térmica a 37°C. Para realizar la biopsia utilizamos 3 tipos de micropipetas:

Sujeción: 80 μ m de diámetro para fijar el embrión.

Perforación: 10 μ m de diámetro, cargada con solución ácida de Tyrode's para disolver localmente la zona pelúcida.

Biopsia: 25 μ m de diámetro cargada con PBS para aspirar uno a uno los blastómeros.

Se utilizaron todos los blastómeros en el estadio de 8 células para evitar un sesgo en los resultados debido a posibles diferencias en el destino de los blastómeros (Gonzalez *et al.*, 2011).

Establecimiento de las mESC:

Se sembraron los blastómeros individualmente sobre una monocapa de células *feeder* en gotas de 50 μ l de medio de derivación definido, contenidas en placas de Petri de 60mm (Nunc) recubiertas de aceite mineral. El medio utilizado fue el DMEM Glutamax 1x suplementado con aminoácidos no esenciales, 100 mM de β -mercaptoethanol, 10^3 unidades/ml de Factor Inhibidor de Leucemia (LIF), 20% de KSR, 0,1 mg/ml de Hormona Adrenocorticotropa (ACTH), 10 unidades/ml de penicilina y 10 μ l/ml estreptomina (Gibco).

El cultivo se realizó a 37°C en 5% de CO₂ y el medio se cambió cada 24 h. Cada grupo fue tratado durante las primeras 24 h con su respectiva sustancia, tal y como se describe en el apartado del diseño experimental, y lavado pasivamente cambiando el medio dos veces con un intervalo de 3 h transcurrido este tiempo. Se mantuvieron en cultivo mientras crecían y cada 6-7 días fueron pasadas a nuevas células *feeder*.

Subcultivo:

A fin de subcultivar las líneas celulares, las células fueron pasadas a una gota de tripsina-EDTA (LabClinics), donde las distintas colonias fueron cortadas con un bisturí para disgregarlas y finalmente lavadas antes de ser pasadas a las nuevas *feeder*, todo esto con ayuda de una pipeta de Pasteur estirada en la llama.

A partir del tercer pasaje, el cultivo se realizó en placas de 4 pocillos (Nunc) con 800 μ l de medio y el mismo fue cambiado cada 48 h.

Se consideraron líneas establecidas a partir del séptimo pasaje.

Caracterización de las mESC:

La caracterización de las líneas de mESC se llevó a cabo mediante tres métodos diferentes:

Caracterización morfológica

Las mESC son células pequeñas, redondas, con una relación núcleo-citoplasma elevada y establecen colonias redondas con límites definidos, a menudo formando grandes colonias que crecen en tres dimensiones como se observa en la figura 1



Figura 1. Colonia de mESC al segundo pasaje.

Caracterización molecular

Se utilizaron técnicas de inmunofluorescencia para detectar la expresión de dos factores de transcripción característicos de pluripotencia: Oct4 y Sox2.

Para ello, las células fueron cultivadas sobre cubreobjetos redondos estériles situados en el fondo de las placas de 4 pocillos, con la monocapa de *feeder* encima. A los 3–4 días se fijaron las células en paraformaldehído al 4% durante 15 min, se lavaron 3 veces con PBS durante 5 min, y se realizó la permeabilización y bloqueo con una solución de PBS con un 0,5% de Tritón X-100 (Sigma), 3% de suero de cabra (Sigma) y 0,2% de azida sódica (Sigma) durante 30 min. En este momento se incubaron con el anticuerpo primario (según Tabla 1) durante toda la noche a 4°C en una cámara húmeda. A la mañana siguiente se hicieron 3 lavados con PBS durante 5 min para retirar el exceso de anticuerpo y se incubaron durante 2 h con el anticuerpo secundario correspondiente (Tabla 1) a temperatura ambiente. Se realizaron 3 nuevos lavados con PBS y los cubreobjetos fueron retirados de las placas de 4 pocillos, secados y teñidos con 10 µg/ml Hoechst 33258 como marcador nuclear. Finalmente se montaron en un portaobjetos y sellaron con laca de uñas.

Las muestras fueron observadas en un microscopio de fluorescencia Olympus BX41TF, con objetivo de inmersión 60x BPF1 C2. Se capturaron imágenes con una cámara Olympus U-TV1X. Las imágenes fueron posteriormente procesadas con el programa Isis V5.4.9 de Metasystems.

Tabla 1. Anticuerpos primarios y secundarios para detectar marcadores de pluripotencia.

AC primario	Dilución	Referencia	AC secundario	Dilución	Referencia
IgG monoclonal de ratón anti-Oct3/4	1:50	Santa Cruz	Anti IgG de ratón Alexa Fluor 488 (gallina)	6 µg/ml	Molecular Probes
IgG policlonal de conejo anti-Sox2	1:200	Chemicon	Anti-IgG de conejo Alexa Fluor 594 (cabra)	6 µg/ml	Molecular Probes

Caracterización funcional

Para confirmar la pluripotencia de las líneas funcionalmente, se procedió a la diferenciación espontánea *in vitro* hacia las tres capas embrionarias (ectodermo, mesodermo y endodermo) y a la posterior detección por inmunofluorescencia de marcadores específicos de estas tres capas.

Para ello se cultivaron las células en placas de 4 pocillos con cubreobjetos estériles recubiertos de gelatina pero sin la monocapa de *feeders*. El medio que se utilizó fue el mismo de derivación, excepto que se sustituyó el KSR por FCS y se suprimió el LIF. Las células fueron cultivadas cambiando este medio cada 48 h durante 10 días. Luego fueron fijadas y procesadas de la misma manera que la mencionada anteriormente para los marcadores de pluripotencia, pero usando los anticuerpos correspondientes para los marcadores de diferenciación de ectodermo (nestina), mesodermo (SMA) y endodermo (AFP) (Tabla 2).

Tabla 2. Anticuerpos primarios y secundarios para detectar marcadores de diferenciación.

AC primario	Dilución	Referencia	AC secundario	Dilución	Referencia
IgG policlonal de conejo anti-nestina	1:250	Abcam	Anti-IgG policlonal de conejo Alexa Flúor 594 (cabra)	6 µg/ml	Molecular Probes
IgG policlonal de conejo anti-AFP	1:400	Dako	Anti-IgG policlonal de conejo Alexa Flúor 594 (cabra)	6 µg/ml	Molecular Probes
IgG monoclonal de ratón anti-alfa-SMA	1:400	Sigma	Anti-IgG monoclonal de ratón Alexa Flúor 488 (gallina)	6 µg/ml	Molecular Probes

Análisis estadístico:

Los resultados fueron analizados mediante un test de χ cuadrado utilizando tablas de contingencia para buscar diferencias entre grupos de tratamientos. Se utilizó el paquete estadístico GraphPad Instat™. Los valores de $p < 0,05$ fueron considerados estadísticamente significativos.

3-RESULTADOS:

Los resultados obtenidos de la derivación de mESC fueron evaluados según el tratamiento recibido y en tres momentos de su desarrollo: los que se dividieron a las 24 h, los crecimientos (*outgrowths*) observados al primer pasaje (6-7 días) y las líneas establecidas, que son aquellas que llegaron al séptimo pasaje (Tabla 3).

Tabla 3. Resultados de división, *outgrowths* y derivación de las mESC en los tres grupos estudiados.

Grupo	n	división 24 h	<i>Outgrowths</i>	Líneas ESC
Control	130	52 (40,5%) ^a	20 (15,4%)	12 (9,2%)
E-cadherina	78	51 (65,4%) ^b	15 (19,2%)	7 (8,9%)
IWR-1-endo	137	69 (50,4%) ^a	27 (19,7%)	18 (13,1%)

Nota: Diferentes superíndices indican diferencias estadísticamente significativas entre filas.

Se obtuvieron un total de 37 líneas.

Como se observa en la tabla 3, el porcentaje de división a las 24 h fue más elevado en los blastómeros tratados con E-cadherina que en los otros dos grupos (Figura 2). Concretamente, entre el grupo control y el tratado con IWR-1 no se observaron diferencias estadísticamente significativas, pero si entre el tratado con E-cadherina y el grupo control ($p=0,0006$) y con el grupo tratado con IWR-1 ($p=0,0452$).

En todos los casos de los que finalmente se obtuvieron líneas se observó a las 48-72h la formación de pseudoblastocistos (Figura 2).

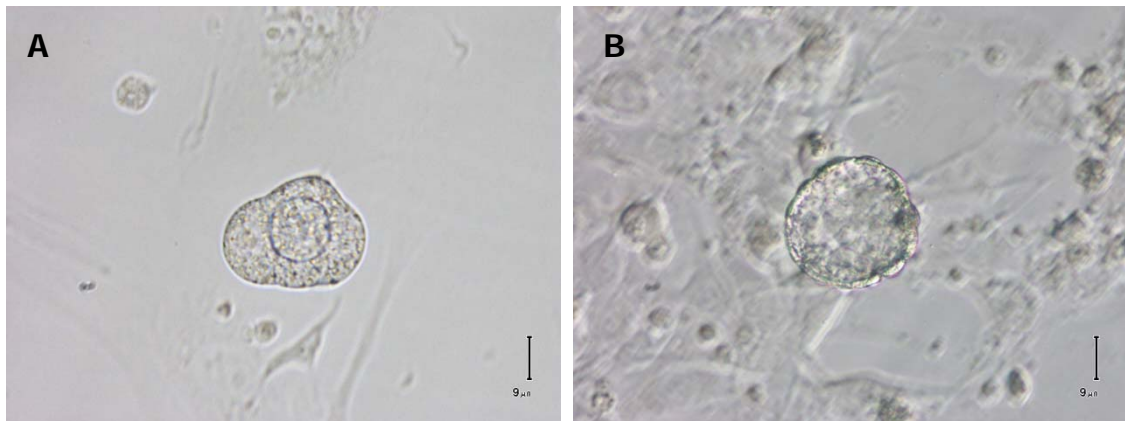


Figura 2. (A) Blastómero tratado con E-cadherina mostrando división a las 24 h. (B) Pseudoblastocisto tratado con IWR-1 a las 72 h.

Por lo que se refiere a la cantidad de crecimientos (*outgrowths*) a los 6-7 días, no se encontraron diferencias significativas entre los diferentes tratamientos ($p=0,6205$).

Finalmente, tampoco se observaron diferencias significativas en la tasa de establecimiento de las líneas de mESC y los tratamientos correspondientes ($p=0,5$). Las líneas obtenidas fueron sometidas a inmunofluorescencia para detectar Oct3/4 y Sox2, marcadores que confirman la pluripotencia (Figura 3). Todas ellas resultaron positivas para Sox2, y un 80% para Oct3/4, de forma que todas ellas fueron consideradas como mESC.

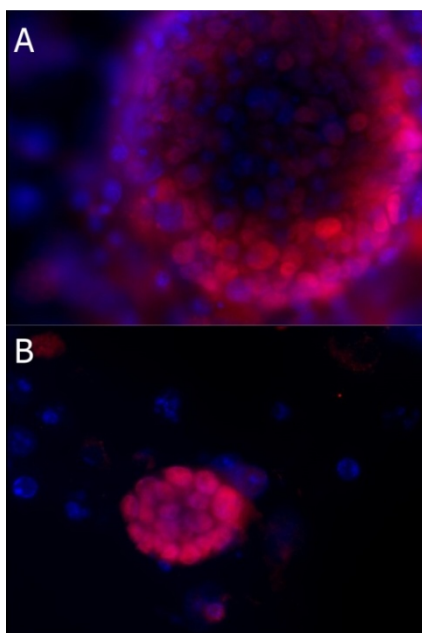


Figura 3. Detección por inmunofluorescencia de los marcadores nucleares de pluripotencia Oct-3/4 (A en color rojo) y Sox2 (B en color rojo) en líneas de mESC procedentes de blastómeros tratados con IWR-1 (A) y E-cadherina (B). Los núcleos aparecen de color azul teñidos con Hoechst.

Luego 12 de las 37 líneas, pertenecientes a los 3 grupos analizados, fueron inducidas a diferenciación espontánea y se buscaron en ellos los marcadores de nestina, AFP y α -SMA. Todas dieron positivo para los tres marcadores.

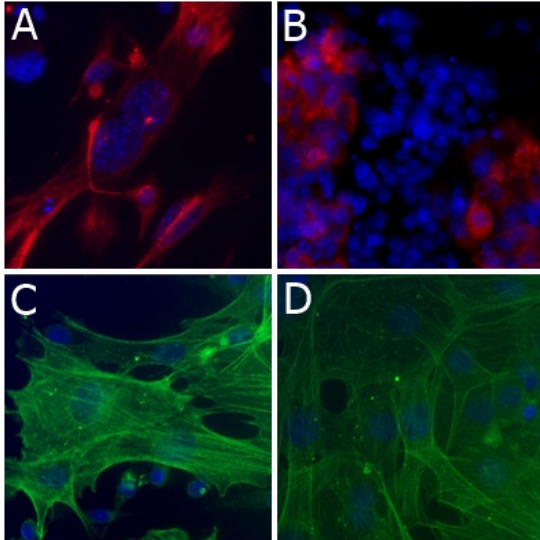


Figura 4. Detección por inmunofluorescencia de los marcadores de diferenciación nestina-ectodermo (A, en color rojo), AFP-endodermo (B, en color rojo) alfa-SMA-mesodermo (C y D, en color verde) en líneas de mESC procedentes de embriones tratados con E-cadherina (A y B), no tratados (C) y tratados con IWR-1 (D). Los núcleos se han teñido con Hoechst y aparecen de color azul.

4-DISCUSIÓN:

En este trabajo se ha probado por primera vez la molécula inhibidora de la vía de Wnt, IWR-1-endo, en embriones y más específicamente en blastómeros aislados para cultivo de células madres. El propósito de este experimento fue observar si el porcentaje de derivación de células madres tratadas con IWR-1 era el mismo obtenido con el tratamiento de E-cadherina y de ésta manera ver si la inhibición de la acción de las β -cateninas es, aunque sea en parte, responsable del aumento de la eficiencia observada en trabajos previos (González *et al.*, 2011) con la E-cadherina.

En primer lugar, hay que destacar que los resultados obtenidos difieren sensiblemente de los encontrados en el citado estudio previo realizado en nuestro laboratorio.

Así, mientras los resultados del grupo control son equiparables en ambos estudios con tasas de división de alrededor del 40%, tasas de *outgrowths* cercanas al 15% en ambos y unas tasas de derivación ligeramente distintas (2,2% en el estudio previo y del 9,2% en el presente), las diferencias surgieron especialmente en el grupo de los blastómeros tratados con E-cadherina. En dicho grupo, todos los parámetros analizados en el presente estudio se encontraban por debajo de las tasas encontradas en el trabajo anterior. Así la tasa de división del 65,4%, de *outgrowths* del 19,2% y de derivación del 8,9% son sensiblemente inferiores a los valores del 88,8%, 50,4% y 33,6%, respectivamente, obtenidos en el trabajo previo.

El origen de estas diferencias podría ser atribuido a problemas surgidos con el tratamiento mediante el cual se lavaban, en el protocolo original, los blastómeros aislados después de haberlos expuesto durante 24 h a la E-cadherina. Este tratamiento, que consistía en tres lavados en PBS libre de calcio y magnesio, BSA y 150mM de EDTA y que aseguraba la completa eliminación de la E-cadherina de la superficie de los blastómeros (tal y como se comprobó inicialmente) no funcionó adecuadamente, ya que los blastómeros tendían a

lisarse y a bloquear su desarrollo. A pesar de que se probaron diferentes concentraciones de EDTA para minimizar dicho efecto deletéreo, y debido a problemas del calendario fijado para el desarrollo del proyecto, finalmente sólo se consiguió derivar líneas lavándolas mediante un simple cambio del medio que contenía la E-cadherina a un medio fresco sin la proteína. Dicho procedimiento no garantiza la total eliminación de la E-cadherina de la superficie de los blastómeros, condición ésta que parece ser fundamental para asegurar el éxito de la derivación de ESC a partir de blastómeros aislados. Ello es debido a que, tal y como se ha descrito anteriormente (González *et al.*, 2011), la no eliminación de la E-cadherina provoca que las células obtenidas tiendan a diferenciarse hacia trofoblasto y produzcan *trophoblastic stem cells* en lugar de las ESC deseadas.

Por otro lado, estos problemas llevaron a que el grupo de blastómeros aislados expuestos a la E-cadherina tenga un número de la muestra inferior a los otros dos.

Lo que sí fue consistente con el experimento previo fue el aumento de la tasa de división a las 24 h en los blastómeros expuestos a la E-cadherina, sin embargo este fenómeno también se observó entre el grupo de blastómeros expuestos de una forma prolongada a la proteína (González *et al.*, 2011). De hecho, las tasas obtenidas en el grupo de tratados con E-cadherina en el presente trabajo son equivalentes a los obtenidos en el estudio previo antes mencionado con una exposición prolongada a la E-cadherina (65,4% de tasa de división, 19,2% de tasa de outgrowth y 8,9% de tasa de derivación frente al 67,0%, 14,0% y 1,0% respectivamente), lo que parece confirmar que nos encontramos en esta situación experimental. En realidad, las únicas diferencias estadísticamente significativas aparecen en la tasa de derivación, con un aumento significativo en el presente estudio. Sin embargo este incremento aparece también al comparar ambos grupos control.

Estos problemas dificultan la interpretación de los resultados, ya que el grupo control positivo que debía representar los blastómeros expuestos durante 24h a

la E-cadherina no se consiguió reproducir adecuadamente. Por ello sólo queda la comparación de los resultados derivados de la exposición al IWR-1 con el control negativo (grupo control no expuesto).

Si abordamos dicha comparación veremos que los resultados no presentan diferencias estadísticamente significativas en ninguno de los parámetros analizados, lo cual sugiere que la vía de Wnt no sea la efectora del incremento observado en la tasa de derivación de mESC a partir de blastómeros aislados obtenido tras la exposición breve a la E-cadherina.

Por otro lado, es interesante mencionar que 5 *outgrowths* procedentes del grupo de blastómeros expuestos al IWR-1 (18,5%) se diferenciaron espontáneamente a músculo cardíaco sin que de ellos se pudieran derivar, obviamente, mESC. Este resultado coincide con los datos descritos anteriormente (Hudson *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2013) donde se emplea dicha substancia para inducir la diferenciación de hESC hacia células del músculo cardíaco. Esta capacidad diferenciadora del IWR-1 podría explicar porqué el grupo de tratados no presentó un incremento en la eficiencia de derivación de mESC a partir de los blastómeros aislados, aunque éste es un extremo que requiere posteriores estudios para ser confirmado.

A pesar de ello, y si bien es cierto que las diferencias no son estadísticamente significativas, si que se observaron incrementos en las tasas obtenidas tras la exposición al IWR-1 por lo que sería interesante repetir el experimento incrementando el tamaño de la muestra y consiguiendo un grupo control positivo consistente con los resultados previos obtenidos en nuestro grupo.

5-CONCLUSIONES:

- 1) Se confirma que una exposición prolongada a la E-cadherina induce un incremento de la tasa de división de los blastómeros aislados, pero que no redundan en un incremento de la tasa de derivación de mESC.
- 2) La exposición de los blastómeros aislados a inhibidores de vía de Wnt que reduzcan los niveles de β -catenina en el núcleo celular no mimetiza los resultados obtenidos en la tasa de derivación de mESC tras una exposición de 24h a la E-cadherina.
- 3) Se necesitan más estudios con una mayor consistencia en el diseño experimental para confirmar dicha conclusión derivada del presente trabajo.

6-AGRADECIMIENTOS:

Quisiera agradecer a mi familia que me apoyó en esta iniciativa de seguir estudiando y aprendiendo fuera del país, a mi mamá, papá, a Sergio, Marcelo, Branko, Anita, Valentina y Pilar.

También quisiera agradecer al IAMZ, a los organizadores del máster por haberme seleccionado y otorgado una beca para hacer esto posible y a los compañeros con los que compartimos esta experiencia, tanto en Barcelona como en Valencia.

Al Dr. Josep Santaló y a la Dra. Elena Ibañez por haberme hecho parte de su equipo y estar siempre dispuestos a solucionar las dudas o problemas que surgieran.

Muy especialmente a Laia Piqué, Anna Mallol, Anna Seriola, Jonatan Lucas y Nerea Gaztelumendi por haber sido excelentes compañeros de laboratorio y haber creado un ambiente de trabajo ameno, al igual que todos los compañeros de la unidad de Biología Celular de la facultad de Biociencias.

Por último, a todos los compañeros de vida que me acompañaron en este tiempo sin los que la experiencia no hubiera sido igual, a Gonzalo, Carlos, Marcos, Marina, Leo, Diana, Tomás, Amancio y a todos los amigos de la casa de los vientos. ¡¡MUCHAS GRACIAS A TODOS, LOS QUIERO MUCHO!!

7-REFERENCIAS:

Aberle H, Schwartz H, Kemler R. 1996 [Cadherin-catenin complex: protein interactions and their implications for cadherin function.](#) J Cell Biochem.61(4):514-23. Review.

Brack AS, Conboy MJ, Roy S, Lee M, Kuo CJ, Keller C, Rando TA. 2007. [Increased Wnt signaling during aging alters muscle stem cell fate and increases fibrosis.](#) Science. 317(5839):807-10.

Brembeck FH, Rosário M, Birchmeier W. 2006. [Balancing cell adhesion and Wnt signaling, the key role of beta-catenin.](#) Curr Opin Genet Dev 16(1):51-9.

Brook, F. A., & Gardner, R. L. 1997. The origin and efficient derivation of embryonic stem cells in the mouse. Proc Natl Acad Sci U S A., 94(11):5709–5712.

Chen B, Dodge ME, Tang W, Lu J, Ma Z, Fan CW, Wei S, Hao W, Kilgore J, Williams NS, Roth MG, Amatruda JF, Chen C, Lum L. 2009. [Small molecule-mediated disruption of Wnt-dependent signaling in tissue regeneration and cancer.](#) Nat Chem Biol. 5(2):100-7.

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(7073):216-9.

Davidson KC, Adams AM, Goodson JM, McDonald CE, Potter JC, Berndt JD, Biechele TL, Taylor RJ, Moon RT. 2012 [Wnt/ \$\beta\$ -catenin signaling promotes differentiation, not self-renewal, of human embryonic stem cells and is repressed by Oct4.](#) Proc Natl Acad Sci U S A.109(12):4485-90.

González S, Ibáñez E, Santaló J. 2010. [Establishment of mouse embryonic stem cells from isolated blastomeres and whole embryos using three derivation methods.](#) J Assist Reprod Genet. 27(12):671-82.

González S, Ibáñez E, Santaló J. 2011. [Influence of early fate decisions at the two-cell stage on the derivation of mouse embryonic stem cell lines.](#) Stem Cell Res.7(1):54-65.

González S, Ibáñez E, Santaló J. 2011. [Influence of E-cadherin-mediated cell adhesion on mouse embryonic stem cells derivation from isolated blastomeres.](#) Stem Cell Rev. 7(3):494-505.

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.](#) Hum Reprod. 23(3):481-92

Gwak J, Hwang SG, Park HS, Choi SR, Park SH, Kim H, Ha NC, Bae SJ, Han JK, Kim DE, Cho JW, Oh S. 2012. [Small molecule-based disruption of the Axin/ \$\beta\$ -catenin protein complex regulates mesenchymal stem cell differentiation.](#) Cell Res.22(1):237-47.

Huang SM, Mishina YM, Liu S, Cheung A, Stegmeier F, Michaud GA, Charlat O, Wiellette E, Zhang Y, Wiessner S, Hild M, Shi X, Wilson CJ, Mickanin C, Myer V, Fazal A, Tomlinson R, Serluca F, Shao W, Cheng H, Shultz M, Rau C, Schirle M, Schlegl J, Ghidelli S, Fawell S, Lu C, Curtis D, Kirschner MW, Lengauer C, Finan PM, Tallarico JA, Bouwmeester T, Porter JA, Bauer A, Cong F. 2009. [Tankyrase inhibition stabilizes axin and antagonizes Wnt signalling.](#) Nature. 461(7264):614-20.

Hudson J, Titmarsh D, Hidalgo A, Wolvetang E, Cooper-White J. 2012. [Primitive cardiac cells from human embryonic stem cells.](#) Stem Cells Dev. 21(9):1513-23

Kemler R 1993. [From cadherins to catenins: cytoplasmic protein interactions and regulation of cell adhesion.](#) Trends Genet. 9(9):317-21. Review.

Klimanskaya I, Chung Y, Becker S, Lu SJ, Lanza R. 2006. [Human embryonic stem cell lines derived from single blastomeres.](#) Nature. 444(7118):481-5.

Klimanskaya I, Chung Y, Becker S, Lu SJ, Lanza R. 2007. [Derivation of human embryonic stem cells from single blastomeres.](#) Nat Protoc.2(8):1963-72.

Lebkowski JS, Gold J, Xu C, Funk W, Chiu CP, Carpenter MK. 2001. [Human embryonic stem cells: culture, differentiation, and genetic modification for regenerative medicine applications.](#) Cancer J. 7 Suppl 2:S83-93.

Lensch MW, Daheron L, Schlaeger TM. 2006. [Pluripotent stem cells and their niches.](#) Stem Cell Rev. 2(3):185-201. Review.

Li W, Jiang K, Wei W, Shi Y, Ding S. 2013. [Chemical approaches to studying stem cell biology](#). Cell Res. 23(1):81-91.

Liu H, Fergusson MM, Castilho RM, Liu J, Cao L, Chen J, Malide D, Rovira II, Schimel D, Kuo CJ, Gutkind JS, Hwang PM, Finkel T. [Augmented Wnt signaling in a mammalian model of accelerated aging](#). Science. 317(5839):803-6.

Lluis F, Pedone E, Pepe S, Cosma MP. 2008. [Periodic activation of Wnt/beta-catenin signaling enhances somatic cell reprogramming mediated by cell fusion](#). Cell Stem Cell. 3(5):493-507.

Martin GR i Evans MJ. 1975. Differentiation of clonal lines of teratocarcinoma cells: formation of embryoid bodies in vitro. Proc Natl Acad Sci U S A. 72(4):1441-5.

Okita K, Yamanaka S. 2006. [Intracellular signaling pathways regulating pluripotency of embryonic stem cells](#). Curr Stem Cell Res Ther. 1(1):103-11. Review.

Sato N, Meijer L, Skaltsounis L, Greengard P, Brivanlou AH. 2004. [Maintenance of pluripotency in human and mouse embryonic stem cells through activation of Wnt signaling by a pharmacological GSK-3-specific inhibitor](#). Nat Med. 10(1):55-63.

Sineva GS, Pospelov VA. 2010. [Inhibition of GSK3beta enhances both adhesive and signalling activities of beta-catenin in mouse embryonic stem cells](#). Biol Cell. 102(10):549-60.

Singh AM, Reynolds D, Cliff T, Ohtsuka S, Mattheyses AL, Sun Y, Menendez L, Kulik M, Dalton S. Signaling 2012. [Network crosstalk in human pluripotent cells: a Smad2/3-regulated switch that controls the balance between self-renewal and differentiation](#). Cell Stem Cell. 10(3):312-26.

Steinberg MS, McNutt PM. 1999. [Cadherins and their connections: adhesion junctions have broader functions](#). Curr Opin Cell Biol. 11(5):554-60.

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(5391):1145-7. Erratum in: Science 282(5395):1827.

Tsutsui H, Valamehr B, Hindoyan A, Qiao R, Ding X, Guo S, Witte ON, Liu X, Ho CM, Wu H. 2011. [An optimized small molecule inhibitor cocktail supports long-term maintenance of human embryonic stem cells.](#) Nat Commun. 2:167.

Van der Jeught M, O'Leary T, Ghimire S, Lierman S, Duggal G, Versieren K, Deforce D, Chuva de Sousa Lopes S, Heindryckx B, De Sutter P 2013. [The combination of inhibitors of FGF/MEK/Erk and GSK3 \$\beta\$ signaling increases the number of OCT3/4- and NANOG-positive cells in the human inner cell mass, but does not improve stem cell derivation.](#) Stem Cells Dev. 22(2):296-306.

Veiga A, Santaló J, Vidal F, Calderón G, Giménez C, Boada M, Egozcue J, Barri PN. 1994. [Twin pregnancy after preimplantation diagnosis for sex selection.](#) Hum Reprod. 9(11):2156-9.

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(4):986-93.

Wobus AM, Boheler KR. 2005. [Embryonic stem cells: prospects for developmental biology and cell therapy.](#) Physiol Rev. 85(2):635-78. Review.