

Efecte d'un antiserum antiendoderm sobre la compactació cel.lular dels cossos embrioids del teratocarcinoma

B. Torres., A. Torregrosa., M. Monzó., I. Serra., M. Amat., A. Cirera.,  
A. Barnadas., i D. Ruano-Gil.

Departament d'Anatomia Humana. Facultat de Medicina, Universitat de  
Barcelona. Diagonal s/n, 08028 Barcelona.

Abstract

Effect of an antiserum against yolk sac on the compactation of the teratocarcinoma derived embryoid bodies

We have obtained an antiserum against a purified population of embryoid bodies (EB) (anti-EBp antibody). This antiserum have been produced in New Zeland rabbit.

These antiserum react specifically with all EB types which are in the ascitic form of teratocarcinoma (TC).

On the contrary, the antiserum don't react with neither of the differentiated EB derived except with the extraembryony endoderm. In addition, it can see that antiserum reaction is negative on various types of differentiated tissues but, these reaction is positive on male germ cells.

When the EB are incubated with the anti-EBp antibody without complement the external layer of EB cells is opened. These external layer is of endodermal type. The anti-EBp antibody rect on proteins of a high molecular weight. Probably these kind of proteins are clossely related with the EB compactation.

Introducció

Els teratocarcinomes (TC) són tumors mixtes formats per dues poblacions cel.lulars diferents. Una d'elles està composta per derivats madurs i immadurs de les tres capes embrionàries. La segona població, anomenada carcinoma embrionari (CE), la compona un grup de cèl.lules homogènies en llur morfologia. Les cèl.lules de CE són indiferenciades, pluripotencials i representen a les *stem cells* del tumor. Això s'ha demostrat amb la injecció d'una única cèl.lula de CE i s'ha observat que, a l'igual que les cèl.lules embrionàries, poden donar lloc a la

formació d'un tumor multidiferenciat (Kleinsmith i Pierce, 1964; Pierce, 1975).

Els TC presenten una forma ascítica en l'interior de la qual s'hi troben unes estructures anomenades cossos embrioids (EB) degut a la seva semblança amb embrions primerencs (Pierce i Dixon, 1959; Stevens, 1959).

Els EB poden mantenir-se *in vivo* mitjançant passatges intraperitoneals succesius sense perdre llurs propietats tumorigèniques ja que poden desenvolupar tumors multidiferenciats a l'injectar-les subcutàniament (Stevens, 1960).

A partir dels TC s'han obtingut línies cel.lulars estables de CE pluri o nul.lipotents. Amb aquestes cèl.lules s'han obtingut diferents anticossos, tant mono específics com monoclonals, que s'utilitzen per a estudiar les primeres fases del desenvolupament embrionari (Stern, 1984).

S'han descrit varis antígens de CE múrid a partir d'anticossos monoclonals i mono específics (Jacob, 1977). Aquests antígens de diferenciació es troben també en les cèl.lules germinals masculines i en les cèl.lules pluripotents de l'embrió de ratolí (Artz et al., 1973; Webb, 1980).

Hem obtingut un anticòs en conills Nova Zelanda albins amb una població purificada d'EB (anticòs anti-EBp). Aquesta població presenta la característica d'estar formada exclusivament per cèl.lules endodèrmiques que envolten a una cavitat sense cèl.lules de CE en el seu interior (Serra, 1985).

Els estudis realitzats amb l'anticòs anti-EBp mostren la seva especificitat i l'activitat de les molècules que actuen com a immunogen.

## Material i mètodes

### 1. Obtenció i separació dels EB.

Els EB s'obtenen mitjançant el rentat amb sèrum fisiològic de la cavitat peritoneal d'animals adults de la soca de ratolins 129/Sv.

Amb gradients discontinus de Ficoll a les concentracions 6, 10, 20 i 35% (p/v) separem quatre poblacions d'EB que sedimenten en les diferents interfases. Les poblacions aïllades reben el nom de BC1, BC2, BS1, i BS2 i són respectivament semblants a embrions de ratolí de 3.5, 4 i 6 dies. La població BS2, isolada en l'última banda del gradient, presenta signes de mort cel·lular.

### 2. Electroforesi i electroblotting.

Realitzem electroforesis en gels d'acrilamida-SDS segons el mètode descrit per Laemmli (1970).

Les mostres són lisades mitjançant xoc osmòtic a 4°C en un tmpó de lisi que conté 200 ml d'NaCl 0.15 M/Tris 10 mM pH 8.0 més EDTA, Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub>, IAA, PMSF i NP-40.

Les mostres es deixen 1h en aquest tampó i passat aquest temps es centrifuguen en una centrífuga *microfuge* durant 3 min. En el sobrenedant s'hi troben les proteïnes problema i pot emmagatzemar-se a -70°C.

Fem gels d'acrilamida-SDS al 12% i 1.5 mm de gruix en els que mitjançant amperatge continu es separen les proteïnes segons el seu pes molecular.

Els gels amb les proteïnes ja separades es processen per a la tècnica de l'electroblotting descrita per Towbin et al. (1979).

Transferim les proteïnes a papers de nitrocel·lulosa i els incubem amb l'anticòs anti-EBp durant 1h. Posteriorment, utilitzem un segon

anticòs conjugat amb peroxidasa i revelem la seva activitat amb una solució de diaminobencidina.

### 3. Incubació dels EB amb l'anticòs anti-EB.

El producte del rentat de la cavitat peritoneal es centrifuga a 1000 r.p.m. durant 10 min obtenint-se així un *pellet* d'EB. Agafem 0.5µl de pes sec d'EB i l'incubem amb l'anticòs anti-EBp.

Hem fet una bateria de dilucions de l'anticòs des de la dilució 1/50 fins a la dilució 1/800 en Hanks BSS lliure de  $Ca^{++}$  i  $Mg^{++}$ . Agafem 800µl de cada una d'aquestes solucions i la barregem amb els 0.5µl d'EB en l'interior d'un *ependorf*. Els diferents *ependorfs* es deixen durant 2h a 37°C en atmosfera humida i  $CO_2$  al 5%. Passat aquest temps els EB són exàminats al microscopi invertit.

També hem realitzat la incubació amb sèrum no immunitzat i descomplementat a les mateixes dilucions utilitzant-se els resultats obtinguts com a control.

## Resultats

### 1. Electroforesi i electroblotting.

Els estudis de la configuració proteica dels EB i de diferents teixits adults juntament amb l'observació de la reactivitat d'aquestes proteïnes dabant de l'anticòs obtingut, posen de manifest l'existència de característiques comunes entre els teixits de tipus embrionari derivats del TC i determinats teixits adults.

Entre les proteïnes aïllades en les diferents poblacions d'EB trobem una reactivitat positiva de l'anticòs anti-EBp sobre 5 bandes presents en la zona corresponent a proteïnes de 90-100 Kd de pes (Fig. 1).

La reactivitat és negativa en tots els teixits adults excepte en el teixit testicular. El testicle presenta reactivitat en quatre bandes proteiques els pesos moleculars de les quals es correspon amb els de les proteïnes dels EB que reaccionen positivament amb l'anticòs.

Existeix una proteïna dels EB entre les bandes que presenten reactivitat en l'electroblotting que no es troba a nivell del testicle (Fig. 2). Aquesta banda, localitzada en la zona intermedia de les proteïnes positives a l'anticòs anti-EBp, individualitza el patró proteic dels EB i permet diferenciar-lo de l'únic teixit adult que presenta reactivitat positiva.

## 2. Incubació dels EB amb l'anticòs anti-EBp.

Els EB s'han incubat amb una bateria de dilucions de l'anticòs. Després de dues hores d'incubació, pot observar-se l'obertura de la coberta endodèrmica dels EB i la desorganització de les cèl.lules de CE presents en el seu interior (Fig. 3).

L'observació dels EB a partir de les 2h no mostra diferències en el seu grau de desorganització la qual cosa indica que l'efecte de l'anticòs anti-EBp no està potenciat per altres factors.

En els casos control no s'observa cap tipus d'alteració dels EB (Fig. 4).

Hem emprat les següents dilucions de l'anticòs: 1/50, 1/100 ..... 1/800 observant el major grau de disgregació a la dilució 1/200. A dilucions més baixes s'observa un menor percentatge d'EB alterats possiblement degut a la petita quantitat d'anticòs present en el medi. A dilucions més altes s'observa també la disminució del tant per cent d'EB descompactats possiblement per interaccions entre les diferents molècules d'anticòs que es troben en excés en el medi (Fig. 5)

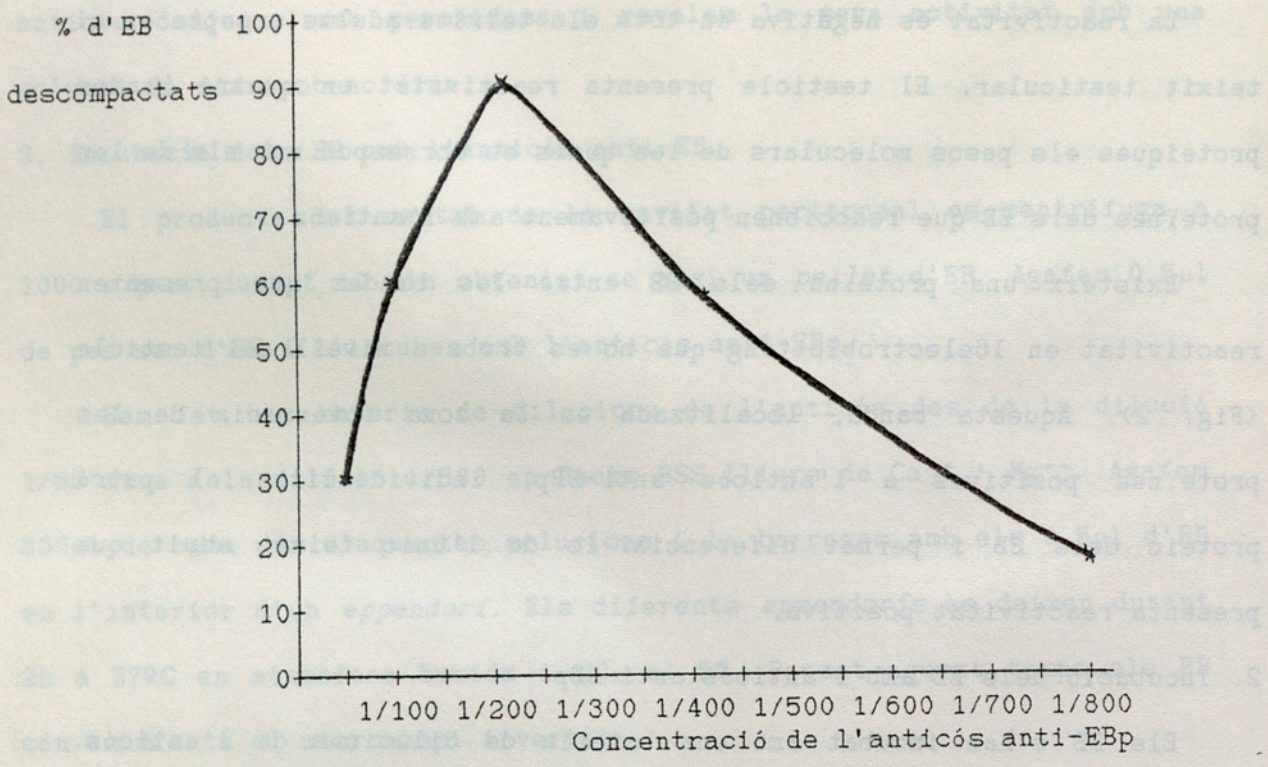


Fig. 5. Corba de descompactació dels EB al ser incubats amb l'anticòs anti-EBp en absència de complement.

Discussió

Són nombrosos els treballs que demostren les relacions antigèniques entre les cèl.lules de la massa cel.lular interna i les de CE (Artz et al., 1973). També s'ha observat que la configuració d'antigens de membrana d'una cèl.lula es correlaciona amb determinades potencialitats cel.lulars (Papaioannou i Rossant, 1983).

Aquest treball intenta estudiar la funció del tipus cel.lular que es troba en estreta relació amb les cèl.lules de CE, amb la finalitat de coneixer el paper que juga l'embolcall cel.lular tant dels EB com dels blastocists. Aquests últims es diferencien dels EB perquè estan envoltats per una coberta de tipus trofodèrmic.

S'ha obtingut un anticòs derivat del TC que mostra afinitat per l'endoderm embrionari, però no amb cap teixit adult (Lennox, 1985).

Per a l'obtenció de l'antisèrum anti-EBp s'han utilitzat les cèl.lules endodèrmiques que envolten als EB i hem observat que existeix reacció creuada amb determinades proteïnes presents en el testicle. Aquesta dada, aparentment contradictòria, troba la seva explicació en el fet de que les cèl.lules de CE a l'evolucionar cap a endoderm deuen passar varis estadis de diferenciació (Stern, 1984).

L'endoderm que envolta a l'EB es trobaria en un estadi de diferenciació menys avançat que el que es troba en els TC sòlids.

A l'observar l'electroblotting podem trobar que l'anticòs anti-EBp reacciona amb quatre bandes proteiques comunes per a les cèl.lules endodèrmiques i l'epiteli testicular. Aquesta dada és superposable al que succeeix en les relacions antigèniques entre les cèl.lules de CE (Hyafil et al., 1980) pel què es pot pensar que les cèl.lules endodèrmiques dels EB es trobarien en un estadi de diferenciació entre les cèl.lules de CE i les endodèrmiques, malgrat presentar un fenotipus típic d'endoderm visceral.

Hi ha una altra banda proteica, que és la més gran de totes, que sols es troba en els electroblottings realitzats sobre els EB no trobant-se entre les bandes positives del teixit testicular. Podem deduir que aquesta banda correspondria a una proteïna específica de l'endoderm.

L'observació de la desorganització de la morfologia dels EB a l'incubar-los amb l'anticòs obtingut a partir de la seva capa externa, indica que hi ha unes proteïnes en les cèl.lules endodèrmiques relacionades amb el manteniment de la forma dels EB.

La corba de dissociació cel.lular obtinguda amb diferents dilucions de l'anticòs indica que estrota d'una corba de precipitació en la que l'anticòs reacciona directament amb l'antigen sense necessitar de la presència d'altres substàncies.

Podem concloure aquest treball dient que l'endoderm que envolta als EB és al responsable de mantenir una estructura més o menys organitzada seguint els patrons evolutius de l'embriogènesi on es demostra que la compactació de les mòrules és necessària per al intercanvi d'informació que regula i coordina els distints processos de la diferenciació cel.lular que s'experimentaran posteriorment (Johnson et al, 1980).

#### Bibliografia

ARTZ, K., DUBOIS, P., BENETT, D., CONDAMINE, H., BABINET, C., i JACOB, F. (1973). Surface antigens common to mouse cleavage and primitive teratocarcinoma cells in culture. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 70, 2988-2992.

HYAFIL, F., MORELLO, D., BABINET, C., i JACOB, F. (1980). A cell surface glycoprotein involved in the compactation of embryonal carcinoma cells and cleavage stage embryos. Cell 21, 927-934.

JACOB, F. (1977). Mouse teratocarcinoma and embryonic antigens. Immunol. Rev. 33, 3-32.

JOHNSON, M.H., PRATT, H.P.M., i HANDYSIDE, A.H. (1980). The generation and recognition of positional information in the preimplantation mouse embryo. En: Cellular and molecular aspects of implantation. D.W. Bullock i S.E. Glasser (eds.). Plenum Press, New York. pp.:55-75

KLEINSMITH, L.J. i PIERCE, G.B. Jr. (1964). Multipotentiality of simple embryonal carcinoma cells. Cancer Res. 24, 1544-1552.

LAEMMLI, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227, 680-685.

LENNOX, E.S. (1985). What are tumor antigens? En: Immunity of cancer. A.E. Reif i M.S. Mitchell (eds). Academic Press, Inc. New York. pp.: 17-27.

PAPAIOANNOU, V.E., i ROSSANT, J. (1983). Effects of the embryonic environment on proliferation and differentiation of embryonal carcinoma cells. Cancer Surveys 2, 165-183.



PIERCE, B.G. (1975). Teratocarcinoma: Introduction and perspectives. En: Teratomas and differentiation. M.I. Sherman i D. Solter (eds.). Academic Press. New York. pp.: 3-12.

PIERCE, B.G. i DIXON, F.J. (1959). Testicular teratomas. I. Demonstration of teratogenesis by metamorphosis of multipotential cells. Cancer 12, 573-583.

SERRA, I. (1985) Relaciones antigénicas entre células de teratocarcinoma y células embrionarias de ratón. Tesi Doctoral. Barcelona

STERN, P.L. (1984). Differentiation antigens of teratomas and embryos. British Medical Bulletin 40, 218-223.

STEVENS, L.C. (1959). Embryology of testicular teratomas in strain 129 mice. J. Nat. Cancer Inst. 23, 1249-1255.

STEVENS, L.C. (1960). Embryonic potency of embryoid bodies derived from a transplantable testicular teratoma of the mouse. Dev. Biol. 2, 285-297.

TOWBIM, H., STAEHELIN, T., i GORDON, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrilamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. Proc. Nat Acad. Sci. USA 76, 4350-4354.

WEBB, C.G. (1980). Chareacterization of antisera against mouse teratocarcinoma OTT6050: Molecular species recognized on embryoid bodies, preimplantation mouse embryos and sperm. Dev. Biol. 70, 203-214.

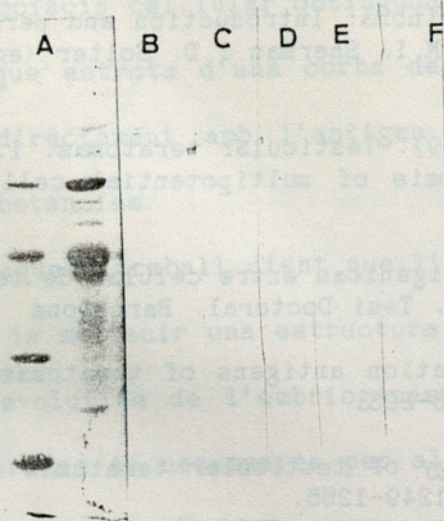


Fig. 1. Electroblotting de les quatre poblacions d'EB. A: proteïnes standard; B: població BC1; C: població BC2; D: població BS1; E: població BS2; F: Blancs.

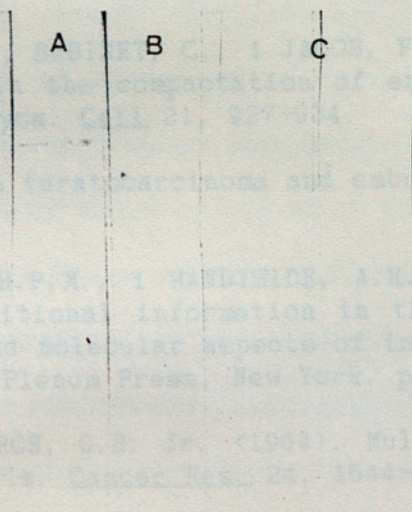


Fig. 2. Electroblotting de testicle i d'EB utilitzat com a control. A: Reactivitat sobre l'EB; B: reactivitat sobre al testicle; C: Blancs.

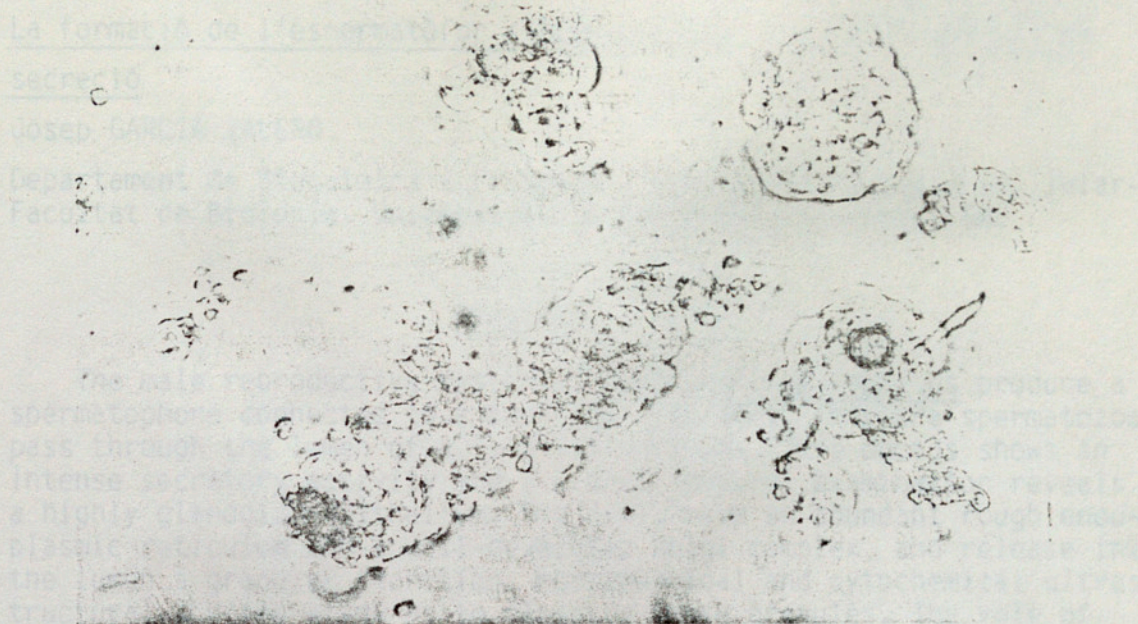


Fig. 3. EB incubats amb l'anticòs anti-EBp a la dilució 1/200. Poden veure's clarament els signes de descompactació d'aquestes estructures.

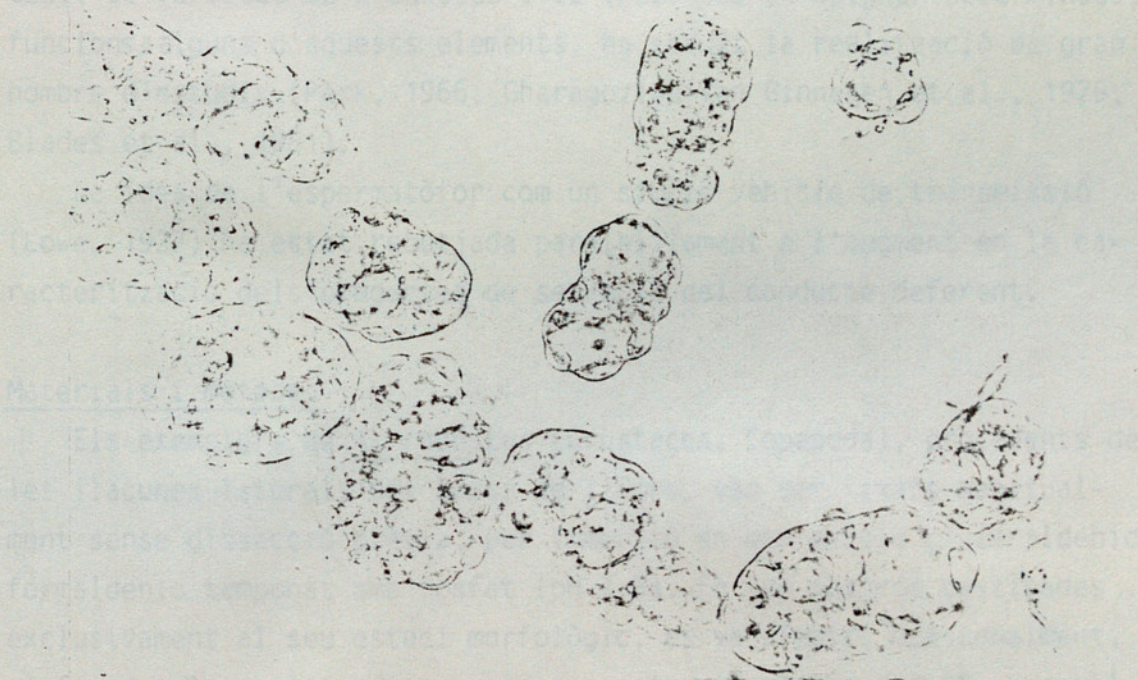


Fig. 4. EB control incubats amb sèrum preimmune i descomplementat a la dilució 1/200. L'estructura dels EB es manté intacta.