

ESTUDIO DE LA PLURIPOTENCIALIDAD DE LOS DIFERENTES BLASTÓMEROS DEL EMBRIÓN A 8 CÉLULAS

Sandra Alonso-Alonso¹, Josep Santaló¹, Elena Ibáñez^{1*}

¹Departament de Biologia Cel·lular, Fisiologia i Immunologia, Facultat de Biociències, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra, Spain

*Autor corresponent: elena.ibanez@uab.cat

Resumen

El cigoto de mamíferos es una célula totipotente que va perdiendo potencialidad a medida que avanza el desarrollo embrionario, dando lugar al epiblasto en el blastocisto tardío, el cual mantiene la pluripotencia necesaria para formar células de las tres láminas embrionarias. La pluripotencia de los distintos blastómeros del embrión en estadio de 8 células sigue estando en discusión, ya que existe poca bibliografía al respecto. En este estudio se analizó la pluripotencialidad de los distintos blastómeros aislados de embriones de ratón en estadio de 8 células mediante dos aproximaciones: su capacidad para formar agregados con células de la masa celular interna (OCT4 positivas) y del epiblasto (NANOG positivas) y su capacidad para generar líneas de células madre embrionarias (ESC). El número de agregados por embrión osciló entre 3 y 8, con una moda de 7. En cuanto al número de agregados con células positivas para OCT4 y NANOG, la moda fue de 7 y 6 agregados por embrión, respectivamente. Por otro lado, el número de líneas de ESC obtenidas por embrión varió entre 0 y 7, con una moda de 3. La capacidad de algunos de los embriones de generar 8 agregados y 7 líneas de ESC sugiere que todos los blastómeros podrían ser pluripotentes, o bien que si existe una predeterminación inicial en el destino celular de los blastómeros esta podría revertirse por su aislamiento y/o las condiciones de cultivo, debido a la plasticidad de los blastómeros en este estadio.

Abstract

The mammalian zygote is a totipotent cell that loses potentiality as embryonic development progresses, giving rise to the epiblast in the late blastocyst, which maintains the necessary pluripotency to form cells of the three embryonic layers. The pluripotency of the different blastomeres of the 8-cell embryo is still under discussion, since there is little literature on the matter. In this study, the pluripotentiality of the different blastomeres isolated from mouse embryos at the 8-cell stage was analyzed using two approaches: their ability to form aggregates with cells from the inner cell mass (OCT4 positive) and from the epiblast (NANOG positive) and their ability to generate embryonic stem cell (ESC) lines. The number of aggregates per embryo ranged between 3 and 8, with a mode of 7. Regarding the number of aggregates with positive cells for OCT4 and NANOG, the mode was 7 and 6 aggregates per embryo, respectively. On the other hand, the number of ESC lines obtained per embryo varied between 0 and 7, with a mode of 3. The ability of some of the embryos to generate 8 aggregates and 7 ESC lines suggests that all blastomeres could be pluripotent, or that if there is an initial predetermination in the cell fate of the blastomeres, this could be reversed by its isolation and/or the culture conditions, due to the plasticity of the blastomeres at this stage.

INTRODUCCIÓN

La totipotencia es la habilidad de una célula individual de producir un organismo adulto fértil en un entorno adecuado (Condic, 2014). El cigoto es la célula totipotente por excelencia, con una restricción progresiva en potencialidad a medida que avanza el desarrollo embrionario. El embrión sufre una primera segregación celular en el estadio de blastocisto, con la formación de la masa celular interna (ICM) y el

trofotodermo (TE) (Cockburn and Rossant, 2010), seguido por una segunda segregación en la que las células de la ICM se dividen en endodermo primitivo y epiblasto. De esta forma, las células del epiblasto en el blastocisto tardío son pluripotentes, capaces de generar células de las tres láminas embrionarias.

En mamíferos, está generalmente aceptado que los blastómeros tempranos en estadios previos a mórula son igualmente (toti)potentes hasta el estadio de 4 células (Torres-Padilla *et al.*, 2007; Maemura *et al.*, 2021). Sin embargo, diversos estudios en embriones a 2 y 4 células ponen en duda esta afirmación (Chazaud *et al.*, 2006; Boiani *et al.*, 2019). Por otro lado, otros estudios sugieren una cierta plasticidad del embrión, de forma que, si bien puede haber cierta predeterminación de los blastómeros hacia un destino celular concreto, su aislamiento puede dar lugar a cambios en su destino celular o eliminar la predeterminación existente (Chen *et al.*, 2010; Bruce, 2013). Analizando la bibliografía se encuentran varios estudios en embriones de 2 y 4 células (Morris *et al.*, 2012; Mihajlović *et al.*, 2015; Casser *et al.*, 2017), pero poca investigación con embriones en estadio de 8 células (Rossant, 1976; Tarkowski and Wroblewska, 1967), estadio de gran importancia para el desarrollo de células madre embrionarias a partir de blastómeros aislados (Bm-ESC).

Por todo esto, el objetivo de este trabajo fue analizar la potencialidad de los diferentes blastómeros de un embrión a 8 células, estudiando su capacidad de formar células de la masa celular interna, células del epiblasto y células madre embrionarias.

MATERIAL Y MÉTODOS

Animales y obtención y congelación de embriones. Todos los procedimientos con animales fueron aprobados por la Comisión de Ética en Experimentación Animal y Humana de la Universidad Autónoma de Barcelona y por el Departamento de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentación de la Generalitat de Cataluña. Los embriones se obtuvieron de ratones hembra de la cepa B6CBAF1/J, de 6-12 semanas de edad, previamente superovuladas mediante administración de 5 UI de gonadotropina sérica de yegua preñada (Foligon) y, 48 h más tarde, de 5 UI de gonadotropina coriónica humana (Divasa-Farmavic), seguida del cruce con machos de la misma cepa. Los embriones fueron extraídos en estadio de 2 células 48 h después, mediante perfusión de los oviductos con medio KSOM con tampón HEPES, criopreservados por congelación lenta (Costa-Borges *et al.*, 2009) y guardados en N₂ líquido a -196°C. Los embriones fueron más tarde descongelados (Costa-Borges *et al.*, 2009) y cultivados a 37°C y 5% CO₂ en microgotas de medio KSMOM Embryomax® (Merck) cubiertas con aceite mineral. Una vez llegados al estadio de 8 células, los embriones fueron biopsiados, excepto 7 embriones usados como control en los recuentos celulares que se cultivaron hasta blastocisto.

Aislamiento de blastómeros. Los blastómeros fueron aislados por biopsia embrionaria cuando los embriones alcanzaron el estadio de 8 células. Mediante micromanipulación, se realizó un agujero en la zona pelúcida con una solución ácida de Tyrode y se aspiraron individualmente todos los blastómeros de cada embrión. Los blastómeros aislados fueron luego utilizados para analizar la formación de agregados y realizar un recuento celular, o para la derivación de Bm-ESC.

Formación de agregados y recuento celular. Los blastómeros se transfirieron individualmente a microgotas de 50 µl de medio de derivación depositadas sobre cubreobjetos y cubiertas con aceite mineral, que contenían una monocapa de *feeders* de fibroblastos de prepucio humano (HFF-1; ATCC®SCRC-1041™), inactivados previamente con mitomicina C. El medio de derivación consistía en medio DMEM suplementado con 100 µl 2-β mercaptoetanol (Gibco), 1x aminoácidos no esenciales (Gibco), 50 U/ml de penicilina y 50 µg/ml de estreptomina (Gibco), 20% *knockout serum replacement* (KSR; Life Technologies) y 10³ U/ml factor inhibidor de la leucemia (LIF; Merck Millipore). Además, el medio fue suplementado con el cocktail R2i, una combinación del inhibidor de MEK PD0325901 (1 µM; Axon Medchem;) y del inhibidor de TGFβ SB431542 (10 µM; Sigma). A las 72 h, los agregados formados fueron fijados en 4% paraformaldehído (PFA) durante 20 min a temperatura ambiente, lavados tres veces con PBS, y bloqueados y permeabilizados con una solución de PBS con 0,2% de azida sódica (Sigma),

0,5% Triton X-100 (Sigma) y 3% de suero de cabra (BioWest) durante 30 min a 37°C. Después, se incubaron con anticuerpos primarios *overnight* a 4°C, se lavaron tres veces con PBS, y se incubaron con los anticuerpos secundarios durante 2 h a temperatura ambiente. Los anticuerpos primarios utilizados fueron un monoclonal anti-OCT4 de ratón (Santa Cruz Sc-5279, dilución 1:50) y un policlonal anti-NANOG de conejo (Abcam, ab80892, dilución 1:100), mientras que los anticuerpos secundarios fueron IgG anti-ratón Alexa Fluor 488 (Molecular Probes - Invitrogen A-21200, dilución 1:500) para OCT4 y IgG anti-conejo Alexa Fluor 594 (Molecular Probes - Invitrogen A-11037, dilución 1:500) para NANOG. Tanto los agregados como los blastocistos usados como control se montaron con 10 µg/ml Hoeschst 33258 diluido en VectaShield (Vector Laboratories) y se contabilizaron el número de células totales (tinción con Hoechst), de células de la ICM (positivas para OCT4) y de células del epiblasto (positivas para NANOG) en un microscopio de epifluorescencia (Olympus BX61) con el software CytoVision (Applied Imaging, Inc) e ImageJ.

Derivación de células madre embrionarias y caracterización de las líneas formadas. Algunos de los blastómeros aislados mediante biopsia embrionaria fueron cultivados como en la sección anterior, en medio de derivación con el cocktail R2i, que se suplementó con 0,1 mg/ml de hormona adrenocorticotropa (ACTH; Prospec) durante la primera semana de cultivo. Se realizaron cambios de medio cada 48 h hasta observar la formación de un *outgrowth* en día 7-10. Los *outgrowths* formados fueron cultivados en placas de 4 pocillos en medio de derivación sin ACTH, subcultivando las células con tripsina-EDTA (BioWest) una o dos veces por semana y manteniéndolas en cultivo durante 6 pases, momento en el que se realizaba la caracterización de las líneas. Esta caracterización consistía en analizar la pluripotencia de las líneas mediante la tinción de la fosfatasa alcalina (ALP) así como la inmunodetección de marcadores de pluripotencia y diferenciación. La tinción de ALP se realizó usando un kit comercial (Sigma AB0300), en células previamente fijadas durante 1 min con 4% PFA, con el cual la pluripotencia de la línea se determinaba por el color azul de las colonias. La inmunodetección se realizó en células cultivadas sobre cubreobjetos con una monocapa de HFF, para determinar su pluripotencia, y también en células sometidas a una diferenciación *in vitro* durante 10 días con medio DMEM suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS; BioWest). La fijación, bloqueo, permeabilización y montaje se realizó como se ha descrito en la sección anterior para los agregados. Para detectar marcadores de pluripotencia se utilizaron los anticuerpos primarios anti-OCT4 y anti-NANOG ya mencionados y, además, un policlonal anti-SOX2 de conejo (Merck Millipore, ab5603, dilución 1:200). Por otra parte, se utilizaron los anticuerpos primarios monoclonales anti-tubulina β3 de ratón (TUJ1; Biologend 801201, dilución 1:500), anti-actina □□ de músculo liso de ratón (αSMA; Sigma A5228, dilución 1:200) y anti-alfa-fetoproteína de ratón (AFP; R&D Systems MAB1368, dilución 1:50) para la detección de marcadores de diferenciación a ectodermo, mesodermo y endodermo, respectivamente. Se utilizaron los mismos anticuerpos secundarios ya mencionados: IgG anti-ratón Alexa Fluor 488 para OCT4, TUJ1, αSMA y AFP, y IgG anti-conejo Alexa Fluor 594 para SOX2 y NANOG.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Habilidad de los blastómeros aislados para producir agregados con células de la ICM y del epiblasto.

En un primer grupo de experimentos los blastómeros aislados se cultivaron de forma individual en medio de cultivo embrionario estándar durante 72 h. Ninguno de los blastómeros (n=80) sobrevivió y no se formó ningún blastocisto, resultado ya observado en algunos estudios previos (Rossant, 1976; Tarkowski and Wroblewska, 1967). Por ese motivo, en un segundo grupo de experimentos los blastómeros fueron cultivados en medio de derivación sobre una monocapa de *feeders* durante tres días hasta formar un agregado, un precursor del *outgrowth* que, debido a la mayor eficiencia de formación y a su aparición más temprana, podría ser un mejor marcador que este del potencial del blastómero. En estas nuevas condiciones, un 81,7% de los blastómeros (98/120) formaron agregados, que podían diferenciarse en dos tipos según su morfología: agregados con cavidad parecida a la de un blastocisto en un 30% de los casos (36/120) y agregados sin cavidad en el 51,7% restantes (62/120). El porcentaje de agregados con

Además, cuando se compara la ratio de células OCT4 positivas/células totales, células NANOG positivas/células totales y células OCT4 positivas/ células NANOG positivas se observa cómo no hay diferencias significativas entre el grupo control de blastocistos y el grupo de estudio con blastómeros aislados procedentes de embriones a 8 células, lo que sugiere que estos agregados son capaces de mantener en cierta forma la potencialidad del embrión precursor.

Habilidad de los blastómeros aislados para producir líneas de células madre embrionarias.

La derivación de Bm-ESC puede también utilizarse como herramienta para investigar el potencial de desarrollo de los blastómeros individuales. De los 1.008 blastómeros utilizados (126 embriones), obtuvimos 292 líneas de Bm-ESC confirmadas mediante criterios morfológicos, de pluripotencia (expresión de OCT4, NANOG, y SOX2, y tinción con ALP) y de diferenciación *in vitro* (expresión de TUJ1, SMA, AFP, marcadores de los tres linajes embrionarios). La eficiencia de derivación obtenida (29%) es menor que la que descrita para blastómeros procedentes de embriones a 2 y 4 células, debido en gran medida a la menor potencialidad de los blastómeros a medida que avanza el desarrollo embrionario (Boiani *et al.*, 2019; Maemura *et al.*, 2021).

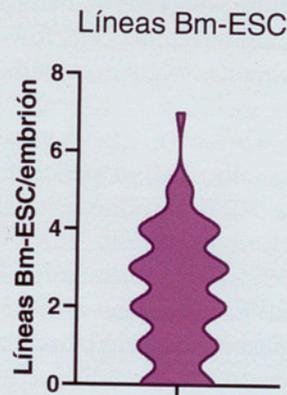


Figura 2. Número de líneas Bm-ESC obtenidas a partir de los distintos blastómeros de cada embrión de ratón en estadio de 8 células.

Analizando la capacidad de los blastómeros de un mismo embrión de producir líneas Bm-ESC, observamos una moda de 3 líneas por embrión (Figura 2). Este resultado sugiere que aproximadamente la mitad de los blastómeros pueden tener la capacidad de producir un agregado funcional que dé como resultado una línea de Bm-ESC, resultado ya observado por Hassani *et al.*, (2014), que obtuvieron entre 3 y 5 líneas por embrión, aunque en ese caso el número de blastómeros utilizado fue muy bajo. Es notable señalar que en nuestro trabajo dos de los embriones fueron capaces de generar 7 líneas Bm-ESC, sugiriendo que todos los blastómeros del embrión en el estadio de 8 células podrían ser pluripotentes y capaces de generar células madre embrionarias, siendo la no obtención de 8 líneas de un mismo embrión debida posiblemente limitaciones técnicas. Alternativamente, debido a la plasticidad del embrión (Chen *et al.*, 2010; Bruce, 2013), la predeterminación existente en el destino celular de los blastómeros podría ser revertida por la metodología y/o las condiciones de cultivo.

AGRADECIMIENTOS

Sandra Alonso Alonso es beneficiaria de una beca PIF-UAB.

Se agradece a María Jesús Asensio, Jonatan Lucas y Ot Massafret el soporte y ayuda en el laboratorio.

BIBLIOGRAFIA

- Boiani, M. *et al.*, 2019. Totipotency continuity from zygote to early blastomeres: A model under revision. *Reproduction* 158, R49–R65.
- Bruce, AW. 2013. Generating different genetic expression patterns in the early embryo: insights from the mouse model. *Reprod Biomed Online* 27, 586–592.
- Casser, E. *et al.*, 2017. Totipotency segregates between the sister blastomeres of two-cell stage mouse embryos. *Sci Rep* 7, 8299.
- Chazaud, C. *et al.*, 2006. Early Lineage Segregation between Epiblast and Primitive Endoderm in Mouse Blastocysts through the Grb2-MAPK Pathway. *Dev Cell* 10, 615–624.
- Chen, L. *et al.*, 2010. Molecular basis of the first cell fate determination in mouse embryogenesis. *Cell Res* 20, 982–993.
- Cockburn, K. and Rossant, J. 2010. Making the blastocyst: lessons from the mouse. *J Clin Invest* 120, 995–1003.
- Condic, ML. 2014. Totipotency: What it is and what it is not. *Stem Cells Dev* 23, 796–812.
- Costa-Borges, N. *et al.*, 2009. Collection and Cryopreservation of Hamster Oocytes and Mouse Embryos. *J Vis Exp* 25, 2–4.
- Hassani, S-N. *et al.*, 2014. Suppression of transforming growth factor β signaling promotes ground state pluripotency from single blastomeres. *Hum Reprod* 29, 1739–1748.
- Maemura, M. *et al.*, 2021. Totipotency of mouse zygotes extends to single blastomeres of embryos at the four-cell stage. *Sci Rep* 11, 11167.
- Mihajlović, AI., Thamodaran, V., Bruce, AW. 2015. The first two cell-fate decisions of preimplantation mouse embryo development are not functionally independent. *Sci Reportsts* 5, 15034.
- Morris, SA., Guo, Y., Zernicka-Goetz, M. 2012. Developmental Plasticity Is Bound by Pluripotency and the Fgf and Wnt Signaling Pathways. *Cell Rep* 2, 756–765.
- Rossant J. 1976. Investigation of inner cell mass determination by aggregation of isolated rat inner cell masses with mouse morulae. *J Embryol Exp Morphol* 36, 163-74.
- Torres-Padilla, ME. *et al.*, 2007. Histone arginine methylation regulates pluripotency in the early mouse embryo. *Nature* 445, 214–218.
- Tarkowski, AK. and Wróblewska, J. 1967. Development of blastomeres of mouse eggs isolated at the 4- and 8-cell stage. *J Embryol Exp Morphol.* 18, 155-80.