Biologia de la reproducció
Vol. 17, p. 19-25 (2022)

L'ESTAT DE PLURIPOTÈNCIA DE LES CÈL·LULES MARE EMBRIONÀRIES HUMANES DERIVADES A PARTIR DE BLASTÒMERS AÏLLATS

Ot Massafret[1], Montserrat Barragán[2], Rita Vassena[2], Elena Ibáñez[1], Josep Santaló[1]*

[1]Unitat de Biologia Cel·lular, Departament de Biologia Cel·lular, Fisiologia i Immunologia, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra (Espanya)
[2]Basic Research Laboratory, Eugin Group, Parc Científic de Barcelona, 08028 Barcelona (Espanya)
[3]Corporate, Eugin Group, 08006 Barcelona (Espanya)
*Autor corresponent: josep.santalo@uab.cat

Resum

Les cèl·lules mare embrionàries (ESC) humanes (hESC) derivades a partir de l'embrió en estadi de blastocist presenten un estat de pluripotència *primed*, en contraposició a les ESC de ratolí, que presenten pluripotència *naïve*. Les ESC *naïve* presenten un major potencial de diferenciació, entre altres característiques que les fan més adients per a possibles usos clínics. Les hESC també es poden obtenir a partir de blastòmers aïllats d'embrions a 8 cèl·lules, i el seu estat de pluripotència no ha estat estudiat a fons. En aquest treball s'han derivat hESC a partir de blastòmers aïllats (bm-hESC) i a partir de blastocists (bc-hESC), de les quals s'han analitzat diversos indicadors de l'estat de pluripotència i s'han comparat amb els d'una línia de hESC convertida a *naïve*. Els indicadors estudiats han estat: la capacitat de proliferació, la clonogenicitat, la localització de la proteïna TFE3, l'activitat mitocondrial, l'estat de metilació i hidroximetilació del genoma i l'expressió de gens marcadors *naïve* i *primed*. Els resultats indiquen que les bm-hESC no són idèntiques a les bc-hESC en relació al seu estat de pluripotència. Les bm-hESC estarien lleugerament més a prop de l'estat *naïve*, la qual cosa converteix la derivació de hESC a partir de blastòmers aïllats en una alternativa interessant a la derivació tradicional a partir de blastocists.

Abstract

Human embryonic stem cells (hESC) derived from the embryo at the blastocyst stage present a primed state of pluripotency, in contrast to mouse ESC, which show naïve pluripotency. Naïve ESCs present a broader differentiation potential, among other characteristics that make them more suitable for potential clinical uses. hESC can also be obtained from single blastomeres from 8-cell embryos, and their pluripotency state has not been deeply studied. In this work, hESC have been derived from single blastomeres (bm-hESC) and from whole blastocysts (bc-hESC), and several pluripotency state indicators have been analysed in these lines and compared with those of a naïve converted hESC line. The indicators studied were: proliferative capacity, clonogenicity, TFE3 protein localization, mitochondrial activity, genome methylation and hydroxymethylation status and expression of naïve and primed marker genes. Results indicate that bm-hESC and bc-hESC are not identical regarding their pluripotency state. Specifically, bm-hESC would be slightly closer to the naïve state, which turns hESC derivation from single blastomeres into an interesting alternative to traditional derivation from blastocysts.

INTRODUCCIÓ

Les cèl·lules mare embrionàries (ESC) poden presentar almenys dos tipus diferents de pluripotència; *naïve* i *primed*. L'estat de pluripotència *naïve* es considera l'equivalent *in vitro* de l'epiblast preimplantacional, mentre que l'estat *primed* correspon a l'epiblast postimplantacional (Nichols and Smith, 2009; Nakamura et al., 2016). Les ESC *naïve* presenten diversos avantatges respecte les *primed* que les fan més adients per a potencials usos clínics, incloent-hi un major potencial de diferenciació a diversos tipus cel·lulars, una proliferació més ràpida i una major supervivència a la dissociació enzimàtica (Weinberger et al., 2016; Kumari et al., 2016). Malgrat que les ESC de ratolí presenten pluripotència

naïve, la derivació convencional d'ESC a partir de la massa cel·lular interna (ICM) d'embrions humans en estadi de blastocist dona lloc a cèl·lules *primed*.

La derivació d'ESC humanes (hESC) a partir de blastocists comporta inevitablement la destrucció de l'embrió. Com a alternativa, s'ha descrit la derivació de hESC a partir de blastòmers aïllats d'embrions en estadi de 8 cèl·lules (Klimanskaya et al., 2006; Chung et al., 2007; Ilic et al., 2009; Taei et al., 2013). Aquest procediment es basa en l'aïllament d'un o més blastòmers de l'embrió mitjançant una biòpsia, de forma similar a la tècnica usada en el test genètic preimplantacional. L'estat de pluripotència d'aquestes línies de hESC derivades a partir de blastòmers aïllats no ha estat estudiat en profunditat. S'ha descrit que els blastòmers de l'embrió a estadi de 8 cèl·lules presenten diferencies transcripcionals i epigenètiques respecte les cèl·lules de la ICM (Yan et al., 2013). Així, degut al seu estadi de desenvolupament més primerenc, la derivació a partir de blastòmers aïllats podria donar lloc a hESC que presentessin característiques més pròpies de la pluripotència *naïve*.

L'objectiu del present treball ha estat derivar noves línies de hESC a partir de blastòmers aïllats i analitzar diversos indicadors per a determinar-ne l'estat de pluripotència.

MATERIAL I MÈTODES

Mostres biològiques. Per aquest treball es van utilitzar un total de 264 embrions humans donats, sota consentiment informat i prèvia autorització del Departament de Salut de la Generalitat de Catalunya (projecte #02/2017), per parelles que van passar per tractaments de reproducció assistida de diferents centres de reproducció de Catalunya.

Cultiu embrionari i derivació i cultiu de hESC. Els embrions, un cop descongelats, es van cultivar en gotes de medi Global Total (LifeGlobal) a 37ºC, 5%CO_2 fins l'estadi desitjat. L'inhibidor de *Glycogen Synthase Kinase 3β* (GSK3β) CHIR99021 (CH; Axon) i l'inhibidor de *Rho-associated protein Kinase* (ROCK) Y-27632 (Y; Stemcell Technologies) es van afegir al medi quan s'indiqui.
Per a la derivació de hESC a partir de blastòmer aïllats, es van obtenir individualment els blastòmers d'embrions a 8 cèl·lules mitjançant biòpsia amb un micromanipulador (Olympus/Eppendorf). Per a la derivació de hESC a partir de blastocists, aquests es van incubar en solució acídica de Tyrode per a eliminar-ne la zona pel·lúcida. Tant els blastòmers com els blastocists sense zona pel·lúcida van ser sembrats sobre una monocapa de fibroblasts prepucials humans inactivats (iHFFs). Com a medi de derivació es va utilitzar KO-DMEM (Gibco) suplementat amb 20% *Knockout Serum Replacement*, 2 mM L-glutamina (BioWest), 1x MEM-aminoàcids no essencials (Gibco), 50 mM 2-mercaptoetanol (Gibco), 1x ITS-X (Gibco), 10000 U/mL Penicil·lina - 10 mg/mL Estreptomicina (Gibco) i 4 ng/mL de *Fibroblast Growth Factor* basic humà (bFGF; Gibco). Quan s'indica, es va afegir al medi 1 mM de l'inhibidor CH i 1 mM de l'Y. Per a la conversió a *naïve*, es va cultivar una línia de hESC procedent del Banc de Línies Cel·lulars de Barcelona en el mateix medi de derivació suplementat amb 0,1 mM butirat sòdic i 50 nM SAHA durant dos passatges. Seguidament, aquests es van substituir per 3 mM de l'inhibidor de les *Mitogen-Activated Protein Kinases* (MAPK) PD0325901 i 1mM de CH, a més de 10 ng/mL de bFGF (medi 2iF; Ware et al., 2014).
Es van definir 3 grups experimentals per a la derivació de hESC a partir de blastòmers i blastocists. En el grup CHY es van cultivar els embrions des de l'estadi de 4 cèl·lules en presència de CH i Y. Aquests inhibidors es van mantenir durant els primers 6 dies (Y) o 12 dies (CH) després de la sembra. En el grup NT, els inhibidors van ser afegits en el moment de la sembra, i en el grup NT-NT no es van afegir els inhibidors en cap moment. Totes les anàlisis que es descriuen a continuació es van realitzar amb 4 línies derivades de blastòmers (bm-hESC), 6 línies derivades de blastocists (bc-hESC) i 1 línia hESC *naive* a passatge 5 de cultiu. Les qPCRs es van realitzar també a passatge 15.

Assaig de clonogenicitat. Les colònies de hESC es van dissociar enzimàticament amb Tripsina-EDTA 1x (BioWest) fins a obtenir-ne cèl·lules aïllades, de les quals se'n van sembrar 5000 per triplicat. Al cap

de 5-6 dies (3 per les hESC *naïve*) es va comptar el nombre de colònies de hESC. La clonogenicitat es va expressar com el nombre de colònies obtingudes respecte el nombre de cèl·lules sembrades.

Càlcul del temps de duplicació cel·lular. Es van sembrar les hESC en dos pous diferents d'una placa de 4 pous i se'n va fer un recompte cel·lular als 4-5 dies de cultiu (t1) i 42-60 hores després (durant la fase exponencial de creixement; t2) en els altres dos. El temps de duplicació (DT) es va calcular segons la fórmula següent:

DT = temps x log(2) / log(nombre de cèl·lules en t2/nombre de cèl·lules en t1)

Localització intracel·lular de TFE3. Es van fixar les cèl·lules amb 4% paraformaldehid i es va realitzar una immunofluorescència incubant amb un anticòs primari de conill anti-TFE3 (Sigma) durant tota la nit a 4ºC i posteriorment amb un anticòs secundari anti-conill Alexa Fluor 594 (Molecular Probes) 2 h a temperatura ambient. Seguidament es van tenyir els nuclis amb Hoechst 33258. Es van prendre imatges amb un microscopi d'epifluorescència (Olympus BX61) i la quantificació de fluorescència es va realitzar amb el software ImageJ seleccionant el nucli i la regió circumdant.

Anàlisi de l'activitat mitocondrial. Es va dur a terme una tinció amb tetrametil-rodamina etil èster (TMRE) utilitzant el TMRE *Mitochondrial Membrane Potential Assay Kit* (Abcam). Breument, es van afegir 100 nM TMRE al medi de cultiu de les hESC i es van incubar a 37ºC i 5%CO_2 durant 20 min. A continuació es van obtenir imatges amb un microscopi invertit de fluorescència (Olympus) i la quantificació de fluorescència es va realitzar amb el software ImageJ, seleccionant les colònies de hESC.

qPCR. Es va extreure l'RNA de les cèl·lules amb el *Maxwell RSC SimplyRNA Tissue Kit* (Promega). Posteriorment, l'RNA es va retrotranscriure a cDNA utilitzant l'*iScript cDNA Synthesis Kit* (Bio-Rad). Les reaccions de qPCR es van dur a terme per triplicat amb una *SYBR green Supermix* (Bio-Rad) en un termociclador CFX96 (Bio-Rad). El programa de la reacció va constar d'un pas de desnaturalització de 3 min a 95ºC seguit de 40 cicles d'amplificació de 5 s a 95ºC i 30 s a 60ºC. La corba de fusió es va obtenir mitjançant un increment de 0,5ºC cada 5 s des de 65ºC fins a 95ºC. Per a la normalització dels valors d'expressió gènica es van utilitzar els gens *GAPDH*, *RPL13A* i *RPLP0*.

Quantificació de 5-metilcitosina(5mC) i 5-hidroximetilcitosina (5hmC). Es va obtenir el DNA de les hESC mitjançant el *Gentra Puregene Cell Kit* (Qiagen). Per a la quantificació de 5mC i 5hmC es van utilitzar el *Fluorometric Methylated DNA Quantification Kit* (Abcam) i el *Fluorometric Hydroxymethylated DNA Quantification Kit* (Abcam), respectivament, seguint les instruccions del fabricant. La intensitat de fluorescència es va mesurar en un lector de plaques Spark (Tecan) a 530 nm d'excitació i 590 nm d'emissió.

Anàlisi estadística. Els ràtios de TFE3 en cada grup es van comparar mitjançant un test de Kruskal-Wallis seguit per un test post-hoc de Dunn. Els valors de clonogenicitat, temps de duplicació, intensitat de TMRE per colònia i percentatges de 5mc i 5hmC de cada grup es van comparar mitjançant una ANOVA d'una via seguida per un test post-hoc de Tukey HSD. En els experiments de qPCR, els valors d'expressió relativa de cada gen es van comparar entre grups mitjançant un test t o bé una ANOVA d'una via seguida per un test post-hoc de Tukey HSD. Tots els tests es van realitzar amb el software GraphPad Prism 7, excepte pels experiments de qPCR, que es va utilitzar el software CFX Maestro (Bio-Rad). En tots els casos, les diferències amb un p-valor inferior a 0,05 es van considerar estadísticament significatives.

RESULTATS

Derivació de hESC a partir de blastòmers i blastocists.

En la derivació de hESC a partir de blastòmers aïllats, es van obtenir 3 línies de bm-hESC en el grup CHY (1,5%), 1 en el grup NT (0,6%) i cap en el grup NT-NT. La taxa de formació d'*outgrowths* va ser

significativament superior en el grup CHY respecte els altres dos grups (Taula 1). En quant a la derivació de hESC a partir de blastocists, es van obtenir 5 línies de bc-hESC en el grup CHY (22,7%), 4 en el grup NT (15,4%) i 2 en el grup NT-NT (8%). No es van observar diferències significatives entre aquests grups (Taula 2). En ambdós casos, previ a l'establiment de les línies de hESC, es va observar la formació del *post-inner cell mass intermediate* (PICMI) descrit per O'Leary i col·laboradors (2012), a partir del 3r-4t dia de cultiu en blastocists i a partir del 6è-7è dia en blastòmers.

Taula 1. Resultats de la derivació de hESC a partir de blastòmers aïllats. Diferents superíndex indiquen diferències estadísticament significatives entre grups.

	Blastòmers sembrats (n)	Divisió cel·lular	*Outgrowths*	PICMIs	Línies de hESC
Grup CHY	198	133 (67,2%)	47 (23,7%) [a]	4 (2,0%)	3 (1,5%)
Grup NT	176	114 (64,8%)	23 (13,1%) [b]	1 (0,6%)	1 (0,6%)
Grup NT-NT	134	78 (58,2%)	2 (1,5%) [c]	0	0

Taula 2. Resultats de la derivació de hESC a partir de blastocists sencers.

	Blastocists sembrats (n)	*Outgrowths*	PICMIs	Línies de hESC
Grup CHY	22	21 (95,5%)	5 (22,7%)	5 (22,7%)
Grup NT	26	26 (100%)	4 (15,4%)	4 (15,4%)
Grup NT-NT	25	23 (92%)	6 (24%)	2 (8%)

Anàlisi d'indicadors de pluripotència *naïve*.

Les bm-hESC van mostrar una clonogenicitat significativament superior a la de les bc-hESC, però inferior a la de les hESC *naïve* (Figura 1a). En canvi, no es van observar diferències significatives entre les bm-hESC i les bc-hESC en el temps de duplicació, mentre que en les hESC *naïve* va ser significativament inferior (Figura 1b).

Les bm-hESC i les bc-hESC van presentar una localització de TFE3 preferentment citoplasmàtica, mentre que les hESC *naïve* van mostrar un marcatge gairebé exclusivament nuclear (Figura 2a). A més, les hESC *naïve* van mostrar una intensitat de marcatge amb TMRE significativament superior al de les bm-hESC i les bc-hESC, que no van presentar diferències significatives entre elles (Figura 2b). Això indicava un major potencial de membrana mitocondrial en les hESC *naïve* respecte les bm-hESC i les bc-hESC. En quant als nivells de metilació i hidroximetilació, les bm-hESC i les bc-hESC no van presentar diferències en el percentatge de 5mC i 5hmC del genoma, mentre que en les hESC *naïve* els nivells de 5mC van ser significativament inferiors. El percentatge de 5hmC també va ser inferior en les hESC *naïve*, però en aquest cas les diferències no van ser estadísticament significatives (Figura 2c,d).

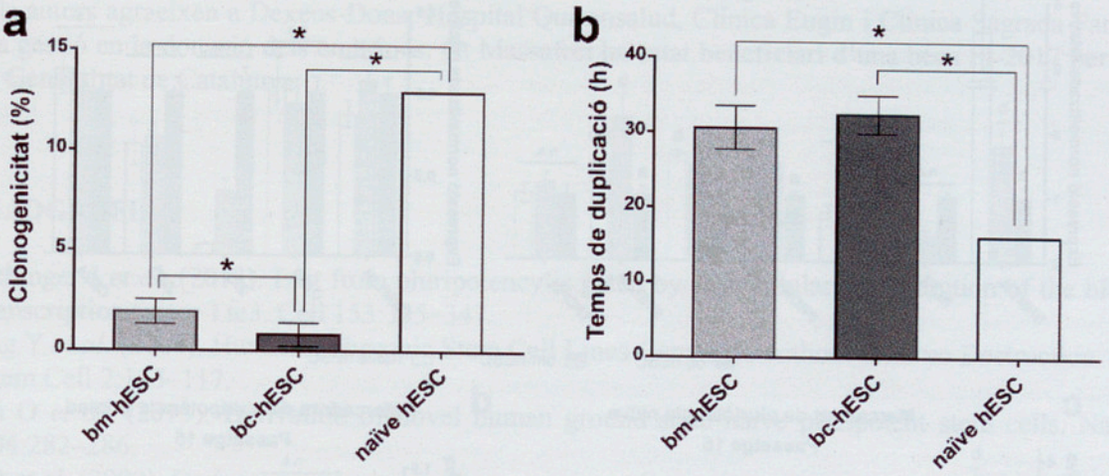

Figura 1. a) Clonogenicitat de les hESC. b) Temps de duplicació de les hESC. Mitjana±SD. *p<0,05.

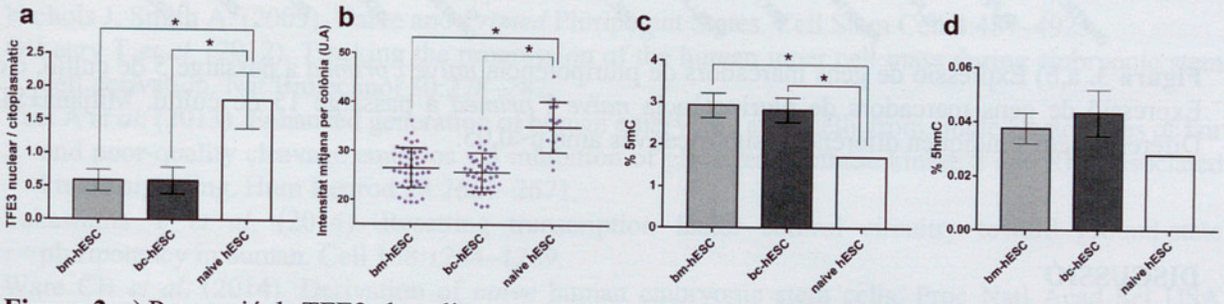

Figura 2. a) Proporció de TFE3 al nucli respecte del citoplasma cel·lular. b) Intensitat mitjana de marcatge de TMRE per colònia. c) Percentatge de 5mC del genoma. d) Percentatge de 5hmC del genoma. Mitjana ±SD. *p<0,05.

Expressió de gens marcadors de pluripotencia *naïve* i *primed*.

A passatge 5 de cultiu, l'expressió del marcador de pluripotència *naïve DNMT3L* va ser significativament superior en les bm-hESC respecte les bc-hESC, però significativament inferior a les hESC *naïve*. L'expressió dels marcadors *naïve PRDM14*, *REX1* i *STELLA* va ser també significativament superior en les bm-hESC, i equivalent a la de les hESC *naïve* (Figura 3a). No es van observar diferències estadísticament significatives entre grups en la resta de marcadors *naïve* i *primed* a passatge 5 (Figura 3b). A passatge 15, només l'expressió de *DNMT3L* va romandre significativament més alta en les bm-hESC respecte les bc-hESC (Figura 3c), i tampoc es van observar diferències significatives en l'expressió els marcadors de pluripotència *primed* (Figura 3d).

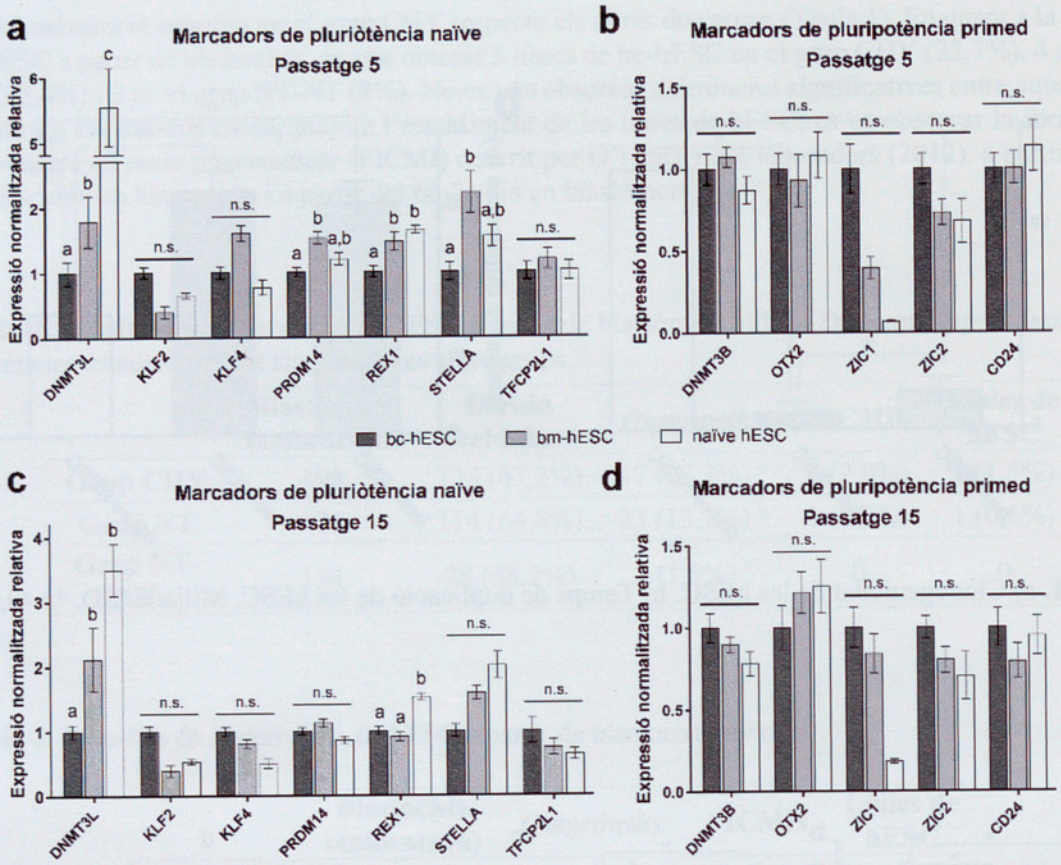

Figura 3. a,b) Expressió de gens marcadors de pluripotència *naïve* i *primed* a passatge 5 de cultiu. c,d) Expressió de gens marcadors de pluripotència *naïve* i *primed* a passatge 15 de cultiu. Mitjana±SD. Diferents lletres indiquen diferències significatives amb p<0,05.

DISCUSSIÓ

Els resultats de derivació a partir de blastòmers aïllats obtinguts en aquest treball confirmen que l'ús dels inhibidors CHIR i Y són beneficiosos pel procés de derivació, en concordança amb allò descrit per Taei i col·laboradors (Taei et al., 2013). El nostre treball també descriu per primera vegada la formació de PICMI durant la derivació de hESC a partir de blastòmers aïllats, ja que fins ara només s'havia descrit en blastocists (O'Leary et al., 2012). Això indica que les colònies de cèl·lules provinents de blastòmers aïllats i dels blastocists experimenten canvis morfològics similars durant el procés de derivació de hESC.

D'altra banda, els nostres resultats mostren que les bm-hESC presenten un temps de duplicació alt, una localització citoplasmàtica de TFE3, una baixa activitat mitocondrial i alts nivells de metilació del DNA, característiques pròpies de la pluripotència *primed* (Betschinger et al., 2013; Gafni et al., 2013; Leitch et al., 2013; Zhou et al., 2012). Malgrat això, el fet que presentin una clonogenicitat significativament superior i una major expressió d'alguns gens marcadors de pluripotència *naïve* respecte les bc-hESC en passatges primerencs de cultiu, suggereix que ambdues no són idèntiques en quant al seu estat de pluripotència, trobant-se les bm-hESC en un estat lleugerament més proper al *naïve*. Això implica que les bm-hESC podrien ser unes línies cel·lulars més interessants com a punt de partida per a possibles aplicacions clíniques.

AGRAÏMENTS

Els autors agraeixen a Dexeus-Dona, Hospital Quironsalud, Clínica Eugin i Clínica Sagrada Família per la gestió en la donació dels embrions. Ot Massafret ha estat beneficiari d'una beca FI-2017 per part de la Generalitat de Catalunya.

BIBLIOGRAFIA

Betschinger J *et al.* (2013). Exit from pluripotency is gated by intracellular redistribution of the bHLH transcription factor Tfe3. Cell 153:335–347.

Chung Y *et al.* (2008). Human Embryonic Stem Cell Lines Generated without Embryo Destruction. Cell Stem Cell 2:113–117.

Gafni O *et al.* (2013). Derivation of novel human ground state naive pluripotent stem cells. Nature 504:282–286.

Ilic D *et al.* (2009). Derivation of human embryonic stem cell lines from biopsied blastomeres on human feeders with minimal exposure to xenomaterials. Stem Cells Dev 18:1343–1349.

Klimanskaya I *et al.* (2006). Human embryonic stem cell lines derived from single blastomeres. Nature 444:481–485.

Kumari D (2016). States of Pluripotency: *Naïve* and *Primed* Pluripotent Stem Cells. Pluripotent Stem Cells - From the Bench to the Clinic; InTech.

Leitch HG *et al.* (2013). Naive pluripotency is associated with global DNA hypomethylation. Nat Struct Mol Biol 20:311–316.

Nichols J, Smith A. (2009). Naive and *Primed* Pluripotent States. Cell Stem Cell 4:487–492.

O'Leary T *et al.* (2012). Tracking the progression of the human inner cell mass during embryonic stem cell derivation. Nat Biotechnol 30:278–282.

Taei A *et al.* (2013). Enhanced generation of human embryonic stem cells from single blastomeres of fair and poor-quality cleavage embryos via inhibition of glycogen synthase kinase β and Rho-associated kinase signaling. Hum Reprod 28:2661–2671.

Takashima Y *et al.* (2014). Resetting transcription factor control circuitry toward ground-state pluripotency in human. Cell 158:1254–1269.

Ware CB *et al.* (2014). Derivation of *naïve* human embryonic stem cells. Proc Natl Acad Sci USA 111:4484–4489.

Weinberger L *et al.* (2016). Dynamic stem cell states: Naive to *primed* pluripotency in rodents and humans. Nat Rev Mol Cell Bio 17:155–169.

Yan L *et al.* (2013). Single-cell RNA-Seq profiling of human preimplantation embryos and embryonic stem cells. Nat Struct Mol Biol 20:1131-1139.