

ANÀLISI DEL DESTÍ DELS DESCENDENTS DELS BLASTÒMERS EN ESTADI DE 4 CÈL·LULES EN EL BLASTOCIST I INFLUÈNCIA EN LA DERIVACIÓ DE CÈL·LULES MARE EMBRIONÀRIES DE RATOLÍ

Sheyla González, Elena Ibáñez, Josep Santaló*

Departament de Biologia Cel·lular, Fisiologia i Immunologia. Unitat de Biologia Cel·lular. Facultat de Biociències. Universitat Autònoma de Barcelona.

08193 Bellaterra. *Sheyla.Gonzalez@uab.cat, Elena.Ibanez@uab.cat, Josep.Santalo@uab.cat*

Resum

Durant anys es va pensar que les primeres decisions pel que fa a la localització dels blastòmers en la massa cel·lular interna o el trofotoderma del blastocist es prenen en estadi de 8 cèl·lules tardà amb la separació de les cèl·lules internes i externes. Darrerament, molts estudis han observat que els blastòmers individuals en estadi de 4 cèl·lules poden presentar diferències en el seu potencial de desenvolupament en funció de la posició que ocupen dins de l'embrió. En aquest article, hem volgut dilucidar si aquestes decisions primerenques pel que fa a la localització dels blastòmers en les regions del blastocist influeixen la producció de línies de cèl·lules mare embrionàries de ratolí, de manera que un aïllament selectiu dels blastòmers en estadi de 4 cèl·lules per tal de derivar les línies podria incrementar l'eficiència del procés de derivació. Els resultats obtinguts a partir del seguiment dels blastòmers al llarg del desenvolupament donen suport a la idea de que els blastòmers dins de l'embrió en estadi de 4 cèl·lules tenen un potencial diferent. No obstant això, una vegada aïllats, els blastòmers mostren una gran plasticitat en el patró de desenvolupament, de manera que tots són igualment competents per tal de derivar les línies de cèl·lules mare embrionàries.

Paraules clau: Potencial de desenvolupament; cèl·lules mare embrionàries; blastòmers aïllats.

Abstract

During years, it was thought that first decisions about blastomere allocation in the inner cell mass or the trophoctoderm of the blastocyst were made in the late 8-cell stage with the formation of inner and outer cells. Lately, many studies have pointed out that individual blastomeres at the 4-cell stage differ in their developmental properties according to their position within the embryo. In this report, we wanted to elucidate whether these early decisions influence the production of mouse embryonic stem cell lines, so that a selective isolation of blastomeres at the 4-cell stage to derive the lines could improve the efficiency of the derivation process. Results from blastomere tracking experiments support the idea of a different developmental potential of blastomeres within the 4-cell stage embryo. However, we also show a high plasticity in the developmental pattern of blastomeres once isolated from the embryo, thus making all 4-cell stage blastomeres equally competent to derive ESC lines.

Keywords: Developmental potential; embryonic stem cells; isolated blastomeres.

INTRODUCCIÓ

La separació de les cèl·lules internes i externes a l'estadi de 8 cèl·lules està guiada per l'establiment d'una polaritat entre els blastòmers al llarg de l'eix apical basal i la generació de divisions simètriques i asimètriques que, juntament amb l'establiment de les unions adherents i estretes, distribueixen diferencialment proteïnes implicades en l'establiment del domini apical en les cèl·lules externes. Posteriorment, l'expressió de factors de transcripció específics, com OCT4 i SOX2 de la ICM i CDX2 del TE, dirigiran definitivament la segregació dels llinatges i mantindran la identitat d'aquestes cèl·lules

una vegada assolit l'estadi de blastocist (Yamanaka *et al.*, 2006; Zernicka-Goetz *et al.*, 2009).

Durant anys, es va considerar que aquesta era la primera evidència de diferenciació morfològica de l'embrió i que tots els blastòmers d'estadis embrionaris primerencs eren idèntics i, per tant, tenien un mateix potencial de desenvolupament fins que no se separen les cèl·lules internes i externes (Gurdon, 1992; Motosugi *et al.*, 2005). No obstant això, altres autors proposaren que podien existir diferències en el potencial de desenvolupament dels blastòmers d'estadis primerencs com a conseqüència de factors presents tant en l'òocit com en l'embrió (Edwards i Beard, 1997; Zernicka-Goetz *et al.*, 2009).

Recentment, s'ha vist que els plans de divisió embrionaris poden ser bons predictors de la futura localització dels descendents dels blastòmers d'estadis embrionaris primerencs en les regions del blastocist. Concretament, Piotrowska i col·laboradors (2005) van descriure que en embrions en estadi de 2 cèl·lules que experimenten una divisió equatorial i l'altra meridional (embrions EM o ME), només quan la primera divisió es produeix en sentit meridional (embrions ME), els descendents d'aquests blastòmers es localitzaran preferentment en la ICM del blastocist. Per contra, no van observar una tendència tant clara en els descendents del segon blastòmer en sentit equatorial, malgrat que la majoria dels seus descendents es localitzaven en el TE. Existeixen evidències moleculars que han donat suport a aquesta teoria (Torres-Padilla *et al.*, 2007; Jedrusik *et al.*, 2008; Plachta *et al.*, 2011).

L'objectiu del present estudi és determinar si les diferències pel que fa al potencial dels blastòmers en estadi de 4 cèl·lules, en funció de l'ordre i l'orientació dels plans de divisió en estadi de 2 cèl·lules, es tradueixen al procés de derivació de línies d'ESCs de ratolí (mESCs).

MATERIAL I MÈTODES

La utilització d'animals en aquest treball s'ha realitzat d'acord amb els procediments aprovats per la Comissió d'Ètica en l'Experimentació Animal i Humana de la UAB i compta amb l'aprovació del DARP de la Generalitat de Catalunya amb el número de procediment 652.

Obtenció d'embrions de ratolí i aïllament dels blastòmers

Els embrions de ratolí van ser obtinguts de femelles de la soca 129/Sv sotmeses a un tractament de superovulació i encreuades amb mascles C57Bl/6 (Brook i Gardner, 1997). El sacrifici dels animals es realitzà per dislocació cervical i la perfusió dels oviductes amb medi KSOM-H per obtenir-ne els embrions que posteriorment es van cultivar en medi EmbryoMax® fins assolir els estadis de 3 i 4 cèl·lules.

Els blastòmers aïllats es van obtenir per biòpsia embrionària per tal de formar els grups de 1-2/3 i 1-2/4 procedents de l'aïllament d'1 i 2 blastòmers en estadi de 3 i 4 cèl·lules, respectivament (Figura 1).

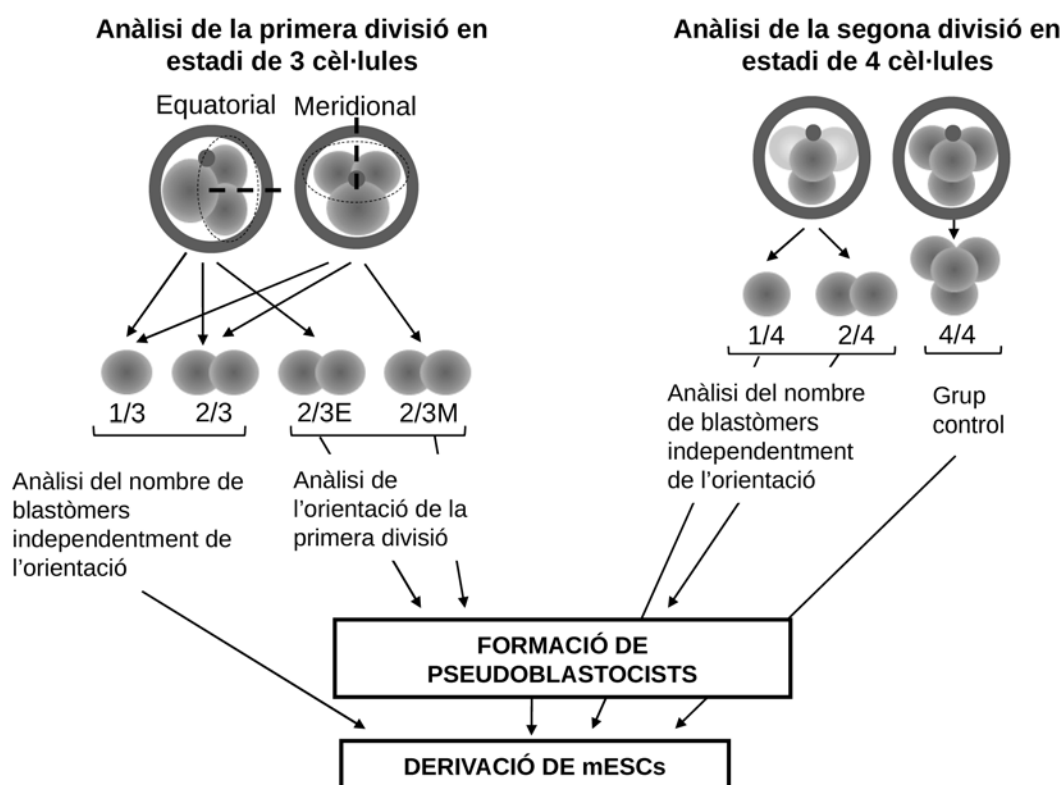


figura 1. Representació esquemàtica dels grups de blastòmers aïllats utilitzats en els experiments de formació de pseudoblastocists i de derivació de línies de mESCs.

Derivació i caracterització de línies de mESCs

La derivació de les ESCs es va dur a terme utilitzant el mètode proposat per Wakayama i col·laboradors (2007).

Les línies establertes de mESCs es van caracteritzar a través de l'expressió de marcadors de pluripotència (OCT4, SOX2 i NANOG) i de diferenciació primerenca de les tres làmines embrionàries (Nestina d'ectoderma, alfa-fetoproteïna o AFP d'endoderma i l'actina de musculatura llisa o α -SMA de mesoderma) per immunofluorescència (Gonzalez *et al.*, 2010).

Seguiment dels blastòmers al llarg del desenvolupament embrionari

El blastòmer no dividit en estadi de 3 cèl·lules va ser tenyit amb el colorant lipofílic DiI, seguint el protocol descrit per Piotrowska i col·laboradors (2001), per tal de determinar si el primer blastòmer que es divideix en estadi de 2 cèl·lules presenta una localització preferencial en les regions del blastocist en funció de l'orientació del pla de divisió. Els embrions tenyits es van cultivar fins a l'estadi de blastocist per tal d'analitzar la distribució del marcatge. Embrions en estadi de 2 cèl·lules sense tenyir es van utilitzar com a controls. Posteriorment, els blastocists analitzats es van fixar i van ser processats per immunofluorescència per a la detecció del marcador CDX2 del TE (Gonzalez *et al.*, 2010) per tal de determinar si la mitjana de cèl·lules de la ICM i del TE era semblant a la del grup control sense tenyir.

Anàlisi dels pseudoblastocists

Dos blastòmers procedents d'una divisió en sentit equatorial d'embrions en estadi de 3 cèl·lules (2/3E) i en

sentit meridional (2/3M) i dos blastòmers en estadi de 4 cèl·lules procedents de la segona divisió en estadi de 2 cèl·lules es van cultivar fins que van assolir l'estadi de pseudoblastocist al cap de 72 h. En aquest punt, es van processar per immunofluorescència per a la detecció dels marcadors OCT4 de la ICM i CDX2 del TE (Gonzalez *et al.*, 2010) per tal d'analitzar la proporció d'aquestes cèl·lules entre els diferents grups (Figura 1).

Anàlisi estadística

Les dades es van analitzar estadísticament mitjançant el test de la X^2 o el test exacte de Fisher. Els valors amb $P < 0.05$ van ser considerats estadísticament significatius.

RESULTATS

Seguiment dels blastòmers al llarg del desenvolupament embrionari

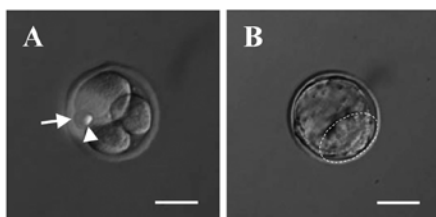
Després de la tinció amb el colorant lipofílic, només el 51.4% dels embrions van sobreviure al cap de 24-48 h en cultiu. D'aquests blastocists, el 82.1% van mostrar una mitjana de cèl·lules de la ICM i del TE similar a la dels grups control i, per tant, el 17.9% van mostrar una reducció en la capacitat de divisió dels blastòmers una vegada tenyits amb el colorant. En els blastocists que presentaven una mitjana de cèl·lules similar a la del grup control, vàrem observar que un 50% dels descendents dels blastòmers 2/3E es localitzaven preferentment al TE del blastocist mentre que pels blastòmers 2/3M no s'observava una tendència clara malgrat que un percentatge major d'aquests (37.5%) es localitzaven a la ICM (Taula 1; Figura 2 Panell A).

Taula 1. Distribució del colorant lipofílic DiI i proporció de cèl·lules de la ICM i el TE en els blastocists.

Grups d'embrions	n	% embrions tenyits vius (n)	n blastocists analitzats	% destí ICM (n)	% destí TE (n)	% destí ICM i TE (n)	Mitjana ICM (\pm SEM)	Mitjana TE (\pm SEM)	Mitjana total (\pm SEM)
2 cèl·lules (control)	10	-	10	-	-	-	13 (\pm 0.68)	42.7 (\pm 1.81)	55.7 (\pm 2.27)
3 cèl·lules tenyit (equatorial)	109	51.4 (56)	22	11.6 (3) ^a	50.0 (11) ^b	36.4 (8) ^{ab}	13.7 (\pm 0.71)	35.8 (\pm 2.61)	49.54 (\pm 2.35)
3 cèl·lules tenyit (meridional)			24	37.5 (9) ^a	16.7 (4) ^a	45.8 (11) ^a	12.9 (\pm 0.68)	36.3 (\pm 1.92)	49.29 (\pm 1.92)

^{a,b} Valors amb un superíndex diferent dins la mateixa filera difereixen significativament ($p < 0.005$). Per a la comparació de mitjanes, els valors dins de la mateixa columna no difereixen significativament.

Panell A



Panell B

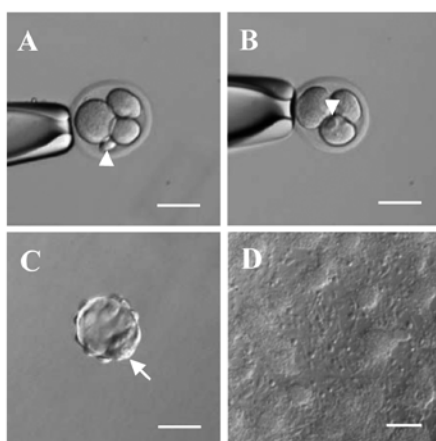


figura 2. Panell A. Experiments de seguiment de blastòmers amb el colorant lipofílic DiI. A. Tinció del segon blastòmer que es divideix en estadi de 2 cèl·lules. B. Distribució del colorant DiI en l'estadi de blastocist. La fletxa indica la posició del corpuscle polar. El cap de fletxa indica la gota d'oli que roman a l'espai perivitellí després de la tinció amb el colorant. El cercle puntejat indica la posició de la ICM. Barra d'escala: 50 μ m. Panell B. A. Embrió en estadi de 3 cèl·lules procedent d'una primera divisió en estadi de 2 cèl·lules en sentit equatorial. B. Embrió en estadi de 3 cèl·lules procedent d'una primera divisió en estadi de 2 cèl·lules en sentit meridional. C. Pseudoblastocist format a partir de blastòmers aïllats del grups de 2/3E, 2/3M o 2/4. Barra d'escala: 50 μ m. D. Línies de mESCs establertes. Barra d'escala: 100 μ m.

Derivació de línies de mESCs

Tots els grups de blastòmers aïllats es van desenvolupar en un pseudoblastocist en 3-4 dies i les línies de mESCs es van establir a partir de tots els grups (Figura 2 Panell B) amb una eficiència del 8.3-54% (Taula 2). En l'anàlisi de la influència de l'ordre dels plans de divisió, no es van observar diferències significatives en l'eficiència de derivació a partir del primer (grups de 1/3 i 2/3) o del segon blastòmer (grups de 1/4 i 2/4) que es dividia en estadi de 2 cèl·lules, independentment de si aïllàvem 1 o 2 blastòmers. En l'anàlisi de l'orientació del pla de

Taula 2. Eficiència de derivació de les línies de mESCs.

Grup de derivació	n	% Colònies tipus ESC (n)	% Línies mESCs establertes (n)
1/3	38	71.0 (27) ^a	10.5 (4) ^{ab}
1/4	36	69.3 (23) ^a	8.3 (3) ^{ab}
2/3 (E + M)	104	86.5 (90) ^b	18.3 (19) ^{bc}
2/3E	34	88.6 (31) ^b	17.6 (6) ^{bc}
2/3M	41	90.2 (37) ^b	14.6 (6) ^{ab}
2/4	112	92.0 (103) ^b	20.5 (23) ^{bc}
4/4	76	92.1 (70) ^b	54.0 (24) ^c

^{a,b,c} Valors amb un superíndex diferent dins la mateixa columna difereixen significativament ($p < 0.005$).

divisió del primer blastòmer (2/3E i 2/3M) tampoc es van veure diferències significatives en l'eficiència de derivació de mESCs.

Diferenciació de línies de mESCs

La diferenciació *in vitro* es va portar a terme per tal de determinar si les línies presentaven el mateix potencial de diferenciació en funció de l'origen dels blastòmers emprats en la derivació. En aquest sentit, totes les línies de mESCs diferenciades *in vitro* van expressar els marcadors primerencs de les tres làmines embrionàries, per tant, totes les línies presenten la mateixa capacitat de diferenciació en estadis inicials.

Anàlisi de la proporció de cèl·lules de la ICM i el TE en els pseudoblastocists

Tots els grups de blastòmers, 2/3E, 2/3M i 2/4, van produir pseudoblastocists que contenien tant cèl·lules de la ICM com del TE (Figura 2C Panell B) i que presentaven una mitjana d'aquests tipus de cèl·lules similar entre ells (Taula 3).

Taula 3. Mitjana de cèl·lules de la ICM i el TE en els pseudoblastocists.

Grup blastòmers	n	Mitjana ICM (\pm SEM)	Mitjana TE (\pm SEM)	Mitjana total (\pm SEM)
2/3E	37	4.9 (\pm 0.36)	14.6 (\pm 1.41)	19.5 (\pm 1.59)
2/3M	41	4.7 (\pm 0.34)	17.7 (\pm 1.13)	22.4 (\pm 1.31)
2/4	64	5.2 (\pm 0.34)	17.4 (\pm 1.13)	22.3 (\pm 1.29)

Valors dins de la mateixa columna no difereixen significativament ($p < 0.005$).

DISCUSSIÓ

La derivació d'ESCs a partir de blastòmers aïllats pretén incrementar l'eficiència de derivació, ja que es considera que els blastòmers aïllats d'estadis previs a la compactació tenen un major potencial de desenvolupament (Delhaise *et al.*, 1996; Chung *et al.*, 2006 i 2008; Klimanskaya *et al.*, 2006; Wakayama *et al.*, 2007; Geens *et al.*, 2009). Paral·lelament, s'ha vist que l'ordre i l'orientació dels plans de divisió en estadi de 2 cèl·lules poden ser bons predictors de la futura localització dels descendents d'aquests blastòmers en les regions del blastocist (Piotrowska *et al.*, 2005). Per tant, mitjançant un aïllament selectiu dels blastòmers en estadi de 4 cèl·lules es podria incrementar l'eficiència de derivació de les línies, sempre que el potencial dels blastòmers una vegada aïllats sigui el mateix que el que presenten dins de l'embrió. En els experiments de seguiment dels blastòmers hem observat que els descendents dels blastòmers de 2/3E tendeixen a localitzar-se en el TE. Per contra, i a diferència dels resultats observats per Piotrowska i col·laboradors (2005), els blastòmers de 2/3M no van mostrar una tendència tan clara.

A partir dels experiments tant de derivació de mESCs com de l'anàlisi de la mitjana de cèl·lules de la ICM i del TE en els pseudoblastocists, hem observat resultats similars independentment de l'ordre i l'orientació dels plans de divisió dels blastòmers d'origen. Sembla que els blastòmers, una vegada aïllats, mostren una major plasticitat i, per tant, un major potencial de desenvolupament que el que s'observa dins de l'embrió, tal com s'havia proposat anteriorment (Edwards i Beard, 1997). Així, la posició i els contactes dins de l'embrió tindrien importància en l'establiment del destí d'aquest blastòmer, mentre que els factors de transcripció i les marques epigenètiques, que també se sap que són importants en la determinació del potencial dels blastòmers (Torres-Padilla *et al.*, 2007; Jedrusik *et al.*, 2008), no tindrien una especial rellevància una vegada aquests s'aïllen de l'embrió.

BIBLIOGRAFIA

- Brook, F.A.; Gardner, R.L. (1997). «The origin and efficient derivation of embryonic stem cells in the mouse». *Proc. natl. Acad. Sci.*, vol. 94, núm. 11, p. 5709-5712.
- Chung, Y. [et al.] (2006). «Embryonic and extraembryonic stem cell lines derived from single mouse blastomeres». *nature*, vol. 439, núm. 70-73, p. 216-219.
- Chung, Y. [et al.] (2008). «Human embryonic stem cell lines generated without embryo destruction». *Cell Stem Cell*, vol. 2, núm. 2, p. 113-117.
- Delhaise, F. [et al.] (1996). «Establishment of an embryonic stem cell line from 8-cell stage mouse embryos». *Eur. J. Morphol.*, vol. 34, núm. 4, p. 237-243.
- Edwards, R.G.; Beard, H.K. (1997). «Oocyte polarity and cell determination in early mammalian embryos». *Mol. Hum. Reprod.*, vol. 3, núm. 10, p. 863-905.
- Geens, M. [et al.] (2009). «Human embryonic stem cell lines derived from single blastomeres of two 4-cell stage embryos». *Hum. Reprod.*, vol. 24, núm. 11, p. 2709-2717.
- Gonzalez, S.; Ibañez, E.; Santalo, J. (2010). «Establishment of mouse embryonic stem cells from isolated blastomeres and whole embryos using three derivation methods». *J. Assist. Reprod. Genet.*, vol. 27, núm. 12, p. 671-682.
- Gurdon, J.B. (1992). «The generation of diversity and pattern in animal development». *Cell*, vol. 68, núm. 2, p. 185-199.
- Jedrusik, A. [et al.] (2008). «Role of Cdx2 and cell polarity in cell allocation and specification of trophectoderm and inner cell mass in the mouse embryo». *Genes Dev.*, vol. 22, núm. 19, p. 2692-2706.
- Klimanskaya, I. [et al.] (2006). «Human embryonic stem cell lines derived from single blastomeres». *nature*, vol. 444, núm. 7118, p. 481-485.
- Motosugi, N. [et al.] (2005). «Polarity of the mouse embryo is established at blastocyst and is not prepatterened». *Genes Dev.*, vol. 19, núm. 9, p. 1081-1092.
- Piotrowska, K. [et al.] (2001). «Blastomeres arising from the first cleavage division have distinguishable fates in normal mouse development». *Development*, vol. 128, núm. 19, p. 3739-3748.
- Piotrowska, K.; Zernicka-Goetz, M. (2005). «Spatial arrangement of individual 4-cell stage blastomeres and the order in which they are generated correlate with blastocyst pattern in the mouse embryo». *Mech. Dev.*, vol. 122, núm. 4, p. 487-500.
- Piotrowska-Nitsche, K. [et al.] (2005). «Four-cell stage mouse blastomeres have different developmental properties». *Development*, vol. 132, núm. 3, p. 479-490.
- Plachta, N. [et al.] (2011). «Oct4 kinetics predict cell lineage patterning in the early mammalian embryo». *Nat. Cell. Biol.*, vol. 13, núm. 2, p. 117-123.
- Torres-Padilla, M.E. [et al.] (2007). «Histone arginine methylation regulates pluripotency in the early mouse embryo». *nature*, vol. 445, núm. 7124, p. 214-218.
- Wakayama, S. [et al.] (2007). «Efficient establishment of mouse embryonic stem cell lines from single blastomeres and polar bodies». *Stem Cells*, vol. 25, núm. 4, p. 986-993.
- Yamanaka, Y. [et al.] (2006). «Cell and molecular regulation of the mouse blastocyst». *Dev. Dyn.*, vol. 235, núm. 9, p. 2301-2314.
- Zernicka-Goetz, M. [et al.] (2009). «Making a firm decision: multifaceted regulation of cell fate in the early mouse embryo». *nat. Genet.*, vol. 10, núm. 7, p. 467-477.