

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús establertes per la següent llicència Creative Commons:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=ca>

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=es>

WARNING. The access to the contents of this doctoral thesis it is limited to the acceptance of the use conditions set by the following Creative Commons license:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=en>

Análisis del potencial de los blastómeros del embrión de ratón a 8 células para generar células madre embrionarias

Sandra Alonso Alonso

Memoria presentada para optar al Grado de Doctora en Biología Celular en la
Universidad Autónoma de Barcelona.

Tesis doctoral inscrita en el Departament de Biologia Cel·lular, Fisiologia i
Immunologia, Facultat de Biociències, Universitat Autònoma de Barcelona.

Directores:

Dra. Elena Ibáñez de Sans

Dr. Josep Santaló Pedro

Bellaterra, 2022

La **Dra. Elena Ibáñez de Sans**, profesora agregada del Departament de Biologia Cel·lular, Fisiologia i Immunologia de la Universitat Autònoma de Barcelona,

y el **Dr. Josep Santaló Pedro**, catedrático del Departament de Biologia Cel·lular, Fisiologia i Immunologia de la Universitat Autònoma de Barcelona,

CERTIFICAN

Que **Sandra Alonso Alonso** ha realizado bajo su dirección el trabajo de investigación que se expone en la memoria titulada “Análisis del potencial de los blastómeros del embrión de ratón a 8 células para generar células madre embrionarias” para optar al Grado de Doctora por la Universitat Autònoma de Barcelona.

Que este trabajo se ha llevado a cabo en la Unitat de Biologia Cel·lular del Departament de Biologia Cel·lular, Fisiologia i Immunologia de la Universitat Autònoma de Barcelona.

Y para que así conste, firmamos el presente certificado.

Bellaterra, 18 de diciembre de 2022.

Dra. Elena Ibáñez de Sans

Dr. Josep Santaló Pedro

Sandra Alonso Alonso

Durante la realización de esta tesis doctoral, Sandra Alonso Alonso ha sido beneficiaria de una beca predoctoral de Personal Investigador en Formación (PIF) concedida por la Universitat Autònoma de Barcelona.

ÍNDICE

ABREVIATURAS	1
RESUMEN	3
ABSTRACT	5
INTRODUCCIÓN	7
1. CÉLULAS MADRE	9
1.1. TIPOS Y CARACTERÍSTICAS	9
1.1.1. Células totipotentes	9
1.1.2. Células pluripotentes	10
1.1.3. Células multipotentes y unipotentes	14
1.2. APLICACIONES	15
2. CÉLULAS MADRE EMBRIONARIAS DE RATÓN	18
2.1. ESTADOS DE PLURIPOTENCIA	18
2.1.1. Pluripotencia naïve	19
2.1.2. Pluripotencia primed	20
2.1.3. Estados intermedios de pluripotencia	20
2.2. MANTENIMIENTO DE LA PLURIPOTENCIA NAÏVE	22
2.2.1. Circuito transcripcional	22
2.2.2. Vías de señalización	25
2.3. SISTEMAS DE DERIVACIÓN Y CULTIVO	31
2.3.1. Fondo genético de los embriones	31
2.3.2. Estado de desarrollo de los embriones	31
2.3.3. Superficie de cultivo	34
2.3.4. Medio de cultivo y suplementos	35
3. DETERMINACIÓN DEL DESTINO CELULAR EN EL EMBRIÓN PREIMPLANTACIONAL Y POTENCIALIDAD DE LOS BLASTÓMEROS	40
3.1. DESARROLLO EMBRIONARIO PREIMPLANTACIONAL Y SEGREGACIÓN CELULAR	40
3.2. HETEROGENEIDAD DE LOS BLASTÓMEROS EN ESTADIOS TEMPRANOS DEL DESARROLLO	45

OBJETIVOS	51
RESULTADOS	55
Estudio nº 1	
Efficient generation of embryonic stem cells from single blastomeres of cryopreserved mouse embryos in the presence of signaling modulators.	57
Estudio nº2	
Blastomeres of 8-cell mouse embryos differ in their ability to generate embryonic stem cells and produce lines with different transcriptional signatures.	85
DISCUSIÓN	127
1. Análisis de parámetros metodológicos en el proceso de derivación de Bm-mESCs	130
2. Análisis de parámetros biológicos en el proceso de derivación de Bm-mESCs	133
3. Propiedades de las líneas Bm-mESCs generadas del mismo embrión	135
CONCLUSIONES	139
BIBLIOGRAFIA	143

ABREVIATURAS

	Castellano	Inglés
2CLCs		<i>2c-like cells</i>
2i	Combinación de inhibidores formada por CHIR99021 y PD0325901	<i>Combination of inhibitors composed by CHIR99021 and PD0325901</i>
ACTH	Hormona adrenocorticotropa	<i>Adrenocorticotropic hormone</i>
AFP	Alfa-fetoproteína	<i>Anti-alpha-fetoprotein</i>
AKT	Proteína quinasa B	<i>Protein kinase B</i>
ALP	Actividad de Fosfatasa Alcalina	<i>Alkaline Phosphatase Activity</i>
AMOT	Angiomotina	<i>Angiomotin</i>
Bc-ESC	Células madre embrionarias obtenidas a partir de blastocisto	
Bm-ESC	Células madre embrionarias obtenidas a partir de blastómero	<i>Bone Morphogenic Protein 4</i>
BMP4	Proteína morfogenética ósea 4	<i>Bone Morphogenic Protein 4</i>
BSA	Albúmina de suero bovino	<i>Bovine Serum Albumin</i>
DMEM		<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
Dpc	Días post coito	<i>Days post coitum</i>
EGCs	Células embrionarias germinales	<i>Embryonic germ cells</i>
EPI	Epiblasto	<i>Epiblast</i>
EpiLCs	Células madre parecidas a epiblasto	<i>Epiblast-like stem cells</i>
EpiSC	Células madre epiblasticas	<i>Epiblast stem cells</i>
EPSCs	Células madre con potencial expandido	<i>Expanded potential stem cells</i>
ESCs	Células madre embrionarias	<i>Embryonic stem cells</i>
FBS	Suero fetal bovino	<i>Fetal Bovine Serum</i>
FGF	Factor de crecimiento de fibroblastos	<i>Fibroblast growth factor</i>
fPSCs	Células madre pluripotentes formativas	<i>Formative pluripotent stem cells</i>
FS cells	Células madre formativas	<i>Formative Stem cells</i>
GSCs	Células madre de línea germinal	<i>Germline stem cells</i>
GSK3	Glucógeno sintasa quinasa 3	<i>Glycogen synthase kinase 3</i>
hESC	Células madre embrionarias humanas	<i>Human embryonic stem cells</i>

HFF	Fibroblastos de prepucio humano	<i>Human foreskin fibroblasts</i>
ICM	Masa celular interna	<i>Inner cell mass</i>
iPSCs	Células madre pluripotentes inducidas	<i>Induced pluripotent stem cells</i>
JAK	Quinasa Janus	<i>Janus kinase</i>
KLF		<i>Krüppel-like factor</i>
KSR	Substitutivo del suero <i>KnockOut</i>	<i>KnockOut Serum Replacement</i>
LIF	Factor inhibidor de la leucemia	<i>Leukemia inhibitory factor</i>
LIFR	Receptor de LIF	<i>LIF receptor</i>
MAPK	Proteínas quinasa activadas por mitógenos	<i>Mitogen-activated protein kinases</i>
MEFs	Fibroblastos embrionarios de ratón	<i>Mouse embryonic fibroblasts</i>
MERV	Retrovirus endógenos murinos	<i>Murine endogenous retroviruses</i>
mESC	Células madre embrionarias de ratón	<i>Mouse embryonic stem cells</i>
NT-ESCs	Células madre embrionarias obtenidas por transferencia nuclear	<i>Nuclear transfer embryonic stem cells</i>
PCA		<i>Principal Component Analysis</i>
PE	Endodermo primitivo	<i>Primitive endoderm</i>
PFA	Paraformaldehído	<i>Paraformaldehyde</i>
PGCs	Células germinales primordiales	<i>Primordial germ cells</i>
R2i	Combinación de inhibidores Royan formada por SB431542 y PD0325901	<i>Combination of Royan inhibitors composed by SB431542 and PD0325901</i>
RSCs		<i>Rosette-like stem cells</i>
RT	Temperatura ambiente	<i>Room Temperature</i>
SCs	Células madre	<i>Stem cells</i>
SMA	Actina de músculo liso	<i>Smooth muscle actin</i>
SSCs	Células madre espermatoogónicas	<i>Spermatogonial stem cells</i>
TBLCs		<i>Totipotent blastomere-like cells</i>
TE	Trofectordermo	<i>Trophectoderm</i>
TGF- β	Factor de crecimiento transformante beta	<i>Transforming growth factor beta</i>
TLSCs		<i>Totipotent-like stem cells</i>
TSC	Células madre trofoblásticas	<i>Trophoblast stem cells</i>
WGCNA		<i>Weighted correlation network analysis</i>

RESUMEN

Las células madre embrionarias de ratón (mESCs) suelen derivarse de embriones en estadio de blastocisto, pero alternativamente pueden obtenerse a partir de blastómeros aislados del embrión a 8 células. Sin embargo, la eficiencia de derivación a partir de blastómeros (25-50%) es menor que a partir de blastocitos (85%), lo cual puede deberse a una limitación técnica o a una limitación biológica inherente presente en alguno/s de los blastómeros. Esto último hace referencia a una posible predisposición de algunos blastómeros hacia un destino celular no pluripotente que impida generar mESCs a partir de ellos. Por ello, el principal objetivo de esta tesis es determinar la capacidad de los blastómeros del embrión a 8 células para generar líneas mESCs y analizar si dichas líneas comparten propiedades semejantes.

En un primer trabajo, se buscó optimizar las condiciones técnicas del proceso de derivación, con el objetivo de aumentar la probabilidad de obtener 8 líneas mESC de un mismo embrión. Para ello, se estudió el efecto de moduladores de las vías de señalización de Wnt, MAPK y TGF β implicados en pluripotencia (cocteles 2i y R2i), suplementos como la hormona adrenocorticotropa (ACTH), el uso de embriones criopreservados o el precltivo de los embriones con 2i o R2i, sobre las tasas de derivación de mESC a partir de los blastómeros, así como sobre la integridad del cariotipo y la expresión de marcadores de pluripotencia de las líneas generadas. Los resultados mostraron que la congelación embrionaria no afecta a ninguno de estos parámetros. Por otro lado, el uso de R2i junto con ACTH y embriones criopreservados generó las mayores tasas de derivación a partir de blastómeros aislados (39%) de entre todos los tratamientos aplicados. Además, el uso de R2i dio lugar a una mayor integridad cromosómica de las líneas mESC generadas frente a 2i. Finalmente, el cultivo de los embriones con R2i aumentó el número de células del epiblasto en los blastocistos, aunque esto no se tradujo en un incremento en las tasas de derivación cuando los blastómeros aislados de los embriones tratados se utilizaron para generar mESC.

En un segundo estudio se analizó la capacidad de los blastómeros hermanos del embrión a 8 células para generar células del epiblasto y líneas mESCs. Se observó que la mitad o menos de los blastómeros hermanos presentaban un mayor potencial para generar líneas mESCs. Sin embargo,

la obtención de más de 4 líneas a partir de varios de los embriones usados demostró que los blastómeros con menor potencial también podían generar líneas mESCs. Esto puede deberse al uso del cocktail R2i durante el proceso de derivación, que podría redirigir el destino celular no pluripotente de los blastómeros con menor potencial hacia un destino pluripotente. Por lo tanto, parece que las características biológicas de cada blastómero, así como su plasticidad tras el aislamiento y las condiciones de cultivo, tienen un efecto sobre las tasas de derivación obtenidas.

Por último, se analizó el transcriptoma de las líneas mESC generadas a partir de distintos blastómeros del mismo embrión. Se observó que, para cada embrión, la mitad de las líneas generadas presentaban una mayor expresión de genes relacionados con la pluripotencia y el desarrollo que la otra mitad, lo que sugiere que probablemente se originaron a partir de aquellos blastómeros con un mayor potencial de desarrollo. Sin embargo, al analizar la capacidad de esas líneas de diferenciarse hacia células de las tres láminas embrionarias, no se observaron diferencias evidentes entre ellas.

En conjunto, el desarrollo de esta tesis ha permitido, por un lado, mejorar y simplificar el proceso de derivación de mESC a partir de blastómeros aislados y, por otro lado, determinar que los blastómeros del embrión a 8 células poseen diferente habilidad para generar líneas de mESCs, si bien esta puede modularse mediante unas condiciones de cultivo adecuadas. En definitiva, el presente trabajo proporciona un mayor conocimiento sobre el potencial de desarrollo de los blastómeros del embrión preimplantacional de ratón, así como del proceso de derivación de mESCs.

ABSTRACT

Mouse embryonic stem cells (mESCs) are usually derived from embryos at the blastocyst stage, but, alternatively, they can be obtained from isolated blastomeres from the 8-cell embryo. However, the derivation efficiency from blastomeres (25-50%) is lower than from blastocysts (85%). This situation could be due to a technical limitation or to an inherent biological limitation of some blastomeres. The latter refers to a possible predisposition of some blastomeres towards a non-pluripotent cell fate that would prevent the generation of mESCs from them. Therefore, the main objective of this thesis is to determine the ability of the 8-cell embryo blastomeres to generate mESCs lines and to analyse whether these lines share similar properties.

In a first study, we aimed to optimize the technical conditions of the derivation process, in order to increase the probability of obtaining 8 mESCs lines from the same embryo. For this purpose, we evaluated the effect of modulators of the Wnt, MAPK and TGF β signalling pathways involved in pluripotency (2i or R2i cocktails), supplements such as adrenocorticotrophic hormone (ACTH), the use of cryopreserved embryos or embryo preculture with 2i or R2i, on the rates of mESCs derivation from single blastomeres, as well as on karyotype integrity and the expression of pluripotency markers in the lines generated. Results showed that embryo freezing did not affect any of these parameters. On the other hand, the use of R2i together with ACTH and cryopreserved embryos produced the highest derivation rates from isolated blastomeres (39%) among all the treatments applied. Furthermore, the use of R2i provided higher karyotype integrity of the lines generated compared with 2i. Finally, culturing the embryos with R2i increased the number of epiblast cells in the blastocysts, although this did not translate into a higher derivation rate when isolated blastomeres from treated embryos were used to produce mESCs.

In a second study, the ability of sister blastomeres of the 8-cell embryo to generate epiblast cells and mESCs lines was analysed. It was observed that half or less of the sister blastomeres had a greater potential to produce mESCs lines. However, the obtention of more than 4 lines from several embryos demonstrated that the blastomeres with lower potential could also generate mESC lines. This could be due to the use of the R2i cocktail during the derivation process, which could redirect the non-pluripotent cell fate of lower potential blastomeres towards a pluripotent

fate. Therefore, the biological characteristics of each blastomere, as well as their plasticity after isolation and the culture conditions, have an influence on the derivation rates obtained.

Finally, the transcriptome of the mESC lines generated from different blastomeres of the same embryo was studied. It was observed that, for each embryo, half of the lines generated showed higher expression of genes related to pluripotency and development than the other half, suggesting that they may have originated from those blastomeres with the greatest developmental potential. However, no evident differences were observed among lines in terms of their capacity to differentiate into cells of the three germ layers.

All in all, the development of this thesis has allowed, on one hand, to improve and simplify the process of mESC derivation from isolated blastomeres and, on the other hand, to determine that blastomeres of the 8-cell embryo have different ability to generate mESC lines, although this can be modulated by appropriate culture conditions. In conclusion, the present work improves our knowledge of the developmental potential of the blastomeres of the preimplantation mouse embryo, as well as of the mESCs derivation process.

INTRODUCCIÓN



1. CÉLULAS MADRE

Las células madre (SCs) son células caracterizadas por dos propiedades fundamentales: la habilidad de auto-renovarse indefinidamente sin perder su estado indiferenciado y la capacidad de diferenciarse a otro tipo celular bajo determinados estímulos. Estas propiedades hacen de las SCs unas células especiales, esenciales para el desarrollo del organismo y el correcto mantenimiento de los tejidos.

La capacidad de las SCs de dar lugar a células especializadas de diferentes tejidos viene determinada por su potencial de desarrollo, es decir, su habilidad de diferenciación. De esta forma, podemos encontrar una gran variedad de SCs dependiendo de su potencial de desarrollo y su origen.

1.1. TIPOS Y CARACTERÍSTICAS

1.1.1. Células totipotentes

La totipotencia es la habilidad de una célula aislada de formar un individuo completo bajo un entorno adecuado (Condic, 2014). De esta forma, las células totipotentes pueden dar lugar tanto a tejidos embrionarios, como a tejidos extraembrionarios. El cigoto es la célula totipotente por excelencia, que se dividirá en blastómeros durante las primeras etapas del desarrollo, los cuales irán perdiendo potencialidad a medida que avanza el desarrollo embrionario (Boiani *et al.*, 2019).

In vitro, las primeras SCs totipotentes descritas fueron las llamadas **2c-like cells** (2CLCs), cuando se observó que en cultivos de células madre embrionarias (ESCs) y de células madre pluripotentes inducidas (iPSCs) de ratón (explicadas en el apartado 1.1.2) había subpoblaciones de células con algunas propiedades que se asemejaban a las de los blastómeros del estadio de 2 células (Zalzman *et al.*, 2010; Macfarlan *et al.*, 2012). Estas 2CLCs son capaces de formar linajes embrionarios y extraembrionarios, muestran un transcriptoma muy similar a embriones de 2 células, con la expresión de genes como retrovirus endógenos murinos (MERV) o el factor de transcripción *Zscan4*, aunque no presentan marcadores moleculares de pluripotencia como OCT4 o NANOG (Falco *et al.*, 2007; Zalzman *et al.*, 2010; Macfarlan *et al.*, 2012; Eckersley-Maslin *et al.*, 2016;

Rodríguez-Terrones *et al.*, 2018). Sin embargo, pese a su alto valor de estudio, el cultivo de estas células no es estable y su mantenimiento *in vitro* sigue siendo un desafío (Malik and Wang, 2022).

Otras células totipotentes descritas son las ***expanded potential stem cells (EPSCs)***, obtenidas a partir de blastocistos y de blastómeros aislados de embriones a 8 células, así como de ESCs y iPSCs de ratón y humano (Yang *et al.*, 2017a, 2017b). Estas células muestran marcadores de totipotencia, mantienen un cariotipo estable y generan células de las tres láminas embrionarias, pero además presentan potencial para producir tejidos extraembrionarios. Sin embargo, un estudio reciente (Posfai *et al.*, 2021) pone en duda la totipotencia de las EPSCs, ya que parece ser que sólo una pequeña población de EPSCs tiene un potencial expandido, mientras el resto tiene propiedades más parecidas a la pluripotencia.

También encontramos las llamadas ***totipotent blastomere-like cells***, obtenidas a partir de ESCs de ratón mediante la inhibición de espliciosomas. Estas células presentan un perfil epigenético y transcripcional similar al de los blastómeros de embriones a 2 y 4 células, pero distinto al de las EPSCs y las 2CLCs, con un potencial de diferenciación más robusto que estas hacia tejidos embrionarios y extraembrionarios (Shen *et al.*, 2021). Sin embargo, parecen tener una baja tasa de proliferación.

Recientemente, otro estudio revela la importancia de la remodelación de la cromatina y el restablecimiento de dominios de metilación como H3K4me3 en el estado de totipotencia, generando las llamadas ***totipotent-like stem cells*** (Yang *et al.*, 2022). Estas células parecen ser las SCs con características más similares a las propias del embrión a 2 células de ratón, como una mayor expresión de MERV y de genes asociados a la totipotencia (*Zscan4*, *Obox3*, *Tcstv1*, etc.), tener potencial para formar tanto linajes embrionarios como extraembrionarios, ser competentes para la transmisión a la línea germinal, además de ser más estables en cultivo, convirtiéndose en un tipo celular muy valioso para el estudio de la totipotencia y la embriología.

1.1.2. Células pluripotentes

La pluripotencia se describe como el potencial para formar células de las tres láminas embrionarias, pero no tejidos extraembrionarios. Aunque la pluripotencia es un estado transitorio

in vivo, se pueden obtener células pluripotentes de diferentes estadios del desarrollo embrionario temprano y mantenerse indefinidamente en un estado inducido de autorrenovación mediante un cultivo adecuado *in vitro* (Nichols and Smith, 2012). Podemos encontrar múltiples tipos de SCs pluripotentes en humano y ratón, divididos según su origen (Figura 1) (Hanna *et al.*, 2010; Weinberger *et al.*, 2016).

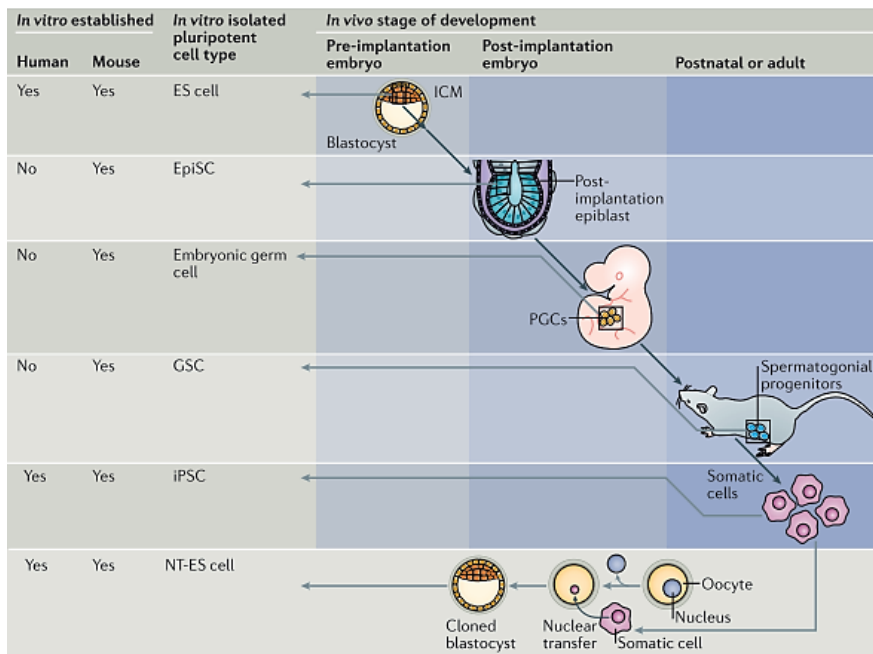


Figura 1. Células madre pluripotentes según su origen. Imagen adaptada reproducida con permiso de Springer Nature: Nature Reviews Molecular Cell Biology. *Dynamic stem cell states: naive to primed pluripotency in rodents and humans*. Weinberger *et al.* Copyright (2016).

Las **células embrionarias germinales (EGCs)** se obtienen a partir del cultivo *in vitro* de células germinales primordiales (PGCs) de embriones de ratón a 8,5-12,5 días post coito (dpc) en presencia del factor inhibidor de la leucemia (LIF), el factor de crecimiento de fibroblasto (FGF) y el factor de células madre (Matsui *et al.*, 1991; Resnick *et al.*, 1992; Leitch *et al.*, 2010). Las PGCs son células unipotentes que se forman antes de la gastrulación (6,5 dpc) durante el desarrollo embrionario y darán lugar a las células germinales, formando los ovocitos y espermatozoides. Estas EGCs de ratón presentan marcadores típicos de pluripotencia (SOX2, NANOG, KLF2, STELLA),

son capaces de diferenciarse a tejidos de las tres láminas embrionarias, contribuyen a formar quimeras y, en ocasiones, se transmiten a la línea germinal (Labosky *et al.*, 1994; Stewart *et al.*, 1994).

Las **células madre de línea germinal (GSCs)**, también conocidas como **células madre espermatoogónicas (SSCs)**, provienen de SCs de testículo de ratón neonatal o de espermatoogonias adultas cultivadas en presencia de citoquinas (Kanatsu-Shinohara *et al.*, 2004, 2005; Tanaka *et al.*, 2015). Presentan fenotipo pluripotente, son estables genéticamente, y además, producen teratomas y forman quimeras cuando se inyectan en blastocistos (Kanatsu-Shinohara and Shinohara, 2007), aunque tienen el inconveniente de retener la firma epigenética masculina (Ko *et al.*, 2009).

Aunque fueron un gran avance en su momento, las SCs mencionadas hasta ahora no se utilizan tanto actualmente debido a que surgieron nuevos tipos celulares más estables, más fáciles de obtener y con mejores características, quedando el campo de las SCs mayoritariamente centrado en los tipos celulares presentados a continuación.

Las **células madre embrionarias (ESC)** fueron obtenidas por primera vez en 1981 a partir de la masa celular interna (ICM) del embrión preimplantacional de ratón (Evans and Kaufman, 1981; Martin, 1981) y más tarde, en 1998, también de blastocistos humanos (Thomson, 1998). También pueden obtenerse de estadios más tempranos del desarrollo (Strelchenko *et al.*, 2004; Tesar, 2005) o a partir de blastómeros aislados (Delhaise *et al.*, 1996; Chung *et al.*, 2006; Klimanskaya *et al.*, 2006; González *et al.*, 2010). De forma general, además de presentar las características típicas de células pluripotentes, estas células tienen un alto ratio núcleo-citoplasma, nucléolos prominentes y una elevada capacidad de desarrollo cuando se inyectan en blastocistos de ratón, contribuyendo a la formación de las tres capas germinales y de la línea germinal de animales quiméricos. Expresan genes propios de la pluripotencia como *Oct4*, *Sox2*, *Nanog*, *Esrrb*, *Rex1*, *Stella*, etc, y tienen un potencial de proliferación ilimitado (Nichols and Smith, 2009). Todas estas características proveen a estas células de un elevado interés, y hablaremos de ellas con más detalle más adelante, ya que son el objeto de estudio de esta tesis doctoral.

Las ESCs pueden obtenerse también de **embriones generados por transferencia nuclear (NT-ESCs)**, es decir, embriones cuyo núcleo proviene de una célula somática que se transfiere a un ovocito receptor enucleado, tanto en humanos como en ratón (Wakayama *et al.*, 2001; Tachibana *et al.*, 2013; Chung *et al.*, 2014; Yamada *et al.*, 2014). Esta aproximación tiene la ventaja de permitir generar células pluripotentes específicas de paciente, cuyo DNA nuclear es idéntico al del donante de la célula somática; sin embargo, el DNA mitocondrial no es isogénico y lo provee la donante del ovocito receptor (Deuse *et al.*, 2015).

Las **células madre epiblasticas (EpiSC)** son células aisladas del epiblasto post-implantacional de ratón (5,5-8,0 dpc), en presencia de FGF2 y activina en el medio de cultivo (Brons *et al.*, 2007; Tesar *et al.*, 2007). Usando estas condiciones, las EpiSCs pueden obtenerse también de blastocistos preimplantacionales (Najm *et al.*, 2011) o mediante un proceso de conversión directamente de ESCs formando unas células parecidas a EpiESC (*EpiSC-like*) (Guo *et al.*, 2009). Tienen la capacidad de diferenciarse *in vitro* a mesodermo, endodermo y ectodermo, así como a células germinales, y formar teratomas cuando se inyectan en individuos adultos (Brons *et al.*, 2007; Tesar *et al.*, 2007). Sin embargo, a diferencia de las ESCs, rara vez producen animales quiméricos cuando se inyectan en blastocistos y presentan un cromosoma X inactivo en células femeninas. Expresan genes típicos de pluripotencia como *Oct4* y *Sox2*, pero expresan en menor medida genes como *Nanog*, *Rex1*, *Klf4*, *Klf5* y *Stella* (Brons *et al.*, 2007). En cambio, expresan genes propios del embrión post-implantacional, como *Brachyury*, *Eomes*, *Fgf8*, *Sox17*, o *Gata6* (Tesar *et al.*, 2007; Hackett and Surani, 2014; Rebuzzini *et al.*, 2021). Mientras las ESCs representan un estado de pluripotencia preimplantacional *in vitro*, las EpiESC son representativas de un estado post-implantacional. Estas diferencias descritas entre ambos tipos celulares revelaron la necesidad de definir varios tipos de pluripotencia, siendo estas EpiESC consideradas de pluripotencia *primed*, mientras las ESCs de ratón son consideradas de pluripotencia *naïve*, dos términos que se definirán en más detalle más adelante (apartado 2.1).

Las **células madre pluripotentes inducidas (iPSCs)** se establecieron por primera vez en 2006 cuando fibroblastos embrionarios de ratón (MEFs) se reprogramaron *in vitro* mediante su exposición a vectores retrovirales portadores de *Oct4*, *Sox2*, *Klf4* y *c-Myc* (llamados factores OSKM), surgiendo unas colonias parecidas a las ESCs (Takahashi and Yamanaka, 2006). Un año más tarde, se

obtuvieron resultados parecidos en humano utilizando las mismas condiciones (Takahashi *et al.*, 2007) y más tarde, utilizando *NANOG* y *LIN28* en lugar de *KLF4* y *C-MYC* (Yu *et al.*, 2007). Estas células surgieron como una gran alternativa a las ESC, ya que evitaban los problemas éticos asociados a la obtención de ESC (destrucción de embriones), pudiendo usarse una gran variedad de células somáticas para el proceso de reprogramación. Además, esta aproximación permite generar células pluripotentes específicas del paciente, con DNA nuclear y mitocondrial idéntico al del donador de las células somáticas.

Sin embargo, la eficiencia del proceso de reprogramación era muy baja, por lo que durante muchos años diversos laboratorios se han esforzaron en aumentarla buscando nuevos factores de transcripción u otras combinaciones de los ya estudiados. Por ejemplo, eliminar el uso de *c-Myc* debido a su tumorigenicidad (Nakagawa *et al.*, 2008) o utilizar *Esrrb* en lugar de *Klf4* y *c-Myc*. Por otro lado, se han desarrollado métodos más eficientes y sin integración de vectores retrovirales en el genoma de la célula huésped, como el uso de adenovirus (Stadtfeld *et al.*, 2008), plásmidos (Okita *et al.*, 2008), el virus Sendai (Fusaki *et al.*, 2009), mRNA sintéticos (Warren *et al.*, 2010), proteínas recombinantes (Kim *et al.*, 2009) o compuestos químicos (Hou *et al.*, 2013).

Aunque parece que estas células tienen un gran potencial todavía presentan una serie de limitaciones como la obtención de iPSCs parcialmente reprogramadas que podrían dar lugar a una diferenciación defectuosa (Miura *et al.*, 2009; Koyanagi-Aoi *et al.*, 2013) o retener cierta memoria epigenética, de forma que a menudo se inclinarán a diferenciarse al linaje de la célula origen (Bhutani *et al.*, 2010).

1.1.3. Células multipotentes y unipotentes

Las SCs multipotentes son aquellas capaces de generar células de un solo linaje embrionario. Se pueden encontrar en la mayoría de los órganos, principalmente en la médula ósea o la sangre, pero también en tejido adiposo, nervioso, fluidos amnióticos o corazón (Sobhani *et al.*, 2017). Estas células tienen una alta capacidad de autorrenovarse y un alto potencial para reconocer sitios dañados o de muerte celular y regenerar las células perdidas y el tejido dañado sin rechazo inmunológico (Liu *et al.*, 2020). Se conocen una amplia gama de estas células, como las SCs hematopoyéticas, las SCs mesenquimales o las células progenitoras endoteliales (Blanpain and

Fuchs, 2014; Clevers, 2015; Trounson and McDonald, 2015; Wuidart *et al.*, 2016), con una gran variedad de aplicaciones clínicas en enfermedades cardiovasculares, inflamatorias, de pulmón o cáncer (Mirzaei *et al.*, 2018).

Las SCs unipotentes son aquellas capaces de diferenciarse a un solo tipo celular, manteniendo la capacidad de autorrenovarse. Entre ellas podemos encontrar las SCs musculares o epiteliales. Por ejemplo, la epidermis o el epitelio corneal se renuevan constantemente gracias a la presencia de estas células.

1.2. APLICACIONES

Debido a su capacidad de autorrenovarse y a su potencial de diferenciarse a varios tipos celulares, las SCs surgen como una gran herramienta para la caracterización de enfermedades, el estudio de fármacos y la ingeniería de tejidos (Avior *et al.*, 2016; Nguyen *et al.*, 2018).

El estudio de las SCs permite obtener una visión de los procesos biológicos y moleculares que ocurren durante el desarrollo y la diferenciación celular. Las ESCs se pueden utilizar también para modelizar enfermedades. En concreto, las ESCs derivadas a partir de embriones portadores de mutaciones o aberraciones cromosómicas pueden usarse como fuente de modelos de enfermedades monogénicas o cromosómicas (Biancotti *et al.*, 2010; Biancotti and Benvenisty, 2011). Alternativamente, pueden manipularse genéticamente las SCs para insertar mutaciones causantes de una enfermedad o bien obtenerse SCs por reprogramación de células somáticas de pacientes con enfermedades genéticas (iPSCs o NT-ESCs) (Figura 2). De esta forma, las ESC son buenos modelos para el estudio de enfermedades de inicio temprano o que aparecen durante el desarrollo embrionario, pero también se pueden usar protocolos de envejecimiento *in vitro* para estudiar enfermedades más tardías o asociadas al envejecimiento, tanto con ESCs como iPSCs y NT-ESCs (Avior *et al.*, 2016).

Por otro lado, las SCs pueden utilizarse para el desarrollo de estructuras más complejas, como los organoides, estructuras parecidas a órganos, compuestas de varios tipos celulares y con un desarrollo tridimensional. Los organoides son prometedores para el estudio de numerosos órganos y tejidos, como la retina (Distefano *et al.*, 2021) o tejidos pancreáticos (Boj *et al.*, 2015),

y todos los procesos o patologías que puedan presentar. También para obtener modelos de estudio en oncología (Drost and Clevers, 2018) o realizar estudios toxicológicos (Pain, 2021) e incluso para estudios de interacción huésped-patógeno, por ejemplo para estudiar la propagación del SARS-Cov-2 en diferentes organoides y reproducir su cinética de infección en humanos (Yang *et al.*, 2020).

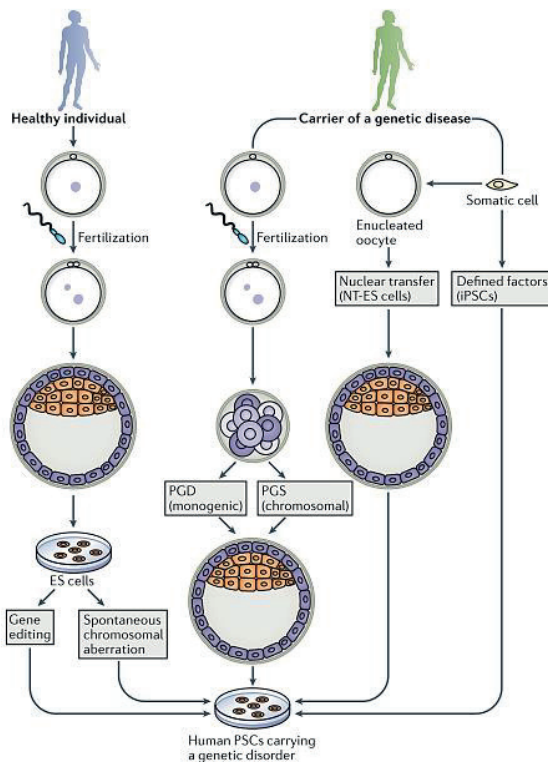


Figura 2. Estrategias para generar modelos de enfermedades usando células madre pluripotentes en humano. Imagen reproducida con permiso de Springer Nature: Nature Reviews Molecular Cell Biology. *Pluripotent stem cells in disease modelling and drug discovery*. Avior *et al.* Copyright (2016).

Recientemente, se ha descrito la formación de estructuras tridimensionales parecidas a blastocistos, llamadas blastoides, obtenidas mediante dos aproximaciones en ratón: la agregación de ESCs y células madre trofoblásticas (TSC) (Rivron *et al.*, 2018) o a partir de EPSCs (Li and Izpisua-Belmonte, 2021). Estas estructuras pueden usarse como un modelo *in vitro* para estudiar cuestiones fundamentales de la embriogénesis pre- y postimplantacional en mamíferos,

modelizar enfermedades relacionadas con fases tempranas del embarazo, test farmacológicos y toxicológicos y posiblemente bioingeniería de la embriogénesis ([Li et al., 2019](#)).

Otra de las aplicaciones prometedoras de las SCs es en medicina regenerativa, mediante el reemplazo de células somáticas muertas por lesiones o por trastornos degenerativos, pudiendo utilizarse para el tratamiento de muchas enfermedades neurodegenerativas, insuficiencias cardíacas o diabetes mellitus tipo I ([Trounson and Dewitt, 2016](#)). También para enfermedades de tipo intestinal, retinal o cerebral utilizando organoides derivados de SCs ([Lancaster et al., 2013](#); [Kretzschmar and Clevers, 2016](#); [Distefano et al., 2021](#)). Sin embargo, los ensayos clínicos con este tipo de células aún están en sus inicios, por lo que la traslación clínica aún no se ha producido con éxito, debido a problemas éticos, compatibilidad inmune, los altos costes, la inestabilidad genómica o una subóptima diferenciación de estas células ([Nguyen et al., 2018](#)).

Las SCs también puede usarse para el estudio de fármacos. De forma parecida al modelizado de enfermedades, se obtienen ESC diferenciadas hacia un tejido en concreto y, una vez identificados los fenotipos a tratar, se realizan cribados de drogas sobre estas células para analizar el fármaco más potente contra esta célula o tejido ([Avior et al., 2016](#)).

Finalmente, las ESCs de ratón (mESCs) pueden usarse como vectores para edición génica. En este sentido, las mESCs pueden ser sometidas a procesos de edición génica con herramientas como CRISPR/Cas, y ser reintroducidas en el blastocisto ([Capecchi, 2005](#)) o en el embrión a 8 células ([Auerbach and DeChiara, 2017](#)) para generar ratones genéticamente modificados.

2. CÉLULAS MADRE EMBRIONARIAS DE RATÓN

2.1. ESTADOS DE PLURIPOTENCIA

Debido a las diferencias en el estado de pluripotencia entre las ESCs de ratón y otras especies como la humana, y a que esta tesis doctoral se centra en la especie murina, salvo que se especifique lo contrario, toda la información se referirá a las mESCs. Las SCs pluripotentes pueden aislarse de embriones pre- o postimplantacionales, y mantenerse *in vitro* aplicando unas condiciones de cultivo de autorrenovación específicas, adquiriendo unas características celulares y moleculares diferentes dependiendo de su estado de pluripotencia (Figura 3). Estos diferentes estados son definidos como pluripotencia *naïve*, *primed* e intermedia, y se caracterizan por una diferente morfología de las colonias, el requerimiento de diferentes factores de crecimiento, diferencias moleculares, y la inactivación o no del cromosoma X en líneas femeninas (Rebuzzini *et al.*, 2021).

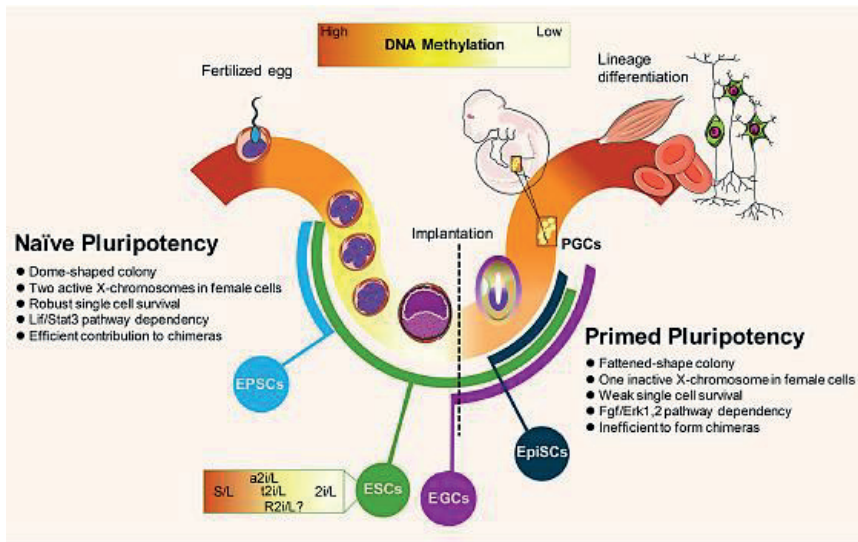


Figura 3. Estados de pluripotencia en distintos tipos de células madre de ratón. Imagen reproducida con permiso de Springer Nature: Cellular and Molecular Life Sciences. *Transition of inner cell mass to embryonic stem cells: mechanisms, facts, and hypotheses*. Hassani *et al.* Copyright (2019).

2.1.1. Pluripotencia *naïve*

En ratón, presentan pluripotencia *naïve* las líneas de ESCs generadas a partir de células del epiblasto preimplantacional (Boroviak et al., 2014; Nichols et al., 2009), y también las EPSCs obtenidas a partir de blastómeros aislados (Yang et al., 2017a) o, incluso, las EpiSCs derivadas del embrión postimplantacional y reprogramadas a ESCs (Stuart et al., 2019).

Estas células crecen *in vitro* formando colonias pequeñas, compactas y con unos bordes bien delimitados, y presentan una alta capacidad de clonogenicidad, es decir, las células individuales son capaces de dividirse y agruparse formando colonias. Además, al ser inyectadas en blastocistos permiten la formación de ratones quiméricos, con contribución a todos los tejidos somáticos y a la línea germinal, probando su pluripotencia *in vivo* (Czechanski et al., 2014).

Las células *naïve* expresan marcadores típicos de pluripotencia como *Oct4*, *Nanog* y *Sox2*, así como marcadores de células del epiblasto (EPI) como *Klf2*, *Klf4*, *Klf5*, *Stella*, *Fgf4*, *Esrrb*, *Rex1*, *Tcf2l1*, *Tbx3*, presentan mayor actividad de la fosfatasa alcalina (Nichols et al., 2009; Yeo and Ng, 2013), y mantienen los dos cromosomas X activos en células femeninas (Orkin and Hochedlinger, 2011).

Originalmente, este tipo de células se obtuvieron mediante cultivo con suero fetal bovino (FBS) y LIF y, posteriormente, se incorporó el uso de la proteína morfogenética ósea 4 (BMP4) para sustituir al suero (Ying et al., 2003), convirtiéndose estas dos opciones en el método de cultivo estándar para células con pluripotencia *naïve*. Sin embargo, más tarde, se empezaron a buscar otras combinaciones para aumentar la eficiencia de derivación de ESCs. De esta forma, se observó que, al añadir moléculas inhibitoras de rutas de diferenciación, como la ruta de señalización de las proteínas quinasa activadas por mitógenos (MAPK), o inhibidores de la glucógeno sintasa quinasa 3 (GSK3), se incrementaba la eficiencia de derivación de ESCs y su estabilidad, además de presentar características más parecidas a las de la ICM (Ying et al., 2008). A este estado se le denominó estado *ground naïve* de pluripotencia. Aunque ambos estados son considerados pluripotencia *naïve*, el estado *ground* se dice que es un estado sin restricciones, más parecido al estado pluripotente *in vivo* (Hackett and Surani, 2014).

Por último, las células *naïve* presentan un DNA hipermetilado, mientras que las células cultivadas en condiciones *ground naïve* exhiben un DNA hipometilado, con bajos niveles de 5 metilcitosina (5mC) y de DNA metiltransferasas (DNMT3A/B) (Betto et al., 2021). Según diversos estudios, esta baja metilación del DNA está relacionada con la inhibición de la quinasa MEK en condiciones *ground naïve*, provocando por un lado la degradación o menor síntesis *de novo* de las DNA metiltransferasas mediante el reclutamiento del complejo PRC2 vía PRDM14 (Yamaji et al., 2013; Hackett and Surani, 2014) y, por otro lado, la mayor conversión de 5mC en hidroximetilcitosina (5hmC) mediante un aumento de la desmetilasa de histonas JMJD2C vía TET1 (Kohli and Zhang, 2013; Sim et al., 2017).

2.1.2. Pluripotencia *primed*

Se consideran células con pluripotencia *primed* aquellas derivadas de embriones postimplantacionales, como las EpiESCs. Estas células crecen en colonias más grandes y planas, tienen una baja clonogenicidad, presentan una gran heterogeneidad entre colonias y líneas celulares, y requieren activina y FGF para su mantenimiento *in vitro* (Brons et al., 2007; Tesar et al., 2007). Como las células *naïve*, presentan un potencial ilimitado para autorrenovarse y diferenciarse a células de las tres láminas embrionarias, pero, por el contrario, no son capaces de generar ratones quiméricos (Tesar et al., 2007; Guo et al., 2009; Huang et al., 2012).

Expresan genes asociados a pluripotencia como *Oct4* y *Sox2*, pero la expresión de *Nanog*, *Rex1*, *Klf2*, *Klf4* y *Stella*, entre otros, es menor o está ausente (Brons et al., 2007; Guo et al., 2009; Festuccia et al., 2012). En cambio, expresan marcadores del embrión postimplantacional, como *Brachyury*, *Eomes*, *Gsc*, *Mixl1*, *Fgf8*, *Sox17*, *Gata6*, *Gata4*, etc, y tienen una menor actividad de la fosfatasa alcalina (Tesar et al., 2007; Guo et al., 2009; Hackett and Surani, 2014; Rebuzzini et al., 2021). Además, presentan un genoma hipometilado, inactivan un cromosoma X en las líneas femeninas y adquieren la marca H3K27me3 (Hackett et al., 2013; Veillard et al., 2014; Weinberger et al., 2016; Takahashi et al., 2018).

2.1.3. Estados intermedios de pluripotencia

Aunque durante muchos años se han considerado sólo estos dos estados de pluripotencia, nuevos estudios dejan claro que el estado de pluripotencia es un espectro gradual, pudiendo encontrar

estados intermedios de pluripotencia con características diferentes al estado de pluripotencia *primed* o *naïve* (Smith, 2017; Du *et al.*, 2018).

Uno de estos estados es la pluripotencia *rosette* (RSCs) obtenida a partir de embriones en estadio 5 dpc o de ESCs cultivadas bajo unas condiciones específicas (Neagu *et al.*, 2020). Estas células presentan características propias de la pluripotencia *naïve* como la expresión de *Klf4* o *Rex1*, así como de marcadores *primed* como *Otx2*, y los autores proponen que es un estado de transición previo a la salida de la célula del estado de pluripotencia *naïve*.

Mientras estas últimas se consideran aún dentro del espectro de la pluripotencia *naïve*, otros grupos de investigación han identificado otros tipos celulares con pluripotencia intermedia denominada pluripotencia *poised* (Du *et al.*, 2018), o más comúnmente formativa (Smith, 2017), dónde podemos encontrar SCs formativas (FS) (Kinoshita *et al.*, 2021) y las SCs pluripotentes formativas (fPSCs) (Wang *et al.*, 2021) obtenidas ambas a partir de embriones 5,5-6 dpc o de ESCs convertidas mediante condiciones específicas. También podemos encontrar ESCs convertidas a EpiSCs (EpiLCs) (Hayashi *et al.*, 2011; Nakaki *et al.*, 2013). Este tipo de células presentan características diferentes entre ellas, siendo una mezcla entre la pluripotencia *primed* y *naïve*. Por ejemplo, las células FS expresan *Nanog* pero no otros genes *naïve*, expresan *Fgf5* y *Sox1* y pueden contribuir a la formación de quimeras pero en menor medida que las ESCs. En cambio, las fPSCs sólo expresan *Nanog* como marcador *naïve*, expresan marcadores formativos como *Otx2*, *Fgf5* y *Dnmt3b* y tienen poca contribución a la formación de quimeras. Finalmente, las EpiLCs no expresan *Nanog* ni ninguno de los marcadores de linaje (*Sox1*, *T*, *Foxa2*, etc).

Mientras las RSCs se hallarían aún dentro del espectro de pluripotencia *naïve*, los últimos tipos celulares descritos se encuentran en un estado de salida de la pluripotencia *naïve* irreversible, dónde las EpiLCs tienen una pluripotencia similar al EPI 5-5,5 dpc, y las fSCs y FS se asemejan al EPI 6 pdc (Endoh and Niwa, 2022) (Figura 4).

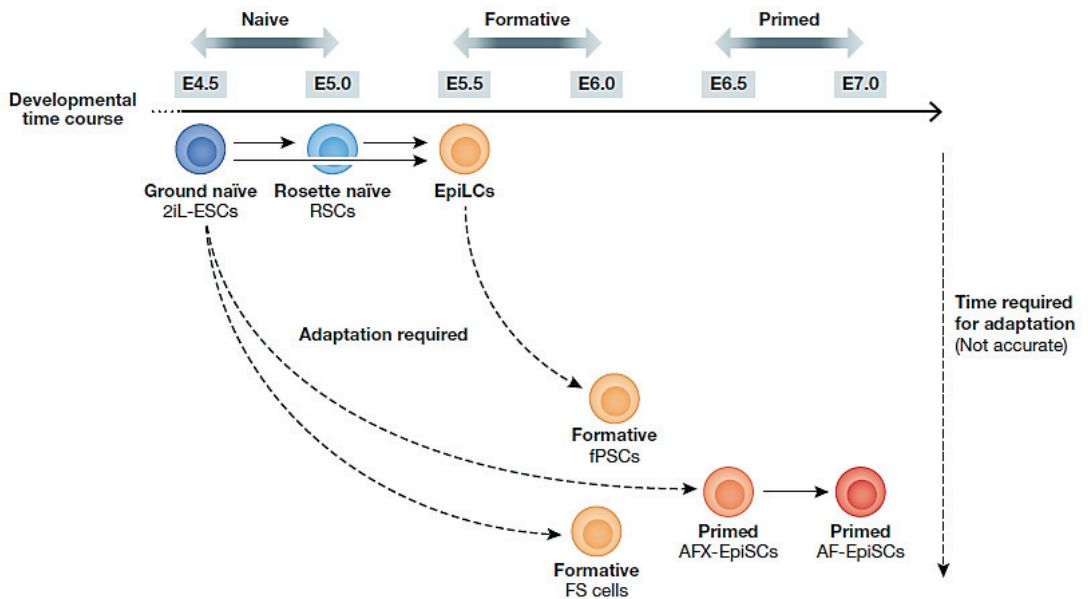


Figura 4. Diferentes estados de pluripotencia derivados de las células embrionarias de ratón. Imagen reproducida con permiso de John Wiley and Sons: EMBO Reports. *Stepwise pluripotency transitions in mouse stem cells*. Endoh and Niwa. Copyright (2022).

2.2. MANTENIMIENTO DE LA PLURIPOTENCIA NAÏVE

La presente tesis doctoral se centra en el estudio de mESCs obtenidas a partir de embriones en estadio pre-implantacional y que presentan pluripotencia *naïve*. En el embrión de ratón, el estado de pluripotencia existe de forma transitoria, desde los primeros ciclos de división, hasta las últimas etapas del blastocisto (Boroviak *et al.*, 2014). Sin embargo, las mESC cultivadas *in vitro* representan un estado pluripotente permanente o “congelado” en las primeras etapas del desarrollo (Papatsenko *et al.*, 2018). Este estado está gobernado por una red reguladora interconectada de genes de pluripotencia, que está anclada funcionalmente por un conjunto de factores de transcripción y vías de señalización.

2.2.1. Circuito transcripcional

En los últimos años, las técnicas de análisis del genoma y los diferentes estudios *in silico* han provisto de bastante información, desvelando una extensa y compleja red de factores interconectados que conforman el estado de pluripotencia (Figura 5) y diferenciación celular. Aquí

nerviosos y el ectodermo extra-embionario. Es un regulador clave en la expresión de *Oct4* en las ESCs ya que actúa formando un complejo con este que le permite regular la expresión de genes como *Fgf4* (Yuan *et al.*, 1995; Ambrosetti *et al.*, 1997), *Nanog* (Kuroda *et al.*, 2005), *Lefty1* (Nakatake *et al.*, 2006), así como al propio *Oct4* (Okumura-Nakanishi *et al.*, 2005).

In vitro, los niveles de expresión de *Oct4* y *Sox2* en mESCs deben estar regulados de forma precisa: una pérdida o expresión reducida de alguno de estos factores da lugar a células del trofoctodermo (TE), mientras que su sobreexpresión da lugar a una diferenciación celular a mesodermo o endodermo (Niwa *et al.*, 2000, 2002; Avilion *et al.*, 2003). Además, si la expresión de *Oct4* se mantiene, las mESCs pueden preservarse en ausencia de SOX2, lo que sugiere que la única función de SOX2 es la de activar o potenciar la acción de OCT4 (Masui *et al.*, 2007).

El tercer componente principal de esta red es **NANOG**, que actúa en coordinación con OCT4 y SOX2 como el núcleo de los factores de transcripción para establecer el estado de pluripotencia. No se hereda vía materna, sino que aparece por primera vez con distribución aleatoria durante la compactación embrionaria (Dietrich and Hiiragi, 2007) y tiene un papel esencial en la formación de la ICM y, más tarde, del EPI del embrión preimplantacional (Mitsui *et al.*, 2003; Silva *et al.*, 2009). Las células con falta de NANOG pueden seguir autorrenovándose sin problemas, aunque son más propensas a diferenciarse (Chambers *et al.*, 2007). Sin embargo, muchos genes asociados a la pluripotencia siguen expresándose en su ausencia (Silva *et al.*, 2008), lo que parece indicar que su papel sea el de salvaguardar la pluripotencia *naïve* contra señales pro-diferenciación más que promover la activación de genes de pluripotencia (Chambers *et al.*, 2007; Li and Izpisua-Belmonte, 2017). Curiosamente, también se ha observado que NANOG puede regular su propia expresión independientemente de OCT4-SOX2 (Navarro *et al.*, 2012).

Algunos factores *Krüppel-like* (KLF) son también importantes para el mantenimiento de la pluripotencia (Jiang *et al.*, 2008). Estos factores conectan con el centro regulatorio OCT4/SOX2/NANOG para prevenir la diferenciación y mantener el estado de pluripotencia (Bourillot and Savatier, 2010). Como miembros de este circuito, KLF2, KLF4 y KLF5, juntos, incrementan la expresión de *Oct4/Sox2/Nanog* (Nakatake *et al.*, 2006; Yeo *et al.*, 2014). *Klf4* es diana directa de STAT3 y uno de los factores que promueven el estado *naïve* de pluripotencia

(Bourillot *et al.*, 2009; Hall *et al.*, 2009). La expresión de *Klf2* se activa por OCT4, mientras *Klf4* y *Klf5* son activados por NANOG (Hall *et al.*, 2009).

Otros factores de esta extensa red de pluripotencia son ESRRB, TBX3, TCL1, TCF3, TFCP2L1 o ZFP-42 (REX1), entre otros (Nichols and Smith, 2012). ESRRB interactúa con OCT4 y está regulado positivamente por NANOG, manteniendo la pluripotencia de las mESCs (van den Berg *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2008; Festuccia *et al.*, 2012). La sobreexpresión de *Tbx3* estimula la autorrenovación de las mESCs activando la transcripción de *Nanog* (Nichols and Smith, 2012). Sin embargo, la ausencia de TBX3 y ESRRB parece ser tolerada por las ESCs (Nichols and Smith, 2012). *Tcl1* es objetivo de OCT4, y está implicado en la activación de la proteína quinasa B (AKT) (Matoba *et al.*, 2006). TCF3 funciona como un represor, controlando negativamente la expresión de *Esrrb*, *Tfcp2l1*, *Nanog* o *Klf4*, y su inhibición es necesaria para prevenir la diferenciación y mantener el circuito generado por OCT4/SOX2/NANOG (Merrill *et al.*, 2001, 2004; Martello and Smith, 2014). *Tfcp2l1* sufre una profunda subregulación durante la diferenciación de las mESC y está regulado positivamente por STAT3, dirigido por NANOG (Martello and Smith, 2014). REX1 es marcador del estado indiferenciado de las mESCs y su gen está regulado por NANOG y SOX2 (Shi *et al.*, 2006).

2.2.2. Vías de señalización

Todos los factores de transcripción comentados están regulados por diferentes rutas de señalización intracelular (Figura 6). Además, cabe señalar que las vías de señalización a menudo son pleiotrópicas, pudiendo tener simultáneamente efectos positivos y negativos sobre la pluripotencia.

Vía LIF/ JAK-STAT3

LIF, que pertenece a la familia de interleucinas IL-6, juega un papel esencial en el mantenimiento del estado pluripotente de las ESCs, al unirse a un complejo receptor de membrana heterodimérico: GP130 y el receptor LIF (LIFR) (Arabadjiev *et al.*, 2012). Esta unión da lugar a la activación de una amplia gama de vías de señalización intracelular que regulan diferentes aspectos de los circuitos transcripcionales centrales. Algunas de estas son pro-pluripotencia, como JAK-STAT3, PI3K-Akt, y la vía YES-YAP, mientras que otras son pro-diferenciación, como la vía de las MAP quinasas MAPK-ERK (Boeuf *et al.*, 1997).

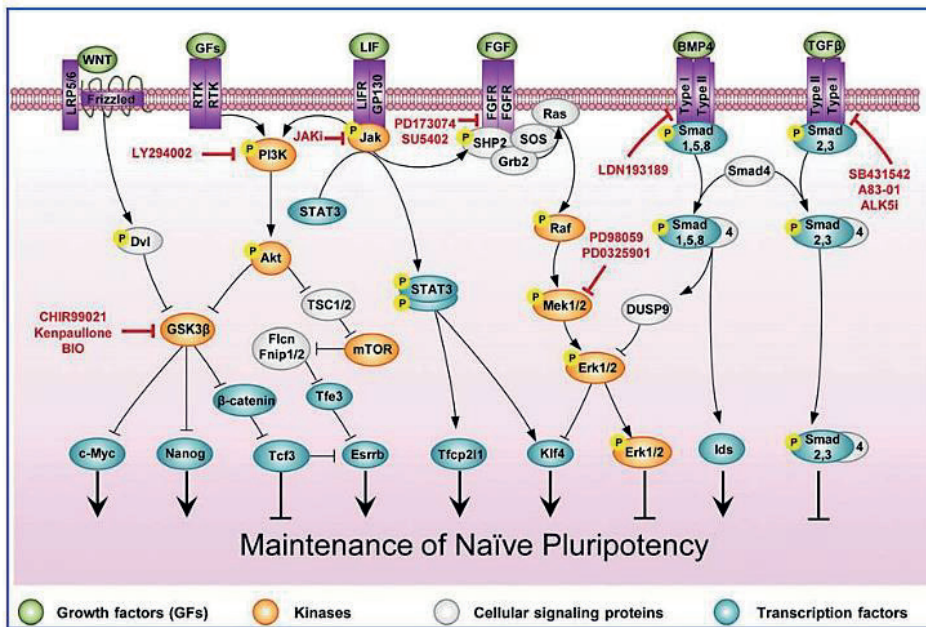


Figura 6. Factores y rutas de señalización intracelular que intervienen en el mantenimiento de la pluripotencia *naïve* en ratones. Imagen reproducida con permiso de Mary Ann Liebert, Inc.: Stem Cells and Development. *Signaling Roadmap Modulating Naive and Primed Pluripotency*. Hassani, et al. Copyright (2014).

La ruta de señalización más característica de este efector es la de **JAK-STAT3** (Figura 7), que comienza cuando la tirosina quinasa Janus (JAK), que está unida a la parte citoplasmática del complejo LIFR/GP130, se fosforila con la unión de LIF, reclutando los factores de transcripción STAT1 y STAT3. Estas dos proteínas están en un estado inactivo en condiciones basales y son rápidamente activadas cuando JAK se fosforila por la unión de LIF a su receptor, dando lugar a su traslocación al núcleo (Niwa *et al.*, 1998; Nicola and Babon, 2015). En el núcleo celular, actúan permitiendo la transcripción de genes diana involucrados en el mantenimiento de un estado indiferenciado, como *Oct4*, *Sox2*, *Nanog*, *c-Myc*, *Klf4*, *Bcl3*, *Tfcp2l1*, *Gbx2* o *Plim1* (Niwa *et al.*, 1998; Burdon *et al.*, 1999; Martello *et al.*, 2013; Tai and Ying, 2013; Ye *et al.*, 2013; Huang *et al.*, 2015; Ohtsuka *et al.*, 2015; Papatsenko *et al.*, 2018). Tanto STAT1/3 como sus objetivos diana

intracelulares juegan un papel muy importante en regular la expresión génica del mantenimiento de la pluripotencia (Matsuda *et al.*, 1999; Chen *et al.*, 2015).

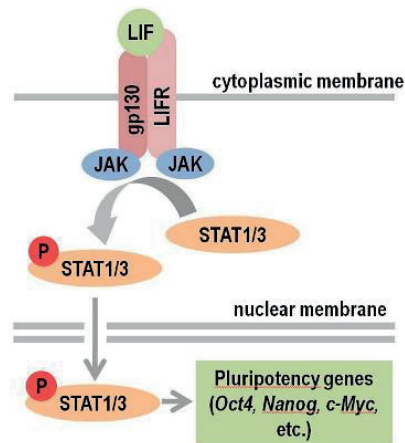


Figura 7. Vía de señalización JAK-STAT3 mediada por LIF. Imagen reproducida de Arabadjiev *et al.*, 2012: *Of mice and men – differential mechanisms of maintaining the undifferentiated state in mESC and hESC*. Creative Commons License CC-BY 4.0.

Otra ruta de señalización pro-pluripotencia activada por LIF es la vía **PI3K-AKT**. Como una segunda señal de LIF, JAK activa PI3K, que además de promover la ruta de mTOR, activa AKT. AKT, por un lado, inhibe GSK3 β , incrementando la expresión de *Nanog* y *c-Myc* y promoviendo la autorrenovación de mESCs. Por otro lado, AKT regula *Tbx3* como otro gen de pluripotencia y causa la acetilación de STAT3, formando un homodímero más estable de STAT3, probablemente seguido de la activación de *Klf4* y *Oct4* (Hassani *et al.*, 2014b; Papatsenko *et al.*, 2018).

Otro de los efectores de LIF es mediante la vía **YES-YAP**, que comienza con la activación de YES mediante el receptor GP130, permitiendo su traslocación al núcleo y la unión a TEAD2, permitiendo unirse al promotor de *Oct4* e inducir su expresión (Tamm *et al.*, 2011).

Por último, LIF también parece producir en menor medida la activación de la ruta pro-diferenciación **MAPK-ERK**, que antagoniza la expresión nuclear de *Tbx3* inhibiendo la expresión de *Nanog* (Niwa *et al.*, 2009).

Vía canónica de Wnt

Parecido a la activación de la ruta de MAPK/ERK por LIF, la señalización por la vía de Wnt contribuye al mantenimiento de la pluripotencia reprimiendo la diferenciación (Aubert *et al.*, 2002). Las proteínas Wnt se unen a su receptor de membrana LRP5/6 y Frizzled, que reclutan a la axina mediante la proteína DVL. La axina forma parte de un complejo intracelular junto con APC y GSK3 β , que se encarga de fosforilar la β -catenina citoplasmática (Figura 8). La β -catenina fosforilada es marcada para su degradación mediante una ruta mediada por ubiquitina. De esta forma, en ausencia de Wnt, este complejo actúa degradando la β -catenina, manteniendo baja su concentración en el citoplasma.

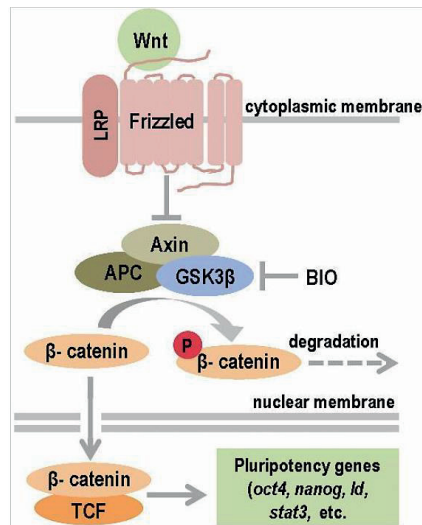


Figura 8. Vía canónica de Wnt. Imagen reproducida de Arabadjiev *et al.*, 2012: *Of mice and men – differential mechanisms of maintaining the undifferentiated state in mESC and hESC*. Creative Commons License CC-BY 4.0.

Sin embargo, cuando las proteínas Wnt están presentes, DVL impide la formación del complejo de fosforilación de la β -catenina, la cual se acumula en el citoplasma y, cuando supera cierto umbral, se transloca al núcleo, donde aumenta la expresión de factores de pluripotencia mediante su unión a la familia de factores de transcripción TCF. La principal interacción de la β -catenina es con TCF3 (Kelly *et al.*, 2011; Yi *et al.*, 2011). TCF3 es un factor que antagoniza la acción de SOX2 y OCT4, sin embargo, en su unión con β -catenina se suprime esta actividad antagonista,

permitiendo la expresión de genes de pluripotencia como *Oct4*, *Nanog*, *Id*, *c-Myc*, *Stat3* y *Esrrb* (Blair *et al.*, 2011; Sokol, 2011; Wray *et al.*, 2012).

Señalización TGF- β

La superfamilia del factor de crecimiento transformante beta (TGF- β) incluye las isoformas TGF β , activina, nodal y BMPs, que se pueden unir a los receptores I de tipo ALK y receptores II BMPRII o TGFRII de la membrana plasmática, activándolos e iniciando la cascada de señalización en el interior celular. La ruta de señalización TGF- β actúa principalmente mediante los factores de transcripción SMAD, que presentan tres categorías: SMADs reguladores (R-SMADs), SMADs cooperadores (Co-SMAD), y SMADs inhibidores (I-SMADs) (Figura 9). La unión de TGF β , activina y nodal llevan a la fosforilación y activación de los R-SMAD2,3, mientras BMP4 lleva a la activación de los R-SMAD1, 5 y 8 en mESCs. Una vez activados, estos complejos R-SMAD se unen al único Co-SMAD descrito en mamíferos, SMAD4, permitiendo su traslocación al núcleo (Shi and Massagué, 2003; Arabadjev *et al.*, 2012). En ausencia de su efector, los I-SMAD (SMAD6 y SMAD7) compiten con Co-SMAD para unirse a R-SMAD, dando lugar a su degradación, y bloqueando la señalización resultante (Hassani *et al.*, 2014b).

De esta forma, BMP4 se une a los receptores I ALK1, 2, 3 o 6 y al receptor tipo II BMPRII, reclutando y activando el complejo SMAD1/5/8, que unido a SMAD-4 se transloca al núcleo donde estimula la expresión de inhibidores de la diferenciación (*Id*), suprimiendo la expresión de muchos genes asociados a diferenciación celular, sobre todo diferenciación neuronal, además de mantener la pluripotencia de las mESC (Ying *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2010). También estimula la expresión de *Dusp9*, que inactiva ERK, restringiendo la diferenciación a los diversos linajes y manteniendo la pluripotencia de las mESCs (Papatsenko *et al.*, 2018).

Por el contrario, TGF β , activina y Nodal, mediante el receptor I ALK4, 5 o 7 y el receptor tipo II TGFRII, permiten la activación de SMAD2,3 y la formación de un complejo junto con SMAD4, cuya traslocación al núcleo provoca la transcripción de factores de diferenciación a diferentes tejidos celulares (Zhou *et al.*, 1993; Shen, 2007). Esta vía de señalización TGF β /SMAD2,3 está activa de manera autocrina y su inhibición reduce la propagación de las mESCs (Ogawa *et al.*, 2006; Watabe and Miyazono, 2009). Sin embargo, algunos estudios sugieren que la perturbación de esta

señalización TGF β no afecta a la autorrenovación de las mESC (Fei *et al.*, 2010; Galvin *et al.*, 2010). Finalmente, Hassani *et al.*, (2014a) sugieren que la inhibición de ALK4, 5 y 7, mediante el inhibidor SB431542 (SB), indirectamente activa la vía BMP4/Id promoviendo la pluripotencia.

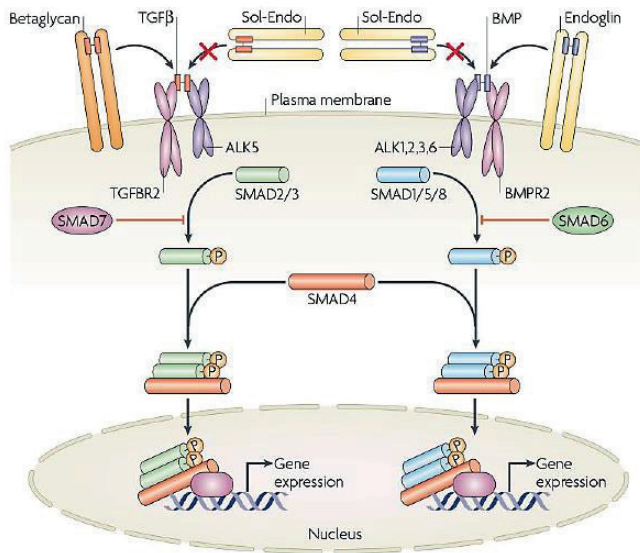


Figura 9. Vía de TFB- β . Imagen reproducida con permiso de Springer Nature: Nature Reviews Molecular Cell Biology. *Extracellular control of TGF β signalling in vascular development and disease*. Ten Dijke and Arthur. Copyright (2007).

Vía MAPK/ERK

ERK1 y ERK2 son dos miembros de la familia de las MAPK, las cuales están implicadas en la regulación de procesos durante la fase G1 del ciclo celular (Meloche and Pouyssegur, 2007; Arabadjiev *et al.*, 2012).

El principal mecanismo de activación de esta vía está asociado con RAS, el producto de un protooncogen que se activa cuando se une a su receptor un factor de crecimiento como FGF. Esto provoca la unión de RAS a un complejo formado por SHP2, GRB2 y el factor SOS de intercambio de nucleótidos de guanina, lo que promueve la fosforilación de RAS-GDP a RAS-GTP, activándose e iniciando una cascada de señalización junto con RAF. Uno de los eventos de esta cascada es la activación de ERK1/2, mediante la fosforilación por parte de MEK1/2, permitiendo su entrada al

núcleo, dónde activa varios factores de transcripción asociados con la regulación positiva del ciclo celular como c-JUN, c-FOS, ETS y ELK (Lee and McCubrey, 2002). Sin embargo, aunque esta cascada de señalización RAS/ERK1/2 estimula la proliferación celular, se ha comprobado que en mESCs esta vía provoca la diferenciación celular (Yoshida-Koide *et al.*, 2004).

2.3. SISTEMAS DE DERIVACIÓN Y CULTIVO

2.3.1. Fondo genético de los embriones

La primera vez que se obtuvieron mESCs fue a partir de embriones de la cepa de ratón 129 (Evans and Kaufman, 1981), viéndose más tarde que era más fácil obtener líneas de esta cepa que de otras (Brook and Gardner, 1997). De esta forma, se clasificaron las cepas de ratón en cepas permisivas para la obtención de mESC (como 129Sv, C57BL6), no permisivas (como NOD, CBA y FVB) e intermedias (como BALB/c) (Kawase *et al.*, 1994; Nagafuchi *et al.*, 1999; Brook *et al.*, 2003; Ohtsuka and Niwa, 2015). Además, parece ser que una cepa híbrida, como por ejemplo la cepa B6CBAF1, formada a partir de una hembra de cepa permisiva (C57BL) y un macho de una cepa no permisiva (CBA), presentaba una permisividad heredada dominante (Vila-Cejudo *et al.*, 2019). Esta diferencia de permisividad parece tener que ver con una mayor activación de la vía de JAK/STAT en las cepas permisivas en presencia de LIF, mientras las cepas no permisivas presentan mayor activación de la vía de señalización de MAPK/ERK (Ohtsuka *et al.*, 2015) (Figura 10). Por ello, una inhibición de la vía de señalización de MAPK, como con el uso del cocktail de 2i (apartado 2.3.4), facilitó la derivación de mESCs a partir de cepas no permisivas (Ying *et al.*, 2008), lo que permitió romper la barrera del fondo genético en la derivación de mESCs a partir de blastocistos (Nichols and Smith, 2009) y a partir de blastómeros aislados (Hassani *et al.*, 2014a).

2.3.2. Estado de desarrollo de los embriones

Tradicionalmente, las ESCs se obtienen a partir de la ICM de embriones en estadio de blastocisto (Bc-ESC) (Evans and Kaufman, 1981; Martin, 1981; Thomson, 1998), pero otra alternativa es utilizar embriones en estadios previos, como embriones a 8 células o mórula (Eistetter, 1989; Strelchenko *et al.*, 2004; Tesar, 2005; González *et al.*, 2010). Derivar a partir de embriones previos a estadio de mórula supone la ventaja de utilizar embriones más tempranos en el desarrollo, cuando aún no se ha producido la primera segregación embrionaria en ICM y TE y, por tanto,

teóricamente tendrían un mayor potencial para producir mESC. Sin embargo, derivar a partir de embriones completos comporta la destrucción del embrión, lo que supone una gran controversia ética y moral, sobre todo en humano, por lo que numerosos estudios han intentado la derivación de ESCs a partir de blastómeros aislados (Bm-ESC) obtenidos mediante biopsia embrionaria, tanto en ratón como en humano (Delhaise *et al.*, 1996; Chung *et al.*, 2006, 2008; Klimanskaya *et al.*, 2006; Wakayama *et al.*, 2007). Utilizar una sola célula del embrión para el proceso de derivación permite la generación de ESCs sin destruir el embrión, ya que este es capaz de mantener su viabilidad (Chung *et al.*, 2008). Esto permitiría la generación de ESCs a partir de un embrión valioso sin destruirlo. Otra alternativa es utilizar todos los blastómeros del embrión por separado para derivar Bm-ESCs de forma que, aunque se produce la destrucción del embrión, la probabilidad de obtener al menos una línea de ESCs por embrión es mayor. Además, se necesitan menos embriones para generar un mayor número de líneas Bm-ESCs (González *et al.*, 2010; Vila-Cejudo *et al.*, 2019).

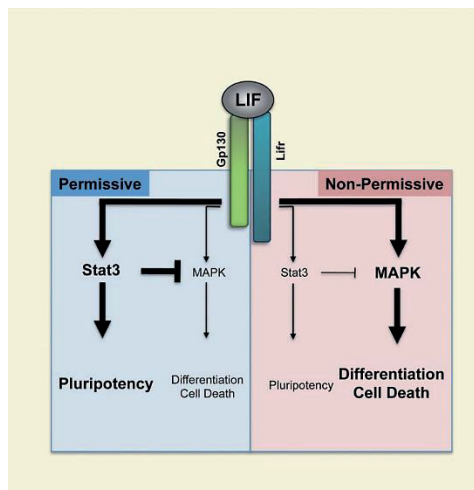


Figura 10. Diferencias en la activación de las vías de señalización mediadas por LIF entre cepas de ratón permisivas y no permisivas para la derivación de células madre embrionarias. Imagen reproducida de Ohtsuka *et al.*, 2015: *LIF signal in mouse embryonic stem cells*. Creative Commons License CC-BY-NC 4.0.

Derivar a partir de blastómeros presenta también la ventaja de utilizar blastómeros previos a la primera segregación embrionaria, los cuales podrían no presentar aún ninguna señal específica de linaje, pudiendo dar lugar tanto a células del TE como de la ICM. En este sentido, un estudio de [Zdravkovic et al., \(2015\)](#) comparando ESC humanas (hESCs) obtenidas a partir de blastocistos (Bc-hESC) y hESC obtenidas a partir de blastómeros (Bm-hESC) de embriones a 8 y 12 células observó que las líneas derivadas a partir de blastómeros presentan un transcriptoma enriquecido en genes involucrados en vías relacionadas con la pluripotencia, pero también en vías trofoblásticas y ectoplacentarias, indicando que este tipo de células pueden tener potencial trofoblástico, además de potencial pluripotente ([Zdravkovic et al., 2015](#)). Más tarde, Yang y colaboradores demostraron que la derivación de Bm-mESC puede dar lugar a líneas EPSCs, capaces de formar células de la ICM, así como células de TE en ensayos quiméricos ([Yang et al., 2017a](#)).

Además, la derivación de Bm-mESCs no altera las características morfológicas de las colonias de mESC resultantes ni la expresión de los genes propios de pluripotencia, obteniéndose líneas Bm-mESC con pluripotencia *naïve* capaces de formar células de las tres láminas embrionarias en la especie murina, al igual que cuando se derivan a partir de un blastocisto ([González et al., 2010](#); [Vila-Cejudo et al., 2019](#)). Ocurre parecido en la especie humana, donde las líneas Bm-hESC presentan pluripotencia *primed* al igual que las líneas Bc-hESC, aunque con algunas características propias de la pluripotencia *naïve* ([Massafret et al., en preparación](#)).

Por último, la derivación de ESC a partir de blastómeros puede usarse para estudiar la diferencia de potencial entre los diferentes blastómeros del embrión preimplantacional, permitiéndonos averiguar si todos los blastómeros son igualmente pluripotentes, y capaces de generar ESCs, o, por el contrario, existe alguna predeterminación hacia un destino celular concreto que impida generar líneas de Bm-ESC a partir de alguno de los blastómeros.

A pesar de todas estas ventajas, la tasa de derivación a partir de blastómeros es bastante más baja que a partir de blastocistos. El grupo de [Chung y colaboradores \(2006\)](#) establecieron líneas Bm-mESCs mediante el co-cultivo de los blastómeros de embriones en estadio a 8 células con colonias de mESC ya establecidas, con una eficiencia del 4%. Más tarde, [Wakayama et al., \(2007\)](#),

analizaron la derivación a partir de blastómeros de embriones de estadios de 2 (1/2), 4 (1/4) y 8 células (1/8), observando una disminución en las tasas de derivación a medida que avanzaba el desarrollo embrionario (69% en 1/2, 40-22% en 1/4, 14% en 1/8) (Wakayama *et al.*, 2007). Lorthongpanich y colaboradores también derivaron Bm-mESCs a partir de blastómeros 1/2 y 1/4, pero obteniendo unas tasas de derivación del 5,6% y 0%, respectivamente (Lorthongpanich *et al.*, 2008b). Sin embargo, aunque con blastómeros 1/2 y 1/4 la tasa de derivación es mayor que con blastómeros 1/8, se retira el 50 y 25% de las células del embrión, respectivamente, comprometiendo su viabilidad. Esto no ocurre en embriones en estadio de 8 células, dónde la retirada de una sola célula no compromete el desarrollo a blastocisto del resto del embrión, siendo a la vez capaz de generar células ESC con características pluripotentes a partir de uno de sus blastómeros (Chung *et al.*, 2008).

2.3.3. Superficie de cultivo

Para mantener su capacidad de pluripotencia y autorrenovación durante un largo tiempo, las colonias de mESC normalmente necesitan de un cocultivo con *feeders*, un tipo de células que producen moléculas de adhesión y forman una matriz extracelular, promoviendo la unión de las células, además de liberar factores de crecimiento y citoquinas necesarias para el mantenimiento de la pluripotencia (Llames *et al.*, 2015). Estas *feeders* deben ser inactivadas para evitar su proliferación y crecimiento, pero manteniendo su actividad metabólica, y normalmente se realiza con radiación o mitomicina C. También podemos encontrar otras alternativas sin cocultivo como el uso de Matrigel (Frank *et al.*, 2012) o de componentes de la matriz extracelular como la laminina (Beattie *et al.*, 2005) o la fibronectina (Amit *et al.*, 2004), entre otros.

En ratón, las *feeders* más utilizadas son los MEFs. Estas células secretan factores como LIF, dando lugar a un mayor potencial de soporte del crecimiento de las mESCs en condiciones indiferenciadas (Eiselleova *et al.*, 2008). Sin embargo, la liberación de estos factores no es homogénea, y está influenciada por el pase celular y la cepa genética del ratón (Choupani *et al.*, 2022). Otra alternativa son los fibroblastos de prepucio humano (HFF), que presentan una morfología estable durante más de 20 pases, aguantan más tiempo en cultivo después de la inactivación, y secretan altos niveles de IL-6 y otras citoquinas (Ma *et al.*, 2012; Yang *et al.*, 2016).

Algunos estudios han demostrado que aunque el uso de *feeders* es dispensable cuando se trabaja con líneas Bc-mESC en presencia de LIF y 2i, su uso mejora la eficiencia de derivación, promueve el mantenimiento de las colonias y un cariotipo estable (Czechanski *et al.*, 2014). En cambio, el uso de *feeders* es esencial para derivar mESCs a partir de blastómeros aislados (Hassani *et al.*, 2014a).

2.3.4. Medio de cultivo y suplementos

Históricamente, las primeras ESC se derivaron a partir de blastocistos obtenidos de la cepa 129 de ratón y cultivados en un medio basado en el método de cultivo de las células de carcinoma, lo que incluía MEFs STO como *feeders* y *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) suplementado con 10% de FBS como medio de cultivo (Evans and Kaufman, 1981). Más tarde, se observó que el suero podía ser sustituido por LIF y BMP4 (Ying *et al.*, 2003a). De esta forma, BMP4 y LIF, o por razones económicas FBS y LIF, se estableció como el método de cultivo estándar para las mESC.

LIF es una citoquina que se descubrió como elemento crítico para el mantenimiento de la pluripotencia de las mESCs y la inhibición de la diferenciación celular (Smith *et al.*, 1988; Williams *et al.*, 1988). Como ya se ha comentado, LIF es el principal efector de la vía de señalización JAK-STAT3 que promueve el mantenimiento de la pluripotencia *naïve* (Matsuda *et al.*, 1999; Ohtsuka *et al.*, 2015). Aunque más tarde se descubrió que el uso de inhibidores de ciertas rutas de señalización permite derivar mESC y mantener su pluripotencia sin necesidad de LIF (Ying *et al.*, 2008), suplementar con LIF se sigue utilizando en la mayoría de laboratorios ya que incrementa la expansión clonal y autorrenovación de las mESCs (Blair *et al.*, 2011; Tamm *et al.*, 2013; Hassani *et al.*, 2014b), sobre todo en el caso de derivar a partir de blastómeros aislados, que presenta mayores requerimientos que derivar a partir de blastocistos (Boroviak *et al.*, 2014; Vila-Cejudo *et al.*, 2019).

Por otro lado, el FBS contiene inductores de diferenciación celular y presenta una gran variabilidad entre lotes (Ogawa *et al.*, 2004; Davies and Fairchild, 2012), además de dar lugar a líneas con una gran heterogeneidad en el cultivo (Ying *et al.*, 2008). Para evitar estas desventajas del FBS, se buscaron otras alternativas como el substitutivo del suero *KnockOut* (KSR). KSR es un producto comercial químicamente definido pero de fórmula no revelada, que es más efectivo que

el FBS para la derivación de mESCs de cepas permisivas en presencia de LIF (Bryja *et al.*, 2006; González *et al.*, 2010; Davies and Fairchild, 2012). Aunque el KSR también presenta variabilidad entre lotes, su uso junto con inhibidores de determinadas ruta de señalización permite unas eficiencias mayores del 20% a la hora de derivar a partir de blastómeros aislados (Vila-Cejudo *et al.*, 2019).

Observando que el uso de LIF daba lugar a unas eficiencias de derivación exitosas de Bc-mESCs pero solo a partir de embriones de cepas permisivas, se probaron otras alternativas como utilizar inhibidores de las rutas de señalización que intervienen en el estado de pluripotencia. De esta forma, el grupo de Ying y colaboradores definió el estado de pluripotencia *ground naïve* (Ying *et al.*, 2008), utilizando el cocktail de inhibidores 2i, formado por un inhibidor de la ruta de señalización de MAPK, PD0325901 (PD), y un inhibidor de GSK3, CHIR99021 (CHIR) (Figura 11). La inhibición de GSK3 da lugar a la activación indirecta de la señalización por la vía canónica de Wnt, promoviendo la entrada de β -catenina al núcleo y la transcripción de genes de pluripotencia. Por otro lado, la inhibición de PD inhibe la acción de ERK, inactivando la diferenciación celular.

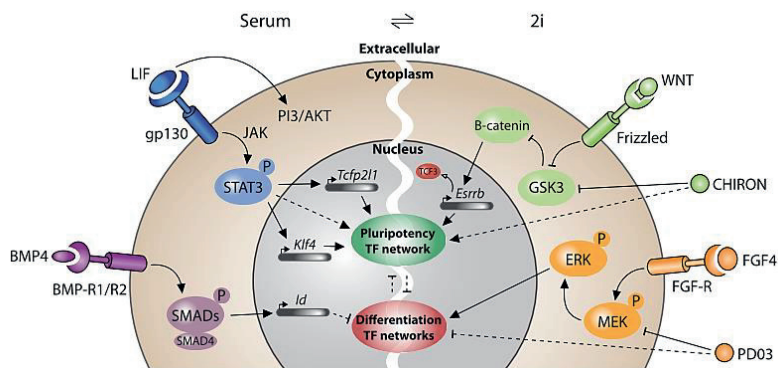


Figura 11. Rutas de señalización principalmente activadas en presencia de suero frente a 2i. Imagen reproducida con permiso de Elsevier: Cell Stem Cell. *Regulatory Principles of Pluripotency: from the Ground State Up*. Hackett and Azim Surani. Copyright (2014).

Aunque se han probado otras moléculas o combinaciones de inhibidores, como el uso del IWR-1-endo (IWR) o utilizar sólo CHIR o PD (Vila-Cejudo *et al.*, 2020), cultivar con 2i ofrece bastantes ventajas con respecto a las demás alternativas. Primero, permite superar la barrera del fondo

genético y obtener buenas eficiencias de derivación de Bc-mESCs (>80%) tanto en cepas permisivas como no permisivas (Ying *et al.*, 2008; Ohtsuka and Niwa, 2015). Segundo, las colonias de mESCs presentan mayor homogeneidad y clonogenicidad, y son transcripcionalmente más parecidas al EPI del embrión preimplantacional (Boroviak *et al.*, 2014). Tercero, permite trabajar con el medio N2B27, en ausencia de FBS y KSR, produciendo un aumento significativo en la tasa de derivación a partir de blastocistos cuando se combina con el cocktail 2i (Ying *et al.*, 2008). Este medio N2B27 promueve una óptima viabilidad celular y, al contrario que el KSR y el FBS, no presenta variabilidad entre lotes. Sin embargo, cuando se deriva a partir de blastómeros aislados en este medio, se produce una gran diferenciación de los *outgrowths* que emergen inicialmente (Vila-Cejudo *et al.*, 2019). Finalmente, el cocktail 2i ha permitido alcanzar unas eficiencias de derivación de hasta el 25% a partir de blastómeros 1/8 en cepas permisivas y refractarias tanto en medio con KSR como en medio N2B27 (Vila-Cejudo *et al.*, 2019; Hassani *et al.*, 2014a).

Sin embargo, las mESC crecidas en presencia de 2i presentan una pérdida de la metilación global del DNA así como una menor integridad cromosómica (Ficz *et al.*, 2013; Choi *et al.*, 2017; Yagi *et al.*, 2017). Debido a que esta última se ha asociado a la inhibición prolongada de FGF-ERK por parte de PD (Choi *et al.*, 2017), el uso de una molécula inhibidora de SRC (CGP77675) en lugar del inhibidor de la vía FGF-ERK, o reducir la dosis del inhibidor PD, dió lugar a mESCs genética y epigenéticamente más estables, sin comprometer su potencial de desarrollo (Shimizu *et al.*, 2012; Choi *et al.*, 2017; Yagi *et al.*, 2017). Por otra parte, los inhibidores de GSK3, como CHIR, también se han propuesto como responsables de provocar cambios en la alineación de los cromosomas, generando una mayor inestabilidad cromosómica (Acevedo *et al.*, 2007; Tighe *et al.*, 2007). En este sentido, sustituir el inhibidor de GSK3 por un inhibidor de la vía de señalización de TGF- β como SB431542 (SB), junto con el uso de PD (Figura 12), conocido como cocktail R2i, llevó a la generación de células mESCs genéticamente más estables (Hassani *et al.*, 2012, 2014c), sugiriendo un posible efecto protector de la inhibición del receptor TGF- β en el genoma de las ESC (Hassani *et al.*, 2019).

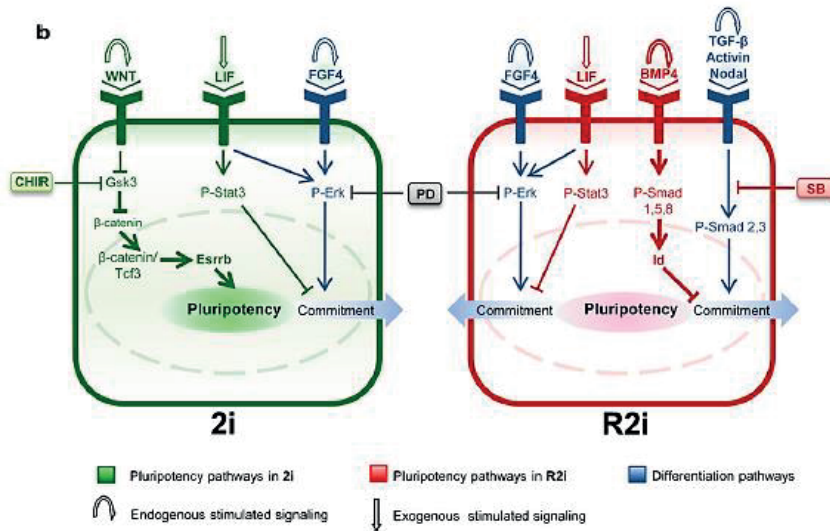


Figura 12. Rutas de señalización moduladas mediante el uso del cocktail 2i versus R2i. Reproducido con permiso de Springer: Stem Cell Reviews and Reports. *Inhibition of TGF β signaling promotes ground state pluripotency*. Hassani *et al.* Copyright (2014).

Pero el mecanismo de acción del SB no está del todo claro. SB es un inhibidor de ALK4, ALK5 y ALK7, bloqueando la acción de SMAD2/3 (Du *et al.*, 2014). La señalización de TGF β -SMAD 2/3 tiene un papel esencial en la especificación de linaje (Zhou *et al.*, 1993), así como BMP4, mediante la inducción de los genes *Id* vía activación de SMAD 1/5/8, tiene un importante rol en la autorrenovación de las mESCs (Ying *et al.*, 2003). Sorprendentemente, el cultivo de mESCs indiferenciadas con SB lleva a una inducción significativa de la señalización de BMP4 mediante un aumento de la expresión de los genes *Id* a través de una regulación transcripcional de SMAD7 (inhibidor de SMAD tanto en la ruta BMP4 como TGF- β) (Galvin *et al.*, 2010). De esta forma, como concluye Hassani *et al.*, (2014), el bloqueo de la señalización TGF- β mediante la acción de SB da lugar a un aumento indirecto de la vía de pro-pluripotencia por BMP4.

El cocktail R2i, al igual que 2i, da lugar a un estado pluripotente *ground naïve*, incluyendo la expresión homogénea de *Oct4*, *Nanog* y *Dppa3*, y una mínima expresión de marcadores típicos de linaje como *Brachyury*, *Lefty1* y *Lefty2*, así como una eficiente clonogenicidad, estabilidad del cultivo e integridad genómica a lo largo de varios pases (Hassani *et al.*, 2014c). Al igual que con 2i, las colonias son redondas y compactas, con límites definidos y con la glucólisis como ruta

metabólica preferente, sobrerregulando enzimas glucolíticas frente a las células cultivadas en suero (Taleahmad *et al.*, 2015, 2018). Además, las mESC cultivadas en R2i presentan mayor metilación del DNA respecto a las cultivadas en 2i, debido a que la ruta de señalización BMP, correlacionada con una mayor metilación del DNA, está menos activa en presencia de 2i (Gomes Fernandes *et al.*, 2016).

Finalmente, la más sorprendente de todas las cualidades del R2i es el aumento de la eficiencia de derivación, generando un 100% de líneas a partir de blastocistos, y hasta un 50% a partir de blastómeros 1/8 en cepas no permisivas, siendo hasta la fecha, y según nuestro conocimiento, la mayor tasa de derivación obtenida a partir de blastómeros aislados (Hassani *et al.*, 2014a). Sin embargo, el número de embriones utilizados en este estudio fue muy bajo (n=8) y ningún otro grupo científico ha conseguido replicar estos experimentos.

Finalmente, la hormona adrenocorticotropa (ACTH) es una hormona proteica producida por la glándula pituitaria e involucrada en la respuesta al estrés biológico. Se observó que promovía la proliferación de mESC y el mantenimiento de su pluripotencia, además de tener un efecto positivo en la derivación y cultivo de Bm-ESC cuando se utiliza en el cultivo hasta la formación del primer *outgrowth* o los primeros pases celulares (Ogawa *et al.*, 2004; Wakayama *et al.*, 2007; Lorthongpanich *et al.*, 2008a; Lee *et al.*, 2012). Aunque se sabe que actúa mediante una vía diferente a la de cAMP-PKA, su mecanismo de acción no está del todo claro (Ogawa *et al.*, 2004). Sin embargo, no se utiliza para la derivación a partir de blastocistos, y algunas líneas Bm-ESC se han obtenido sin necesidad de esta hormona (Hassani *et al.*, 2014a).

3. DETERMINACIÓN DEL DESTINO CELULAR EN EL EMBRIÓN PREIMPLANTACIONAL Y POTENCIALIDAD DE LOS BLASTÓMEROS

3.1. DESARROLLO EMBRIONARIO PREIMPLANTACIONAL Y SEGREGACIÓN CELULAR

El desarrollo embrionario preimplantacional en ratón es un periodo que comienza con la fecundación de ovocito y termina con la implantación del blastocisto en el útero. Este proceso se puede dividir en varias partes fundamentales. Primero, el cigoto (embrión a 1 célula) sufre diversas divisiones incrementando el número de células a 2, 4 y 8 sucesivamente. Este proceso va acompañado de modificaciones genéticas y epigenéticas, como la degradación del mRNA materno y la activación del genoma cigótico (ZGA) en la etapa de 2 células.

Más tarde, en el embrión en estadio de 8 células, se produce la compactación y la polarización. La compactación es uno de los mayores cambios morfogénéticos que sufre el embrión, donde los blastómeros comienzan a aplanarse e incrementan los contactos con sus células vecinas, lo que aumenta el área de superficie (Ducibella and Anderson, 1975). El principal responsable de la compactación y la formación de las uniones célula-célula es la E-cadherina. Si la E-cadherina se neutraliza o se eliminan los iones de Ca^{2+} del medio de incubación de los embriones (lo que previene la acción de la E-cadherina) no se produce la compactación (Ducibella *et al.*, 1977; Vestweber and Kemler, 1984). La E-cadherina está distribuida a lo largo de la membrana plasmática de los blastómeros del estadio a 8 células antes de la compactación, y luego se limita a los sitios de contacto célula a célula durante la compactación (Vestweber and Kemler, 1984). La presencia de filopodios en la superficie de los blastómeros, regulada por E-cadherina (Fierro-González *et al.*, 2013), y la contractibilidad celular, mediada por Cdh1 (Maître *et al.*, 2015), se han propuesto como dos mecanismos que actúan en la dinámica del aplanamiento de los blastómeros y la compactación (Yildirim *et al.*, 2021). En el estadio de 8 células también ocurre la polarización, donde cada blastómero adquiere polaridad apico-basal, mediante la localización apical de microvellosidades, regulada por la proteína Ezrina, y la formación de un complejo formado por

aPKC, PAR3 y PAR6, restringido a las superficies libres de contacto de los blastómeros durante la polarización (Louvet *et al.*, 1995; Pauken and Capco, 1999; Vinot *et al.*, 2005).

Cuando los blastómeros están compactados y polarizados, empiezan a dividirse hasta formar el estado de mórula, en el que se inicia la primera segregación celular, que dará lugar a dos tipos celulares distintos en el blastocisto temprano: el TE, que formará la futura placenta, y la ICM, que formará el embrión propiamente dicho (Sutherland *et al.*, 1990). Para explicar la formación de los dos primeros linajes celulares en el embrión se han propuesto varios modelos.

El **modelo de posición celular o modelo interior-exterior** fue propuesto por primera vez en 1967 (Tarkowski and Wróblewska, 1967) (Figura 13) y postula que las células están expuestas a diferentes microambientes según a su posición dentro del embrión, lo que determinará su identidad celular y la formación de ICM o TE. De esta forma, las células internas que están rodeadas de contactos celulares se convertirán en ICM, mientras que las células externas que formarán el TE tienen tres contactos celulares y una superficie apical libre (Tarkowski and Wróblewska, 1967). Este modelo está apoyado por el hecho de que el reordenamiento de las células dentro del embrión las fuerza a adoptar el destino adecuado de su nueva posición (Hillman *et al.*, 1972; Kelly, 1977; Suwińska *et al.*, 2008). Sin embargo, no puede explicar la existencia de pequeñas poblaciones de células externas apolares que no forman TE, que gradualmente se internalizan y forman ICM (Plusa *et al.*, 2005; Anani *et al.*, 2014).

El otro modelo propuesto es el de **polaridad celular** (Johnson and Ziomek, 1981a,b). Este modelo propone que las células que heredan el dominio apical de membrana durante la división de 8 a 16 células formarán el TE, mientras que las células que no lo heredan serán apolares y forman la ICM. De esta forma, una división asimétrica donde el plano de división es paralelo a la superficie del embrión generará una célula TE con el dominio apical y por tanto polar, y una célula ICM que sólo ha heredado dominios basolaterales y, por tanto, será apolar. Por otro lado, una división simétrica generará dos células con dominio apical que formarán el TE. Sin embargo, hay estudios que demuestran que los dominios apicales se desmontan antes de la división celular y que las células apolares pueden polarizarse espontáneamente horas después de la división, lo que sugiere que

este modelo no puede explicar completamente la segregación de los dos primeros linajes celulares (Anani *et al.*, 2014; Zenker *et al.*, 2018).

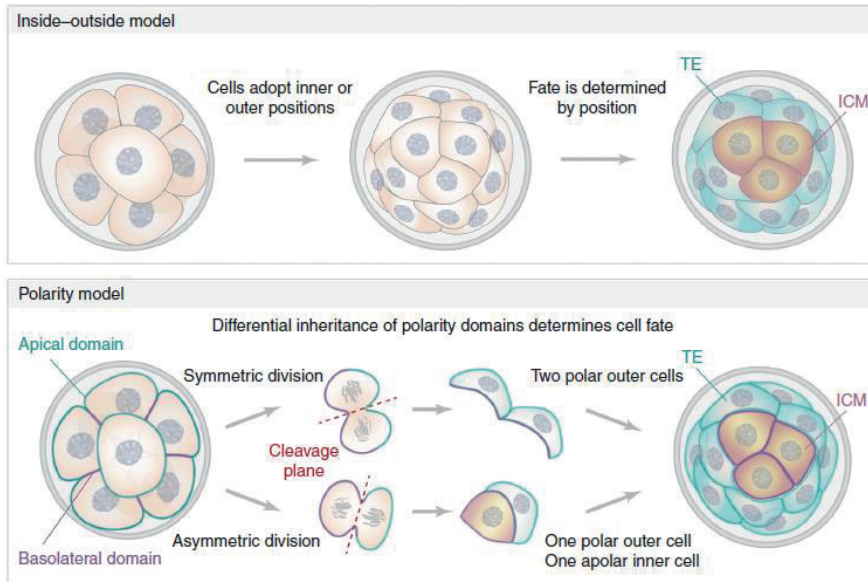


Figura 13. Modelos de la primera segregación celular en el embrión preimplantacional. Reproducido con permiso de Cold Spring Harbor Laboratory Press: *Specification of the First Mammalian Cell Lineages In Vivo and In Vitro*. White and Plachta. Copyright 2020.

Aunque estos dos modelos siempre se han propuesto como contrarios, diversos trabajos demuestran que la señalización Hippo, capaz de regular el destino celular en respuesta a la polaridad celular y a los contactos celulares, reconcilia estos dos modelos (Yagi *et al.*, 2007; Biggins *et al.*, 2015; Saini and Yamanaka, 2018; Yao *et al.*, 2019) (Figura 14). La activación de la señalización Hippo lleva a la fosforilación del factor transcripcional YAP por las quinasas LATS1/2, siendo incapaz de entrar al núcleo y quedando retenido en el citoplasma o degradado mediante proteosomas. Cuando el factor YAP está defosforilado, YAP puede entrar en el núcleo y actuar como cofactor de TEAD4, esencial para la activación de *Cdx2* y *Gata3* que dan lugar a la formación de TE e inhiben la expresión de *Oct4* y *Sox2* (Yagi *et al.*, 2007).

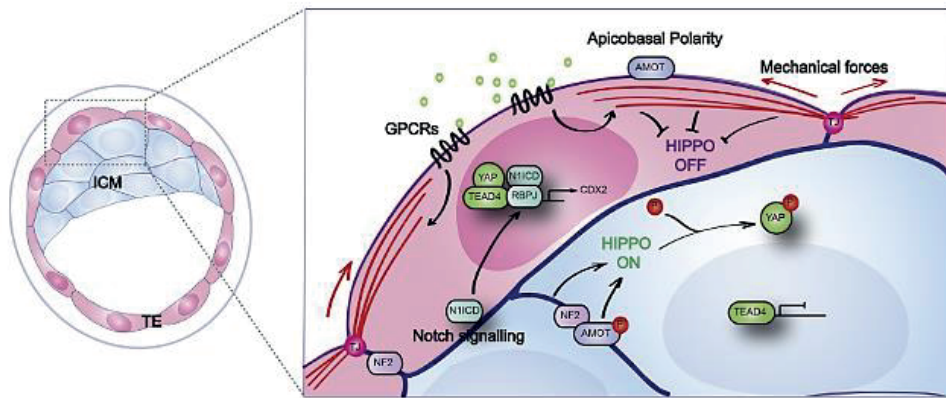


Figura 14. Señalización celular mediada por la vía de señalización Hippo. Reproducido de Biggins *et al.*, 2015: *Towards understanding the roles of position and geometry on cell fate decisions during preimplantation development*. Creative Commons License CC-BY- 4.0.

El estado fosforilado de YAP está regulado por el balance entre polaridad celular y la adhesión célula-célula, finalmente determinado por el destino celular (White and Plachta, 2020). A nivel molecular, estas propiedades son detectadas por la célula mediante la distribución intracelular de angiomotina (AMOT) (Zhao *et al.*, 2011). En las células internas apolares, AMOT se localiza en las uniones adherentes entre las células asociada a un complejo formado por NF2, α -, β - y E-cadherina, activándose mediante la fosforilación de las quinasas LATS1/2 (Nishioka *et al.*, 2009; Cockburn *et al.*, 2013; Hirate *et al.*, 2013). Conjuntamente, la fosforilación de AMOT y LATS1/2 promueve la fosforilación y la exclusión nuclear de YAP1, permitiendo la expresión de los genes asociados a pluripotencia. Por el contrario, en las células externas polarizadas, AMOT queda secuestrado en el dominio apical lejos de las uniones celulares y permaneciendo defosforilado (Hirate *et al.*, 2013). En estas condiciones, la señalización por Hippo permanece inactiva y YAP1 no fosforilado se transloca al núcleo, dónde activa genes relacionados con TE (Hirate *et al.*, 2013; Biggins *et al.*, 2015; Sasaki, 2017).

Aparte de la señalización Hippo, también actúa en paralelo la señalización Notch. La activación de la señalización de Notch causa la traslocación de NICD al núcleo permitiendo su unión al factor de transcripción RBPJ, lo que promueve la expresión de *Cdx2* (Rayon *et al.*, 2014; Watanabe *et al.*,

2017). Estudios recientes han demostrado que la señalización Notch se activa heterogéneamente entre las células tempranas ya en el estadio de 4 células (Menchero *et al.*, 2019).

De esta forma, los factores de transcripción OCT4 y CDX2, al inicio presentes en todas las células del embrión, son los principales reguladores de la primera segregación de los dos primeros linajes celulares, manteniéndose CDX2 en las células de TE, mientras OCT4 se restringe a las células de la ICM debido a la baja presencia de CDX2. La expresión de *Cdx2* es esencial para la expansión del linaje de TE, mientras *Oct4* mantiene la pluripotencia de la ICM (Niwa, 2007; Arnold and Robertson, 2009) (Figura 15).

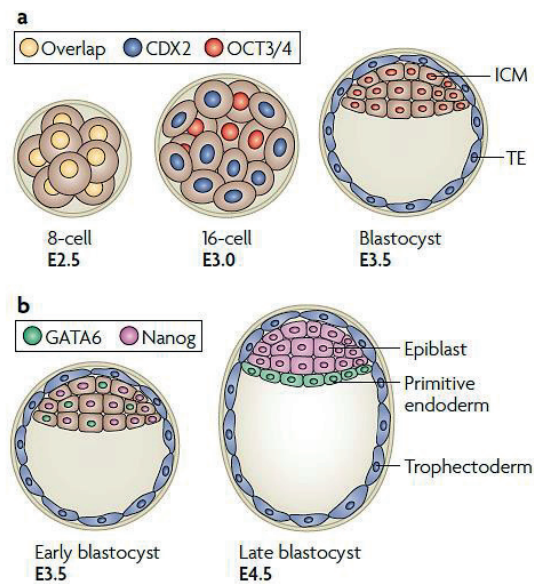


Figura 15. Segregación de los diferentes linajes celulares en el embrión preimplantacional. Reproducido con permiso de Springer Nature: Nature Reviews Molecular Cell Biology. *Making a commitment: cell lineage allocation and axis patterning in the early mouse embryo*. Arnold and Robertson. Copyright (2009).

En el estadio de blastocisto ocurre la segunda segregación embrionaria, cuando la ICM se divide en EPI y hipoblasto o endodermo primitivo (PE). El EPI es el linaje celular que mantiene la pluripotencia y dará lugar al embrión propiamente dicho en las siguientes etapas del desarrollo, mientras que el PE principalmente contribuye a las membranas extraembrionarias, como el saco

amniótico. Las células EPI se caracterizan por expresar factores de pluripotencia como NANOG, mientras las células PE presentan una activación de GATA6 (Figura 15) (Arnold and Robertson, 2009). Sin embargo, no se conoce exactamente como se regula este proceso, aunque diversos estudios lo relacionan con la actividad de FGF/ERK (Chazaud *et al.*, 2006; Saiz *et al.*, 2016; Simon *et al.*, 2020). En la etapa de blastocisto, las células de la ICM primero expresan factores de pluripotencia como NANOG, SOX2, OCT4 y FGF4, en un patrón espacial variegado aparentemente con distribución al azar (Chazaud *et al.*, 2006). Más tarde, *Fgf4* es el primer gen en expresarse diferencialmente en la ICM, llevando a la activación de la señalización de ERK, promoviendo la represión de *Nanog* y sobreexpresando *Gata6*, dando lugar a la diferenciación a PE. De esta forma, las células PE presentan elevados niveles de actividad FGF/ERK, mientras el EPI pluripotente presenta unos niveles basales (Chazaud *et al.*, 2006; Chazaud and Yamanaka, 2016; Saiz *et al.*, 2016; Simon *et al.*, 2020). Por otro lado, la expresión de *Nanog* produce la especificación de las células a EPI asegurando la expresión de marcadores de pluripotencia (Allègre *et al.*, 2022).

3.2. HETEROGENEIDAD DE LOS BLASTÓMEROS EN ESTADIOS TEMPRANOS DEL DESARROLLO

Tradicionalmente, se ha considerado que no había diferencias entre las células del embrión de ratón hasta el estadio de 16 células (Hiiragi and Solter, 2004; Alarcón and Marikawa, 2005; Motosugi *et al.*, 2005; Guo *et al.*, 2010). Sin embargo, nuevos estudios están sacando a la luz diferencias entre blastómeros en estadios tempranos embrionarios, incluso en la primera división embrionaria (Biase *et al.*, 2014; Piras *et al.*, 2014; Shi *et al.*, 2015). Hasta el estadio de 2 células, el genoma cigótico aún no está activado y el desarrollo está dirigido principalmente por factores maternos, de forma que la activación del genoma cigótico se ha propuesto como la principal causa de la diferencia de potencial en los blastómeros tempranos (Shi *et al.*, 2015; Gao *et al.*, 2017; Zhang *et al.*, 2018).

Algunas de las primeras diferencias encontradas entre las células embrionarias son a nivel epigenético. Por ejemplo, en el estadio de 4 células es evidente una asimetría en los niveles de metilación de H3R17 y H3R26 y en la expresión de los modificadores de la cromatina CARM1 y PRDM14 (Torres-Padilla *et al.*, 2007; Burton *et al.*, 2013). Las células con altos niveles de

metilación en H3R17 y H3R26 en el estadio de 4 células contribuyen a la ICM, por lo que los niveles de metilación de H3 se han propuesto como un influyente en la determinación del destino celular. Además, la sobreexpresión de CARM1 lleva a un incremento de la metilación H3R26, asociado con un posicionamiento de la célula hacia ICM (Torres-Padilla *et al.*, 2007; Burton *et al.*, 2013).

Los blastómeros tempranos también presentan diferencias transcripcionales. Por ejemplo, la expresión de *Cdx2* comienza en el estadio tardío de 8 células, pero solo en dos o tres blastómeros (Dietrich and Hiiragi, 2007; Jedrusik *et al.*, 2008; Ralston and Rossant, 2008). Además, la expresión de *Nanog* es indispensable para el mantenimiento del EPI, y empieza en algunos blastómeros en el estadio de 4 células (Toyooka, 2020; Allègre *et al.*, 2022). También se detectan diferencias entre los blastómeros del estadio a 4 células en la expresión de *Oct4*, *Sox2*, y factores reguladores como *Sox21* (Goolam *et al.*, 2016; White *et al.*, 2016) y *Gadd45a*, el cual codifica una proteína involucrada en reparación del daño en el DNA (Rosàs-Canyelles *et al.*, 2020).

Aparte de estas diferencias transcripcionales y epigenéticas, estudios recientes cuestionan la equivalencia en el potencial de desarrollo y diferenciación de los blastómeros en estadios tempranos. Es evidente que el embrión preimplantacional tiene un potencial de diferenciación menor a medida que avanza su desarrollo embrionario y las células pierden su estado totipotente (Figura 16).

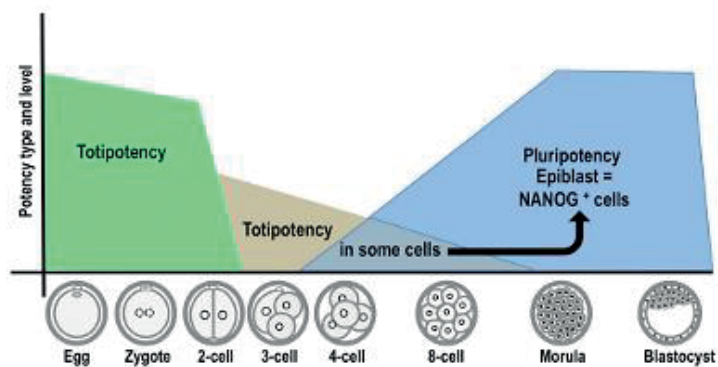


Figura 16. Evolución de la potencialidad con el desarrollo embrionario en ratón. Reproducido con permiso de BIOSIENTIFICA LTD: Reproduction. *Totipotency continuity from zygote to early blastomeres: a model under revision*. Boiani *et al.* Copyright (2019).

Sin embargo, no está claro en qué momento ocurre esta pérdida de potencial, ni si esta predeterminación del destino celular es equivalente entre blastómeros hermanos, ni si es o no reversible. Tradicionalmente, se ha considerado que los diferentes blastómeros de estadios previos a mórula son homogéneos, aunque no sean equivalentes epigenética y molecularmente, siendo capaces de generar linajes embrionarios y extraembrionarios. Por ejemplo, siempre se ha asumido que los blastómeros 1/2 son totipotentes, ya que se ha demostrado que, si se daña un blastómero, el restante puede continuar su desarrollo y formar un ratón viable (Tarkowski and Wróblewska, 1967; Tsunoda and McLaren, 1983). Sin embargo, hay evidencias más recientes de que las células presentan un sesgo del destino celular ya en el estadio de 4 células, e incluso a 2 células (Piotrowska-Nitsche *et al.*, 2005; Morris *et al.*, 2012; Tabansky *et al.*, 2013; Casser *et al.*, 2017, 2018; Boiani *et al.*, 2019; Krawczyk *et al.*, 2021; Maemura *et al.*, 2021).

En el estadio de 2 células, los blastómeros 1/2 aislados son capaces de formar blastocistos, aunque la división celular es más asincrónica y éstos contienen un menor número de células de la ICM, presentando además un número desigual de células de la ICM y TE entre blastómeros hermanos (Katayama *et al.*, 2010). Además, la capacidad de estos blastómeros para generar descendencia viable es de solo el 30% (Tsunoda and McLaren, 1983; Wang and Latham, 1997; Casser *et al.*, 2017). Analizando la capacidad de generar un EPI funcional (precursor de las ESCs), solo un 27-33% de embriones presentan una contribución balanceada de los dos blastómeros en la formación del EPI (Tabansky *et al.*, 2013; Mihajlovic *et al.*, 2015). Además, en un reciente estudio se ha visto que los blastómeros 1/2 de un mismo embrión son capaces de formar linajes celulares de PE y EPI en la ICM solo en un 13% de los casos (Maemura *et al.*, 2021). Esto, junto con otros estudios, deja claro un potencial de desarrollo desigual de las células resultantes de la primera división embrionaria, y que el desarrollo de la ICM y EPI no es uniforme entre blastómeros hermanos (Katayama *et al.*, 2010; Lorthongpanich *et al.*, 2012; Casser *et al.*, 2017; Krawczyk *et al.*, 2021; Maemura *et al.*, 2021).

En blastómeros 1/4, una media del 37% generan blastocistos (Tarkowski and Wróblewska, 1967; Rossant, 1976), llegando a un 52,6% cuando los blastómeros son cocultivados con otros embriones o blastómeros (Krawczyk *et al.*, 2021; Maemura *et al.*, 2021). Además, estos blastómeros son capaces de generar descendencia viable (Maemura *et al.*, 2021; Zhang *et al.*,

2018), aunque la capacidad para formar una población homogénea de ICM y TE por parte de todos los blastómeros del mismo embrión es limitada (Katayama *et al.*, 2010; Krawczyk *et al.*, 2021; Maemura *et al.*, 2021). En un estudio de Tabansky y colaboradores, usando una variante del sistema *Brainbow* para etiquetar cada blastómero por colores y trazar la progenie de cada blastómero, observaron que sólo un 30% de los blastocistos que se desarrollaban presentaban una distribución homogénea de cada blastómero en la ICM (Tabansky *et al.*, 2013).

Por último, el desarrollo de los blastómeros 1/8 de forma aislada está aún más comprometido, obteniendo sólo 0-11% de desarrollo a blastocisto (Tarkowski and Wróblewska, 1967; Rossant, 1976), aunque un 59% de los blastómeros forman una cavidad (Maemura *et al.*, 2021). Además, solo un 3,7% de estos blastómeros son capaces de generar descendencia (Zhang *et al.*, 2018). Por último, la habilidad para formar células de TE, PE y EPI está prácticamente ausente en los blastómeros del estadio de 8 células (Maemura *et al.*, 2021).

Hay que tener en cuenta que analizar la diferencia de potencial entre blastómeros es un asunto difícil de abordar. Primero, porque su estudio implica la disociación del embrión y aislamiento de cada blastómero, lo que debe hacerse de la forma menos invasiva posible (Boiani *et al.*, 2019).

Segundo, porque es difícil extraer resultados concluyentes, en parte debido a la diferencia de homología entre todos los estudios reportados, tanto en las cepas utilizadas, como en las condiciones de cultivo o las pruebas realizadas (Casser *et al.*, 2018). Además, las nuevas tecnologías como las técnicas de secuenciación generan una gran cantidad de datos que a menudo son difíciles de interpretar o generan resultados contradictorios (Taher *et al.*, 2014).

Tercero, el embrión presenta una gran regulación y plasticidad ante el aislamiento, la eliminación o la reordenación de sus blastómeros, de forma que si bien puede haber cierta predeterminación de los blastómeros hacia un destino celular concreto, su aislamiento y cultivo puede dar lugar a cambios en su destino celular o eliminar la predeterminación existente (Suwińska *et al.*, 2008; Chen *et al.*, 2010; Bruce, 2013; Toyooka, 2020). Aunque las diferencias presentes entre blastómeros tempranos pueden deberse al comienzo de la determinación del destino celular y la pérdida de la potencialidad, muchos estudios demuestran que es un proceso gradual pero todavía

reversible. Por otro lado, muchas células de la ICM parecen dar lugar tanto a EPI como a PE, indicando que son bipotentes (Meilhac *et al.*, 2009; Morris *et al.*, 2010; Tarkowski *et al.*, 2010; Yamanaka *et al.*, 2010; Grabarek *et al.*, 2012). Por ejemplo, Saiz *et al.*, (2016) analizaron embriones en estadio de mórula y blastocisto mediante inmunofluorescencia de GATA6 y NANOG observando tres tipos de poblaciones celulares en la ICM: unas positivas para GATA6 dirigidas hacia PE, otras positivas para NANOG destinadas a EPI, y curiosamente una población doblemente positiva para los dos marcadores, lo que ellos consideran es un estado bipotente no dirigido aún a ningún linaje celular. Esto reconcilia los modelos de determinación embrionaria con la plasticidad celular del embrión, dónde hay poblaciones ya determinadas e incapaces de redirigir su destino celular, mientras otras células aún mantienen esta capacidad bipotente, pudiendo reconducir la predeterminación existente (Saiz *et al.*, 2016). Además, Wigger y colaboradores encontraron que en ICM aisladas del blastocisto, en algunas células se silenciaba y en otras se iniciaba la expresión de genes asociados al linaje de PE, cambiando su destino celular de PE a EPI y viceversa (Wigger *et al.*, 2017).

Por otro lado, otra aproximación para estimar el potencial pluripotente de cada blastómero se puede realizar mediante la derivación de ESCs a partir de cada blastómero aislado. Analizando las tasas de derivación de cada estadio embrionario temprano, es evidente la reducción de potencial a medida que avanza el desarrollo, desde un 75% de líneas a partir de blastómeros 1/2, 41% de blastómeros 1/4, a 9-25% de blastómeros 1/8 (Vila-Cejudo *et al.*, 2020; Maemura *et al.*, 2021). Sin embargo, la heterogeneidad entre blastómeros para producir Bm-ESC dentro de un mismo embrión está poco estudiada. En un estudio de González *et al.* (2011) se observó que, a pesar de tener células de la ICM, algunos blastocistos formados a partir de blastómeros 1/2, 1/4 y 1/8 no son capaces de generar mESC. Los blastómeros 1/8 tienden a diferenciarse a TE cuando son aislados de su ambiente natural y pierden las uniones con sus blastómeros vecinos (González *et al.*, 2011a; Lorthongpanich *et al.*, 2012), siendo incapaces de generar ESC a no ser que se añadan aditivos al medio de cultivo que reconduzca su diferenciación hacia ICM. En este sentido, se han conseguido obtener hasta 3 líneas Bm-ESC a partir del mismo embrión en humano (Taei *et al.*, 2013) y hasta 5 en ratón (Hassani *et al.*, 2014a).

De esta forma, es posible que la plasticidad presente en el embrión permita redirigir el potencial de los blastómeros y generar ESC a partir de blastómeros 1/8 aun presentando éstos cierta predeterminación. Dadas las heterogeneidades entre blastómeros tempranos y su gran flexibilidad en el desarrollo, se presume que una parte de los blastómeros tienden a promover el proceso de diferenciación hacia un linaje celular, pero este proceso de diferenciación es todavía reversible y puede cancelarse. Su potencial de diferenciación no está todavía restringido, aunque comiencen a expresar marcadores de linaje y adaptarse a cambios posicionales por cambios flexibles en su destino.

Finalmente, si varios o todos los blastómeros de un mismo embrión son capaces de generar Bm-ESC, no está claro que las líneas generadas sean iguales o equivalentes. Aun utilizando el mismo medio de cultivo, las líneas siempre presentan algún tipo de heterogeneidad entre ellas que podría deberse a los blastómeros originarios de estas líneas. En un estudio de Zdravkovic y colaboradores, analizando el transcriptoma de líneas Bm-hESC, observaron diferencias en las líneas generadas a partir del mismo embrión, lo que hace sospechar que estas diferencias tempranas de los blastómeros se mantienen aún después del proceso de derivación y el posterior cultivo celular (Zdravkovic *et al.*, 2015). Sin embargo, hasta la fecha, sólo este grupo de investigación ha analizado líneas de ESCs generadas a partir de un mismo embrión, y utilizaron un limitado número de líneas: 4 líneas Bm-hESC de un embrión, 3 de un segundo y dos líneas generadas a partir de otros dos embriones. Esta es una limitación del estudio, ya que la tasa de derivación a partir de blastómeros en humano es muy baja, siendo la más alta de un 13% (Taei *et al.*, 2013). Si trasladamos esta perspectiva al ratón, la tasa de derivación está en torno a un 25% (Hassani *et al.*, 2014a; Vila-Cejudo *et al.*, 2019) o el 50% sólo logrado por un grupo de investigación (Hassani *et al.*, 2014a). Aun siendo mayor que en humano, sigue siendo una limitación que impide determinar si la falta de derivación a partir de alguno de los blastómeros se debe a limitaciones biológicas o limitaciones técnicas. Por ello, es importante aumentar la tasa de derivación a partir de blastómeros aislados, que permita abordar con mayor eficacia el estudio de la posible heterogeneidad entre blastómeros a la hora de derivar ESCs y entre las líneas Bm-mESC generadas.

OBJETIVOS

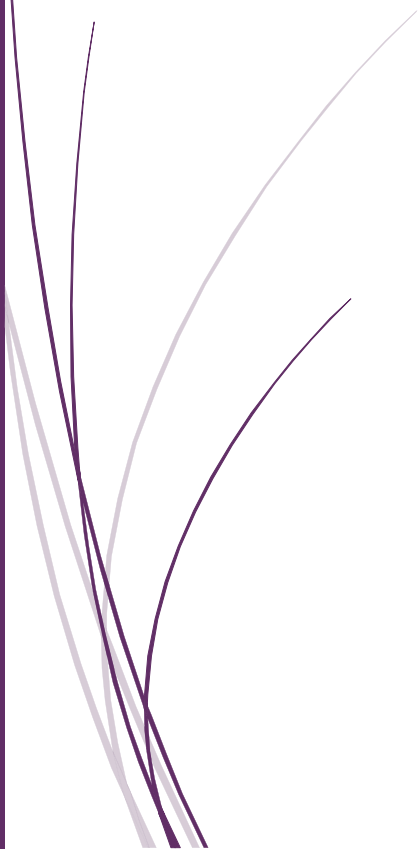


El principal objetivo de esta tesis doctoral es determinar la potencialidad de los blastómeros del embrión de ratón a 8 células, analizando si todos ellos son capaces de generar Bm-ESCs bajo unas condiciones de cultivo adecuadas, produciendo líneas con propiedades semejantes.

Para conseguir este objetivo principal, se han propuesto tres objetivos secundarios:

1. Optimizar el protocolo de derivación de Bm-mESCs analizando las condiciones de cultivo de los blastómeros aislados de embriones a 8 células para maximizar la formación de múltiples líneas a partir de un mismo embrión.
2. Determinar la capacidad de los diferentes blastómeros aislados de un mismo embrión para generar agregados con EPI pluripotente y líneas Bm-mESCs.
3. Analizar si las líneas de Bm-mESCs derivadas de un mismo embrión son equivalentes en cuanto a su patrón de expresión génica y su potencial de diferenciación hacia tipos celulares de las tres láminas embrionarias.

RESULTADOS



Estudio nº 1

Efficient generation of embryonic stem cells from single blastomeres of cryopreserved mouse embryos in the presence of signaling modulators.

Sandra Alonso-Alonso^A, Josep Santaló^A, Elena Ibáñez^{A*}

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

*Corresponding author. Email: elena.ibanez@uab.cat

Published: Alonso-Alonso S, Santalo J, Ibanez E (2022) Efficient generation of embryonic stem cells from single blastomeres of cryopreserved mouse embryos in the presence of signalling modulators. *Reprod Fertil Dev* **34**, 576–587. doi: [10.1071/RD21297](https://doi.org/10.1071/RD21297)

Abstract

Context: Derivation of embryonic stem cells (ESC) from single blastomeres is an interesting alternative to the use of whole blastocysts, but derivation rates are lower and the requirements for successful ESC obtention are still poorly defined.

Aims: To investigate the effects of embryo cryopreservation and of signaling modulators present during embryo culture and/or ESC establishment on ESC derivation efficiency from single 8-cell mouse blastomeres.

Method: Fresh and cryopreserved 2-cell embryos were cultured and biopsied at the 8-cell stage. Single blastomeres were cultured in the presence of 2i or R2i cocktails, with or without adrenocorticotrophic hormone (ACTH). We analyzed ESC derivation efficiencies and characterized pluripotency genes expression and karyotype integrity of the resulting lines. We also evaluated the impact of embryo preculture with R2i on epiblast cell numbers and derivation rates.

Key results: ESC generation was not compromised by embryo cryopreservation and ACTH was dispensable under most of the conditions tested. While 2i and R2i were similarly effective for ESC derivation, R2i provided higher karyotype integrity. Embryo preculture with R2i yielded increased numbers of epiblast cells but did not lead to increased ESC generation.

Conclusions: Our findings help to define a simplified and efficient procedure for the establishment of mouse ESC from single 8-cell blastomeres.

Implications: This study will contribute to improve the potential of this experimental procedure, providing a tool to investigate the developmental potential of blastomeres isolated from different embryonic stages and to reduce the number of embryos needed for ESC derivation.

Keywords: adrenocorticotrophic hormone, embryo cryopreservation, embryo culture, embryonic stem cells, ERK inhibition, mouse embryos, single blastomeres, TGB β inhibition.

Introduction

Embryonic stem cells (ESC) are pluripotent cells with infinite self-renewal ability *in vitro* and able to generate all derivatives of the three embryonic germ layers. These fundamental features enable ESCs to be a powerful tool for basic and applied research in regenerative medicine, development biology, disease modeling and drug testing (Avior *et al.*, 2016; Mahla, 2016; Weinberger *et al.*, 2016).

Traditionally, ESC have been derived from the inner cell mass (ICM) of blastocysts (Bc-ESC) (Evans and Kaufman, 1981; Martin, 1981), but they can also be established from earlier embryonic stages (Strelchenko *et al.*, 2004; Tesar, 2005) and even from single blastomeres (Bm-ESC) (Delhaise *et al.*, 1996; Klimanskaya *et al.*, 2006; Chung *et al.*, 2006; González *et al.*, 2010). In humans, this latter approach could circumvent the ethical concerns associated with embryo destruction and could potentially allow the generation of autologous ESC lines for children born from embryos transferred in preimplantation genetic screening cycles (Klimanskaya *et al.*, 2006). However, the extremely low efficiencies of Bm-ESC derivation in humans have so far precluded the translation of this approach into the clinical practice. A more realistic application of Bm-ESC derivation is based on the separate use of all the blastomeres from an 8-cell embryo to initiate the derivation process. This, though leading to the destruction of the used embryos, could increase the probability of obtaining at least one ESC line from each embryo, thus reducing the total number of embryos needed to generate ESC lines both in clinical and research settings. On the other hand, the generation of Bm-ESC offers a powerful tool to investigate the development potential of blastomeres isolated from mammalian embryos at different developmental stages, and especially past the 2-cell stage, when the ability of all the blastomeres to develop autonomously into blastocysts and liveborn animals is highly reduced (Boiani *et al.*, 2019). Although these applications are feasible in the mouse with the current efficiencies of Bm-ESC derivation, technical limitations still exist and improvements in Bm-ESC derivation, particularly from 8-cell stage embryos, should be implemented to achieve the full potential of this experimental approach.

In humans, hESC are typically derived from cryopreserved embryos, but this practice is uncommon when working with mice, so the effects of cryopreservation on mESC derivation efficiencies and on the characteristics of the lines produced are largely unknown. Nonetheless, the use of

cryopreserved embryos as the source of mESC could help to simplify and optimize the procedure, particularly for the longer and more complex Bm-ESC derivation, involving an extra step of embryo biopsy. So far, only one study has investigated the effects of embryo cryopreservation on mESC derivation, and the authors reported that it probably affected derivation efficiency, as well as the karyotype, pluripotency genes expression, and differentiation capacity of the mESC lines produced from whole blastocysts (Assadollahi *et al.*, 2019). Whether cryopreservation also affects Bm-ESC derivation is presently unknown.

Indeed, requirements for successful Bm-ESC derivation are not exactly the same as for ESC derivation from whole embryos, particularly regarding culture conditions. For instance, the adrenocorticotrophic protein hormone (ACTH), a peptide hormone produced by the pituitary gland and involved in the response to biological stress, is often used for Bm-ESC derivation, but unnecessary for ESC derivation from blastocysts. ACTH has been shown to promote ESC proliferation and to have a positive effect on single blastomere culture and Bm-ESC derivation when present in the derivation medium until outgrowth formation (Ogawa *et al.*, 2004; Wakayama *et al.*, 2007; Lorthongpanich *et al.*, 2008; Lee *et al.*, 2012). Nonetheless, some mouse Bm-ESC lines have been obtained without ACTH supplementation (Hassani *et al.*, 2014a), so it is unclear whether ACTH has an essential role in efficient Bm-ESC derivation, especially from 8-cell stage embryos.

Other signaling modulators have been shown to promote both Bc-ESC and Bm-ESC derivation when added to the culture media. Notably, the introduction of the 2i cocktail to mouse ESC derivation medium (Ying *et al.*, 2008) represented a significant advance in the derivation and pluripotency maintenance of Bc-ESC and Bm-ESC. This cocktail consists of a combination of the mitogen-activated protein kinase (MAPK) kinase (MEK) inhibitor PD0325901 and the glycogen synthase kinase 3 (GSK3) inhibitor CHIR99021. In the case of Bm-ESC from 8-cell blastomeres, derivation efficiencies up to 25% can be obtained when 2i is added to culture medium containing Knockout Serum Replacement (KSR), Leukemia Inhibitory Factor (LIF) and ACTH (Lee *et al.*, 2012; Vila-Cejudo *et al.*, 2019) or N2B27 medium containing LIF (Hassani *et al.*, 2014a). Alternatively, the use of the R2i cocktail, composed of PD0325901 and the transforming growth factor β (TGF β) inhibitor SB431542, has resulted in derivation rates of up to 50% from single blastomeres of 8-cell embryos from the NMRI and BALB/c non-permissive strains in N2B27/LIF (Hassani *et al.*, 2014a).

In addition to the increase in derivation rates, these two cocktails maintain ESC in a ground state of pluripotency, characterized by the expression of core (*Oct4*, *Nanog*, *Sox2*) and naïve (*Rex1*, *Esrrb*, *Tfcp2l1*, etc.) pluripotency markers. However, in the case of the R2i cocktail, the number of 8-cell embryos used in the study was low (n=18) and no other groups have replicated these experiments, so more research is needed to validate the higher efficacy of R2i versus the 2i cocktail in terms of Bm-ESC derivation and to test its potential benefits also in permissive mouse strains. The effects of the two cocktails on Bm-ESC derivation from cryopreserved embryos also deserves investigation.

In this study, we aimed to simplify and improve Bm-ESC derivation by investigating the impact of embryo cryopreservation and culture media supplements (ACTH, 2i, R2i) on Bm-ESC derivation from single blastomeres biopsied from 8-cell mouse embryos from the permissive B6CBAF1 strain. We analyze derivation efficiencies and characterise the expression profile of pluripotency genes and the karyotype integrity of the resulting Bm-ESC lines. In addition, we also evaluate the effect of the preculture of embryos with the inhibitor cocktails prior to ESC derivation.

Materials and methods

Animal procedures

Mouse care and procedures were conducted according to the protocols approved by the Ethics Committee on Animal and Human Research of the Universitat Autònoma de Barcelona and by the Departament d'Agricultura, Ramaderia, Pesca i Alimentació of the Generalitat de Catalunya (permit numbers 4090 and 9995, respectively).

Embryo obtention and cryopreservation

Mouse embryos were obtained from 6-12 weeks old B6CBAF1/J females were obtained from Charles River Laboratories. Females were induced to superovulate by intraperitoneal injection of 5 IU Pregnant Mare's Serum Gonadotropin (Foligon) followed by the injection of 5 IU Human Chorionic Gonadotropin (Divasa-Farmavic) 48 h later, and were mated with B6CBAF1/J males. Embryos were collected at the 2-cell stage by flushing the oviducts with HEPES-buffered KSOM medium (H-KSOM) (Biggers *et al.*, 2000) 48 h later, and were divided into two groups: fresh

embryos, which were immediately transferred to culture dishes, and cryopreserved embryos, which were slow-frozen (Costa-Borges *et al.*, 2009) and stored in liquid N₂ at -196°C for a minimum of 1 month before thawing and culture.

Embryo culture

Fresh and thawed 2-cell embryos were cultured in equilibrated EmbryoMax® KSOM Medium (Merck) covered with mineral oil (Sigma) at 37°C and 5% CO₂ until the 8-cell stage, when the biopsy was performed.

In some experiments, embryo culture media was supplemented with either the 2i or the R2i cocktail (preculture groups). The 2i cocktail was a combination of PD0325901 (Axon Medchem; 1 μM) and CHIR99021 (Axon Medchem; 3 μM), whereas R2i was a combination of PD0325901 and SB431542 (Sigma; 10 μM). These embryos were either biopsied on reaching the 8-cell stage, and blastomeres used for mESC derivation, or maintained in culture until they reached the blastocyst stage, to monitor their development and perform cell counts.

Blastomeres isolation and culture for stem cells derivation

When reaching the 8-cell stage, embryos were biopsied by micromanipulation in PBS (Sigma) supplemented with 1% bovine serum albumin (BSA; Sigma) to obtain single blastomeres. Using a double pipette holder, the zona pellucida was drilled with a 10 μm diameter pipette containing acidic Tyrode's solution and, immediately, all the blastomeres were individually aspirated with a 25 μm diameter biopsy pipette containing PBS with 1% BSA. Within each experimental group, blastomeres isolated from different embryos were pooled and randomly distributed among the different treatments.

The isolated blastomeres were individually transferred to 50 μl drops of mESC derivation medium that contained a feeder layer of mitomycin C-inactivated human foreskin fibroblasts (HFF-1; ATCC SCRC-1041), in a 60 mm Petri dish covered with mineral oil (Sigma). Culture dishes were prepared prior to the biopsy by adding several 50 μl 0.2% gelatin (Sigma) drops on a 60 mm Petri dish. After a 10 min incubation at 37°C, gelatin was pipetted out and HFF solution drops were deposited at the same place and were covered with mineral oil.

Bm-ESC lines were derived using either KSR medium (K-medium) or N2B27 medium (N-medium). The K-medium consisted of DMEM supplemented with 100 μ M 2- β mercaptoethanol (Gibco), 1x non-essential amino acids (Gibco), 50 U/ml penicillin and 50 μ g/ml streptomycin (Gibco), 20% KSR (Life Technologies) and 10^3 U/ml LIF (Merk Millipore). The N-medium was composed of a 1:1 mixture of DMEM-F12 (Gibco) and neurobasal medium plus 100x N2 (Gibco), 50x B27 (Gibco) and 1 mM L-glutamine (Gibco) and was supplemented with 50 μ M 2- β mercaptoethanol, 1x non-essential amino acids, 10^3 U/ml LIF, 50 U/ml penicillin and 50 μ g/ml streptomycin. Both media were also supplemented with the 2i or the R2i inhibitor cocktails. Moreover, when indicated, 0.1 mg/ml ACTH (Prospec) were added during the first week of culture. This resulted in four different treatment groups in terms of the signaling modulators used: 2i, R2i, 2i + ACTH and R2i + ACTH. At least three replicates per treatment were performed, with a total of 60-70 blastomeres seeded for each treatment in K-medium and around 50 blastomeres in N-medium.

Blastomeres were cultured at 37°C and 5% CO₂, changing the medium every 48 h for 7-10 days until *outgrowths* were observed. After the first passage, *outgrowths* were cultured in 4-well plates without ACTH and putative mESC lines were subcultured, using trypsin-EDTA (BioWest), once or twice a week and maintained in culture for at least six passages.

Characterization of stem cell lines

At the seventh passage, the stemness and differentiation potential of all the putative mESC lines were assessed by Alkaline Phosphatase Activity (ALP) staining and immunodetection of pluripotency and differentiation markers. Lines that were positive for these analyses were considered genuine mESC lines.

ALP activity was determined using a commercial kit (Sigma AB0300). Cells were fixed in 4% paraformaldehyde (PFA; Sigma) for 1 min at room temperature (RT) and washed twice with PBS. Then, samples were washed twice with a 1:1 mixture of 5-bromine-4-chloride-3-inodyl phosphate and nitroblue tetrazolium and incubated for 10 min at RT in the dark. The pluripotency of the putative mESC lines was determined by the blue color of the colonies.

For immunofluorescence, putative mESC lines cultured on HFFs on glass coverslips and lines subjected to spontaneous in vitro differentiation, by culturing them in DMEM supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS; BioWest) in feeder-free conditions for 10 days, were fixed to analyse their pluripotency and differentiation potential, respectively. Fixation consisted of an incubation in 4% PFA during 20 min at RT and three washes with PBS for 5 min each at RT. Samples were blocked and permeabilised with a PBS solution containing 0.2% sodium azide (Sigma), 0.5% Triton X-100 (Sigma) and 3% goat serum (BioWest) for 30 min at 37°C. Next, they were incubated with primary antibodies overnight at 4°C, washed three times with PBS for 5 min and incubated with secondary antibodies for 2 h at RT. Samples were washed again three times with PBS for 5 min, and the nuclear material was counterstained with 10 µg/ml Hoechst 33258 (Molecular Probes, Invitrogen) diluted in Vectashield (Vector Laboratories). Finally, samples were mounted and analysed with an epifluorescence microscope (Olympus BX61) and the Cytovision software (Applied Imaging, Inc).

Mouse monoclonal anti-Oct4 (Santa Cruz Sc-5279, 1:50 dilution), rabbit polyclonal anti-Nanog (Abcam, ab80892, 1:100 dilution) and rabbit polyclonal anti-Sox2 (Merck Millipore, ab5603, 1:200 dilution) antibodies were used to detect pluripotency markers. Mouse monoclonal anti-Tubulin β3 (Tuj1; Biolegend 801201, 1:500 dilution), mouse monoclonal anti-α smooth muscle actin (αSMA; Sigma A5228, 1:200 dilution) and mouse monoclonal anti-alpha-fetoprotein (AFP; R&D Systems MAB1368, 1:50 dilution) antibodies were used to detect ectoderm, mesoderm and endoderm differentiation markers, respectively. Secondary antibodies were anti-mouse IgG Alexa Fluor 488 (Molecular Probes - Invitrogen A-21200, 1:500 dilution) for Oct4, Tuj1, αSMA and AFP, and anti-rabbit IgG Alexa Fluor 594 (Molecular Probes - Invitrogen A-11037, 1:500 dilution) for Sox2 and Nanog. All the antibodies were diluted in a PBS-based solution containing 0.2% sodium azide, 0.1% Triton X-100 and 3% goat serum.

Chromosome number analysis

Mouse ESC growing in a 35 mm Petri dish were treated for 7 h at 37°C with 10 µg/ml Karyomax Colcemid Solution (Gibco 15210-040). After trypsinization, resuspended cells were centrifuged for 5 min at 340 g, washed with PBS and centrifuged again for 5 min. Then, the samples were exposed to a 0.075M KCl hypotonic solution for 8 min at 37°C, centrifuged for 10 min at 620 g and fixed in

three methanol: one acetic acid solution. The cell suspension was dropped on degreased slides with absolute methanol previously dried with a tissue for chromosome spreading, aged during 1.5-2 h at 120°C and then stained with 10 µg/mL Hoechst 33258 diluted in Vectashield.

Three mESC lines were analysed for each treatment. Images of 30-40 metaphases per line were taken in an epifluorescence microscope (Olympus BX61) with the Cytovision software (Applied Imaging, Inc) and the number of chromosomes was counted using ImageJ software. Counts of 40 chromosomes were considered as a normal euploid karyotype.

RNA extraction and qPCR

The expression of pluripotency genes (*Oct4*, *Nanog*, *Rex1*, *Esrrb* and *Tfcp2l1*) was assessed by quantitative PCR (qPCR) on some randomly selected blastomere-derived mESC lines (two lines per treatment). STO mouse fibroblast were used as a negative control.

Total RNA was extracted from trypsinized ESC cultures using Maxwell RSC SimplyRNA Tissue Kit (Promega) and its concentration and quality were assessed using a Nanodrop spectrophotometer (ThermoFisher). One microgram of the extracted RNA was used as a template for the reverse transcriptase reaction using the iScript cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad).

The qPCR reactions were performed using iTaq Universal SYBR Green Supermix (Bio-Rad), on a CFX96 Real-Time System thermocycler (Bio-Rad). The amplification program consisted in a first denaturation step of 3 min at 95°C followed by 40 cycles of 10 s at 95°C (denaturing) and 30 s at 60°C (annealing and extension). Finally, to assess the specificity of the amplification product, an additional thermal denaturing cycle was performed to obtain the melt curve of the qPCR products.

Validated commercial PrimePCR SYBR Green Assays (BioRad) for *Oct4* (Pou5f1, qMmuCED0046525), *Rex1* (*Zfp42*, qMmuCID0008767), *Nanog* (qMmuCID0005399), *Esrrb* (qMmuCED0039638) and *Tfcp2l1* (qMmuCID0013329) were used to assess pluripotency. A no template control (NTC) was added for each primer, all samples were tested in triplicate and the results were normalised to *Gapdh* (qMmuCED0027497) expression. The cycle quantification value

(Cq-value) was determined for each sample with the BioRad CFX Maestro 195 Software and relative expression was calculated using the $\Delta\Delta Cq$ method.

Blastocysts cell counts

Some of the embryos precultured in the presence of 2i or R2i were maintained in culture until they reached the blastocyst stage (72 h). Blastocysts were fixed in 4% PFA for 15 min at RT and blocked with a PBS solution containing 1% BSA, 0.05% Tween 20 and 0.2% sodium azide overnight at 4°C. Fixed embryos were incubated with a mixture of mouse monoclonal anti-Oct4 (Santa Cruz Sc-5279, 1:50 dilution) and rabbit polyclonal anti-Nanog (Abcam ab80892, 1:200 dilution) primary antibodies diluted in block solution during 1.5 h at RT. Then, embryos were washed three times with block solution for 10 min and incubated 30 min at RT in the dark with a mixture of anti-mouse IgG-AF488 (Molecular Probes A21200, 6 µg/ml) and anti-rabbit IgG-AF594 (Molecular Probes A11037, 6 µg/ml) secondary antibodies. Finally, they were washed again thrice with block solution for 10 min, counterstained for 10 min with 10 µg/ml Hoechst 33528 diluted in block solution and mounted in 10 µg/ml Hoechst 33258 diluted in Vectashield. The number of total cells (Hoechst staining), ICM cells (positive for OCT4) and epiblast cells (positive for NANOG) were counted on an epifluorescence microscope (Olympus BX61) with the Cytovision and ImageJ software.

In these experiments, around 70 2-cell embryos were cultured per treatment group, with at least four replicates, and around 40 blastocysts per group were used for cell counts.

Statistical analysis

Embryo development, *outgrowth* formation and mESC derivation rates were analyzed with χ^2 and Fisher exact test, using GraphPad Prism software.

Relative expression results from qPCR analyses were compared with an ANOVA test with the Bonferroni correction using the CFX Maestro software (Bio-Rad).

The number of ICM, epiblast and total cells were compared by One-Way ANOVA with post hoc Tukey test, using GraphPad Prism software.

In all statistical analyses, $p < 0.05$ was considered statistically significant.

Results

Effect of embryo cryopreservation, signaling modulators and culture medium on mESC derivation from single blastomeres

In the first set of experiments, a total of 546 blastomeres isolated from 8-cell embryos (n=70) were allocated to eight different experimental groups, depending on the source of embryos (fresh or cryopreserved) and the signaling modulators added to K-medium during mESC derivation (2i or R2i with or without ACTH). In all the experimental groups, most of the outgrowths produced progressed in culture to form mESC lines (Table 1), with no remarkable differences in colonies morphology among them. All 144 mESC lines generated showed stem-cell like morphology (rounded colonies with defined edges), ALP activity, were positive for pluripotency markers (ALP, OCT4 and NANOG) and, after spontaneous differentiation, were positive for markers of three germ layers (TUJ1, α -SMA and AFP) (Fig. 1).

Table 1. Outgrowth formation and derivation efficiencies of mESC lines established under different treatments with signaling modulators in K-medium from single blastomeres of 8-cell embryos obtained from fresh or cryopreserved 2-cell embryos.

Embryo source	Treatment group	Blastomeres (n)	% Outgrowth formation (n)	% mESC lines (n)
Fresh	2i	67	32.8 (22) ^a	31.3 (21) ^a
	R2i	71	38.0 (27) ^a	33.8 (24) ^a
	2i + ACTH	71	28.2 (20) ^{a,b}	22.5 (16) ^{a,b}
	R2i + ACTH	71	16.9 (12) ^b	14.1 (10) ^b
Cryopreserved	2i	61	24.6 (15) ^{a,b}	24.6 (15) ^{a,b}
	R2i	61	19.7 (12) ^b	16.4 (10) ^b
	2i + ACTH	72	27.8 (20) ^{a,b}	26.4 (19) ^{a,b}
	R2i + ACTH	72	38.9 (28) ^a	38.9 (28) ^a

^{a-b} Different superscripts indicate statistically significant differences ($P < 0.05$) among treatment groups within the same embryo source group (χ^2 and Fisher exact test).

In blastomeres biopsied from fresh embryos, the inhibitor cocktails 2i and R2i resulted in similar mESC derivation efficiencies, but addition of ACTH during the first week of culture decreased efficiencies, especially with the R2i treatment (Table 1). In particular, a significant reduction of more than 50% was observed in the R2i group when comparing derivation in the presence or

absence of ACTH. Surprisingly, the reverse was observed in blastomeres obtained from cryopreserved embryos, where addition of ACTH during the first week of culture in the presence of R2i significantly increased derivation efficiencies by more than 50% and yielded the highest derivation rates of all experimental groups (38.9%). No effect of ACTH was observed in the case of 2i treatment. As in blastomeres of fresh embryos, no significant differences between 2i and R2i groups were detected in mESC derivation efficiencies from blastomeres of cryopreserved embryos (Table 1).

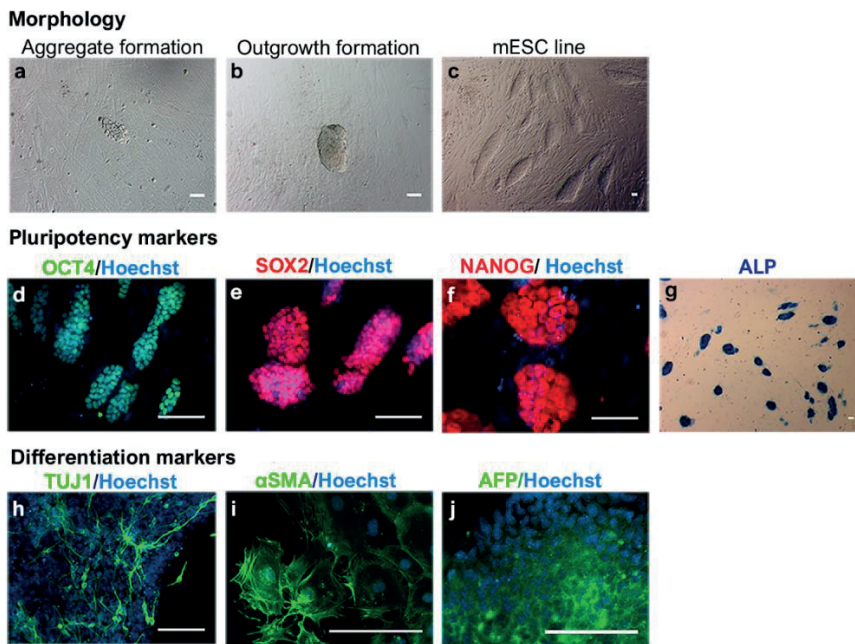


Fig. 1. Morphology of blastomere-derived mESC lines and immunodetection of pluripotency and differentiation markers. (a-c) Morphology of aggregate formation at day 3 of blastomere seeding (a), outgrowth obtained at day 9 (b), and colonies of a mESC line cultured for six passages (c), showing stem cell-like morphology with defined edges. (d-f) mESC colonies expressing pluripotency markers OCT4 (green, d), SOX2 (red, e) and NANOG (red, f). (g) mESC colonies showing alkaline phosphatase (ALP) activity (blue staining). (h-j) mESC colonies expressing ectoderm marker TUJ1 (green, h), mesoderm marker α SMA (green, i) and endoderm marker AFP (green, j) after spontaneous differentiation. In all the immunofluorescence images, nuclear material is counterstained with Hoechst (blue). All the scale bars represent 50 μ m.

The source of blastomeres did not have a remarkable effect on mESC derivation efficiencies either. When comparing results for the same treatment groups between fresh and cryopreserved blastomeres, significant differences were only detected in the case of R2i, both in the presence or absence of ACTH. As mentioned, ACTH had a deleterious effect on mESC derivation from R2i-treated blastomeres isolated from fresh embryos, but a beneficial effect on their cryopreserved counterparts.

In a second set of experiments, mESC derivation was attempted using the same treatments but in N-medium. Given the lack of significant differences between the two embryo sources, only blastomeres obtained from cryopreserved embryos were used in these experiments. Although the percentage of outgrowths formed was high, without significant differences among treatments, massive differentiation occurred at low passages resulting in extremely low rates of mESC derivation in this medium (Table 2).

Table 2. Outgrowth formation and derivation efficiencies of mESC lines established under different treatments with signaling modulators in N-medium from single blastomeres of 8-cell embryos obtained from cryopreserved 2-cell embryos.

Treatment group	Blastomeres (n)	% Outgrowth formation (n)	% mESC line (n)
2i	46	28.3 (13)	2.2 (1)
R2i	46	32.6 (15)	0
2i + ACTH	54	38.9 (21)	0
R2i + ACTH	54	40.7 (22)	3.7 (2)

No significant differences were found among groups.

Effect of embryo cryopreservation and signaling modulators on pluripotency gene expression and karyotype integrity of blastomere-derived mESC lines

Aside from the analyses used to validate the stemness of all the mESC lines obtained, some lines were subjected to further characterisation to assess the effect of embryo cryopreservation and signaling modulators used during derivation and culture on the expression of pluripotency markers (Fig. 2a) and karyotype integrity (Fig. 2b). To determine the effect of signaling modulators, we randomly selected two (for qPCR) or three (for chromosome counts) mESC lines derived from single blastomeres of cryopreserved embryos from all the treatment groups in K-medium (2i, R2i, 2i + ACTH and R2i + ACTH). An equivalent number of lines derived from fresh embryos of the 2i + ACTH group in K-medium was also included to assess the effect of embryo cryopreservation.

Equivalent levels of *Esrrb*, *Nanog* and *Tfcp2l1* gene expression were found by qPCR among the different groups of mESC lines (Fig. 2a). Although lines derived from fresh embryos under 2i + ACTH treatment showed higher levels of expression of *Oct4* and *Rex1*, differences were only significant when compared with lines obtained from cryopreserved embryos under R2i (for *Oct4* expression) and R2i + ACTH (for *Rex1* expression). The lack of significant differences between 2i and R2i groups, with or without ACTH, and between groups with or without ACTH, either in the presence of 2i or R2i, for any of the genes indicates that signaling modulators used during derivation and/or culture have no significant effect on pluripotency gene expression of the mESC lines generated. Nor does embryo cryopreservation, as no differences were detected for any of the genes between lines derived in 2i + ACTH conditions from either fresh or cryopreserved embryos. For all the genes analysed, STO feeder cells, used as a negative control, displayed barely undetectable expression levels (data not shown).

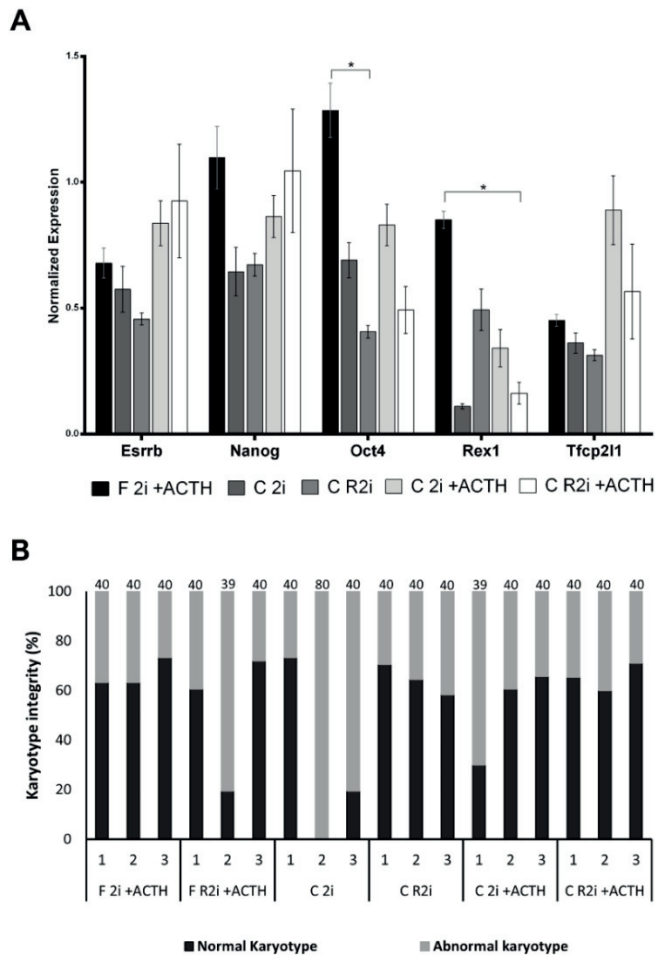


Fig. 2. Expression of pluripotency markers and karyotype integrity in mESC lines established under different treatments with signaling modulators in K-medium from single blastomeres of 8-cell embryos derived from fresh or cryopreserved 2-cell embryos. (A) Expression of pluripotency markers measured by qPCR. *Gapdh* was used for normalisation of cDNA amount. Data represents the mean of two biological and three technical replicates \pm s.e.m. for each treatment group. Significant differences are denoted with $*P \leq 0.05$ (one-way ANOVA with Bonferroni correction). (B) Stacked bar chart showing the percentage of cells with a normal (black) or abnormal (grey) chromosome number for each treatment group. Three mESC lines were analysed for each treatment. Numbers on top of the bars indicate the modal karyotype of each line. F, fresh embryos. C, cryopreserved embryos.

Chromosome counts in mESC lines derived from cryopreserved embryos under R2i treatments, with or without ACTH, showed a normal modal karyotype (40 acrocentric chromosomes) and high percentages (58.3-71.0%) of euploid cells (Fig. 2b). By contrast, mESC lines derived from cryopreserved embryos under 2i treatments presented more chromosomal abnormalities. In particular, in the absence of ACTH one polyploid line and one line showing a chromosomal fusion were observed, and in the presence of ACTH the lack of one chromosome was detected in almost 50% of the cells in one of the three lines studied. These abnormalities were not observed in the 2i + ACTH group derived from fresh embryos, since the three lines analysed presented a normal modal karyotype and high percentages of euploid cells (>60%). To elucidate a potential effect of embryo cryopreservation on the karyotype integrity of the resulting mESC lines, we decided to include a new experimental group: three lines derived from fresh embryos under R2i + ACTH treatment. The results showed that while two lines retained an euploid modal karyotype of 40 acrocentric chromosomes (with >60% of euploid cells), one line suffered the loss of one chromosome.

Effect of signaling modulators in embryo culture medium on blastocyst development, cell counts and mESC derivation

Two-cell embryos were thawed and cultured in the continuous presence of 2i or R2i, in parallel to a control group, and fixed at the blastocyst stage. No significant differences in 8-cell embryo formation or blastocyst development were observed among the three groups (Table 3). However, immunodetection analyses (Fig. 3a) revealed a significantly decreased number of total cells of the blastocysts in the 2i group (77.6 ± 2.0) when compared with the control and the R2i groups (85.4 ± 2.3 and 85.6 ± 1.8 , respectively) (Fig. 3b). While R2i had no effect on total cell numbers, it significantly increased the numbers of both ICM (23.0 ± 0.8) and epiblast cells (14.9 ± 0.7) when compared with the control (19.6 ± 0.6 and 10.3 ± 0.5 , respectively) and the 2i groups (20.1 ± 0.7 and 11.4 ± 0.5 , respectively) (Fig. 3b).

Table 3. In vitro development of 2-cell embryos cultured in the presence or absence of signalling modulators.

Treatment group	Embryos (n)	% 8-cell embryos (n)	% blastocysts (n)
Control	69	82.6 (57)	79.7 (55)
2i	70	77.1 (54)	72.9 (51)
R2i	68	85.3 (58)	83.8 (57)

No significant differences were found among groups.

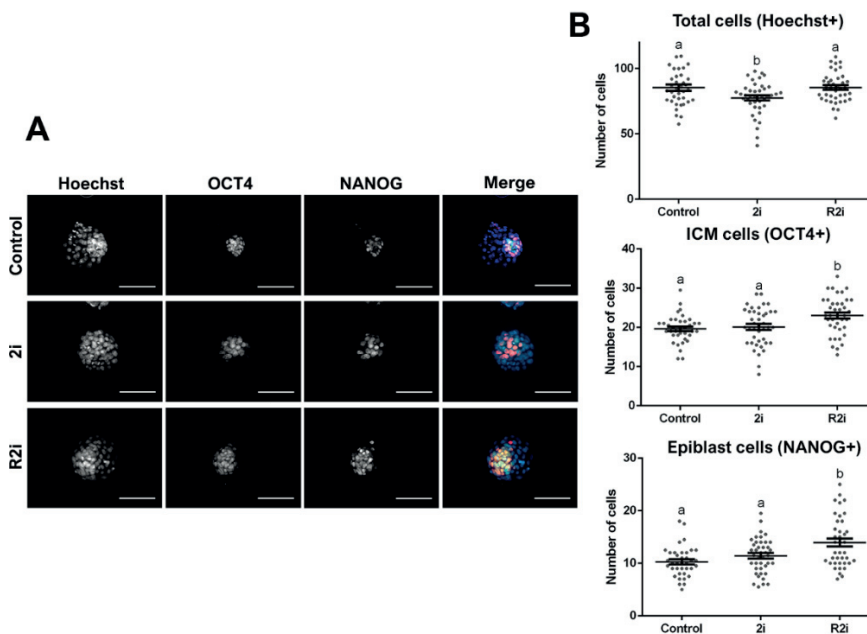


Figure 3. Total, ICM and epiblast cells counts in blastocysts obtained from 2-cell embryos cultured in the presence or absence of signaling modulators. (A). Epifluorescence raw and merge images of blastocysts immunostained for OCT4 and NANOG and counterstained with Hoechst. All the scale bars represent 60 μ m. (B) Mean number \pm s.e.m. of total cells (Hoechst positive), ICM cells (OCT4 positive) and epiblast cells (NANOG positive) in blastocysts. Each grey dot represents the number of cells of a single blastocyst. ^{a-b}Different superscripts indicate statistically significant differences among treatments ($P < 0.05$; ANOVA).

To assess whether the increase in epiblast cells observed with R2i could translate into higher mESC derivation rates from the treated embryos, thawed 2-cell embryos precultured in the presence of R2i were biopsied at the 8-cell stage and individual blastomeres were seeded in K-medium supplemented with LIF, R2i and ACTH. No significant differences in mESC derivation rates from control and R2i precultured embryos were detected (Table 4).

Table 4. Outgrowth formation and derivation efficiencies of mESC lines established from single blastomeres of 8-cell stage embryos obtained from cryopreserved 2-cell embryos cultured with R2i.

Treatment group	Blastomeres (n)	% Outgrowth formation (n)	% mESC lines (n)
Control	347	25.4 (88)	24.8 (86)
R2i	344	29.4 (101)	29.1 (100)

No significant differences between groups.

Discussion

With the aim to simplify and improve Bm-ESC derivation from 8-cell stage mouse embryos, in the present study we evaluated the effect of embryo cryopreservation, derivation medium and signaling modulators on derivation efficiency, pluripotency gene expression and karyotype integrity of Bm-ESC lines. Furthermore, blastocyst formation, blastocyst cell number and Bm-ESC derivation were analysed after embryo culture in the presence of signaling modulators.

Embryo cryopreservation is a common and well-established procedure in mice, as well as in other species. Nonetheless, several studies have shown that it can induce alterations in cytoskeletal organisation, mitochondrial function, gene expression patterns, blastocyst cell numbers and allocation of cells to the ICM and trophectoderm (TE), among others, thus compromising the developmental potential of the thawed embryos (Sohn *et al.*, 2002; Larman *et al.*, 2011; Shin *et al.*, 2011; Dasiman *et al.*, 2013). Because of this, embryo cryopreservation could potentially impact subsequent ESC derivation from the thawed embryos and the characteristics of the ESC lines established, an issue that has been scarcely investigated. In the present study, blastomeres

obtained from frozen-thawed embryos produced Bm-ESC lines with similar efficiencies than blastomeres obtained from fresh embryos, and no significant differences in terms of pluripotency gene expression or karyotype integrity were observed between the Bm-ESC lines derived from both embryo sources. These results enable us to uncouple ESC derivation from embryo collection, thus shortening and simplifying Bm-ESC derivation experiments and optimising the use of the embryo donor females. Moreover, by using cryopreserved embryos, donor embryos are available for biopsy and Bm-ESC derivation at any time and derivation experiments are not subjected to the availability of female mice, superovulation schedules or superovulation success.

Our results differ from those observed in a previous work by [Assadollahi *et al* \(2019\)](#) that, to the best of our knowledge, is the only other study on the effects of embryo cryopreservation on mouse ESC derivation. In that study, C57BL/6 mouse embryos vitrified at the 8-cell stage were used for Bc-ESC derivation in 3i + LIF medium. Despite the limitations of the study (only five cryopreserved embryos used and no fresh control group), the authors concluded that cryopreservation seems to affect ESC derivation efficiency as well as the characteristics of the generated lines, such as karyotype or expression of pluripotency genes. Dissimilarities in the mouse strains, embryo stage at the time of cryopreservation, cryopreservation method, number of embryos used, source of the ESC (whole blastocysts vs. single 8-cell blastomeres) and derivation medium employed could explain the different outcomes of the two studies.

A recent study by [Vila-Cejudo *et al* \(2019\)](#) showed that the original classification of mouse strains into permissive and non-permissive for Bc-ESC derivation ([Kawase *et al.*, 1994](#); [Brook and Gardner, 1997](#)) also stands when ESC are derived from single blastomeres, and this study further identified the hybrid B6CBAF1 strain as permissive for both Bc-ESC and Bm-ESC derivation. But they also demonstrated that, contrary to what occurs during Bc-ESC derivation, the effect of the embryos' genetic background on Bm-ESC derivation is not abolished by the addition of the 2i cocktail. R2i has been proposed as an alternative to the widely used 2i and proved to be as efficient as 2i in the derivation of Bc-ESC from several refractory strains and in the maintenance of these cells in a ground state of pluripotency ([Hassani *et al.*, 2012, 2014b](#)). R2i has also been used for ESC derivation from single blastomeres of mouse embryos at the 2-, 4- and 8-cell stages, but only from

two non-permissive strains, resulting in approximately two-fold higher efficiencies of Bm-ESC derivation than when 2i was used (Hassani *et al.*, 2014a).

Our results corroborate that R2i produces high ESC derivation efficiencies from single blastomeres from 8-cell embryos also in a permissive strain, but we failed to detect significant differences between 2i and R2i. Bm-ESC derivation rates in 2i (22.5%-31.3%) were similar or slightly higher than those previously obtained by our group (22.9%; Vila-Cejudo *et al.*, 2019) in the same mouse strain and culture conditions (KSR + ACTH + LIF) and than those reported by Hassani *et al.* (2014a) in the non-permissive strains cultured in N2B27 + LIF (23%-25%). Nonetheless, the derivation efficiency in R2i was slightly lower in our study (38.9% in the most efficient conditions) than the 46-50% obtained by Hassani *et al.* (2014a). We tried to replicate the culture conditions from this other study by using N2B27 medium but, in agreement with previous results in our laboratory (Vila-Cejudo *et al.*, 2019, 2020), we did not succeed in establishing Bm-ESC lines in this medium or did so but with extremely low efficiencies (<4%) both when using 2i as when using R2i. Thus, in our hands, ESC lines can only be efficiently established from single blastomeres of 8-cell embryos in KSR + LIF + 2i or KSR + LIF + R2i.

Bm-ESC lines derived under 2i and R2i displayed similar expression levels of core and naïve pluripotency genes, but R2i resulted in a higher number of lines with an euploid karyotype. These results are in agreement with those previously reported in Bc-ESC lines (Hassani *et al.*, 2014b), suggesting that the effects of these inhibitor cocktails on pluripotency gene expression and karyotype integrity is equivalent in Bc-Esc and Bm-ESC lines and across strains. The higher number of euploid lines under the R2i treatment may be attributed to the absence of CHIR99021 in this cocktail, as it has been reported that prolonged inhibition of GSK3 induces chromosomal instability in cultured cells (Tighe *et al.*, 2007).

On the other hand, since the report that ACTH supports proliferation of single mouse ESC cells in KSR + LIF without loss of pluripotency (Ogawa *et al.*, 2004), ACTH has been regularly added to the culture medium for the derivation of mouse ESC from single blastomeres, both in the absence or presence of 2i (Wakayama *et al.*, 2007; Lorthongpanich *et al.*, 2008; González *et al.*, 2010; Lee *et al.*, 2012; Vila-Cejudo *et al.*, 2019). Some of these studies have proved that single blastomeres

from 2- and 4-cell stage mouse embryos produce higher rates of Bm-ESC in the presence than in the absence of ACTH (Lee *et al.*, 2012; Lorthongpanich *et al.*, 2008). But no true comparisons have been made with blastomeres from embryos at the 8-cell stage. Our results demonstrate that, under 2i conditions, generation of ESC from single blastomeres of 8-cell embryos is not significantly enhanced by the presence of ACTH. These results agree with those obtained by Gonzalez *et al.* (2010), though in that study the derivation medium lacked 2i and culture conditions slightly differed between blastomeres cultured in the presence or absence of ACTH. Concerning R2i, there are no reports on the combined effects of this inhibitor cocktail and ACTH on ESC derivation. Our observation that ACTH induced a significant decrease in Bm-ESC derivation rates in the R2i group when blastomeres were obtained from fresh embryos suggests a deleterious effect of the R2i + ACTH combination. Interestingly, such a deleterious effect was also observed in blastocyst formation from 2-cell mouse embryos cultured in N2B27 + LIF + R2i in the presence of ACTH (Hassani *et al.*, 2014a). Surprisingly, when blastomeres were obtained from cryopreserved embryos, we observed the opposite effect, as Bm-ESC derivation in R2i conditions was significantly improved by the presence of ACTH. We cannot provide an explanation for these apparently incoherent effects of ACTH in fresh and cryopreserved embryos, and this issue deserves further investigation. In any case, our results indicate that ACTH is dispensable for Bm-ESC generation from blastomeres of 8-cell embryos, except when cryopreserved embryos are used as the source of blastomeres and derivation is performed under R2i conditions. As expected, because ACTH was only present during the first week of culture, no long-term effects of ACTH (either positive or negative) were detected in pluripotency gene expression or karyotype integrity of the established Bm-ESC lines.

Last, to try to further improve Bm-ESC derivation rates, we precultured the embryos in the presence of 2i or R2i cocktails from the 2-cell stage. Signaling pathways play a critical role in the first two differentiation events during early embryo development: the segregation of the ICM and TE and, subsequently, the segregation of the epiblast and hypoblast from the ICM. Thus, modulation of the endogenous signaling pathways can alter these differentiation events and shift the balance of cells allocated to each lineage, as demonstrated by increased epiblast cells numbers in mouse and human embryos cultured in the presence of 2i (Nichols *et al.*, 2009; Van Der Jeught *et al.*, 2013). Contrary to these previous results, we did not observe a significant increase in

epiblast (NANOG positive) cells in the 2i-treated blastocysts. But embryo preculture in R2i significantly increased both ICM (OCT4 positive) and epiblast cell numbers, in line with the reported effects of SB431542 in human embryos (Van der Jeught *et al.*, 2014). Although epiblast cells are considered the progenitors of ESC (Boroviak *et al.*, 2014) and increased numbers of epiblast cells have been correlated with higher rates of Bc-ESC derivation in some studies (Campbell *et al.*, 2013), we did not find enhanced Bm-ESC establishment from embryos precultured in R2i. Unlike what occurs when whole embryos are used, successful derivation of Bm-ESC lines requires that individual blastomeres are able to generate epiblast cells. So it is possible that some blastomeres do not generate epiblast cells despite the R2i treatment or that they generate an insufficient number of epiblast cells to support the establishment of an ESC line.

In conclusion, we have provided evidence that embryo cryopreservation does not compromise the potential of single blastomeres for Bm-ESC generation, which allows the simplification and optimisation of the Bm-ESC derivation procedures by uncoupling embryo collection from ESC derivation. Moreover, we have confirmed and extended previous results on the effectiveness of the R2i cocktail for the successful derivation and karyotype integrity of Bm-ESC lines, by using embryos from a permissive strain and a KSR-based medium. Finally, we have demonstrated that ACTH is dispensable for Bm-ESC generation (except when cryopreserved embryos and R2i conditions are used) and that embryo preculture with R2i results in increased numbers of epiblast cells but does not lead to increased Bm-ESC generation. Altogether, the findings of the present study help to define a simplified and efficient procedure for the establishment of mouse ESC lines from single blastomeres of 8-cell embryos. This will contribute to achieve the full potential of this experimental procedure.

Conflicts of interest

The authors declare no conflicts of interest.

Declaration of funding

This work has been partially supported by the 2017-SGR-503 project from the Generalitat de Catalunya. SAA was beneficiary of a PIF-UAB fellowship.

Acknowledgements

We thank staff from Servei Estabulari from Universitat Autònoma de Barcelona for animal care, Jonatan Lucas and Maria Jesús Álvarez for help with feeder cell culture and reagent preparation, Salvador Bartolomé for his assistance and advice in the design of the RT-qPCR experiments and Ot Massafret and Aida Blanes for their support in the laboratory work.

Data availability

Available upon request.

References

Assadollahi V, Hassanzadeh K, Abdi M, Alasvand M, Nasseri S, Fathi F (2019) Effect of embryo cryopreservation on derivation efficiency, pluripotency, and differentiation capacity of mouse embryonic stem cells. *Journal of Cellular Physiology* **234**, 21962–21972. doi:[10.1002/jcp.28759](https://doi.org/10.1002/jcp.28759)

Avior Y, Sagi I, Benvenisty N (2016) Pluripotent stem cells in disease modelling and drug discovery. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **17**, 170–182. doi:[10.1038/nrm.2015.27](https://doi.org/10.1038/nrm.2015.27)

Biggers JD, McGinnis LK, Raffin M (2000) Amino acids and preimplantation development of the mouse in protein-free potassium simplex optimized medium. *Biology of Reproduction* **63**, 281–293. doi:[10.1095/biolreprod63.1.281](https://doi.org/10.1095/biolreprod63.1.281)

Boiani M, Casser E, Fuellen G, Christians ES (2019) Totipotency continuity from zygote to early blastomeres: a model under revision. *Reproduction* **158**, R49–R65. doi:[10.1530/REP-18-0462](https://doi.org/10.1530/REP-18-0462)

Boroviak T, Loos R, Bertone P, Smith A, Nichols J (2014) The ability of inner-cell-mass cells to self-renew as embryonic stem cells is acquired following epiblast specification. *Nature Cell Biology* **16**, 513–525. doi:[10.1038/ncb2965](https://doi.org/10.1038/ncb2965)

Brook FA, Gardner RL (1997) The origin and efficient derivation of embryonic stem cells in the mouse. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **94**, 5709–5712. doi:[10.1073/PNAS.94.11.5709](https://doi.org/10.1073/PNAS.94.11.5709)

Campbell J, Lane M, Vassiliev I, Nottle M (2013) Epiblast cell number and primary embryonic stem cell colony generation are increased by culture of cleavage stage embryos in insulin. *Journal of Reproduction and Development* **59**, 131–138. doi:[10.1262/jrd.2012-103](https://doi.org/10.1262/jrd.2012-103)

Chung Y, Klimanskaya I, Becker S, Marh J, Lu S-J, Johnson J, Meisner L, Lanza R (2006) Embryonic and extraembryonic stem cell lines derived from single mouse blastomeres. *Nature* **439**, 216–219. doi:[10.1038/nature04277](https://doi.org/10.1038/nature04277)

Costa-Borges N, González S, Ibáñez E, Santaló J (2009) Collection and cryopreservation of hamster oocytes and mouse embryos. *Journal of Visualized Experiments: JoVE* **25**, e1120. doi:[10.3791/1120](https://doi.org/10.3791/1120)

Dasiman R, Rahman N-SA, Othman S, Mustafa M-F, Jusoh N, Jusof W-HW, Rajikin MH, Froemming GRA, Khan N-AMN (2013) Cytoskeletal alterations in different developmental stages of in vivo cryopreserved preimplantation murine embryos. *Medical Science Monitor Basic Research* **19**, 258–266. doi:[10.12659/MSMBR.884019](https://doi.org/10.12659/MSMBR.884019)

Delhaise F, Bralion V, Schuurbiens N, Dessy F (1996) Establishment of an embryonic stem cell line from 8-cell stage mouse embryos. *European Journal of Morphology* **34**, 237–243. doi:[10.1076/ejom.34.4.237.13046](https://doi.org/10.1076/ejom.34.4.237.13046)

Evans MJ, Kaufman MH (1981) Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* **292**, 154–156. doi:[10.1038/292154a0](https://doi.org/10.1038/292154a0)

González S, Ibáñez E, Santaló J (2010) Establishment of mouse embryonic stem cells from isolated blastomeres and whole embryos using three derivation methods. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* **27**, 671–682. doi:[10.1007/s10815-010-9473-9](https://doi.org/10.1007/s10815-010-9473-9)

Hassani S-N, Totonchi M, Farrokhi A, Taei A, Larijani MR, Gourabi H, Baharvand H (2012) Simultaneous suppression of TGF- β and ERK signaling contributes to the highly efficient and reproducible generation of mouse embryonic stem cells from previously considered refractory

and non-permissive strains. *Stem Cell Reviews and Reports* **8**, 472–481. doi:[10.1007/s12015-011-9306-y](https://doi.org/10.1007/s12015-011-9306-y)

Hassani S-N, Pakzad M, Asgari B, Taei A, Baharvand H (2014a) Suppression of transforming growth factor β signaling promotes ground state pluripotency from single blastomeres. *Human Reproduction* **29**, 1739–1748. doi:[10.1093/humrep/deu134](https://doi.org/10.1093/humrep/deu134)

Hassani S-N, Totonchi M, Sharifi-Zarchi A, Mollamohammadi S, Pakzad M, Moradi S, Samadian A, Masoudi N, Mirshahvaladi S, Farrokhi A, Greber B, Araúzo-Bravo MJ, Sabour D, Sadeghi M, Salekdeh GH, Gourabi H, Schöler HR, Baharvand H (2014b) Inhibition of TGF β signaling promotes ground state pluripotency. *Stem Cell Reviews and Reports* **10**, 16–30. doi:[10.1007/s12015-013-9473-0](https://doi.org/10.1007/s12015-013-9473-0)

Kawase E, Suemori H, Takahashi N, Okazaki K, Hashimoto K, Nakatsuji N (1994) Strain difference in establishment of mouse embryonic stem (ES) cell lines. *International Journal of Developmental Biology* **38**, 385–390.

Klimanskaya I, Chung Y, Becker S, Lu S-J, Lanza R (2006) Human embryonic stem cell lines derived from single blastomeres. *Nature* **444**, 481–485. doi:[10.1038/nature05142](https://doi.org/10.1038/nature05142)

Larman MG, Katz-Jaffe MG, McCallie B, Filipovits JA, Gardner DK (2011) Analysis of global gene expression following mouse blastocyst cryopreservation. *Human Reproduction* **26**, 2672–2680. doi:[10.1093/humrep/der238](https://doi.org/10.1093/humrep/der238)

Lee K-H, Chuang C-K, Guo S-F, Tu C-F (2012) Simple and efficient derivation of mouse embryonic stem cell lines using differentiation inhibitors or proliferation stimulators. *Stem Cells and Development* **21**, 373–383. doi:[10.1089/scd.2011.0021](https://doi.org/10.1089/scd.2011.0021)

Lorthongpanich C, Yang S-H, Piotrowska-Nitsche K, Parnpai R, Chan AWS (2008) Development of single mouse blastomeres into blastocysts, outgrowths and the establishment of embryonic stem cells. *Reproduction* **135**, 805–813. doi:[10.1530/REP-07-0478](https://doi.org/10.1530/REP-07-0478)

Mahla RS (2016) Stem cells applications in regenerative medicine and disease therapeutics. *International Journal of Cell Biology* **2016**, 6940283. doi:[10.1155/2016/6940283](https://doi.org/10.1155/2016/6940283)

Martin GR (1981) Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **78**, 7634–7638. doi:[10.1073/pnas.78.12.7634](https://doi.org/10.1073/pnas.78.12.7634)

Nichols J, Silva J, Roode M, Smith A (2009) Suppression of Erk signalling promotes ground state pluripotency in the mouse embryo. *Development* **136**, 3215–3222. doi:[10.1242/dev.038893](https://doi.org/10.1242/dev.038893)

Ogawa K, Matsui H, Ohtsuka S, Niwa H (2004) A novel mechanism for regulating clonal propagation of mouse ES cells. *Genes to Cells* **9**, 471–477. doi:[10.1111/j.1356-9597.2004.00736.x](https://doi.org/10.1111/j.1356-9597.2004.00736.x)

Shin MR, Choi HW, Kim MK, Lee SH, Lee H-S, Lim CK (2011) In vitro development and gene expression of frozen-thawed 8-cell stage mouse embryos following slow freezing or vitrification. *Clinical and Experimental Reproductive Medicine* **38**, 203–209. doi:[10.5653/cerm.2011.38.4.203](https://doi.org/10.5653/cerm.2011.38.4.203)

Sohn IP, Ahn HJ, Park DW, Gye MC, Jo DH, Kim SY, Min CK, Kwon HC (2002) Amelioration of mitochondrial dysfunction and apoptosis of two-cell mouse embryos after freezing and thawing by the high frequency liquid nitrogen infusion. *Molecules and Cells* **13**, 272–280.

Strelchenko N, Verlinsky O, Kukhareenko V, Verlinsky Y (2004) Moruladerived human embryonic stem cells. *Reproductive Biomedicine Online* **9**, 623–629. doi:[10.1016/S1472-6483\(10\)61772-5](https://doi.org/10.1016/S1472-6483(10)61772-5)

Tesar PJ (2005) Derivation of germ-line-competent embryonic stem cell lines from preblastocyst mouse embryos. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**, 8239–8244. doi:[10.1073/pnas.0503231102](https://doi.org/10.1073/pnas.0503231102)

Tighe A, Ray-Sinha A, Staples OD, Taylor SS (2007) GSK-3 inhibitors induce chromosome instability. *BMC Cell Biology* **8**, 34. doi:[10.1186/1471-2121-8-34](https://doi.org/10.1186/1471-2121-8-34)

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 β 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 and Development* **22**, 296–306. doi:[10.1089/scd.2012.0256](https://doi.org/10.1089/scd.2012.0256)

Van der Jeught M, Heindryckx B, O’Leary T, Duggal G, Ghimire S, Lierman S, Van Roy N, Chuva de Sousa Lopes SM, Deroo T, Deforce D, De Sutter P (2014) Treatment of human embryos with the TGF β inhibitor SB431542 increases epiblast proliferation and permits successful human embryonic stem cell derivation. *Human Reproduction* **29**, 41–48. doi:[10.1093/humrep/det400](https://doi.org/10.1093/humrep/det400)

Vila-Cejudo M, Massafret O, Santaló J, Ibáñez E (2019) Single blastomeres as a source of mouse embryonic stem cells: effect of genetic background, medium supplements, and signaling modulators on derivation efficiency. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* **36**, 99–111. doi:[10.1007/s10815-018-1360-9](https://doi.org/10.1007/s10815-018-1360-9)

Vila-Cejudo M, Alonso-Alonso S, Pujol A, Santaló J, Ibáñez E (2020) Wnt pathway modulation generates blastomere-derived mouse embryonic stem cells with different pluripotency features. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* **37**, 2967–2979. doi:[10.1007/s10815-02001964-7](https://doi.org/10.1007/s10815-02001964-7)

Wakayama S, Hikichi T, Suetsugu R, Sakaide Y, Bui H-T, Mizutani E, Wakayama T (2007) Efficient establishment of mouse embryonic stem cell lines from single blastomeres and polar bodies. *Stem Cells* **25**, 986–993. doi:[10.1634/stemcells.2006-0615](https://doi.org/10.1634/stemcells.2006-0615)

Weinberger L, Ayyash M, Novershtern N, Hanna JH (2016) Dynamic stem cell states: naive to primed pluripotency in rodents and humans. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **17**, 155–169. doi:[10.1038/nrm.2015.28](https://doi.org/10.1038/nrm.2015.28)

Ying Q-L, Wray J, Nichols J, Batlle-Morera L, Doble B, Woodgett J, Cohen P, Smith A (2008) The ground state of embryonic stem cell self-renewal. *Nature* **453**, 519–523. doi:[10.1038/nature06968](https://doi.org/10.1038/nature06968)

Estudio nº2

Blastomeres of 8-cell mouse embryos differ in their ability to generate embryonic stem cells and produce lines with different transcriptional signatures.

Sandra Alonso-Alonso¹, Anna Esteve²⁻³, Beatriz Martin², Lucia Álvarez-González¹, Aurora Ruiz-Herrera¹, Josep Santaló¹, Elena Ibáñez^{1*}

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

²CNAG-CRG, Centre for Genomic Regulation, Institute of Science and Technology (BIST), Barcelona, Spain.

³Universitat Pompeu Fabra (UPF), Barcelona, Spain

*Corresponding author. Email: elena.ibanez@uab.cat

Abstract

Embryonic stem cell derivation from single blastomeres (Bm-mESCs) of 8-cell mouse embryos, rather than from whole blastocysts (Bc-mESCs), results in lower derivation rates. This situation raises a biological question about the distribution of developmental potential of sister blastomeres. Therefore, we aimed to assess the ability of sister blastomeres to produce epiblast cells and Bm-mESC lines after isolation, and the properties of the lines generated from the same embryo. Our results revealed an unequal competence among sister blastomeres to produce Bm-mESC lines, estimated to be related with their ability to give rise a minimum of 5 epiblast cells during the first 3 days in culture. Half or more of the blastomeres possess lower potential to generate mESCs, although culture conditions and blastomeres' plasticity after isolation can redirect their non-pluripotent fate towards epiblast lineage, allowing us to generate up to seven Bm-mESC lines from the same embryo. The lines generated from the same embryo can be split in two groups according to their transcriptional signature. While expression of genes related with pluripotency and development is higher in one of the groups, no differences were found in their differentiation ability to cells of the three germ layers. These results may help to improve our understanding of the ESC derivation process from single blastomeres and the cell fate determination in the preimplantation mouse embryos.

Keywords: ESC, epiblast, cell fate, pluripotency, developmental potential

Introduction

Embryonic stem cells (ESC), traditionally derived from the inner cell mass (ICM) of blastocysts (Evans and Kaufman, 1981; Martin, 1981), can also be obtained from single blastomeres (Delhaise *et al.*, 1996; Chung *et al.*, 2006; Klimanskaya *et al.*, 2006; Wakayama *et al.*, 2007; González *et al.*, 2010). This later approach allows the generation of ESCs from a single cell while the rest of the embryo maintains its viability (Chung *et al.*, 2008), thus enabling the generation of ESCs from valuable animal and human embryos without the need to destroy them. Alternatively, the separate use of all the blastomeres for ESC derivation, while leading to the destruction of that particular embryo, could allow the generation of multiple ESC lines from a single embryo, thereby reducing the total number of embryos needed to produce various ESC lines. On the other hand, individual blastomeres from 8-cell embryos have been used to obtain mouse ESC (mESC) lines with an expanded potential to generate descendants of both the trophectoderm (TE) and the ICM. Remarkably, upon introduction into a blastocyst, these expanded potential mESC lines are able to contribute both to the embryo proper and to the extra-embryonic tissues (Yang *et al.*, 2017a).

Currently, the main limitation of using single blastomeres as a source of ESC is the decreased derivation rate in comparison with the use of whole embryos, particularly when blastomeres of 8-cell embryos are used. Because ESC are known to derive from the pluripotent epiblast (EPI) of the preimplantation embryo (Boroviak *et al.*, 2014), this raises a significant biological question about the distribution of developmental potency among sister blastomeres of 8-cell embryos, i.e., if all sister blastomeres maintain their totipotent/pluripotent potential or if some of the blastomeres are already committed towards a non-pluripotent cell fate. In the first case, all the blastomeres should be able to generate ESC lines under the appropriate conditions and technical limitations of the experimental procedure could be the reason behind the failure of some of them to produce ESC. Therefore, efforts to improve culture conditions to maintain the inherent developmental potential of the blastomeres after isolation could be pursued in order to improve derivation rates. In the second case, some blastomeres could be biologically unable to generate ESC, so strategies other than improving culture conditions would be required to improve derivation rates. So far, up to 3 and 5 ESC lines have been derived from sister blastomeres of human (Taei *et al.*, 2013) and mouse (Hassani *et al.*, 2014a) 8-cell embryos, respectively. But the low number of embryos used

in these studies, which were not aimed at resolving this question, is insufficient to reach a solid conclusion.

During preimplantation development, blastomeres gradually lose their developmental potential as cleavages progress and they eventually differentiate into three separate lineages. It is widely accepted that the formation of the ICM and the TE in the blastocyst is the first lineage segregation in the mammalian embryo (Cockburn and Rossant, 2010), followed by a second segregation where the outer cells of the ICM form the primitive endoderm (PE) and the EPI arises from the inner cells. TE and PE cells will give rise to the extraembryonic tissues whereas the pluripotent EPI cells will generate all the cells of the embryo proper. It is still unclear at what developmental stage embryonic cells start to differ in their potential to differentiate into these multiple lineages, but mounting evidence suggests that a developmental bias may already be present in early cleavage-stage blastomeres. In this sense, recent studies have shown that sister blastomeres of 2-cell and 4-cell mouse embryos have unequal capacities to form EPI, PE and TE lineages (Casser *et al.*, 2017; Krawczyk *et al.*, 2021; Maemura *et al.*, 2021). Multicolor lineage tracing has also revealed that sister blastomeres of intact 4-cell embryos display a bias in contributing to either the TE or the ICM (Tabansky *et al.*, 2013). Additionally, interblastomeric molecular differences in transcriptional profiles, histone modifications and transcription factors kinetics, among others, have been detected as early as the 2-cell stage (reviewed in Bruce, 2013; Boiani *et al.*, 2019; Toyooka, 2020; White and Plachta, 2020), though whether these differences are relevant for subsequent cell fate decisions is still an unresolved question.

Although heterogeneities among blastomeres in cleavage-stage embryos could play a role in cell fate commitment under normal development, it is known that preimplantation embryos are able to adapt to experimental perturbations such as the addition or removal of cells (Tarkowski and Wróblewska, 1967) due to their developmental plasticity. Therefore, even if a developmental bias exists among blastomeres in the intact early embryo, blastomere fate may not yet be irreversible restricted at pre-compactional stages (Toyooka, 2020) and thus could be experimentally altered. For instance, isolation of the blastomeres from their normal environment could lead to changes in signaling pathways which, in turn, could generate transcriptional and epigenetic alterations, changing cell fate or removing the pre-existing developmental bias. Similarly, the addition of

signaling modulators to the culture medium could alter blastomeres' cell fate. In this sense, some studies with single blastomeres from 4-cell embryos suggest that their plasticity should allow all of them to generate ESC upon being isolated from the embryo, regardless of whether their cell fate is predetermined in the intact embryo (Geens *et al.*, 2009; González *et al.*, 2011b). On the contrary, blastomeres from 8-cell embryos seem to lean towards a TE fate after isolation (Lorthongpanich *et al.*, 2008b), which may explain the low rates of mESC derivation from these blastomeres (Wakayama *et al.*, 2007; González *et al.*, 2010). Nonetheless, short exposure of the blastomeres to a chimeric E-cadherin (González *et al.*, 2011a) or incubation in the presence of the 2i (Ying *et al.*, 2008) or the R2i (Hassani *et al.*, 2014c) cocktails can increase mESC derivation rates (Hassani *et al.*, 2014a; Alonso-Alonso *et al.*, 2022).

The aim of this study was to determine whether, under optimized culture conditions that promote pluripotency maintenance and expansion of the EPI cell population, all the blastomeres of the 8-cell stage mouse embryo are able to generate mESC lines and whether the lines originating from the same embryo have similar characteristics or they differ depending on the blastomere they originated from. To this aim, we first examined the potential of individual sister blastomeres of 8-cell embryos to develop into mESC lines and into precursor cell aggregates containing pluripotent EPI cells. Next, we compared the transcriptional profile of the mESC lines derived from blastomeres of the same 8-cell embryos and their ability to differentiate into cells of the three primary germ layers. Our findings will help to improve the generation of ESCs from single blastomeres and to better understand the developmental potential of single blastomeres of 8-cell stage embryos and the determination of cell fate during preimplantational embryo development.

Material and methods

Animal procedures

Mouse care and procedures were conducted according to the protocols approved by the Ethics Committee on Animal and Human Research of the Universitat Autònoma de Barcelona and by the *Departament d'Agricultura, Ramaderia, Pesca i Alimentació of the Generalitat de Catalunya* (permit numbers 4090 and 9995, respectively).

Collection and biopsy of embryos

Mouse embryos were obtained from 6-12 weeks old B6CBAF1/J females (Charles River Laboratories). Females were induced to superovulate by intraperitoneal injection of 5 IU Pregnant Mare's Serum Gonadotropin (MSD Animal Health) followed by the injection of 5 IU Human Chorionic Gonadotropin (Divasa-Farmavic) 48 h later and were mated with B6CBAF1/J males. Oviducts were flushed with HEPES-buffered KSOM medium (H-KSOM) (Biggers *et al.*, 2000) 48 h later to collect the 2-cell stage embryos, which were immediately cryopreserved following standard slow-freezing procedures (Costa-Borges *et al.*, 2009) and stored in liquid N₂ at -196°C. Cryopreservation allowed us to optimize the use of the donor females and to have the exact number of embryos required for each experimental replicate regardless of superovulation success.

When required, embryos were thawed (Costa-Borges *et al.*, 2009), cultured in EmbryoMax® KSOM Medium (Merck Millipore) under mineral oil (Sigma) at 37°C and 5% CO₂, and biopsied when they reached the 8-cell stage, as previously reported (Alonso-Alonso *et al.*, 2022). Embryo biopsy, instead of embryo disaggregation, was used for the isolation of blastomeres to minimize injury and avoid compromising their development ability. Only embryos from which all the blastomeres could be successfully isolated were used in the subsequent experiments.

Culture of single blastomeres for mESC derivation

Single blastomeres were individually cultured in 50 μ l drops of mESC derivation medium that contained a feeder layer of mitomycin C-inactivated human foreskin fibroblasts (HFF-1; ATCC®SCRC-1041™), as previously reported (Alonso-Alonso *et al.*, 2022).

Mouse ESC derivation medium (KSR + R2i) consisted of DMEM high glucose (BioWest) supplemented with 100 μ M 2- β mercaptoethanol (Gibco), 1x non-essential amino acids (Gibco), 50 U/ml penicillin and 50 μ g/ml streptomycin (Biowest), 20% knockout serum replacement (KSR; Gibco ThermoFisher), 10³ U/ml leukemia inhibitory factor (LIF; Merck Millipore) and the R2i inhibitor cocktail, a combination of MEK inhibitor PD0325901 (Axon Medchem; 1 μ M) and the TGF β inhibitor SB431542 (Sigma, 10 μ M). During the first week of culture, 0.1 mg/ml adrenocorticotrophic hormone (ACTH; Prospec) were also added to the medium.

Blastomeres were cultured at 37°C and 5% CO₂ for 7-10 days, changing the medium every 48 h, until outgrowths were observed. After the first passage, outgrowths were cultured in 4-well plates without ACTH. Putative mESC lines were passaged once or twice a week, using trypsin-EDTA (BioWest), and maintained in culture for at least 6 passages.

Pluripotency characterization of mESC lines

The stemness of all the putative mESC lines was assessed at the seventh passage by Alkaline Phosphatase Activity (ALP) staining and immunodetection of pluripotency and differentiation markers.

ALP activity was determined using a commercial kit (Sigma AB0300) and a previously reported protocol (Alonso-Alonso *et al.*, 2022). In brief, cells were fixed in 4% paraformaldehyde (PFA; Sigma Aldrich) for 1 min at room temperature (RT) and incubated for 10 min at RT in the dark in a 1:1 mixture of 5-bromine-4-chloride-3-inodyl phosphate and nitroblue tetrazolium. Cells were observed under a microscope and the pluripotency of the putative mESC lines was determined by the blue color of the colonies.

Immunofluorescence staining was performed both before and after spontaneous *in vitro* differentiation of the putative mESC lines to confirm their pluripotency and differentiation potential, respectively. Spontaneous differentiation was achieved by culturing mESC lines in DMEM high glucose supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS; BioWest) in feeder-free conditions for 10 days. Cells were fixed in 4% PFA during 20 min at RT and blocked and permeabilized with a PBS solution containing 0.2% sodium azide (Sigma), 0.5% Triton X-100 (Sigma) and 3% goat serum (BioWest) for 30 min at 37°C. Fixed cells were incubated with primary antibodies overnight at 4°C, washed and incubated with secondary antibodies for 2 h at RT.

Mouse monoclonal anti-OCT4 (Santa Cruz Sc-5279, 1:50 dilution), rabbit polyclonal anti-NANOG (Abcam, ab80892, 1:100 dilution) and rabbit polyclonal anti-SOX2 (Merck Millipore, ab5603, 1:200 dilution) antibodies were used to detect pluripotency markers. Mouse monoclonal anti-Tubulin β 3 (TUJ1; Biolegend 801201, 1:500 dilution), mouse monoclonal anti- α smooth muscle actin (α SMA; Sigma A5228, 1:200 dilution) and mouse monoclonal anti-alpha-fetoprotein (AFP; R&D Systems MAB1368, 1:50 dilution) antibodies were used to detect ectoderm, mesoderm, and endoderm differentiation markers, respectively. Secondary antibodies were anti-mouse IgG Alexa Fluor 488 (Molecular Probes - Invitrogen A-21200, 1:500 dilution) for OCT4, TUJ1, α SMA and AFP, and anti-rabbit IgG Alexa Fluor 594 (Molecular Probes - Invitrogen A-11037, 1:500 dilution) for SOX2 and NANOG.

Finally, cells were mounted with 10 μ g/ml Hoechst 33258 (Molecular Probes, Invitrogen) diluted in Vectashield (Vector Laboratories) and analyzed with an epifluorescence microscope (Olympus BX61) and the Cytovision software (Applied Imaging, Inc).

Culture of single blastomeres for cell aggregates formation

Single blastomeres were seeded on a monolayer of inactivated HFF (iHFF) in KSR + R2i medium, as detailed for the derivation of mESC, and incubated at 37°C and 5% CO₂ for 72 h to allow the formation of cell aggregates. Whole 8-cell embryos previously incubated in an acidic Tyrode's solution to remove the zona pellucida were also cultured under the same conditions and used as controls.

Immunofluorescence staining of cell aggregates

Cell aggregates were fixed and immunostained following the same protocols described above for mESC. Mouse monoclonal anti-OCT4 and rabbit polyclonal anti-NANOG were used as primary antibodies for the detection of ICM and EPI cells, respectively. Secondary antibodies were anti-mouse IgG Alexa Fluor 488 for OCT4 and anti-rabbit IgG Alexa Fluor 594 for NANOG.

Finally, cell aggregates were mounted with 10 µg/ml Hoechst 33258 (Molecular Probes, Invitrogen) diluted in Vectashield (Vector Laboratories). The number of total cells (Hoechst staining), OCT4-positive (OCT4+) cells and NANOG-positive (NANOG+) cells were counted on an epifluorescence microscope (Olympus BX61) with the Cytovision and ImageJ software.

RNA-seq library preparation and sequencing

Feeder cells were removed from the mESC cultures by a protocol described by [Sakai *et al.*, \(2011\)](#). Briefly, cells were trypsinized for 5 min, trypsin was inactivated by addition of an equal volume of medium, and then the cell suspensions were transferred to a 0.1% gelatin-coated plate and incubated for 15 min at 37°C, 5% CO₂. After this short incubation, feeder cells attached to the plates whereas mESC remained in solution.

Total RNA was extracted from the mESC using the Maxwell RSC SimplyRNA Tissue Kit (Promega). Its concentration and quality were assessed using a Nanodrop spectrophotometer (ThermoFisher).

The input sample-type for the RNA-Seq libraries was DNA free total RNA. The samples were quantified by Qubit® RNA BR Assay kit (Thermo Fisher Scientific) and the RNA integrity was estimated with Agilent RNA 6000 Pico Bioanalyzer 2100 Assay (Agilent).

The RNA-Seq libraries were prepared with KAPA Stranded mRNA-Seq Illumina Platforms Kit (Roche) following the manufacturer's recommendations. Briefly, 500 ng of total RNA was used for the poly-A fraction enrichment with oligo-dT magnetic beads, following the mRNA fragmentation. The strand specificity was achieved during the second strand synthesis performed in the presence of dUTP instead of dTTP. The blunt-ended double stranded cDNA was 3'adenylated and Illumina

platform compatible adaptors with unique dual indexes and unique molecular identifiers (Integrated DNA Technologies) were ligated. The ligation product was enriched with 15 PCR cycles. The size and quality of the libraries were assessed in a High Sensitivity DNA Bioanalyzer assay (Agilent).

The libraries were sequenced on NovaSeq 6000 (Illumina) with a read length of 2x51bp, following the manufacturer's protocol for dual indexing. Image analysis, base calling and quality scoring of the run were processed using the manufacturer's software Real Time Analysis (RTA 3.4.4).

RNA-seq data processing and analysis

RNA-seq reads were mapped against *Mus musculus* reference genome (GRCm39) using STAR software version 2.7.8a (Dobin *et al.*, 2013) with ENCODE parameters. Annotated genes were quantified with RSEM v1.3.0 (Li and Dewey, 2011) using the annotation file from GENCODE version M27 and default parameters.

Differential expression analysis was performed with the DESeq2 v1.18 R package (Love *et al.*, 2014) using a Wald test to compare the different embryos. Genes were considered differentially expressed (DE) with adjusted p-value < 0.05 and absolute fold change |FC| > 1.5.

Between-embryo variation was corrected from raw counts using ComBat-seq function from the sva R package v3.40 (Zhang *et al.*, 2020). Adjusted counts were regularized log transformed (rlog) with DESeq2. A weighted gene correlation network analysis (WGCNA) of genes with variance > 0.05 was conducted with the WGCNA R package v1.69 (Langfelder and Horvath, 2008). Modules were detected using automatic gene network construction function, lowering the sensitivity by setting the *deepSplit* parameter to 0. Eigengene values were calculated for each module and module membership values were determined for each gene. The modules were characterized by a GO enrichment analysis using gProfileR v07.0 (Kolberg *et al.*, 2020).

Principal Component Analysis (PCA) plot was generated with the rlog transformed counts using the top 500 most variable genes and the ggplot2 R library (Wickham, 2009). Heatmaps with the top 50 DE genes were generated using scaled rlog transformed counts with the pheatmap R

package. Heatmaps with specific gene expression of core, naïve and primed pluripotency were generated with the pheatmap R package.

Embryoid bodies formation, RNA extraction and qPCR analysis

To assess the potential for *in vitro* differentiation towards cells of the three germ layers, mESC lines were subjected to embryoid body (EB) formation following the protocol described by (Ezekiel *et al.*, 2007). First, feeder cells were removed from the Bm-mESC cultures, as detailed above, and then dissociated single mESCs were resuspended in differentiation medium (KSR medium without R2i and LIF) and counted using a hemocytometer chamber. To achieve the formation of uniformly sized EBs, 1.000 cells in a 200 µl volume were dispensed into each well of sterile 96-conical well plates (ThermoFisher), filling 45 wells per mESC line, tapped gently and incubated at 37°C and 5% CO₂. Every two days, 100 µl of medium were removed and 100 µl of fresh differentiation medium were added to each well.

After seven days, 20-30 EBs per mESC line were collected to analyze the expression of pluripotency genes (*Oct4*, *Nanog* and *Rex1*), endoderm lineage genes (*Afp*, *Foxa2* and *Ttr*), mesoderm lineage genes (*T-Brachyury*, *Nkx2-5* and *Kdr*) and ectoderm lineage genes (*Nes*, *Pax6*, *Fgf5*) by real time quantitative PCR (qPCR).

Total RNA was extracted from trypsinized EBs using the Maxwell RSC SimplyRNA Tissue Kit according to the manufacturer's instructions. RNA concentration and quality were assessed using a Nanodrop spectrophotometer. One microgram of the extracted RNA was retrotranscribed to cDNA using the iScript cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad).

The qPCR reactions were performed in triplicate using the iTaq Universal SYBR Green Supermix (Bio-Rad), on a CFX3846 Real-Time System thermocycler (Bio-Rad). The amplification program consisted in a first denaturation step of 3 min at 95°C followed by 40 cycles of 10 s at 95°C (denaturing) and 30 s at 60°C (annealing and extension). An additional thermal denaturing cycle was performed to obtain the melt curve of the qPCR products.

Validated commercial PrimePCR SYBR Green Assays (BioRad) for *Oct4* (*Pou5f1*, qMmuCED0046525), *Rex1* (*Zfp42*, qMmuCID0008767) and *Nanog* (qMmuCID0005399) were used to assess pluripotency. *Afp* (qMmuCID0023288), *Foxa2* (qMmuCED0048428) and *Ttr* (qMmuCID0006861), *T-Brachyury* (qMmuCID0015169), *Nkx2-5* (qMmuCID0020858) and *Kdr* (qMmuCID0005890), and *Nes* (qMmuCID0023067), *Pax6* (qMmuCID0026137), and *Fgf5* (qMmuCID0008576) were used to assess differentiation to endoderm, mesoderm and ectoderm lineages, respectively. A no template control (NTC) was added for each primer and the results were normalized to *Gapdh* (qMmuCED0027497) expression. Additionally, relative expression values in EBs samples were normalized with their respective undifferentiated ESC line. The cycle quantification value (Cq-value) was determined for each sample with the BioRad CFX Maestro™ 195 Software and relative expression was calculated using the $\Delta\Delta Cq$ method.

Statistical analysis

Aggregate formation rates were analyzed with Fisher's exact test. The mean numbers of total, OCT4+ and NANOG+ cells and the mean ratios of OCT4+/total cells, NANOG+/total cells and NANOG+/OCT4+ were first analyzed with the Shapiro-Wilk test to check the normality of the samples and then were compared using either an unpaired t-test or a Mann-Whitney test. All the statistical analyses were performed using the GraphPad Prism 8 software and $P < 0.05$ was considered as statistically significant.

Mean values are indicated in the text, tables and figures as mean \pm SEM.

Results

Ability of sister blastomeres of 8-cell embryos to produce mESC lines

In a first set of experiments, we analyzed the ability of the individual blastomeres from the 8-cell embryo to yield mESC. In total, 1,008 blastomeres from 126 embryos were biopsied in 13 replicate experiments, and individually cultured. We obtained a total of 292 mESC lines (29%), which stemness was confirmed by morphological criteria (colonies with rounded morphology and defined edges at passage 6), pluripotency criteria (positive for ALP, OCT4, SOX2 and NANOG) and differentiation criteria (positive for TUJ1, SMA and AFP after *in vitro* spontaneous differentiation).

Out of the total embryos, 84.1% (106/126) were able to form at least one mESC line. Most of the embryos (97/126) gave rise to 1-4 lines, but two embryos were able to produce 7 lines (Table 1). These results suggest that in the majority of the embryos, 50% or less of the blastomeres possess the potential to form a line of pluripotent mESC under our derivation conditions, although in a few embryos this potential is expanded to almost all (87.5%) of the blastomeres.

Table 1. Number and percentage of 8-cell embryos producing different numbers of blastomere-derived mESC lines.

Lines per embryo	Number of embryos (%)
0	20 (15.9)
1	22 (17.5)
2	26 (20.6)
3	27 (21.4)
4	22 (17.5)
5	7 (5.6)
6	0
7	2 (1.6)
8	0

Ability of single blastomeres of 8-cell embryos to develop into cell aggregates with pluripotent potential

To assess whether failure of some blastomeres within each embryo to produce mESC lines was related to their lack of pluripotent potential, we next examined the ability of the single

blastomeres to develop into cell aggregates containing pluripotent EPI cells. Cell aggregates are the precursors of outgrowths, and due to their higher formation efficiency and earlier manifestation in the derivation process, their formation could be a better marker of the blastomeres' developmental potential.

In this second set of experiments, a total of 120 blastomeres from 8-cell embryos (n=15) were singly extracted by micromanipulation (Figure 1A.1-2) in three replicate experiments, and individually cultured for 72 h. After three days in culture, 81.7% of the blastomeres (98/120) formed a cell aggregate, a percentage that did not statistically differ from the 90.9% of aggregates formed from control zona-free whole 8-cell embryos (10/11). Some of the aggregates formed from single blastomeres (36.7%, 36/98) displayed a cavity (Figure 1A.3), similar to that of a blastocyst, but the majority did not cavitate (63.3%, 62/98) (Figure 1A.4). These percentages were similar in aggregates formed from control 8-cell embryos: 30% (3/10) with cavity and 70% (7/10) without cavity (Supplementary Figure S1 and Supplementary Table S1). To investigate whether aggregate cavitation was related with their developmental potential, we next evaluated the presence of ICM and EPI cells in the two types of cell aggregates. To this end, we immunostained all the aggregates for the detection of OCT4 and NANOG markers. The percentage of aggregates that contained at least one OCT4+ or one NANOG+ cell (Supplementary Table S1), the mean number of total, OCT4+ and NANOG+ cells (Supplementary Table S2), and the mean ratios of OCT4+/Total cells, NANOG+/Total cells and OCT4+/NANOG+ cells (Supplementary Table S3) did not significantly differ between cavitated and non-cavitated aggregates. A similar result was observed when comparing cavitated and non-cavitated aggregates formed from control 8-cell embryos (Supplementary Tables S1-S3). According to these results, no differences in the developmental potential of cell aggregates with or without cavity seem to exist, so from this point the two types of aggregates were grouped.

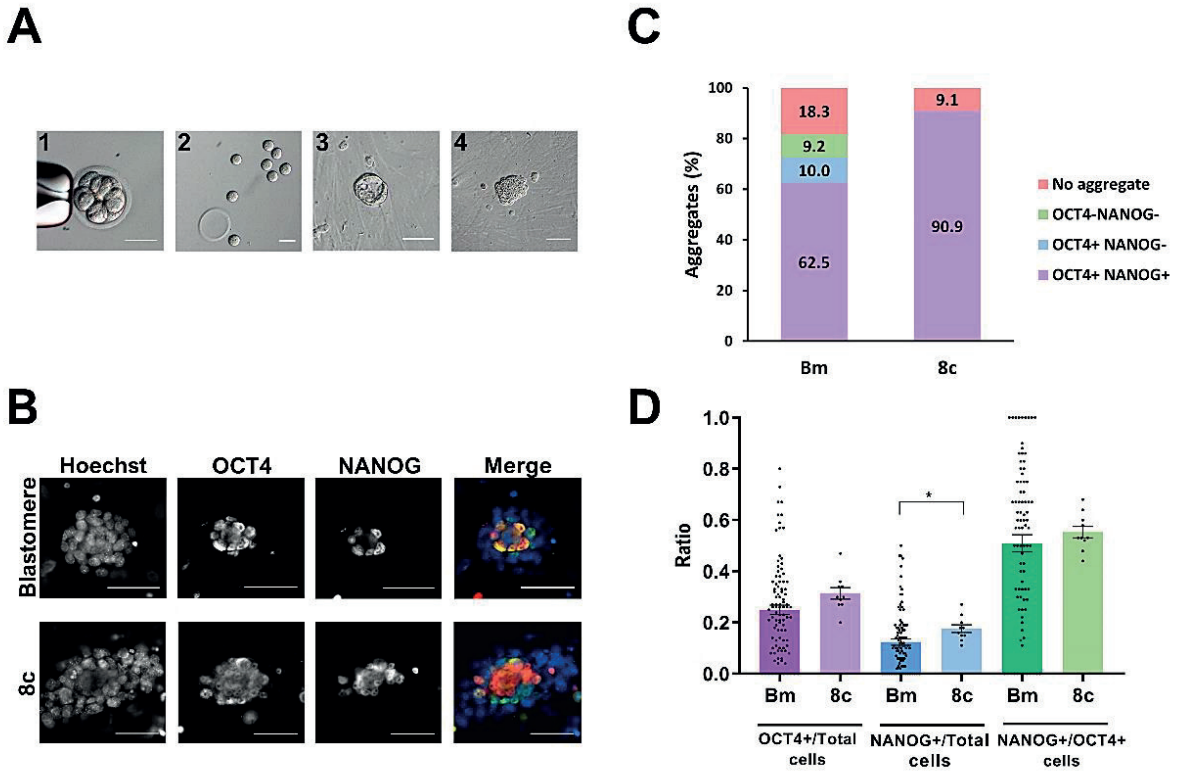


Figure 1. Pluripotency of cell aggregates derived from single blastomeres and control 8-cell embryos. (A) Eight-cell embryo before (1) and after (2) biopsy for the obtention of single blastomeres. After individual culture for 72 h, most blastomeres formed cell aggregates with (3) or without (4) cavity. All the scale bars represent 50 μ m. **(B)** Epifluorescence raw and merge images of blastomeres-derived and 8-cell embryos-derived cell aggregates immunostained for OCT4 (green) and NANOG (red) and counterstained with Hoechst (blue). All the scale bars represent 30 μ m. **(C)** Percentage of blastomeres (Bm) and control 8-cell embryos (8c) developed into cell aggregates positive or negative for NANOG and OCT4 markers. **(D)** Mean values (bar chart) \pm SEM of the ratios of OCT4+/Total cells, NANOG+/Total cells and NANOG+/OCT4+ cells in aggregates formed from single blastomeres and control 8-cell embryos. Each black dot indicates the value of a single aggregate. Statistically significant differences were found between both groups in NANOG/Total cells ratios ($p < 0,05$, Mann-Whitney test).

In control 8-cell embryos, all the aggregates formed contained both OCT4+ and NANOG+ cells, indicating that 90.9% of the embryos (10/11) were able to develop into cell aggregates containing pluripotent EPI cells after 72 h of culture. This ability was reduced in single blastomeres, as only 62.5% of the initial blastomeres (75/120) developed into aggregates containing OCT4+ and NANOG+ cells, even though 72.5% (87/120) of the blastomeres formed aggregates with OCT4+ cells (Figures 1B and 1C). It must be noted that, both in the control and the blastomeres groups, all the aggregates that were positive for NANOG were also positive for OCT4.

When comparing the mean ratios of OCT4+/Total cells, NANOG+/Total cells and NANOG+/OCT4+ cells between the aggregates derived from single blastomeres (0.25 ± 0.02 , 0.12 ± 0.01 and 0.51 ± 0.03 , respectively) and those derived from control 8-cell embryos (0.31 ± 0.02 , 0.18 ± 0.02 and 0.55 ± 0.02 , respectively), statistically significant differences were found only in the NANOG+/Total cells ratio (Figure 1D).

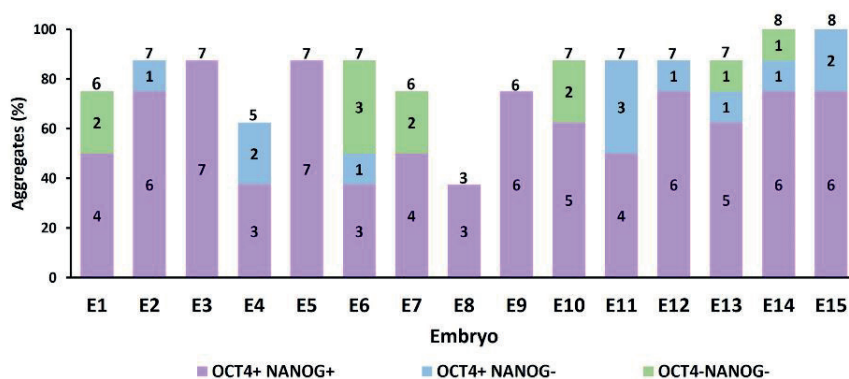
Altogether, these results suggest that single blastomeres isolated from 8-cell embryos have the same potential as whole 8-cell embryos to develop into cell aggregates, but specification of pluripotent EPI is slightly impaired.

Distribution of the ability to develop into cell aggregates with pluripotent potential among sister blastomeres of 8-cell embryos

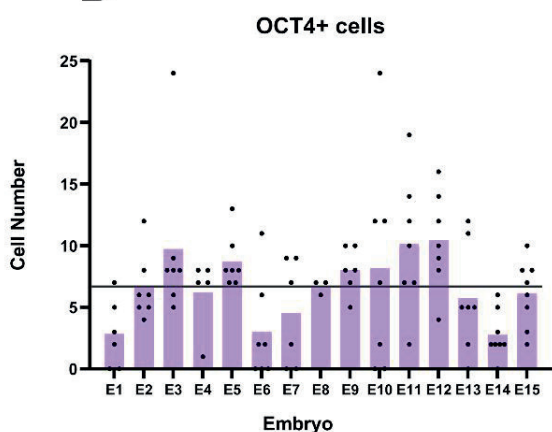
We next sought to determine how the potential to develop into cell aggregates containing pluripotent cells is distributed among the different blastomeres of the 8-cell embryo. For this, the results obtained from single blastomeres were grouped according to their parental embryos.

The number of single blastomeres per embryo that developed into a cell aggregate after 72 h in culture ranged from 3 to 8, with a mean number of 6.5 ± 0.3 (Figure 2A). Most of the embryos (11/15) produced 6-7 aggregates, and two were able to form 8 aggregates. These results indicate that most, if not all, the blastomeres of the 8-cell embryo have the potential to develop and form a cell aggregate under our culture conditions.

A



B



C

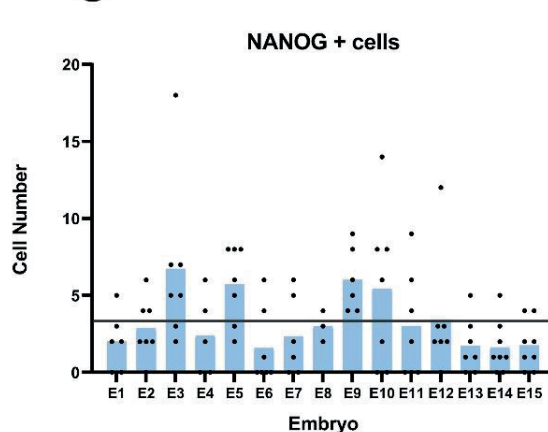


Figure 2. Formation and pluripotency of cell aggregates derived from sister blastomeres of 8-cell embryos. (A) Percentage (bar height) and number (numbers inside the bars) of cell aggregates positive or negative for OCT4 and NANOG markers formed by the sister blastomeres of each parental embryo. Numbers on top of the bars indicate the total number of aggregates formed per parental embryo. (B, C) Number of OCT4+ and NANOG+ cells in cell aggregates formed from sister blastomeres of each parental embryo. Each black dot indicates the cell number for a single aggregate and each bar represents the mean cell number in each parental embryo. The horizontal lines indicate the mean cell number in all the parental embryos.

The sum of aggregates formed by the sister blastomeres of the same parental embryo had an average total number of 190.5 ± 16.8 cells (222.8 ± 15.9 if only embryos forming 7-8 aggregates are considered), a value significantly higher than the average total number of cells in control 8-cell embryo-derived aggregates (95.2 ± 10). These results indicate that, when blastomeres from the same embryo are isolated and cultured separately, they can generate a higher number of cells than when they remain together.

The mean number of aggregates per embryo that were positive for both OCT4 and NANOG was 5.0 ± 0.4 , ranging from 3 to 7 (Figure 2A). Thus, the percentage of blastomeres within an embryo that possess the capacity to form aggregates containing NANOG+ cells varied largely among embryos, from 37.5% (3 NANOG+ aggregates) to 87.5% (7 NANOG+ aggregates). However, most commonly (7/15), embryos formed 6-7 cell aggregates containing NANOG+ cells, meaning that 75.0-87.5% of the blastomeres of these embryos had the ability to form aggregates with pluripotent EPI cells.

The number of OCT4+ and NANOG+ cells in the cell aggregates was heterogeneous and showed a large variation both among sister blastomeres and among parental embryos (Figures 2B and 2C). The number of ICM cells (OCT4+) varied from 0 to 24 in the aggregates produced from the different blastomeres, with a mean of 6.7 ± 0.5 , and the number of EPI cells (NANOG+) varied from 0 to 18, with a mean of 3.3 ± 0.3 . These values were significantly lower than the mean number of OCT4+ cells (29.5 ± 3.3 ; range 15-50) and NANOG+ cells (16.3 ± 2.1 ; range 8-32) present in the cell aggregates formed by control whole 8-cell embryos. Interestingly, however, when all the aggregates formed by the sister blastomeres of each parental embryo were grouped, the mean numbers of OCT4+ and of NANOG+ cells in the sum of aggregates (43.5 ± 5.1 and 21.5 ± 3.2 , respectively) were higher but did not significantly differ from the mean numbers in control whole 8-cell embryo-derived aggregates (29.5 ± 3.3 and 16.3 ± 2.0 , respectively).

Finally, given the variation in the number of pluripotent EPI cells among sister blastomeres and that only 29% of the blastomeres were able to produce a mESC line in the first set of experiments, we tried to estimate the minimum number of NANOG+ cells required for the successful establishment of a mESC line from single blastomeres. To do this, we classified the cell aggregates

formed by all the individual blastomeres according to the number of NANOG+ cells they contained and selected the 29% upper range, assuming that mESC lines would be most probably formed from cell aggregates possessing a higher number of NANOG+ cells. This 29% upper range contained 5-18 NANOG+ cells, meaning that single blastomeres should generate cell aggregates containing at least 5 NANOG+ cells for them to be able to establish a mESC line. Considering that in the first set of experiments the majority of the embryos (97/126; 77.0%) generated 1-4 mESC lines, we next calculated the percentage of embryos in the second set of experiments that were able to form 1-4 aggregates containing the estimated minimal number of NANOG+ cells (≥ 5). Interestingly, the percentage was very similar (73.3%; 11/15).

Transcriptomic variations among mESC lines derived from sister blastomeres of 8-cell embryos

To characterize and compare the molecular features of mESC lines produced from different blastomeres of the same parental embryo in terms of their gene expression patterns, we selected the lines produced by those embryos that had given rise to the largest number of mESC lines in the first set of experiments. In particular, five mESC lines established from one embryo and seven mESC lines established from two other embryos (total mESC lines=19) were selected and subjected to RNA sequencing (RNA-seq) (Figure 3.A). Two interesting observations emerged from the analysis of their transcriptomes. First, PCA revealed that the lines clearly clustered in three separate groups according to the parental embryo from which the blastomeres originating these lines were biopsied (Figure 3.B). Second, a heatmap of the top 50 most representative differentially expressed genes (Figure S2) revealed a high frequency of differential expression of pseudogenes among the three embryos. Most of these pseudogenes were related to ribosomal protein genes.

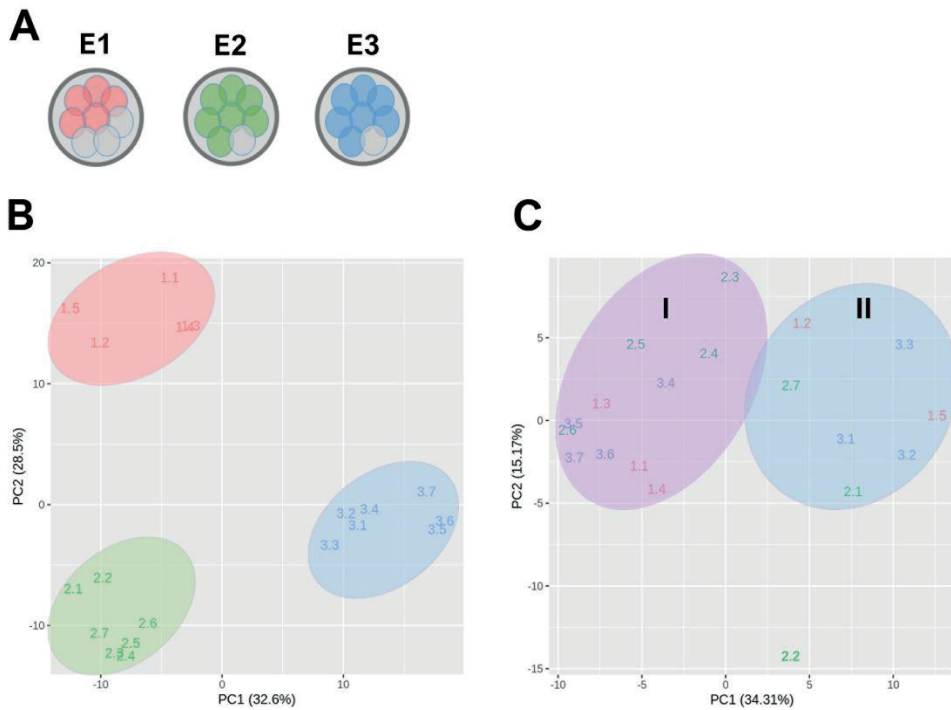


Figure 3. Transcriptomic analysis of 19 mESC lines derived from single blastomeres by RNA-seq. (A)

Diagram representing the mESC lines used in RNA-seq analysis, obtained from three different embryos.

(B) Principal component analysis (PCA) showing the clustering of the mESC lines according to their parental embryo.

(C) PCA after between-embryo variation correction, showing lines segregating in two clusters, labeled as group I and II. **(D)** Heatmap of weighted gene correlation network analysis (WGCNA) of genes with variance > 0.05. Five modules of highly correlated genes were identified: blue, brown, green, turquoise and yellow.

To reveal possible transcriptional variations among blastomeres-derived mESC other than those related with the parental embryo of the blastomeres, between-embryo variability was corrected and a new PCA was performed. This new analysis revealed that lines segregated into two clusters (Group I and II) and that, interestingly, half of the lines from each embryo were allocated to each cluster (Figure 3.C), except one of the lines derived from embryo 2 (line 2.2).

Next, a WGCNA was performed on the embryo-adjusted gene counts, in which the mESC line 2.2 was shown to clustered together with lines in group II. With this analysis, we identified five clusters of highly correlated genes (blue, brown, green, turquoise and yellow modules) (Figure 4) involved in different processes and pathways (Figure 5). In module blue (1104 genes), upregulated in group I, GO enrichment analysis revealed differential expression of genes involved in developmental and morphogenesis process, such as anatomical structure, tissue, organ and cell development, regarding GO term biological process. Analyzing KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) and WikiPathways (WP) databases, upregulation in signaling pathways associated with stem cell pluripotency, such as TGF- β and PI3k-Akt was also observed. On the other hand, lines from Group II displayed upregulation of genes from the module turquoise (1431 genes), related with transport and localization process, as well as in nervous system development, neurogenesis and neuron projection development, in terms of GO biological process. Regarding KEGG or WP databases, biosynthesis of amino acids and metabolic pathways, such as glycolysis and gluconeogenesis were processes upregulated in this module. Whereas transcriptional differences in genes included in modules blue and turquoise were evident between mESC lines belonging to group I and those belonging to group II, differences were not so evident for genes in modules brown, green and yellow, with some lines in each group showing upregulated and others showing downregulated expression of genes included in each of these three modules. Module brown (658 genes) was enriched in genes that play a role in biological processes such as development process as well as in neuron system development and generation of neurons, also consistent with the analysis performed with the KEGG database. Genes in module green (105 genes) were related with biosynthetic process and, finally, module yellow (208 genes) was enriched in transcripts involved in apoptotic process and cell death. Altogether, the results of these analyses indicate that mESC lines derived from different blastomeres of the 8-cell embryo can be split in two different groups according to their transcriptional profile, with one group showing upregulated expression of genes related with pluripotency and development.

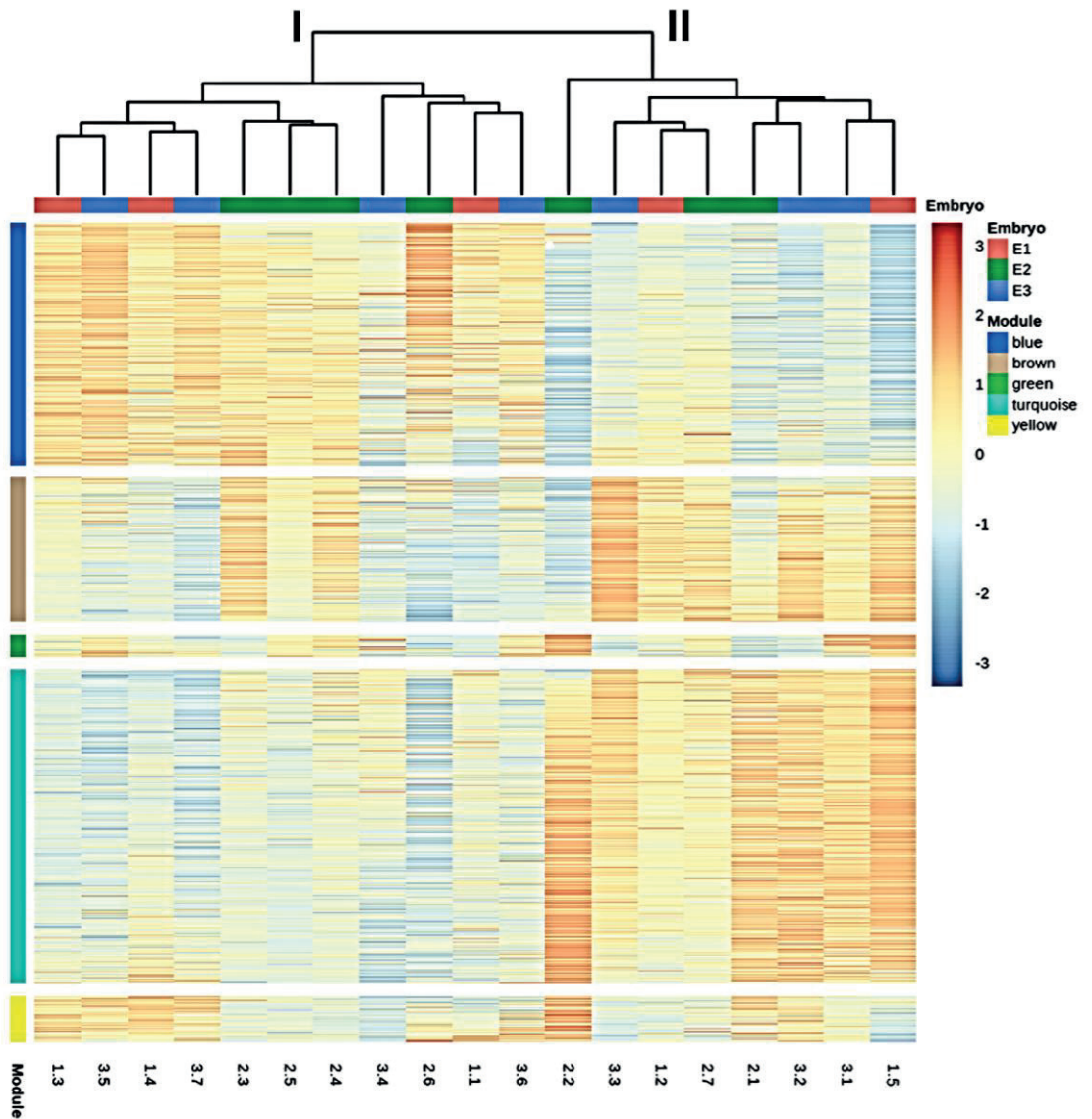


Figure 4. Weighted gene correlation network analysis (WGCNA) of genes of 19 mESC lines derived from single blastomeres by RNA-seq. Heatmap of genes with variance > 0.05 . Five modules of highly correlated genes were identified: blue, brown, green, turquoise and yellow.

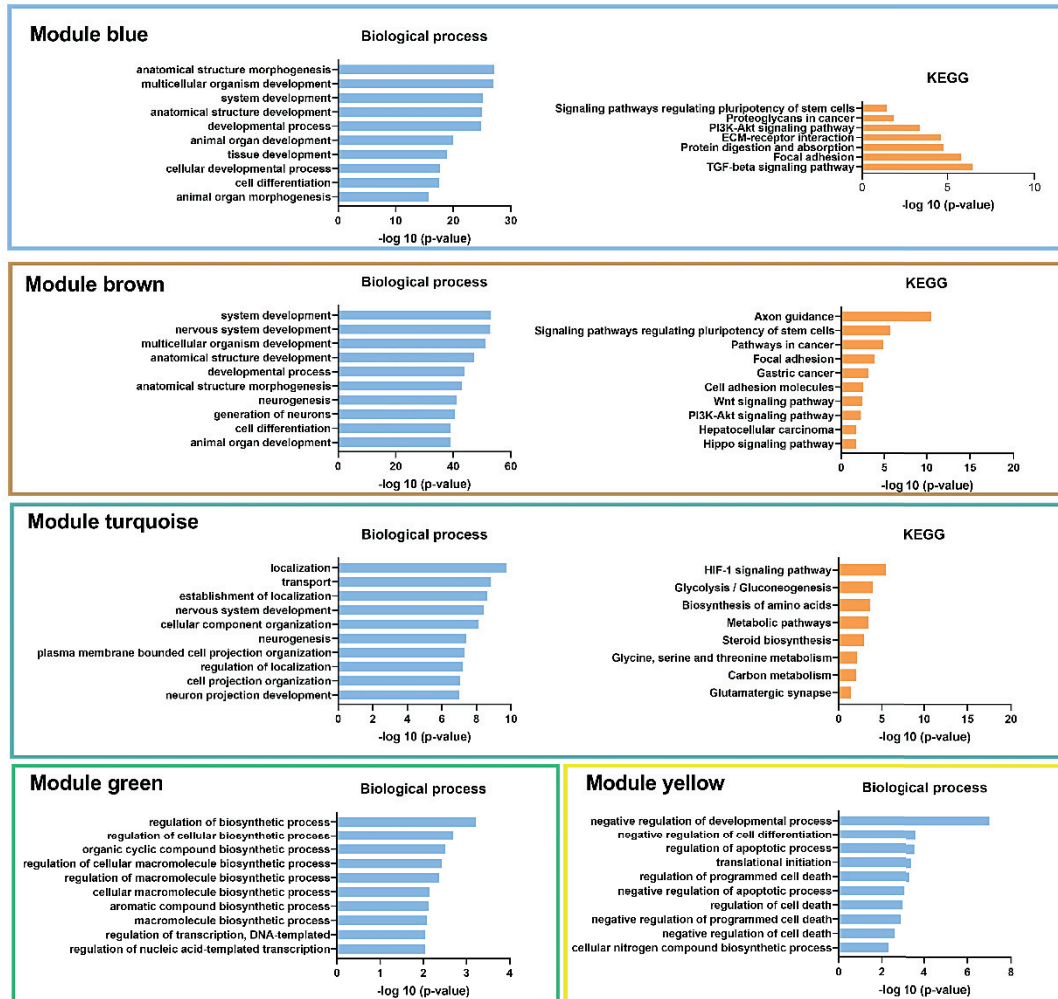


Figure 5. Representation of Gene Ontology enrichment analysis in the five WGCNA modules. Top 10 significantly enriched (-log₁₀ (p-value)) GO process in GO biological process terms and KEGG database.

Finally, to visualize how the two groups of mESC lines differed in their pluripotency potential, we produced a heatmap for the differential expression of several core, naïve and primed pluripotency genes (Figure 6). Lines in group I showed upregulated expression of core and naïve pluripotency genes and downregulated expression of primed pluripotency genes when compared with lines from group II. These results suggest that among the mESC lines generated from sister blastomeres of the 8-cell embryo, half possess a higher pluripotency potential than the other half, according to their transcriptional profile.

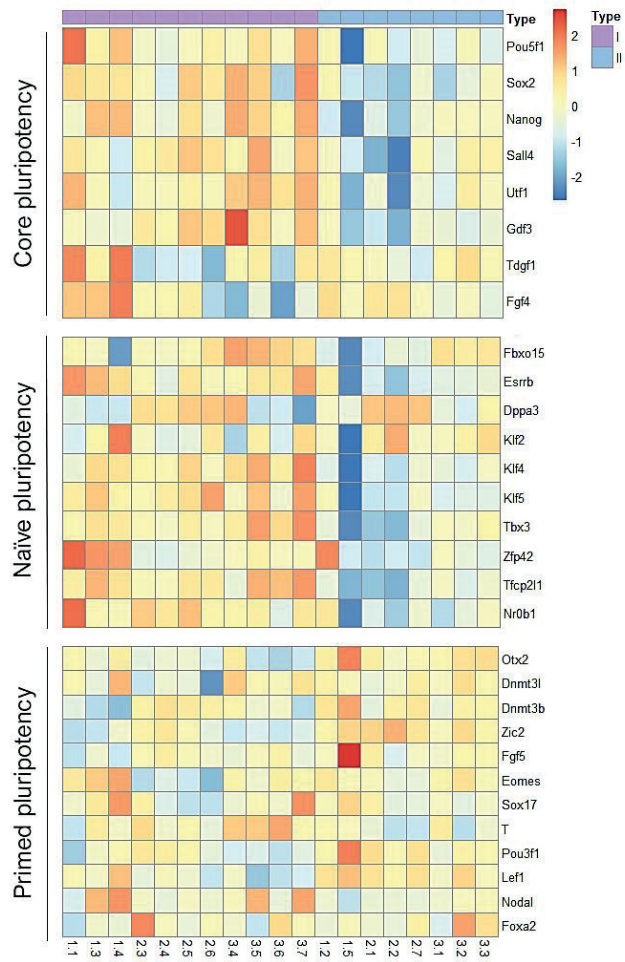


Figure 6. Heatmap representation of pluripotency gene expression in the two groups of mESC lines. Differential expression of core, naïve and primed pluripotency markers in the two groups of blastomere-derived mESC lines identified after between-embryo effect correction.

Formation of cells of the three primary germ layers from mESC lines obtained from sister blastomeres of 8-cell embryos

Finally, we sought to determine whether transcriptional differences observed between the mESC lines generated from single blastomeres (groups I and II) would create a bias in their ability to form cells of the three developmental germ layers. To this aim, the same blastomere-derived mESC lines used in the RNA-seq analyses were subjected to spontaneous *in vitro* differentiation for EBs formation, and the expression of pluripotency (*Oct4*, *Nanog* and *Rex1*), endoderm lineage (*Afp*, *Foxa2* and *Ttr*), mesoderm lineage (*T-Brachyury*, *Nkx2-5* and *Kdr*) and ectoderm lineage (*Nes*, *Pax6*, *Fgf5*) marker genes was measured by qPCR on the EBs formed. All but one of the mESC lines (line 2.1, a member of group II) were able to form EBs. Heterogeneity in the expression of these markers was evident among mESC lines, regardless of the group they belonged to or the parental embryo they originated from (Figure 7). Although mESC lines from group I exhibited a higher reduction in pluripotency genes expression (*Oct4*, *Rex1*, *Nanog*) upon differentiation, when compared with mESC lines from group II, no biased differentiation towards a specific lineage was found among mESC lines of the two groups.

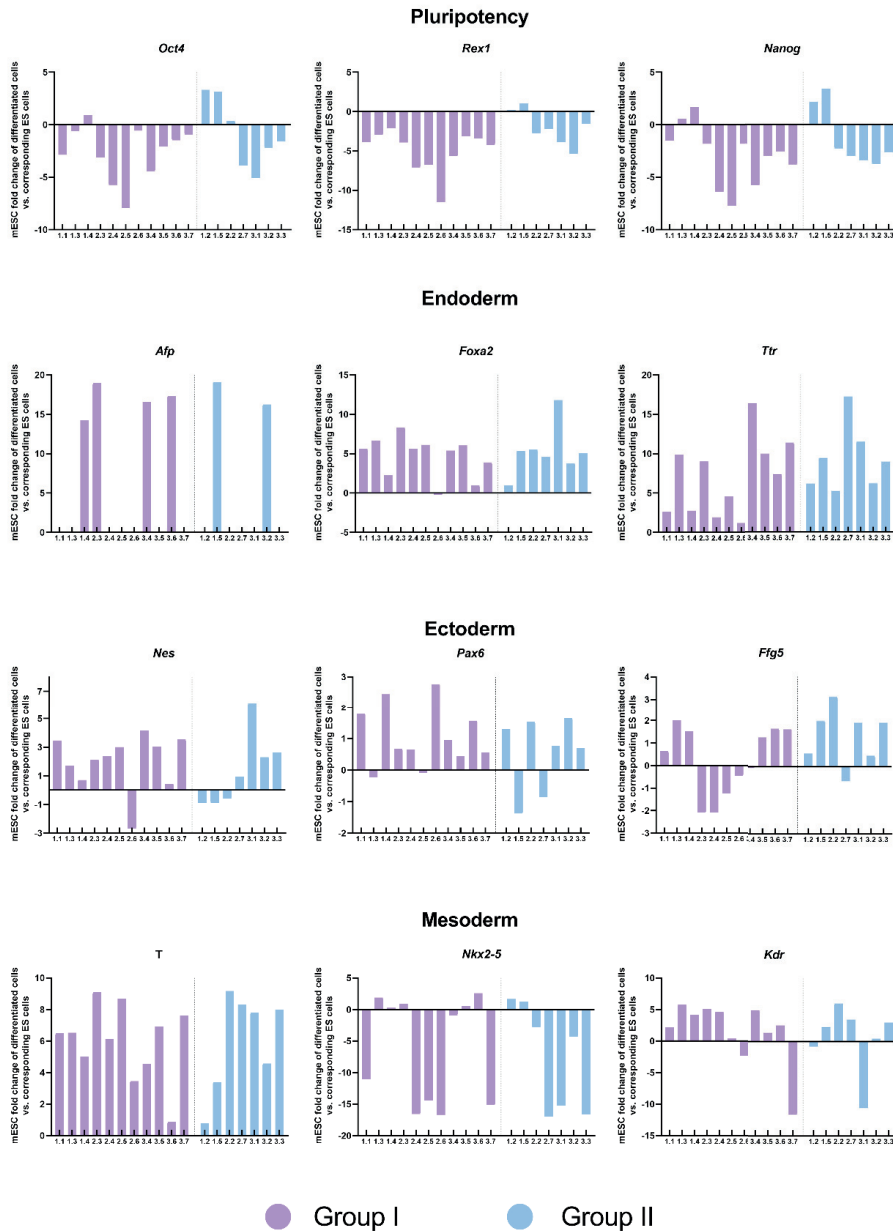


Figure 7. Expression of pluripotency and germ layer-specific genes in embryoid bodies generated from the blastomere-derived mESC lines. Expression of pluripotency, endoderm, ectoderm and mesoderm markers in EBs analyzed by qPCR and normalized to their corresponding undifferentiated lines. The two groups of mESC lines identified in the transcriptomic analysis are shown in different colors.

Discussion

Derivation of ESC lines from single blastomeres instead of from whole blastocysts offers some potential advantages, such as the possibility to preserve the viability of the parental embryo, to obtain multiple lines from a single embryo or to produce lines with higher developmental and differentiation potential. In the first two cases, blastomeres of 8-cell embryos would be a better choice than blastomeres from earlier embryonic stages. Nonetheless, it is not known whether all the blastomeres of an 8-cell embryo are equally capable of producing an ESC line and this is a relevant question in terms of derivation efficiencies and potential efforts to improve them. Although several groups have succeeded in deriving ESC from 8-cell human and mouse embryos (Klimanskaya *et al.*, 2006; Chung *et al.*, 2008; Taei *et al.*, 2013; Hassani *et al.*, 2014a; Yang *et al.*, 2017a; Vila-Cejudo *et al.*, 2019; Alonso-Alonso *et al.*, 2022), the low number of embryos used or the randomization of the blastomeres obtained from the different embryos have precluded answering this question. Moreover, whereas the developmental potential of single blastomeres of 2-cell and 4-cell stage embryos has been explored in several studies, blastomere potency at the 8-cell stage has been seldom investigated (Boiani *et al.*, 2019). Here, we tried to answer this question by employing a high number of embryos ($n=126$) and blastomeres ($n=1.008$) and by keeping track of the parental embryo of each blastomere. We first analyzed the potential of the sister blastomeres of 8-cell embryos to produce mESC lines and cell aggregates containing pluripotent cells (as precursors of the mESC lines). To maximize the development of blastomeres into cell aggregates, outgrowths and mESC lines, we cultured the isolated blastomeres on feeder cells and in the presence of LIF and R2i in the culture medium (Alonso-Alonso *et al.*, 2022).

The percentage of embryos that were able to produce at least one mESC line (84.1%) was similar to the 85.3% derivation rate usually obtained by our group from whole blastocysts of the same mouse strain (Vila-Cejudo *et al.*, 2019). Nonetheless, because most of the parental 8-cell embryos yielded more than one mESC line, the total number of lines derived from the isolated blastomeres (292) was almost three times the number of lines we would have produced had we used the intact embryos (107 lines from 126 embryos, according to a 85% derivation rate). We were unable to obtain 8 mESC line from a single embryo, but two embryos generated 7 mESC lines. Remarkably,

this is the highest number of mESC produced from a single embryo reported so far in the literature.

The large variation in the number of mESC lines obtained per embryo (0-7) suggests that blastomeres from 8-cell stage embryos are not equally competent at establishing mESC lines and that the number of competent blastomeres is not uniformly distributed among embryos. Nonetheless, among the embryos that produced at least one mESC line, those in which mESC generation potential was restricted to half or less of the blastomeres were much more abundant (91.5%) than those in which more than 50% of the blastomeres produced a mESC line (8.5%). To the best of our knowledge, no similar studies have been performed with 8-cell embryos, but [Lorthongpanich *et al* \(2008\)](#) also found that in the majority of the 4-cell stage embryos only 50% or less of the blastomeres were able to produce outgrowths with visible ICM clumps. Similarly, [Casser *et al* \(2017\)](#) demonstrated that blastomeres in most 2-cell mouse embryos displayed unbalance abilities to generate mESC lines, though in approximately 30% of the embryos this ability was concordant between the two blastomeres.

One of the limiting factors during mESC establishment from whole blastocysts is the rapid loss of pluripotent EPI cells, the progenitors of the mESC, during the first few days of culture ([Buehr and Smith, 2003](#)). So we next examined the development of blastomeres at an earlier point of the derivation process (day 3 of culture), in trying to determine their ability to produce pluripotent EPI cells before this culture-induced loss occurred. We again found a large variability among embryos in the number of blastomeres that developed into OCT4+ and NANOG+ cell aggregates (3-7). But in this case, the embryos in which more than half of the blastomeres were capable of developing into cell aggregates containing EPI cells were more abundant (60%) than those in which half or less of the blastomeres showed this capacity (40%). Moreover, a large variation in the number of EPI cells per aggregate was found among blastomeres, and the percentage of embryos that produced at least one NANOG+ cell aggregate (100%) was higher than the percentage of embryos that produced at least one mESC line in the first set of experiments (84.1%). Altogether, these results led us to assume that the limiting factor for a blastomere to be able to produce a mESC line should reside in its ability to produce a minimum number of pluripotent EPI cells rather than in its ability to simply generate a NANOG+ cell aggregate, and we

estimated this minimum number to be 5 cells. Lineage tracing experiments should be performed in future experiments to confirm it. However, interestingly, this number is similar to the 4 or more EPI cells that have been reported to be required by the time of implantation for successful development to term (Morris *et al.*, 2012).

Several studies have shown that blastomeres isolated from most precompaction embryos differ in their ability to form TE, EPI and PE cells, indicating their unequal developmental potential (Krawczyk *et al.*, 2021; Maemura *et al.*, 2021). A developmental bias among sister blastomeres has also been reported in intact 4-cell and 8-cell mouse embryos, in which lineage tracing experiments demonstrated that most individual embryos contain blastomeres exhibiting biased and unbiased contribution patterns to the TE and the ICM and their derivatives (Tabansky *et al.*, 2013). Other lineage tracing experiments in intact 2-cell and 4-cell embryos have also revealed that, on average, half of the cells of the embryo preferentially contribute to the TE while the other half contribute preferentially to the ICM (Jedrusik *et al.*, 2008). Considering these results, it would seem reasonable to assume that blastomeres that gave rise to mESC lines in our study were those with an intrinsically higher developmental potential in the intact embryo. In this scenario, a biological constraint could be limiting the generation of mESC to only half or less of the blastomeres of most 8-cell embryos, although this number could be further reduced by culture conditions that do not allow to maintain the inherent developmental potential of some blastomeres during the mESC derivation process. Indeed, the maximum rate of mESC derivation achieved so far from blastomeres of 8-cell embryos has been 50% (Hassani *et al.*, 2014a). However, because the culture conditions used in this study were very similar to ours, these results could probably be attributed to the much lower number of blastomeres used (n=72) compared with our study (n=1.008), rather than to the use of ideal experimental conditions for the maintenance of blastomere developmental potential.

Other than this biological constraint, the plasticity of embryonic development and the presence of signaling modulators in the derivation medium should also be considered when interpreting the results of our study. Blastomeres of 8-cell embryos show an impaired ability to form pluripotent EPI cells after isolation and culture in standard embryo culture medium, and they tend to develop as trophoblastic vesicles instead of forming blastocysts (Krawczyk *et al.*, 2021;

Maemura *et al.*, 2021). This could be attributed to the lack of cell-cell contacts and positional information, which was shown to induce the blastomeres to change their gene expression pattern towards a unique pattern characteristic of neither ICM or TE but with a tendency to mimic that of TE cells (Lorthongpanich *et al.*, 2012). This would explain the extremely low rates of mESC derivation from isolated blastomeres of 8-cell embryos (Wakayama *et al.*, 2007; González *et al.*, 2010) and their partial rescue when incubating the blastomeres for 24 h with E-cadherin to mimic cell-cell contacts (González *et al.*, 2011a). Similarly, addition of 2i or R2i to the culture medium significantly improves mESC derivation rates from single 8-cell blastomeres (Hassani *et al.*, 2014a; Vila-Cejudo *et al.*, 2019; Alonso-Alonso *et al.*, 2022). The signaling modulators present in these cocktails have been shown to expand the pluripotent EPI population in intact embryos and isolated blastomeres (Alonso-Alonso *et al.*, 2022; Nichols *et al.*, 2009; Van Der Jeught *et al.*, 2014) and their effect on maintaining ESC pluripotency is well known (Ying *et al.*, 2008). Moreover, MEK inhibition has been shown to promote the retention of pluripotent cells during the outgrowth phase of mESC derivation (Buehr and Smith, 2003). Therefore, the use of R2i in our mESC derivation medium could be promoting the maintenance of the pluripotent potential or the reversal of their pre-determined non-EPI fate after isolation and the loss of cell-cell contacts. Considering all this, the mESC derivation rates obtained in the present study are probably the result of a combination of the biological constraints in terms of developmental potential among sister blastomeres, the developmental plasticity of the blastomeres and the culture conditions. Efforts to increase derivation rates should therefore be focused on improving experimental protocols to maintain pluripotency after isolation in those blastomeres with higher developmental potential in the intact embryo and to promote the redirection of cell fate towards the EPI lineage in the ones with lower developmental potential. Alternatively, groups of 2 or 3 blastomeres from each 8-cell embryo instead of a single one could be used to ensure the generation of the minimum number of EPI cells required for the successful establishment of a mESC line, as demonstrated by Morris *et al.* (2012).

Next, we were interested in determining whether mESC lines produced from different blastomeres of the same embryo differ in their transcriptional signature. To the best of our knowledge, only one study has tackled this question, using mESC derived from single blastomeres of 8-cell human embryos (Zdravkovic *et al.*, 2015). We found that the transcriptional profile of the

mESC lines differed according to the parental embryo from which they were established, in contrast to the findings of [Zdravkovic et al \(2015\)](#). This discrepancy may be attributable to genetic differences among embryos, as all the human embryos used in the previous study were collected from a single couple whereas our embryos were collected from different donor hybrid F1 mice. F1 animals are genetically identical (heterozygous at all loci where the inbred parental strains differ) but F2 embryos are genetically distinct as a result of meiotic recombination and random chromosome segregation during meiosis, and may bear different contributions of the two parental inbred strains. Surprisingly, we also found a high number of pseudogenes in the top 50 differentially expressed genes among mESC derived from different embryos. Although pseudogenes cannot produce functional proteins, it has been reported that some of them can be transcribed and may play a role in regulating the expression of protein-coding genes ([Pink et al., 2011](#)). Most of them are processed pseudogenes, generated by highly expressed housekeeping genes ([Pink et al., 2011](#)), so it is not surprising that most of the pseudogenes identified in our analyses are related to genes encoding ribosomal proteins. However, the fact that so many pseudogenes are present among the top differentially expressed genes in mESC lines derived from the different embryos deserves further investigation, which is out of the scope of the present study.

When we removed between-embryo variability, differences at the transcriptional level between mESC lines derived from the same embryos became apparent and, interestingly, the lines consistently segregated into two distinct groups. When compared with the lines in group II, lines in group I displayed upregulation of genes involved in developmental and morphogenesis process and in signaling pathways associated with stem cell pluripotency, and of core and naïve pluripotency genes. This suggests that half of the mESC lines generated from each embryo possess a higher pluripotency potential than the other half. Because derivation of mESC lines is a long process, it is not possible to completely rule out that differences in the lines' transcriptomes were acquired during the generation of the line and the extended culture. However, the fact that the same pattern was observed in all three parental embryos and that a high number of lines were analyzed for each embryo (5-7), rather suggest that these differences stem from the blastomere that the lines originated from and were maintained during derivation and culture. It is tempting to speculate that lines in group I could have been established from the blastomeres that in the

intact embryo possessed the highest developmental potential, whereas lines in group II could derive from those blastomeres with lower developmental potential in which redirection of cell fate towards the EPI lineage after isolation and culture successfully occurred. Because most of the lines used in the transcriptome analysis were obtained from two embryos in which 7 of the 8 blastomeres produced mESC lines, this reinforces the idea that in the intact 8-cell stage embryo about half of the blastomeres would belong to each of these two categories. It would be interesting to investigate transcriptional differences among sister blastomeres of the 8-cell embryo in future studies, to corroborate this idea. [Zdravkovic et al. \(2015\)](#) also found differences in gene expression among lines derived from the same embryo and related them to heterogeneities among the parental sister blastomeres, but the results of the two studies are difficult to compare in terms of the particular genes differently expressed because of the different species of the mESC lines and the primed pluripotency of hESC vs. the naïve pluripotency of the mESC lines. Moreover, only two of the four 8-cell embryos used in this previous study had produced more than two lines, and the other two embryos had resulted in only one line.

Finally, in spite of the higher pluripotency of mESC lines belonging to group I and the upregulated expression of genes related to nervous system development in lines belonging to group II, the two group of lines did not show biased differentiation to any of the three primary germ layers. Terminal differentiation to derivatives of the three germ layers could be performed in future experiments for a more definitive assessment of whether a correlation exists between the transcriptional differences among the two groups of lines and their differentiation potential.

In summary, we have demonstrated that it is possible to obtain multiple mESC lines from the blastomeres of a single 8-cell embryo, but that blastomeres at this developmental stage are unequally competent at producing mESC lines. We estimated that this competence is related to their ability to produce at least 5 EPI cells during the first 3 days in culture. Our results also suggest that current derivation rates probably reflect a combination of three factors: biological constraints, developmental plasticity, and culture conditions. Although in most embryos up to half of the blastomeres would have a higher developmental potential (thus, more competent at mESC generation), isolation and culture of the blastomeres could reduce this potential. This could be prevented by culture conditions, such as the use of R2i, which could also allow to “rescue” those

blastomeres with reduced developmental potential, by redirecting their cell fate to the EPI lineage. It is possible that the two distinct types of transcriptional signatures identified in the mESC lines produced from the same embryos reflect the intrinsic developmental potential of the parental blastomeres they originated from. However, these two different transcriptional signatures do not affect the lines' ability to differentiate into cells of the primary germ layers. Our findings may help to improve the generation of mESC from single blastomeres and the understanding cell fate determination in the preimplantation mouse embryo.

References

- Alonso-Alonso, S., Santalo, J. and Ibanez, E. (2022) Efficient generation of embryonic stem cells from single blastomeres of cryopreserved mouse embryos in the presence of signalling modulators. *Reprod. Fertil. Dev.*, **34** (7), 576–587. doi:[10.1071/RD21297](https://doi.org/10.1071/RD21297).
- Biggers, J.D., McGinnis, L.K. and Raffin, M. (2000) Amino Acids and Preimplantation Development of the Mouse in Protein-Free Potassium Simplex Optimized Medium. *Biol. Reprod.*, **63** (1), 281–293. doi:[10.1095/biolreprod63.1.281](https://doi.org/10.1095/biolreprod63.1.281).
- Boiani, M. *et al.* (2019) Totipotency continuity from zygote to early blastomeres: A model under revision. *Reproduction*. BioScientifica Ltd., R49–R65. doi:[10.1530/REP-18-0462](https://doi.org/10.1530/REP-18-0462).
- Boroviak, T. *et al.* (2014) The ability of inner-cell-mass cells to self-renew as embryonic stem cells is acquired following epiblast specification. *Nat. Cell Biol.*, **16** (6), 513–525. doi:[10.1038/NCB2965](https://doi.org/10.1038/NCB2965).
- Bruce, A.W. (2013) Generating different genetic expression patterns in the early embryo: Insights from the mouse model. *Reprod. Biomed. Online*, **27**(6), 586–592. doi:[10.1016/j.rbmo.2013.03.024](https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2013.03.024).
- Buehr, M. and Smith, A. (2003) Genesis of embryonic stem cells. *Philos Trans R Soc L. B Biol Sci*, **358** (358), 1397–1402. doi:[10.1098/rstb.2003.1327](https://doi.org/10.1098/rstb.2003.1327).
- Casser, E. *et al.* (2017) Totipotency segregates between the sister blastomeres of two-cell stage mouse embryos. *Sci. Rep.*, **7**, 8299. doi:[10.1038/s41598-017-08266-6](https://doi.org/10.1038/s41598-017-08266-6).
- Chung, Y. *et al.* (2006) Embryonic and extraembryonic stem cell lines derived from single mouse blastomeres. *Nature*, **439** (7073), 216–219. doi:[10.1038/nature04277](https://doi.org/10.1038/nature04277).
- Chung, Y. *et al.* (2008) Human Embryonic Stem Cell Lines Generated without Embryo Destruction. *Cell Stem Cell*. Elsevier, 113–117. doi:[10.1016/j.stem.2007.12.013](https://doi.org/10.1016/j.stem.2007.12.013).
- Cockburn, K. and Rossant, J. (2010) Making the blastocyst: lessons from the mouse. *J. Clin. Invest.*, **120** (4), 995–1003. doi:[10.1172/JCI41229](https://doi.org/10.1172/JCI41229).

Costa-Borges, N. *et al.* (2009) Collection and Cryopreservation of Hamster Oocytes and Mouse Embryos. *J. Vis. Exp.*, (25), 1–3. doi:[10.3791/1120](https://doi.org/10.3791/1120).

Delhaise, F. *et al.* (1996) Establishment of an embryonic stem cell line from blastocyst stage mouse embryos. *Rom. J. Morphol. Embryol.*, **34** (4), 237–243. doi: [10.1076/ejom.34.4.237.13046](https://doi.org/10.1076/ejom.34.4.237.13046)

Dobin, A. *et al.* (2013) STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics*, **29** (1), 15–21. doi:[10.1093/BIOINFORMATICS/BTS635](https://doi.org/10.1093/BIOINFORMATICS/BTS635).

Evans, M.J. and Kaufman, M.H. (1981) Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature*, **292** (5819), 154–156. doi:[10.1038/292154a0](https://doi.org/10.1038/292154a0).

Ezekiel, U.R. *et al.* (2007) Single embryoid body formation in a multi-well plate. *Electron. J. Biotechnol.*, **10** (2), 328–335. doi:[10.2225/vol10-issue2-fulltext-2](https://doi.org/10.2225/vol10-issue2-fulltext-2).

Geens, M. *et al.* (2009) Human embryonic stem cell lines derived from single blastomeres of two 4-cell stage embryos. *Hum. Reprod.*, **24** (11), 2709. doi:[10.1093/HUMREP/DEP262](https://doi.org/10.1093/HUMREP/DEP262).

González, S., Ibáñez, E. and 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), 671–682. doi:[10.1007/s10815-010-9473-9](https://doi.org/10.1007/s10815-010-9473-9).

González, S., Ibáñez, E. and Santaló, J. (2011a) Influence of E-Cadherin-Mediated Cell Adhesion on Mouse Embryonic Stem Cells Derivation from Isolated Blastomeres. *Stem Cell Rev. Reports*, **7** (3), 494–505. doi:[10.1007/s12015-010-9221-7](https://doi.org/10.1007/s12015-010-9221-7).

González, S., Ibáñez, E. and Santaló, J. (2011b) 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. doi:[10.1016/J.SCR.2011.03.005](https://doi.org/10.1016/J.SCR.2011.03.005).

Hassani, S.-N. *et al.* (2014) Suppression of transforming growth factor β signaling promotes ground state pluripotency from single blastomeres. *Hum. Reprod.*, **29** (8), 1739–48. doi:[10.1093/humrep/deu134](https://doi.org/10.1093/humrep/deu134).

Hassani, S.N. *et al.* (2014) Inhibition of TGF β Signaling Promotes Ground State Pluripotency. *Stem Cell Rev. Reports*, **10** (1), 16–30. doi:[10.1007/s12015-013-9473-0](https://doi.org/10.1007/s12015-013-9473-0).

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.*, **22** (19), 2692. doi:[10.1101/GAD.486108](https://doi.org/10.1101/GAD.486108).

Van Der Jeught, M. *et al.* (2014) Treatment of human embryos with the TGF β inhibitor SB431542 increases epiblast proliferation and permits successful human embryonic stem cell derivation. *Hum. Reprod.*, **29** (1), 41–48. doi:[10.1093/HUMREP/DET400](https://doi.org/10.1093/HUMREP/DET400).

Klimanskaya, I. *et al.* (2006) Human embryonic stem cell lines derived from single blastomeres. *Nature*, **444** (7118), 481–485. doi:[10.1038/nature05142](https://doi.org/10.1038/nature05142).

Kolberg, L. *et al.* (2020) gprofiler2 -- an R package for gene list functional enrichment analysis and namespace conversion toolset. *F1000Research*, **9**, 709. doi:[10.12688/f1000research.24956.2](https://doi.org/10.12688/f1000research.24956.2).

Krawczyk, K. *et al.* (2021) Developmental capacity is unevenly distributed among single blastomeres of 2-cell and 4-cell stage mouse embryos. *Sci. Rep.*, **11** (1), 21422. doi:[10.1038/s41598-021-00834-1](https://doi.org/10.1038/s41598-021-00834-1).

Langfelder, P. and Horvath, S. (2008) WGCNA: An R package for weighted correlation network analysis. *BMC Bioinformatics*, **9** (1), 559. doi:[10.1186/1471-2105-9-559](https://doi.org/10.1186/1471-2105-9-559).

Li, B. and Dewey, C.N. (2011) RSEM: Accurate transcript quantification from RNA-Seq data with or without a reference genome. *BMC Bioinformatics*, **12** (1), 1–16. doi:[10.1186/1471-2105-12-323](https://doi.org/10.1186/1471-2105-12-323).

Lorthongpanich, C. *et al.* (2008) Development of single mouse blastomeres into blastocysts, outgrowths and the establishment of embryonic stem cells. *Reproduction*, **135** (6), 805–813. doi:[10.1530/REP-07-0478](https://doi.org/10.1530/REP-07-0478).

Lorthongpanich, C. *et al.* (2012) Developmental fate and lineage commitment of singled mouse blastomeres. *Dev.*, **139** (20), 3722–3731. doi:[10.1242/dev.086454](https://doi.org/10.1242/dev.086454).

Love, M.I., Huber, W. and Anders, S. (2014) Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol.*, **15**, 550. doi:[10.1186/S13059-014-0550-8](https://doi.org/10.1186/S13059-014-0550-8).

Maemura, M. *et al.* (2021) Totipotency of mouse zygotes extends to single blastomeres of embryos at the four-cell stage. *Sci. Rep.* doi:[10.1038/s41598-021-90653-1](https://doi.org/10.1038/s41598-021-90653-1).

Martin, G.R. (1981) Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **78** (12 II), 7634–7638. doi:[10.1073/pnas.78.12.7634](https://doi.org/10.1073/pnas.78.12.7634).

Morris, S.A., Guo, Y. and Zernicka-Goetz, M. (2012) Developmental Plasticity Is Bound by Pluripotency and the Fgf and Wnt Signaling Pathways. *Cell Rep.*, **2** (4), 756–765. doi:[10.1016/j.celrep.2012.08.029](https://doi.org/10.1016/j.celrep.2012.08.029).

Nichols, J. *et al.* (2009) Suppression of Erk signalling promotes ground state pluripotency in the mouse embryo. *Development*, **136** (19), 3215–3222. doi:[10.1242/dev.038893](https://doi.org/10.1242/dev.038893).

Pink, R.C. *et al.* (2011) Pseudogenes: pseudo-functional or key regulators in health and disease? *RNA*, **17** (5), 792–798. doi:[10.1261/RNA.2658311](https://doi.org/10.1261/RNA.2658311).

Sakai, Y., Yoshiura, Y. and Nakazawa, K. (2011) Embryoid body culture of mouse embryonic stem cells using microwell and micropatterned chips. *J. Biosci. Bioeng.*, **111** (1), 85–91. doi:[10.1016/j.jbiosc.2010.08.014](https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2010.08.014).

Tabansky, I. *et al.* (2013) Developmental bias in cleavage-stage mouse blastomeres. *Curr. Biol.*, **23** (1), 21–31. doi:[10.1016/J.CUB.2012.10.054](https://doi.org/10.1016/J.CUB.2012.10.054).

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** (10), 2661–2671. doi:[10.1093/humrep/det309](https://doi.org/10.1093/humrep/det309).

Tarkowski, A.K. and Wróblewska, J. (1967) Development of blastomeres of mouse eggs isolated at the 4- and 8-cell stage. *J. Embryol. Exp. Morphol.*, **18** (1), 155–180. doi:[10.1242/dev.18.1.155](https://doi.org/10.1242/dev.18.1.155).

Toyooka, Y. (2020) Trophoblast lineage specification in the mammalian preimplantation embryo. *Reprod. Med. Biol.*, **19**, 209–221.

Vila-Cejudo, M. *et al.* (2019) Single blastomeres as a source of mouse embryonic stem cells: effect of genetic background, medium supplements, and signaling modulators on derivation efficiency. *J. Assist. Reprod. Genet.*, **36** (1), 99–111. doi:[10.1007/s10815-018-1360-9](https://doi.org/10.1007/s10815-018-1360-9).

Wakayama, S. *et al.* (2007) Efficient Establishment of Mouse Embryonic Stem Cell Lines from Single Blastomeres and Polar Bodies. *Stem Cells*, **25** (4), 986–993. doi:[10.1634/stemcells.2006-0615](https://doi.org/10.1634/stemcells.2006-0615).

White, M.D. and Plachta, N. (2020) Specification of the first mammalian cell lineages in vivo and in vitro. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, **12** (4), 1–24. doi:[10.1101/cshperspect.a035634](https://doi.org/10.1101/cshperspect.a035634).

Wickham, H. (2009) *Ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis*. New York Springer-Verlag. Springer New York. doi:[10.1007/978-0-387-98141-3](https://doi.org/10.1007/978-0-387-98141-3).

Yang, J. *et al.* (2017) Establishment of mouse expanded potential stem cells. *Nature*, **550** (7676), 1–5. doi:[10.1038/nature24052](https://doi.org/10.1038/nature24052).

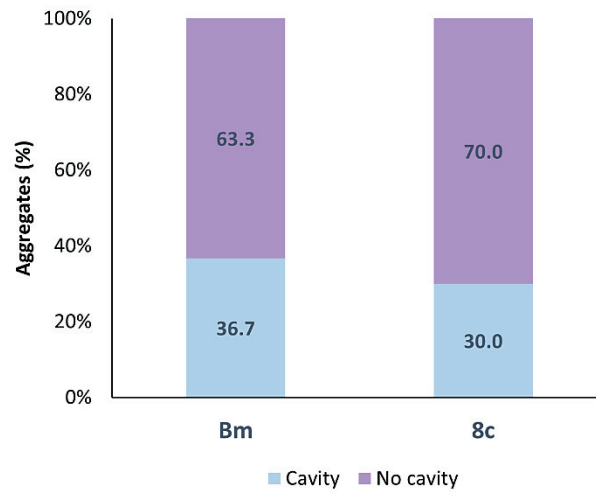
Ying, Q.-L. *et al.* (2008) The ground state of embryonic stem cell self-renewal. *Nature*, **453**, 519–523. doi:[10.1038/nature06968](https://doi.org/10.1038/nature06968).

Zdravkovic, T. *et al.* (2015) Human stem cells from single blastomeres reveal pathways of embryonic or trophoblast fate specification. *Development*, **142** (23), 4010–4025. doi:[10.1242/dev.122846](https://doi.org/10.1242/dev.122846).

Zhang, Y., Parmigiani, G. and Johnson, W.E. (2020) ComBat-seq: batch effect adjustment for RNA-seq count data. *NAR Genomics Bioinforma.*, **2** (3), 1–10. doi:[10.1093/NARGAB/LQAA078](https://doi.org/10.1093/NARGAB/LQAA078).

Supplementary information

Figure S1. Cavitation in cell aggregates. Percentage of cell aggregates with and without cavity obtained from single blastomeres (Bm) and from control zona-free 8-cell embryos (8c).



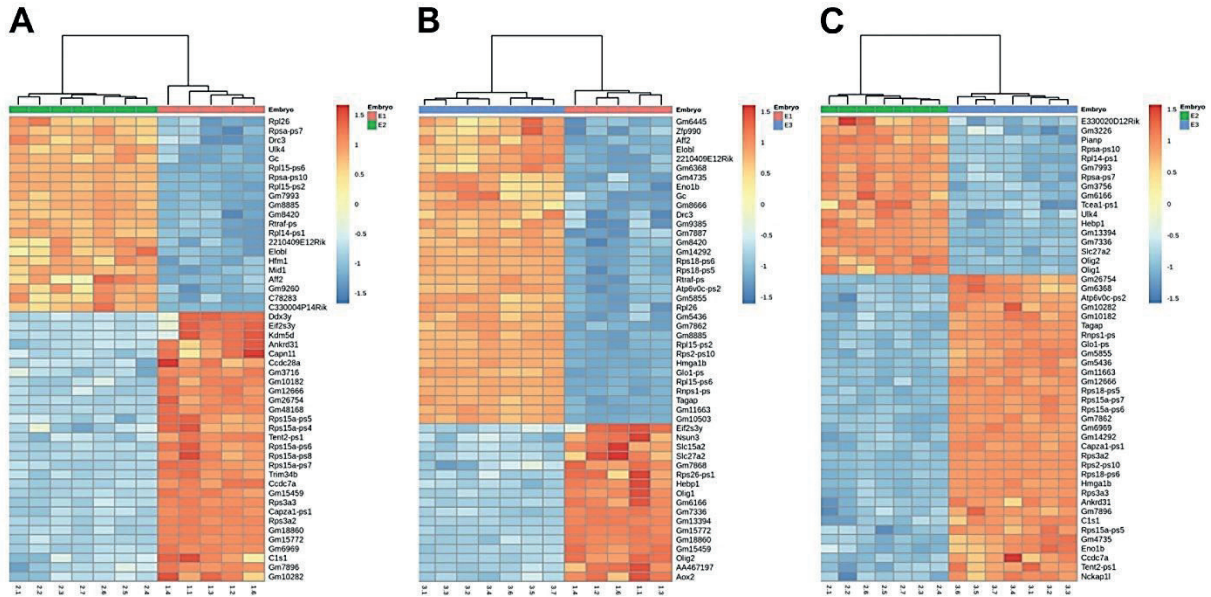


Figure S2. Heatmap of the top 50 differentially expressed genes among mESC lines derived from single blastomeres of three different embryos. In each heatmap, mESC lines derived from the blastomeres of one embryo are compared with mESC lines derived from the blastomeres of another embryo (A: E1 vs. E2; B: E1 vs. E3; C: E2 vs. E3). For each comparison, the name of the top 50 differentially expressed genes is indicated on the right.

Table S1. Percentage of cell aggregates with and without cavity derived from single blastomeres and control 8-cell embryos containing OCT4-positive and NANOG-positive cells.

Group	Type of aggregates	Nº of aggregates	OCT4+ (n)	NANOG+ (n)
Blastomeres	Cavity	36	86.1 (31)	77.8 (28)
	No cavity	62	90.3 (56)	75.8 (47)
8-cell embryos	Cavity	3	100 (3)	100 (3)
	No cavity	7	100 (7)	100 (7)

Table S2. Mean number of total, OCT4-positive and NANOG-positive cells in cell aggregates with and without cavity derived from single blastomeres and control 8-cell embryos.

Group	Type of aggregates	Total cells	OCT4+ cells	NANOG+ cells
Blastomeres	Cavity	29.9 ± 1.5	6.3 ± 0.8	3.4 ± 0.5
	No cavity	28.7 ± 1.5	6.8 ± 0.8	3.2 ± 0.4
8-cell embryos	Cavity	111.3 ± 7.4	30.7 ± 4.3	16.3 ± 1.8
	No cavity	88.3 ± 13.4	29.0 ± 4.6	16.3 ± 3.0

Table S3. Mean ratios of OCT4+/total cells, NANOG+/total cells and NANOG+/OCT4+ cells in cell aggregates with and without cavity derived from single blastomeres and control 8-cell embryos.

Group	Group	OCT4+/total cells	NANOG+/total cells	NANOG+/OCT4+
Blastomeres	Cavity	0.23 ± 0.03	0.12 ± 0.02	0.57 ± 0.06
	No cavity	0.26 ± 0.03	0.13 ± 0.02	0.48 ± 0.04
8-cell embryos	Cavity	0.28 ± 0.04	0.15 ± 0.03	0.54 ± 0.07
	No cavity	0.33 ± 0.03	0.19 ± 0.02	0.56 ± 0.02

DISCUSIÓN



Las mESCs pueden obtenerse tanto de blastocistos como de blastómeros aislados (Evans and Kaufman, 1981; Martin, 1981; Delhaise *et al.*, 1996; Chung *et al.*, 2006; Wakayama *et al.*, 2007). Sin embargo, las tasas de derivación de Bm-mESC son significativamente más bajas que las de derivación de Bc-mESC, especialmente cuando se utilizan blastómeros 1/8 (Vila-Cejudo *et al.*, 2019), y esto puede deberse a varios motivos. Primero, obviamente un blastocisto presenta un mayor número de células EPI, progenitoras de las mESCs (Boroviak *et al.*, 2014), en el momento de la derivación, ya que varios de los blastómeros del embrión suelen contribuir a su generación. Segundo, aunque no todos los blastómeros del embrión tengan potencial pluripotente ni sean capaces de generar células EPI en igual medida, seguirá siendo posible generar una línea de mESC a partir de un blastocisto completo. En cambio, solo los blastómeros 1/8 predeterminados hacia el linaje EPI serían capaces de generar mESC cuando se trabaja con los blastómeros aislados. Tercero, al aislar los blastómeros de su entorno natural, éstos pueden dañarse y, además, pierden inevitablemente la conexión con sus células vecinas y su información de posición y polaridad, lo que puede dar lugar a una pérdida de su viabilidad y/o posibles cambios en su destino celular. Y cuarto, mientras el proceso de derivación a partir de blastocistos está ampliamente estudiado, con una gran cantidad de trabajos en los que se han analizado las diferentes variables y condiciones de obtención y cultivo de las Bc-mESCs, no ocurre lo mismo con la derivación a partir de blastómeros aislados. Es posible que derivar a partir de un solo blastómero 1/8 requiera unas condiciones de cultivo diferentes a cuando se trabaja con blastocistos, o que éstas sean más exigentes.

A partir de todos estos motivos, surge el objetivo principal de esta tesis doctoral: analizar si todos los blastómeros del embrión a 8 células son igualmente pluripotentes y capaces de generar Bm-mESCs en unas condiciones de cultivo adecuadas o si en este estadio algunos blastómeros ya presentan cierta predeterminación hacia un destino celular no pluripotente, lo que nos impediría generar Bm-mESC a partir de éstos. La prueba definitiva para aclarar esta cuestión sería obtener 8 líneas Bm-mESC a partir de un mismo embrión. Sin embargo, esto no es fácil de abordar con las eficiencias actuales en nuestro laboratorio (alrededor del 25%), ya que se requeriría una cantidad de blastómeros y embriones muy alta para poder demostrar esta hipótesis. Concretamente, la probabilidad de obtener 8 líneas de Bm-mESC a partir de un solo embrión con las eficiencias actuales sería del 0,0015% (1 de 8192 embriones), lo que es manifiestamente inviable. Por esto,

el primer objetivo que nos planteamos fue optimizar el proceso de derivación de Bm-mESC para alcanzar una eficiencia mayor que nos permitiese abordar el objetivo principal de esta tesis doctoral con mayor facilidad, sin llegar a una conclusión errónea sobre la potencialidad de los blastómeros debido a las limitaciones técnicas presentes.

1. ANÁLISIS DE PARÁMETROS METODOLÓGICOS EN EL PROCESO DE DERIVACIÓN DE Bm-mESC

En el primer trabajo de esta tesis doctoral se ha abordado el proceso de derivación de Bm-mESCs desde un punto metodológico, analizando diversos factores que intervienen en este proceso en un intento de mejorar las tasas de derivación y simplificar el procedimiento.

El primer factor analizado fue el uso de embriones congelados en el proceso de derivación. Diferentes estudios han determinado que la congelación embrionaria puede afectar a la expresión génica de los embriones, cambiar la predeterminación del destino celular de los blastómeros, o impactar en la eficiencia de derivación de mESC a partir de blastocistos y las características de las líneas establecidas (Sohn *et al.*, 2002; Larman *et al.*, 2011; Shin *et al.*, 2011b; Dasiman *et al.*, 2013; Assadollahi *et al.*, 2019). Sin embargo, en nuestro primer trabajo observamos que no había diferencias en las tasas de derivación a partir de blastómeros 1/8, ni tampoco en la expresión de marcadores de pluripotencia ni en la integridad del cariotipo de las líneas Bm-mESCs generadas, cuando se utilizan blastómeros aislados de embriones en fresco o de embriones congelados-descongelados. Esto es una gran ventaja ya que permite simplificar el proceso de derivación y optimizar el número de animales usados, al poder disponer de un *pool* de embriones criopreservados bajo las mismas condiciones y poder descongelar solo los necesarios para cada sesión de derivación. De esta forma se evita no disponer de embriones el día programado para un experimento de derivación, por problemas de superovulación o monta de las hembras, así como el exceso de embriones.

Una de las variables más importantes a la hora de aumentar las tasas de derivación es el uso de moduladores de las vías de señalización celular implicadas en la pluripotencia. Por ello, el segundo factor analizado fue el uso de dos combinaciones de inhibidores de las rutas de señalización: 2i

(Ying *et al.*, 2008) y R2i (Hassani *et al.*, 2012, 2014a). Ambos han demostrado ser muy eficientes a la hora de derivar Bc-mESC y Bm-mESC, tanto de cepas permisivas como no permisivas, y manteniendo el estado *ground naïve* de pluripotencia. Sin embargo, el cocktail R2i ha reportado la mayores tasas de derivación de Bm-mESC descritas hasta la fecha (50%) y una mayor integridad cromosómica a lo largo del cultivo (Hassani *et al.*, 2014a, 2014c). Aunque en nuestro trabajo no se consiguió igualar las eficiencias obtenidas por el grupo de Hassani y colaboradores, el uso de R2i dio lugar a la mayor tasa de derivación entre todos los grupos estudiados (38,9%). Además, aunque las líneas Bm-mESC del grupo 2i y R2i presentaban niveles de expresión de marcadores de pluripotencia semejantes, observamos como el uso de R2i daba lugar a un mayor número de líneas Bm-mESC con los 40 cromosomas presentes. Este resultado concuerda con estudios que determinan que el uso de CHIR da lugar a inestabilidad cromosómica (Tighe *et al.*, 2007), de forma que el uso de R2i genera líneas con mayor integridad cromosómica (Hassani *et al.*, 2014c).

El tercer factor estudiado en el proceso de derivación es el uso de ACTH, una hormona que ha sido ampliamente utilizada para derivar y cultivar Bm-mESC porque mejora las eficiencias de derivación a partir de blastómeros 1/2 y 1/4 y permite el mantenimiento de la pluripotencia de las mESCs (Ogawa *et al.*, 2004; Wakayama *et al.*, 2007; Lorthongpanich *et al.*, 2008b; Lee *et al.*, 2012; Vila-Cejudo *et al.*, 2019). En nuestro caso, mientras que no se observó ninguna diferencia entre usar o no ACTH junto con el cocktail 2i, curiosamente vimos que al trabajar con blastómeros de embriones congelados y el cocktail R2i se obtenía la mayor tasa de derivación de Bm-mESC de todos los grupos estudiados (38,9%).

Por último, se ha analizado el efecto del precultivo embrionario con el cocktail 2i y R2i sobre la formación de células EPI y la derivación de Bm-mESCs, ya que se ha reportado que el uso de estas combinaciones de moduladores aumentan la formación de células EPI en blastocistos (Nichols *et al.*, 2009; Van Der Jeught *et al.*, 2013, 2014), lo cual daría lugar a mayores tasas de derivación (Campbell *et al.*, 2013). En este trabajo observamos como el cocktail R2i aumentaba el número de células EPI del embrión, aunque esto no se traducía en un aumento de la eficiencia de derivación de Bm-mESCs. La diferencia entre blastómeros y blastocistos puede deberse a que, en el caso de los blastómeros, el aumento del número de células EPI podría no ser homogéneo en los diferentes blastómeros o no ser suficiente para generar líneas Bm-mESCs a partir de los

blastómeros con menor potencial. En el segundo trabajo de esta tesis observamos como la mitad o menos de los blastómeros presentan un mayor potencial pluripotente, siendo más fácil generar Bm-ESC a partir de éstos. Aunque el destino celular de estos blastómeros podría ser parcialmente redirigido mediante el cultivo con R2i (como se explica más adelante en esta discusión), el hecho de utilizar blastómeros randomizados en este primer trabajo no nos permite diferenciar el efecto de este precultivo entre los diferentes blastómeros de un mismo embrión.

De esta forma, analizando las diferentes variables que intervienen en el proceso de derivación conseguimos una tasa de derivación de hasta un 38,9%, partiendo de blastómeros obtenidos de embriones congelados y mediante un cultivo con KSR+R2i+ACTH. Esta mayor eficiencia debiera permitir abordar con mayor facilidad el siguiente objetivo de esta tesis doctoral, al ser necesarios menos embriones para poder determinar el diferente potencial de los blastómeros 1/8 a la hora de generar líneas Bm-mESCs. Sin embargo, cabe destacar que en los experimentos posteriores no fue posible conseguir de nuevo esta elevada tasa de derivación. En el grupo control del experimento de precultivo embrionario con cocktails de inhibidores de este primer estudio, así como en la derivación a partir de blastómeros aislados del segundo estudio de esta tesis doctoral, las tasas de derivación obtenidas fueron del 24,8% y 29%, respectivamente. Esto hace hincapié en la gran variabilidad observada a lo largo de los experimentos de esta tesis doctoral, tanto en lo que se refiere a la derivación de líneas Bm-mESC, como a la generación de células EPI y las características de las líneas generadas. Esta variabilidad entre experimentos podría deberse al uso de diferentes lotes de KSR en los diferentes experimentos realizados a lo largo de esta tesis doctoral, ya que este medio tiene composición desconocida y una gran variabilidad entre lotes. Por todo esto, la variabilidad intrínseca existente en este tipo de experimentos y las tasas de derivación de las Bm-mESCs son dos limitaciones que se deben tener en cuenta en este trabajo, puesto que pueden dificultar extraer conclusiones absolutas.

2. ANÁLISIS DE PARÁMETROS BIOLÓGICOS EN EL PROCESO DE DERIVACIÓN DE Bm-mESC

Una vez analizado el proceso metodológico de derivación de Bm-ESC, se abordó el segundo objetivo de la tesis: determinar si todos los blastómeros del embrión a 8 células son igualmente pluripotentes y capaces de generar líneas mESC en igual medida. Esta cuestión es de gran importancia ya que puede indicar si vale la pena o no seguir invirtiendo esfuerzos en la mejora de las condiciones metodológicas del proceso de derivación. Para responder a esta cuestión, se utilizaron un gran número de blastómeros, que se cultivaron de forma individual bajo las condiciones de cultivo que generaron la mayor tasa de derivación en el primer estudio (R2i + ACTH) con el fin de minimizar las posibles limitaciones técnicas y mantener la trazabilidad del embrión de origen. En un primer experimento, se determinó la capacidad de los blastómeros aislados de un mismo embrión para producir líneas Bm-mESCs. En el segundo, se analizó la capacidad de generar células de la ICM y EPI de los blastómeros de un mismo embrión después de 3 días de cultivo, ya que las células EPI son progenitoras de las mESCs (Boroviak *et al.*, 2014).

Los resultados del primer experimento mostraron que el porcentaje de embriones que producen al menos una línea de Bm-mESC (84,1%) es parecido al porcentaje de blastocistos que generan líneas de Bc-mESC (85,3%). Sin embargo, una de las grandes ventajas de derivar a partir de blastómeros es la de poder obtener un mayor número de líneas utilizando menos embriones para ello, hecho que en este trabajo demostramos al obtener hasta tres veces más líneas a partir de blastómeros que si hubiéramos usado blastocistos enteros. Estos resultados indican que más de un blastómero de cada embrión en estadio de 8 células es capaz de producir Bm-mESCs, siendo lo más común obtener 1-4 líneas Bm-mESC por embrión. No fue posible obtener 8 líneas de Bm-mESC a partir de ninguno de los 126 embriones utilizados en este trabajo, pero es de destacar que dos embriones generaron líneas de Bm-mESC a partir de 7 de sus 8 blastómeros. Según nuestro conocimiento de la literatura existente, este es hasta el momento el mayor número de líneas mESC obtenidas a partir de un mismo embrión.

Si bien en el primer experimento el porcentaje de embriones en los que más de la mitad de los blastómeros fueron capaces de generar una línea de mESC fue muy bajo (8,5%), en el segundo

experimento observamos que en un 60% de los embriones más de la mitad de los blastómeros se desarrollaron en agregados con células EPI a los 3 días de cultivo. Además, el 100% de los embriones generaron al menos un agregado con células EPI, mientras que en el primer experimento un 15,9% de los embriones no dieron lugar a ninguna línea de mESC. Por otro lado, se observó una gran variabilidad en el número de células EPI por agregado entre los diferentes blastómeros. Conjuntamente, todos estos resultados sugieren que el factor limitante para que un blastómero sea capaz de formar una línea de Bm-mESC podría ser el número de células EPI que este es capaz de generar. Combinando los datos de los dos experimentos estimamos que un blastómero 1/8 debería ser capaz de producir un número mínimo de 5 células EPI durante los primeros 3 días de cultivo para poder formar una línea Bm-mESCs. Curiosamente, este número es similar a las 4 o más células EPI que se han reportado como necesarias en el momento de la implantación para que un embrión pueda llegar a término (Morris *et al.*, 2012).

Globalmente, los resultados de estos experimentos indican que no todos los blastómeros del embrión a 8 células son igualmente competentes para generar líneas Bm-mESCs, debido a su diferente capacidad para formar un mínimo de células EPI. Solo la mitad o menos de los blastómeros mostrarían esta competencia en la mayoría de los embriones, mientras que el resto de los blastómeros tendrían un potencial de desarrollo más restringido. Estos resultados son consistentes con los de otros autores, que han descrito también una diferente capacidad de los blastómeros de embriones de 2, 4 y 8 células, tanto aislados como en el embrión intacto, para generar células TE, EPI y PE (Tabansky *et al.*, 2013; Caser *et al.*, 2017; Krawczyk *et al.*, 2021; Maemura *et al.*, 2021). Esta diferencia de potencial podría originarse ya en la primera división embrionaria, ya que algunos estudios sugieren que la primera división divide el plano celular, generando una célula que formaría predominantemente ICM y otra que formaría TE (Piotrowska-Nitsche *et al.*, 2005; Torres-Padilla *et al.*, 2007; Jedrusik *et al.*, 2008). Además, se han descrito diferencias moleculares entre blastómeros ya en el estadio de 2 células (Bruce, 2013; Boiani *et al.*, 2029; Toyooka, 2020; White and Plachta, 2020).

Sin embargo, hay que tener en cuenta también otros factores como la plasticidad del embrión y las condiciones de cultivo. El aislamiento de los blastómeros da lugar a una falta de contactos célula-célula y una pérdida de la información de su posición y polaridad, de forma que su posible

predeterminación hacia un destino celular puede eliminarse o cambiar (Lorthongpanich *et al.*, 2012). En concreto, los blastómeros 1/8 muestran una reducida habilidad para formar células EPI pluripotentes al aislarse y cultivarse en medio embrionario, tendiendo a desarrollarse en forma de vesículas trofoblásticas (Krawczyk *et al.*, 2021; Maemura *et al.*, 2021). Sin embargo, su potencial pluripotente puede recuperarse o expandirse mediante el uso de E-caderina para imitar los contactos celulares (González *et al.*, 2011a) o el uso de moduladores de las vías de señalización en el medio de cultivo. Como hemos demostrado en el primer trabajo de esta tesis, el uso de R2i produce un aumento de las células EPI del embrión y otros autores han descrito que la inhibición de MEK permite la retención de las células pluripotentes durante las primeras etapas del proceso de derivación de mESC (Buehr y Smith, 2003). Así, el cocktail de inhibidores R2i usado en nuestros experimentos podría prevenir la pérdida de potencial de los blastómeros tras el aislamiento y pérdida de los contactos celulares, así como revertir la predeterminación hacia linajes celulares no pluripotentes preexistente en algunos de los blastómeros antes de su aislamiento.

De esta forma, las tasas de derivación de Bm-mESC obtenidas resultan probablemente de la combinación de las limitaciones biológicas en cuanto a potencial de desarrollo de los diferentes blastómeros en el embrión intacto (la mitad o más de los blastómeros estarían predeterminados hacia un linaje no pluripotente), la plasticidad del embrión (que permite cambiar la predeterminación existente una vez aislados los blastómeros) y las condiciones de cultivo (que permiten potenciar la pluripotencia de los blastómeros). En esta situación, los esfuerzos para mejorar las tasas de derivación de Bm-mESC deberían enfocarse en mejorar aún más las condiciones de cultivo de los blastómeros para mantener, tras el aislamiento, el potencial pluripotente de aquellos con mayor potencial de desarrollo en el embrión intacto y redirigir el destino celular de aquellos blastómeros menos competentes hacia el linaje EPI.

3. PROPIEDADES DE LAS LÍNEAS Bm-mESCs GENERADAS DEL MISMO EMBRIÓN

El diferente potencial observado entre los blastómeros 1/8 podría traducirse en diferencias entre las líneas Bm-mESCs generadas a partir de distintos blastómeros de un mismo embrión. Para averiguarlo, nos planteamos como tercer objetivo de esta tesis analizar si estas presentaban el

mismo perfil transcriptómico o el mismo potencial de diferenciación a las tres láminas germinales. Este estudio se realizó únicamente con las líneas Bm-mESC generadas a partir de los embriones que formaron mayor número de líneas, es decir, dos embriones que generaron 7 líneas y uno de los embriones que generó 5 líneas.

Un primer análisis por RNA-seq de la expresión génica de las líneas reveló cómo estas segregaban según su embrión de origen, al contrario de lo que se había observado en un estudio previo con líneas derivadas de blastómeros de embriones humanos (Zdravkovic *et al.*, 2015). Esta diferencia puede deberse a las diferencias a nivel genético entre los embriones de las dos especies, teniendo en cuenta que los embriones humanos de los que derivan las líneas usadas provenían de una misma pareja y que los de ratón corresponden a la F2, con una diferente contribución en su genoma de las dos cepas consanguíneas parentales. Además, en este otro trabajo utilizaron sólo 1 línea en dos embriones y 3-4 líneas en otros dos, es decir, sin llegar a más de la mitad de los blastómeros de cada embrión.

Gracias a las herramientas bioinformáticas, pudimos suprimir la variabilidad generada por el efecto embrionario y observamos como sin este efecto las líneas generadas a partir de un mismo embrión se separaban transcripcionalmente en dos grupos, con diferente potencial pluripotente: uno con mayor expresión de genes relacionados con desarrollo embrionario y la pluripotencia *core* y *naïve*, y otro con mayor expresión de genes relacionados con diferenciación neuronal y pluripotencia *primed*. El hecho de que este patrón se repitiera en los tres embriones utilizados sugiere que no se trata de diferencias adquiridas durante el proceso de derivación y cultivo de las líneas, sino que probablemente tienen su origen en los blastómeros que dieron lugar a estas líneas. Por lo tanto, parece que el patrón transcripcional de las líneas Bm-mESC retiene una cierta memoria de su blastómero parental, que se mantiene durante la derivación y el cultivo durante más de 9 pases. La existencia de dos grupos claramente diferenciados de líneas Bm-mESC originadas a partir de un mismo embrión, con diferente expresión de genes relacionados con la pluripotencia, parece corroborar los resultados obtenidos en los experimentos anteriores sobre la existencia de dos grupos de blastómeros en el embrión a 8 células, con diferente potencial de desarrollo. Parece aceptable asumir que los blastómeros con un mayor potencial de desarrollo

den lugar a líneas Bm-mESC con una mayor capacidad pluripotente, mientras los blastómeros con un potencial más restringido formarían líneas con menor potencial pluripotente.

A pesar de las diferencias transcripcionales observadas entre las líneas Bm-mESC obtenidas de un mismo embrión, no se detectaron diferencias en su capacidad de diferenciación hacia los tres linajes embrionarios (endodermo, mesodermo y ectodermo) a los 7 días de cultivo en ausencia de *feeder cells*, LIF y R2i, ni ninguna propensión a diferenciarse hacia un linaje concreto.

CONCLUSIONES

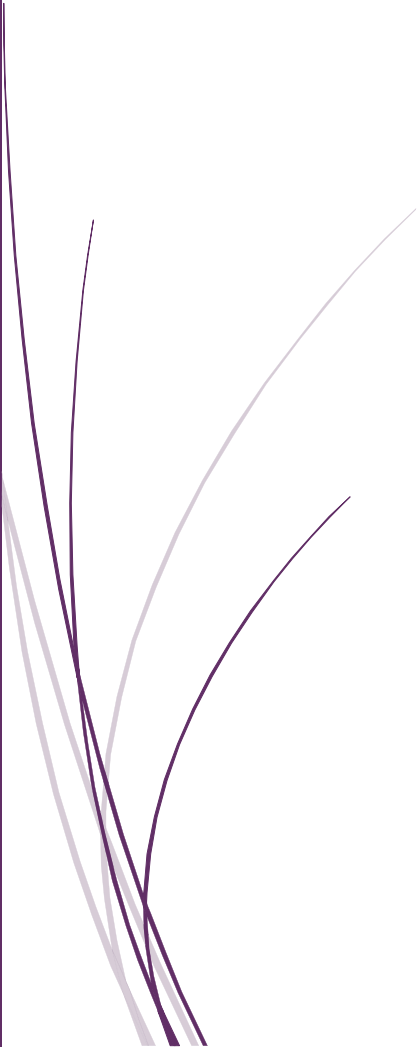


A partir de los trabajos realizados sobre la optimización del proceso de derivación de Bm-mESCs, la capacidad de los diferentes blastómeros del embrión a 8 células de ratón para generar líneas de Bm-mESC y las características de las líneas de Bm-mESC generadas del mismo embrión, en esta tesis doctoral podemos concluir que:

1. La criopreservación de los embriones previa a la biopsia no afecta las tasas de derivación de Bm-mESCs, así como tampoco la expresión de marcadores de pluripotencia ni la integridad del cariotipo de las líneas de Bm-mESC generadas.
2. La hormona ACTH puede ser prescindible a la hora de derivar Bm-mESCs, aunque es favorable cuando se trabaja con embriones criopreservados y los blastómeros son cultivados en presencia del cocktail R2i.
3. El uso del cocktail R2i, junto con ACTH y partiendo de embriones criopreservados, dio lugar a la mayor tasa de derivación de Bm-mESCs (38,9%) entre todos los grupos experimentales estudiados. Además, el cocktail R2i genera líneas de Bm-mESCs con expresión de marcadores de pluripotencia *naïve* y una mayor integridad del cariotipo respecto al cocktail 2i.
4. El uso de blastómeros 1/8 aislados genera hasta tres veces más cantidad de líneas de mESCs que la derivación a partir de blastocistos, ya que más de un blastómero por embrión es capaz de generar Bm-mESCs.
5. Los blastómeros 1/8 aislados del mismo embrión no son igualmente competentes a la hora de generar células EPI y líneas de Bm-mESCs. Pero las tasas de derivación también se ven afectadas por las condiciones de cultivo y la plasticidad de los blastómeros tras su aislamiento. En este sentido, la mitad o menos de los blastómeros presentarían un mayor potencial para generar líneas Bm-mESCs. El resto presentarían un potencial más restringido, aunque el uso de R2i parece redirigir su destino hacia un linaje pluripotente. Esto ha permitido la obtención de hasta 7 líneas de Bm-mESCs a partir de un mismo embrión.
6. Las líneas de Bm-mESC derivadas a partir de un mismo embrión se separan en dos grupos claramente diferenciados por su perfil transcripcional. La mitad de las líneas muestran una mayor expresión de genes relacionados con la pluripotencia y el desarrollo, y podrían derivar de los blastómeros con mayor potencial pluripotente en el embrión intacto.

7. A pesar de las diferencias a nivel transcripcional, los dos grupos de líneas de Bm-mESC generadas a partir de un mismo embrión no presentan diferencias en su potencial de diferenciación a células de las tres láminas germinales.

BIBLIOGRAFIA



A

- Acevedo N., Wang X., Dunn R. L., and Smith G. D. (2007). Glycogen synthase kinase-3 regulation of chromatin segregation and cytokinesis in mouse preimplantation embryos. *Molecular Reproduction and Development*, **74** (2), 178–188. doi: 10.1002/mrd.20495
- Alarcón V. B. and Marikawa, Y. (2005). Unbiased contribution of the first two elastomeres to mouse blastocyst development. *Molecular Reproduction and Development*, **72** (3), 354–361. doi: 10.1002/mrd.20353
- Allègre, N., Chauveau, S., Dennis, C., Renaud, Y., Meistermann, D., Estrella, L. V., Pouchin, P., Cohen-Tannoudji, M., David, L., and Chazaud, C. (2022). NANOG initiates epiblast fate through the coordination of pluripotency genes expression. *Nature Communications*, **13** (1), 3550. doi: 10.1038/s41467-022-30858-8
- Alonso-Alonso, S., Santalo, J., and Ibanez, E. (2022). Efficient generation of embryonic stem cells from single blastomeres of cryopreserved mouse embryos in the presence of signalling modulators. *Reproduction, Fertility and Development*, **34** (7), 576–587. doi: 10.1071/RD21297
- Ambrosetti, D. C., Basilico, C., and Dailey, L. (1997). Synergistic activation of the fibroblast growth factor 4 enhancer by Sox2 and Oct-3 depends on protein-protein interactions facilitated by a specific spatial arrangement of factor binding sites. *Molecular and Cellular Biology*, **17** (11), 6321–6329. doi: 10.1128/mcb.17.11.6321
- Amit, M., Shariki, C., Margulets, V., and Itskovitz-Eldor, J. (2004). Feeder Layer- and Serum-Free Culture of Human Embryonic Stem Cells 1 Analysis of Cloning Efficiency. *Biology of Reproduction*, **70**, 837–845. doi: 10.1095/biolreprod.103.021147
- Anani, S., Bhat, S., Honma-Yamanaka, N., Krawchuk, D., and Yamanaka, Y. (2014). Initiation of Hippo signaling is linked to polarity rather than to cell position in the pre-implantation mouse embryo. *Development*, **141** (14), 2813–2824. doi: 10.1242/dev.107276
- Arabadjiev, B., Petkova, R., Momchilova, A., Chakarov, S., and Pankov, R. (2012). Of mice and men – differential mechanisms of maintaining the undifferentiated state in mESC and hESC.

Biodiscovery, **3**, 1. doi: 10.7750/biodiscovery.2012.3.1

Arnold, S. J., and Robertson, E. J. (2009). Making a commitment: Cell lineage allocation and axis patterning in the early mouse embryo. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, **10** (2), 91–103. doi: 10.1038/nrm2618

Assadollahi, V., Hassanzadeh, K., Abdi, M., Alasvand, M., Nasser, S., and Fathi, F. (2019). Effect of embryo cryopreservation on derivation efficiency, pluripotency, and differentiation capacity of mouse embryonic stem cells. *Journal of Cellular Physiology*, **234** (12), 21962–21972. doi: 10.1002/jcp.28759

Aubert, J., Dunstan, H., Chambers, I., and Smith, A. (2002). Functional gene screening in embryonic stem cells implicates Wnt antagonism in neural differentiation. *Nature Biotechnology*, **20** (12), 1240–1245. doi: 10.1038/nbt763

Auerbach, W., and DeChiara, T. M. (2017). Injecting embryonic stem cells into eight-cell-stage mouse embryos. *Cold Spring Harbor Protocols*, **2017** (9), 701–705. doi: 10.1101/pdb.prot094367

Avilion, A. A., Nicolis, S. K., Pevny, L. H., Perez, L., Vivian, N., and Lovell-badge, R. (2003). Multipotent cell lineages in early mouse development depend on SOX2 function. *Genes and Development*, **17**, 126–140. doi: 10.1101/gad.224503.derm

Avior, Y., Sagi, I., and Benvenisty, N. (2016). Pluripotent stem cells in disease modelling and drug discovery. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, **17** (3), 170–182. doi: 10.1038/nrm.2015.27

B

Beattie, G. M., Lopez, A. D., Bucay, N., Hinton, A., Firpo, M. T., King, C. C., and Hayek, A. (2005). Activin A Maintains Pluripotency of Human Embryonic Stem Cells in the Absence of Feeder Layers. *Stem Cells*, **23**, 489–495. doi: 10.1634/stemcells.2004-0279

Bhutani, N., Brady, J. J., Damian, M., Sacco, A., Stéphane, Y., and Blau, H. M. (2010). Reprogramming towards pluripotency requires AID-dependent DNA demethylation. *Nature*, **463** (7284), 1042–1047. doi: 10.1038/nature08752.Reprogramming

- Biancotti, J. C., and Benvenisty, N. (2011). Aneuploid human embryonic stem cells: origins and potential for modeling chromosomal disorders. *Regen Med*, **6** (4), 493–503. doi: 10.2217/RME.11.27
- Biancotti, J. C., Narwani, K., Buehler, N., Mandefro, B., Golan-Lev, T., Yanuka, O., Clark, A., Hill, D., Benvenisty, N., and Lavon, N. (2010). Human embryonic stem cells as models for aneuploid chromosomal syndromes. *Stem Cells*, **28** (9), 1530–1540. doi: 10.1002/stem.483
- Biase, F. H., Cao, X., and Zhong, S. (2014). Cell fate inclination within 2-cell and 4-cell mouse embryos revealed by single-cell RNA sequencing. *Genome Research*, **24** (11), 1787–1796. doi: 10.1101/gr.177725.114
- Biggers, J. D., McGinnis, L. K., and Raffin, M. (2000). Amino Acids and Preimplantation Development of the Mouse in Protein-Free Potassium Simplex Optimized Medium. *Biology of Reproduction*, **63** (1), 281–293. doi: 10.1095/biolreprod63.1.281
- Biggins, J. S., Royer, C., Watanabe, T., and Srinivas, S. (2015). Towards understanding the roles of position and geometry on cell fate decisions during preimplantation development. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, **47–48**, 74–79. doi: 10.1016/J.SEMCDB.2015.09.006
- Blair, K., Wray, J., and Smith, A. (2011). The Liberation of Embryonic Stem Cells. *PLoS Genetics*, **7** (4), 1–6. doi: 10.1371/journal.pgen.1002019
- Blanpain, C., and Fuchs, E. (2014). Plasticity of epithelial stem cells in tissue regeneration. *Science*, **344** (6189), 1242281. doi: 10.1126/science.1242281.Plasticity
- Boeuf, H., Hauss, C., De Graeve, F., Baran, N., and Kedinger, C. (1997). Leukemia inhibitory factor-dependent transcriptional activation in embryonic stem cells. *Journal of Cell Biology*, **138** (6), 1207–1217. doi: 10.1083/jcb.138.6.1207
- Boiani, M., Casser, E., Fuellen, G., and Christians, E. S. (2019). Totipotency continuity from zygote to early blastomeres: A model under revision. *Reproduction*, **158** (2), R49–R65. doi: 10.1530/REP-18-0462
- Boj, S. F., Hwang, C. I., Baker, L. A., Chio, I. I. C., Engle, D. D., Corbo, V., Jager, M., Ponz-Sarvisé, M.,

- Tiriac, H., Spector, M. S. et al. (2015). Organoid models of human and mouse ductal pancreatic cancer. *Cell*, **160** (1–2), 324–338. doi: 10.1016/j.cell.2014.12.021
- Boroviak, T., Loos, R., Bertone, P., Smith, A., and Nichols, J. (2014). The ability of inner-cell-mass cells to self-renew as embryonic stem cells is acquired following epiblast specification. *Nature Cell Biology*, **16** (6), 513–525. doi: 10.1038/NCB2965
- Bourillot, P. Y., Aksoy, I., Schreiber, V., Wianny, F., Schulz, H., Hummel, O., Hubner, N., and Savatier, P. (2009). Novel STAT3 target genes exert distinct roles in the inhibition of mesoderm and endoderm differentiation in cooperation with Nanog. *Stem Cells*, **27** (8), 1760–1771. doi: 10.1002/stem.110
- Bourillot, P. Y., and Savatier, P. (2010). Krüppel-like transcription factors and control of pluripotency. *BMC Biology*, **8**, 125. doi: 10.1186/1741-7007-8-125
- Brons, I. G. M., Smithers, L. E., Trotter, M. W. B., Rugg-Gunn, P., Sun, B., Chuva De Sousa Lopes, S. M., Howlett, S. K., Clarkson, A., Ahrlund-Richter, L., Pedersen, R. A. et al. (2007). Derivation of pluripotent epiblast stem cells from mammalian embryos. *Nature*, **448** (7150), 191–195. doi: 10.1038/nature05950
- Brook, F. A., Evans, E. P., Lord, C. J., Lyons, P. A., Rainbow, D. B., Howlett, S. K., Wicker, L. S., Todd, J. A., and Gardner, R. L. (2003). The Derivation of Highly Germline-Competent Embryonic Stem Cells Containing NOD-Derived Genome. *Diabetes*, **52** (1), 205–208. doi: 10.2337/diabetes.52.1.205
- Brook, F. A., and Gardner, R. L. (1997). The origin and efficient derivation of embryonic stem cells in the mouse. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **94** (11), 5709. doi: 10.1073/PNAS.94.11.5709
- Bruce, A. W. (2013). Generating different genetic expression patterns in the early embryo: Insights from the mouse model. *Reproductive BioMedicine Online*, **27** (6), 586–592. doi: 10.1016/j.rbmo.2013.03.024
- Bryja, V., Bonilla, S., Parish, C. L., Catherine, M., Luo, Y., Rao, M. S., and Arenas, E. (2006). An Efficient Method for the Derivation of Mouse Embryonic Stem Cells. *Stem Cells*, **24** (4), 844–849. doi:

10.1634/stemcells.2005-0444

Buehr, M., and Smith, A. (2003). Genesis of embryonic stem cells. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, **358** (1436), 1397–1402. doi: 10.1098/rstb.2003.1327

Burdon, T., Chambers, I., Stracey, C., Niwa, H., and Smith, A. (1999). Signaling mechanisms regulating self-renewal and differentiation of pluripotent embryonic stem cells. *Cells Tissues Organs*, **165** (3–4), 131–143. doi: 10.1159/000016693

Burton, A., Muller, J., Tu, S., Padilla-Longoria, P., Guccione, E., and Torres-Padilla, M. E. (2013). Single-cell profiling of epigenetic modifiers identifies PRDM14 as an inducer of cell fate in the mammalian embryo. *Cell Reports*, **5** (3), 687–701. doi: 10.1016/J.CELREP.2013.09.044

C

Campbell, J. M., Lane, M., Vassiliev, I., and Nottle, M. B. (2013). Epiblast cell number and primary embryonic stem cell colony generation are increased by culture of cleavage stage embryos in insulin. *Journal of Reproduction and Development*, **59** (2), 131–138. doi: 10.1262/jrd.2012-103

Capecchi, M. R. (2005). Gene targeting in mice: Functional analysis of the mammalian genome for the twenty-first century. *Nature Reviews Genetics*, **6** (6), 507–512. doi: 10.1038/nrg1619

Casser, E., Israel, S., Schlatt, S., Nordhoff, V., and Boiani, M. (2018). Retrospective analysis: Reproducibility of interblastomere differences of mRNA expression in 2-cell stage mouse embryos is remarkably poor due to combinatorial mechanisms of blastomere diversification. *Molecular Human Reproduction*, **24** (7), 388–400. doi: 10.1093/molehr/gay021

Casser, E., Israel, S., Witten, A., Schulte, K., Schlatt, S., Nordhoff, V., and Boiani, M. (2017). Totipotency segregates between the sister blastomeres of two-cell stage mouse embryos. *Scientific Reports*, **7** (1), 8299. doi: 10.1038/s41598-017-08266-6

Chambers, I., Silva, J., Colby, D., Nichols, J., Nijmeijer, B., Robertson, M., Vrana, J., Jones, K., Grotewold, L., and Smith, A. (2007). Nanog safeguards pluripotency and mediates germline development. *Nature*, **450** (7173), 1230–1234. doi: 10.1038/nature06403

- Chazaud, C., and Yamanaka, Y. (2016). Lineage specification in the mouse preimplantation embryo. *Development*, **143** (7), 1063–1074. doi: 10.1242/dev.128314
- Chazaud, C., Yamanaka, Y., Pawson, T., and Rossant, J. (2006). Early Lineage Segregation between Epiblast and Primitive Endoderm in Mouse Blastocysts through the Grb2-MAPK Pathway. *Developmental Cell*, **10** (5), 615–624. doi: 10.1016/j.devcel.2006.02.020
- Chen, L., Wang, D., Wu, Z., Ma, L., and Daley, G. Q. (2010). Molecular basis of the first cell fate determination in mouse embryogenesis. *Cell Research*, **20** (9), 982–993. doi: 10.1038/cr.2010.106
- Chen, X., Ye, S., and Ying, Q. L. (2015). Stem cell maintenance by manipulating signaling pathways: Past, current and future. *BMB Reports*, **48** (12), 668–676. doi: 10.5483/BMBRep.2015.48.12.215
- Choi, J., Huebner, A. J., Clement, K., Walsh, R. M., Lin, K., Gu, H., Stefano, B. Di, Brumbaugh, J., Kim, S., Sharif, J. et al. (2017). Prolonged Mek1/2 suppression impairs the developmental potential of embryonic stem cells. *Nature*, **548** (7666), 219–223. doi: 10.1038/nature23274
- Choupani, F., Assadollahi, V., Vahabzadeh, Z., Daneshi, E., Abouzaripour, M., Soleimani, F., Bahrami, S., and Fathi, F. (2022). Feeding role of mouse embryonic fibroblast cells is influenced by genetic background, cell passage and day of isolation. *Zygote*, **30** (4), 550-560. doi: 10.1017/S0967199421000083
- Chung, Y. G., Eum, J. H., Lee, J. E., Shim, S. H., Sepilian, V., Hong, S. W., Lee, Y., Treff, N. R., Choi, Y. H., Kimbrel, E. A. et al. (2014). Human somatic cell nuclear transfer using adult cells. *Cell Stem Cell*, **14** (6), 777–780. doi: 10.1016/j.stem.2014.03.015
- Chung, Y., Klimanskaya, I., Becker, S., Li, T., Maserati, M., Lu, S. J., Zdravkovic, T., Ilic, D., Genbacev, O., Fisher, S. et al. (2008). Human Embryonic Stem Cell Lines Generated without Embryo Destruction. *Cell Stem Cell*, **2** (2), 113–117. doi: 10.1016/j.stem.2007.12.013
- Chung, Y., Klimanskaya, I., Becker, S., Marh, J., Lu, S. J., Johnson, J., Meisner, L., and Lanza, R. (2006). Embryonic and extraembryonic stem cell lines derived from single mouse blastomeres. *Nature*, **439** (7073), 216–219. doi: 10.1038/nature04277

- Clevers, H. (2015). What is an adult stem cell? *Science*, **350** (6266), 1319–1320. doi: 10.1126/SCIENCE.AAD7016
- Cockburn, K., Biechele, S., Garner, J., and Rossant, J. (2013). The hippo pathway member nf2 is required for inner cell mass specification. *Current Biology*, **23** (13), 1195–1201. doi: 10.1016/j.cub.2013.05.044
- Cockburn, K., and Rossant, J. (2010). Making the blastocyst: lessons from the mouse. *The Journal of Clinical Investigation*, **120** (4), 995–1003. doi: 10.1172/JCI41229
- Condic, M. L. (2014). Totipotency: What it is and what it is not. In *Stem Cells and Development*, **23** (8), 796–812. doi: 10.1089/scd.2013.0364
- Costa-Borges, N., Gonzalez, S., Ibañez, E., and Santalo, J. (2009). Collection and Cryopreservation of Hamster Oocytes and Mouse Embryos. *Journal of Visualized Experiments*, **27** (25), 112. doi: 10.3791/1120
- Czechanski, A., Byers, C., Greenstein, I., Schrode, N., Donahue, L. R., Hadjantonakis, A. K., and Reinholdt, L. G. (2014). Derivation and characterization of mouse embryonic stem cells from permissive and nonpermissive strains. *Nature Protocols*, **9** (3), 559–574. doi: 10.1038/nprot.2014.030

D

-
- Dasiman, R., Rahman, N. S. A., Othman, S., Mustafa, M. F., Yusoff, N. J. M., Jusoff, W. H. W., Rajikin, M. H., Froemming, G. R. A., and Khan, N. A. M. N. (2013). Cytoskeletal alterations in different developmental stages of in vivo cryopreserved preimplantation murine embryos. *Medical Science Monitor Basic Research*, **19**, 258–266. doi: 10.12659/MSMBR.884019
- Davies, T. J., and Fairchild, P. J. (2012). Optimization of protocols for derivation of mouse embryonic stem cell lines from refractory strains, including the non obese diabetic mouse. *Stem Cells and Development*, **21** (10), 1688–1700. doi: 10.1089/scd.2011.0427
- Delhaise, F., Bralion, V., Schuurbiens, N., and Dessy, F. (1996). Establishment of an embryonic stem cell line from blastocyst stage mouse embryos. *Romanian Journal of Morphology and Embryology*,

34 (4), 237–243. doi: 10.1076/ejom.34.4.237.13046

Deuse, T., Wang, D., Stubbendorff, M., Itagaki, R., Grabosch, A., Greaves, L. C., Alawi, M., Grünewald, A., Hu, X., Hua, X. et al. (2015). SCNT-derived ESCs with mismatched mitochondria trigger an immune response in allogeneic hosts. *Cell Stem Cell*, **16** (1), 33–38. doi: 10.1016/j.stem.2014.11.003

Dietrich, J. E., and Hiiragi, T. (2007). Stochastic patterning in the mouse pre-implantation embryo. *Development*, **134** (23), 4219–4231. doi: 10.1242/dev.003798

Distefano, T., Chen, H. Y., Panebianco, C., Kaya, K. D., Brooks, M. J., Gieser, L., Morgan, N. Y., Pohida, T., and Swaroop, A. (2021). Accelerated and Improved Differentiation of Retinal Organoids from Pluripotent Stem Cells in Rotating-Wall Vessel Bioreactors. *Stem Cell Reports*, **10** (1), 300–313. doi: 10.1016/j.stemcr.2017.11.001

Dobin, A., Davis, C. A., Schlesinger, F., Drenkow, J., Zaleski, C., Jha, S., Batut, P., Chaisson, M., and Gingeras, T. R. (2013). STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics*, **29** (1), 15–21. doi: 10.1093/BIOINFORMATICS/BTS635

Drost, J., and Clevers, H. (2018). Organoids in cancer research. *Nature Reviews Cancer*, **18** (7), 407–418. doi: 10.1038/s41568-018-0007-6

Du, J., Wu, Y., Ai, Z., Shi, X., Chen, L., and Guo, Z. (2014). Mechanism of SB431542 in inhibiting mouse embryonic stem cell differentiation. *Cellular Signalling*, **26** (10), 2107–2116. doi: 10.1016/j.cellsig.2014.06.002

Du, P., Pirouz, M., Choi, J., Huebner, A. J., Clement, K., Meissner, A., Hochedlinger, K., and Gregory, R. I. (2018). An intermediate pluripotent state controlled by microRNAs is required for the Naïve to Primed Stem Cell Transition. *Cell Stem Cell*, **22** (6), 851–864. doi: 10.1016/j.stem.2018.04.021

Ducibella, T., and Anderson, E. (1975). Cell shape and membrane changes in the eight-cell mouse embryo: Prerequisites for morphogenesis of the blastocyst. *Developmental Biology*, **47** (1), 45–58. doi: 10.1016/0012-1606(75)90262-6

Ducibella, T., Ukena, T., Karnovsky, M., and Anderson, E. (1977). Changes in cell surface and cortical cytoplasmic organization during early embryogenesis in the preimplantation mouse embryo. *Journal of Cell Biology*, **74** (1), 153–167. doi: 10.1083/jcb.74.1.153

E

Eckersley-Maslin, M. A., Svensson, V., Krueger, C., Stubbs, T. M., Giehr, P., Krueger, F., Miragaia, R. J., Kyriakopoulos, C., Berrens, R. V. et al. (2016). MERVL/Zscan4 Network Activation Results in Transient Genome-wide DNA Demethylation of mESCs. *Cell Reports*, **17** (1), 179–192. doi: 10.1016/j.celrep.2016.08.087

Eiselleova, L., Peterkova, I., Neradil, J., Slaninova, I., Hampl, A., and Dvorak, P. (2008). Comparative study of mouse and human feeder cells for human embryonic stem cells. *International Journal of Developmental Biology*, **52** (4), 353–363. doi: 10.1387/ijdb.082590le

Eistetter, H. R. (1989). Pluripotent Embryonal Stem Cell Lines Can Be Established from Disaggregated Mouse Morulae. *Development Growth and Differentiation*, **31** (3), 275–282. doi: 10.1016/s1472-6483(10)60910-8

Endoh, M., and Niwa, H. (2022). Stepwise pluripotency transitions in mouse stem cells. *EMBO Reports*, **23** (9), e55010. doi: 10.15252/embr.202255010

Evans, M. J., and Kaufman, M. H. (1981). Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature*, **292** (5819), 154–156. doi: 10.1038/292154a0

Ezekiel, U. R., Muthuchamy, M., Ryerse, J. S., and Heuertz, R. M. (2007). Single embryoid body formation in a multi-well plate. *Electronic Journal of Biotechnology*, **10** (2), 328–335. doi: 10.2225/vol10-issue2-fulltext-2

F

Falco, G., Lee, S. L., Stanghellini, I., Bassey, U. C., Hamatani, T., and Ko, M. S. H. (2007). Zscan4: A novel gene expressed exclusively in late 2-cell embryos and embryonic stem cells. *Developmental Biology*, **307** (2), 539–550. doi: 10.1016/j.ydbio.2007.05.003

- Fei, T., Zhu, S., Xia, K., Zhang, J., Li, Z., Han, J. D. J., and Chen, Y. G. (2010). Smad2 mediates Activin/Nodal signaling in mesendoderm differentiation of mouse embryonic stem cells. *Cell Research*, **20** (12), 1306–1318. doi: 10.1038/cr.2010.158
- Festuccia, N., Osorno, R., Halbritter, F., Karwacki-Neisius, V., Navarro, P., Colby, D., Wong, F., Yates, A., Tomlinson, S. R., and Chambers, I. (2012). Esrrb is a direct Nanog target gene that can substitute for Nanog function in pluripotent cells. *Cell Stem Cell*, **11** (4), 477–490. doi: 10.1016/j.stem.2012.08.002
- Ficz, G., Hore, T. A., Santos, F., Lee, H. J., Dean, W., Arand, J., Krueger, F., Oxley, D., Paul, Y., Walter, J. et al. (2013). FGF Signaling Inhibition in ESCs Drives Rapid Genome-wide Demethylation to the Epigenetic Ground State of Pluripotency. *Cell Stem Cell*, **13** (3), 351–359. doi: 10.1016/j.stem.2013.06.004
- Fierro-González, J. C., White, M. D., Silva, J. C., and Plachta, N. (2013). Cadherin-dependent filopodia control preimplantation embryo compaction. *Nature Cell Biology*, **15** (12), 1424–1433. doi: 10.1038/ncb2875
- Frank, S., Zhang, M., Schöler, H. R., and Greber, B. (2012). Small Molecule-Assisted, Line-Independent Maintenance of Human Pluripotent Stem Cells in Defined Conditions. *PLoS ONE*, **7** (7), e41958. doi: 10.1371/journal.pone.0041958
- Fusaki, N., Ban, H., Nishiyama, A., Saeki, K., and Hasegawa, M. (2009). Efficient induction of transgene-free human pluripotent stem cells using a vector based on Sendai virus, an RNA virus that does not integrate into the host genome. *Proceedings of the Japan Academy Series B: Physical and Biological Sciences*, **85** (8), 348–362. doi: 10.2183/pjab.85.348

G

-
- Galvin, K. E., Travis, E. D., Yee, D., Magnuson, T., and Vivian, J. L. (2010). Nodal Signaling Regulates the Bone Morphogenic Protein Pluripotency Pathway in Mouse Embryonic Stem Cells. *The Journal of Biological Chemistry*, **285** (26), 19747–19756. doi: 10.1074/jbc.M109.077347
- Gao, Y., Liu, X., Tang, B., Li, C., Kou, Z., Li, L., Liu, W., Wu, Y., Kou, X., Li, J. et al. (2017). Protein Expression

- Landscape of Mouse Embryos during Pre-implantation Development. *Cell Reports*, **21** (13), 3957–3969. doi: 10.1016/j.celrep.2017.11.111
- Geens, M., Mateizel, I., Sermon, K., De Rycke, M., Spits, C., Cauffman, G., Devroey, P., Tournaye, H., Liebaers, I., and Van De Velde, H. (2009). Human embryonic stem cell lines derived from single blastomeres of two 4-cell stage embryos. *Human Reproduction*, **24** (11), 2709-2717. doi: 10.1093/HUMREP/DEP262
- Gomes Fernandes, M., Dries, R., Roost, M. S., Semrau, S., Bernardo, A. D. M., Davis, R. P., Ramakrishnan, R., Szuhai, K., Maas, E., Umans, L. et al. (2016). BMP-SMAD Signaling Regulates Lineage Priming, but Is Dispensable for Self-Renewal in Mouse Embryonic Stem Cells. *Stem Cell Reports*, **6** (1), 85–94. doi: 10.1016/j.stemcr.2015.11.012
- González, S., Ibáñez, E., and Santaló, J. (2010). Establishment of mouse embryonic stem cells from isolated blastomeres and whole embryos using three derivation methods. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, **27** (12), 671–682. doi: 10.1007/s10815-010-9473-9
- González, S., Ibáñez, E., and Santaló, J. (2011a). Influence of E-Cadherin-Mediated Cell Adhesion on Mouse Embryonic Stem Cells Derivation from Isolated Blastomeres. *Stem Cell Reviews and Reports*, **7** (3), 494–505. doi: 10.1007/s12015-010-9221-7
- González, S., Ibáñez, E., and Santaló, J. (2011b). Influence of early fate decisions at the two-cell stage on the derivation of mouse embryonic stem cell lines. *Stem Cell Research*, **7** (1), 54–65. doi: 10.1016/J.SCR.2011.03.005
- Goolam, M., Scialdone, A., Graham, S. J. L., MacAulay, I. C., Jedrusik, A., Hupalowska, A., Voet, T., Marioni, J. C., and Zernicka-Goetz, M. (2016). Heterogeneity in Oct4 and Sox2 Targets Biases Cell Fate in 4-Cell Mouse Embryos. *Cell*, **165** (1), 61–74. doi: 10.1016/j.cell.2016.01.047
- Grabarek, J. B., Zzyńska, K., Saiz, N., Piliszek, A., Frankenberg, S., Nichols, J., Hadjantonakis, A. K., and Plusa, B. (2012). Differential plasticity of epiblast and primitive endoderm precursors within the ICM of the early mouse embryo. *Development*, **139** (1), 129–139. doi: 10.1242/DEV.067702
- Guo, G., Huss, M., Tong, G. Q., Wang, C., Li Sun, L., Clarke, N. D., and Robson, P. (2010). Resolution of

Cell Fate Decisions Revealed by Single-Cell Gene Expression Analysis from Zygote to Blastocyst. *Developmental Cell*, **18** (4), 675–685. doi: 10.1016/j.devcel.2010.02.012

Guo, G., Yang, J., Nichols, J., Hall, J. S., Eyres, I., Mansfield, W., and Smith, A. (2009). Klf4 reverts developmentally programmed restriction of ground state pluripotency. *Development*, **136** (7), 1063–1069. doi: 10.1242/dev.030957

H

Hackett, J. A., and Azim Surani, M. (2014). Regulatory principles of pluripotency: From the ground state up. *Cell Stem Cell*, **15** (4), 416–430. doi: 10.1016/j.stem.2014.09.015

Hackett, J. A., Dietmann, S., Murakami, K., Down, T. A., Leitch, H. G., and Surani, M. A. (2013). Synergistic mechanisms of DNA demethylation during transition to ground-state pluripotency. *Stem Cell Reports*, **1** (6), 518–531. doi: 10.1016/j.stemcr.2013.11.010

Hall, J., Guo, G., Wray, J., Eyres, I., Nichols, J., Grotewold, L., Morfopoulou, S., Humphreys, P., Mansfield, W., Walker, R. et al. (2009). Oct4 and LIF/Stat3 Additively Induce Krüppel Factors to Sustain Embryonic Stem Cell Self-Renewal. *Cell Stem Cell*, **5** (6), 597–609. doi: 10.1016/j.stem.2009.11.003

Hanna, J. H., Saha, K., and Jaenisch, R. (2010). Pluripotency and cellular reprogramming: Facts, hypotheses, unresolved issues. *Cell*, **143** (4), 508–525. doi: 10.1016/j.cell.2010.10.008

Hassani, S.-N., Pakzad, M., Asgari, B., Taei, A., and Baharvand, H. (2014). Suppression of transforming growth factor β signaling promotes ground state pluripotency from single blastomeres. *Human Reproduction (Oxford, England)*, **29** (8), 1739–1748. doi: 10.1093/humrep/deu134

Hassani, S. N., Moradi, S., Taleahmad, S., Braun, T., and Baharvand, H. (2019). Transition of inner cell mass to embryonic stem cells: mechanisms, facts, and hypotheses. *Cellular and Molecular Life Sciences*, **76** (5), 873–892. doi: 10.1007/s00018-018-2965-y

Hassani, S. N., Totonchi, M., Farrokhi, A., Taei, A., Larijani, M. R., Gourabi, H., and Baharvand, H. (2012). Simultaneous Suppression of TGF- β and ERK Signaling Contributes to the Highly Efficient and

- Reproducible Generation of Mouse Embryonic Stem Cells from Previously Considered Refractory and Non-permissive Strains. *Stem Cell Reviews and Reports*, **8** (2), 472–481. doi: 10.1007/s12015-011-9306-y
- Hassani, S. N., Totonchi, M., Gourabi, H., Schöler, H. R., and Baharvand, H. (2014). Signaling roadmap modulating naive and primed pluripotency. *Stem Cells and Development*, **23** (3), 193–208. doi: 10.1089/scd.2013.0368
- Hassani, S. N., Totonchi, M., Sharifi-Zarchi, A., Mollamohammadi, S., Pakzad, M., Moradi, S., Samadian, A., Masoudi, N., Mirshahvaladi, S., Farrokhi, A. et al. (2014). Inhibition of TGF β Signaling Promotes Ground State Pluripotency. *Stem Cell Reviews and Reports*, **10** (1), 16–30. doi: 10.1007/s12015-013-9473-0
- Hayashi, K., Ohta, H., Kurimoto, K., Aramaki, S., and Saitou, M. (2011). Reconstitution of the mouse germ cell specification pathway in culture by pluripotent stem cells. *Cell*, **146** (4), 519–532. doi: 10.1016/J.CELL.2011.06.052
- Hiiragi, T., and Solter, D. (2004). First cleavage plane of the mouse egg is not predetermined but defined by the topology of the two apposing pronuclei. *Nature*, **430** (6997), 360–364. doi: 10.1038/nature02595
- Hillman, N., Sherman, M. I., and Graham, C. (1972). The effect of spatial arrangement on cell determination during mouse development. *Journal of Embryology and Experimental Morphology*, **28** (2), 263–278. doi: 10.1242/dev.28.2.263
- Hirate, Y., Hirahara, S., Inoue, K. I., Suzuki, A., Alarcon, V. B., Akimoto, K., Hirai, T., Hara, T., Adachi, M., Chida, K. et al. (2013). Polarity-dependent distribution of angiominin localizes hippo signaling in preimplantation embryos. *Current Biology*, **23** (13), 1181–1194. doi: 10.1016/j.cub.2013.05.014
- Hou, P., Li, Y., Zhang, X., Liu, C., Guan, J., Li, H., Zhao, T., Ye, J., Yang, W., Liu, K. et al. (2013). Pluripotent stem cells induced from mouse somatic cells by small-molecule compounds. *Science*, **341** (6146), 651–654. doi: 10.1126/SCIENCE.1239278
- Huang, G., Ye, S., Zhou, X., Liu, D., and Ying, Q.-L. (2015). Molecular basis of embryonic stem cell self-

renewal: from signaling pathways to pluripotency network HHS Public Access. *Cell Mol Life Sci*, **72** (9), 1741–1757. doi: 10.1007/s00018-015-1833-2

Huang, Y., Osorno, R., Tsakiridis, A., and Wilson, V. (2012). In Vivo Differentiation Potential of Epiblast Stem Cells Revealed by Chimeric Embryo Formation. *Cell Reports*, **2** (6), 1571–1578. doi: 10.1016/j.celrep.2012.10.022

J

Jedrusik, A., Parfitt, D. E., Guo, G., Skamagki, M., Grabarek, J. B., Johnson, M. H., Robson, P., and Zernicka-Goetz, M. (2008). Role of Cdx2 and cell polarity in cell allocation and specification of trophoblast and inner cell mass in the mouse embryo. *Genes & Development*, **22** (19), 2692–2706. doi: 10.1101/GAD.486108

Jiang, J., Chan, Y. S., Loh, Y. H., Cai, J., Tong, G. Q., Lim, C. A., Robson, P., Zhong, S., and Ng, H. H. (2008). A core Klf circuitry regulates self-renewal of embryonic stem cells. *Nature Cell Biology*, **10** (3), 353–360. doi: 10.1038/ncb1698

Johnson, M. H., and Ziomek, C. A. (1981a). Induction of polarity in mouse 8-cell blastomeres: Specificity, geometry, and stability. *Journal of Cell Biology*, **91** (1), 303–308. doi: 10.1083/jcb.91.1.303

Johnson, M. H., and Ziomek, C. A. (1981b). The foundation of two distinct cell lineages within the mouse morula. *Cell*, **24** (1), 71–80. doi: 10.1016/0092-8674(81)90502-X

K

Kanatsu-Shinohara, M., Inoue, K., Lee, J., Yoshimoto, M., Ogonuki, N., Miki, H., Baba, S., Kato, T., Kazuki, Y., Toyokuni, S. et al. (2004). Generation of pluripotent stem cells from neonatal mouse testis. *Cell*, **119** (7), 1001–1012. doi: 10.1016/j.cell.2004.11.011

Kanatsu-Shinohara, M., Miki, H., Inoue, K., Ogonuki, N., Toyokuni, S., Ogura, A., and Shinohara, T. (2005). Long-term culture of mouse male germline stem cells under serum- or feeder-free conditions. *Biology of Reproduction*, **72** (4), 985–991. doi: 10.1095/biolreprod.104.036400

Kanatsu-Shinohara, M., and Shinohara, T. (2007). Culture and genetic modification of mouse germline

- stem cells. *Annals of the New York Academy of Sciences*, **1120**, 59–71. doi: 10.1196/annals.1411.001
- Katayama, M., Ellersieck, M. R., and Roberts, R. M. (2010). Development of monozygotic twin mouse embryos from the time of blastomere separation at the two-cell stage to blastocyst. *Biology of Reproduction*, **82** (6), 1237–1247. doi: 10.1095/biolreprod.109.082982
- Kawase, E., Suemori, H., Takahashi, N., Okazaki, K., Hashimoto, K., and Nakatsuji, N. (1994). Strain difference in establishment of mouse embryonic stem (ES) cell lines. *International Journal of Developmental Biology*, **38** (2), 385–390. doi: 10.1387/IJDB.7981049
- Kehler, J., Tolkunova, E., Koschorz, B., Pesce, M., Gentile, L., Boiani, M., Nagy, A., Mclaughlin, K. J., Scho, H. R., and Lomeli, H. (2004). Oct4 is required for primordial germ cell survival James. *Scientific Reports*, **5** (11), 1078–1083. doi: 10.1038/sj.embor.7400279
- Kelly, K. F., Ng, D. Y., Jayakumar, G., Wood, G. A., Koide, H., and Doble, B. W. (2011). β -catenin enhances Oct-4 activity and reinforces pluripotency through a TCF-independent mechanism. *Cell Stem Cell*, **8** (2), 214–227. doi: 10.1016/j.stem.2010.12.010
- Kelly, S. J. (1977). Studies of the developmental potential of 4- and 8-cell stage mouse blastomeres. *Journal of Experimental Zoology*, **200** (3), 365–376. doi: 10.1002/jez.1402000307
- Kim, D., Kim, C., Moon, J., Chung, Y., Chang, M., Han, B., Ko, S., Yang, E., Cha, K. Y., Lanza, R. et al. (2009). Generation of Human Induced Pluripotent Stem Cells by Direct Delivery of Reprogramming Proteins. *Cell Stem Cell*, **4** (6), 472–476. doi: 10.1016/j.stem.2009.05.005.
- Kinoshita, M., Barber, M., Mansfield, W., Cui, Y., Spindlow, D., Stirparo, G. G., Dietmann, S., Nichols, J., and Smith, A. (2021). Capture of Mouse and Human Stem Cells with Features of Formative Pluripotency. *Cell Stem Cell*, **28** (3), 453–471. doi: 10.1016/J.STEM.2020.11.005
- Klimanskaya, I., Chung, Y., Becker, S., Lu, S. J., and Lanza, R. (2006). Human embryonic stem cell lines derived from single blastomeres. *Nature*, **444** (7118), 481–485. doi: 10.1038/nature05142
- Ko, K., Tapia, N., Wu, G., Kim, J. B., Bravo, M. J. A., Sasse, P., Glaser, T., Ruau, D., Han, D. W., Greber, B.

et al. (2009). Induction of Pluripotency in Adult Unipotent Germline Stem Cells. *Cell Stem Cell*, **5** (1), 87–96. doi: [10.1016/j.stem.2009.05.025](https://doi.org/10.1016/j.stem.2009.05.025)

Kohli, R. M., and Zhang, Y. (2013). TET enzymes, TDG and the dynamics of DNA demethylation. *Nature*, **502** (7472), 472–479. doi: [10.1038/nature12750](https://doi.org/10.1038/nature12750)

Kolberg, L., Raudvere, U., Kuzmin, I., Vilo, J., and Peterson, H. (2020). gprofiler2 -- an R package for gene list functional enrichment analysis and namespace conversion toolset. *F1000Research*, **9** (ELIXIR), 709. doi: [10.12688/f1000research.24956.2](https://doi.org/10.12688/f1000research.24956.2)

Koyanagi-Aoi, M., Ohnuki, M., Takahashi, K., Okita, K., Noma, H., Sawamura, Y., Teramoto, I., Narita, M., Sato, Y., Ichisaka, T. et al. (2013). Differentiation-defective phenotypes revealed by large-scale analyses of human pluripotent stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **110** (51), 20569–20574. doi: [10.1073/pnas.1319061110](https://doi.org/10.1073/pnas.1319061110)

Krawczyk, K., Kosyl, E., Częścik-Łysyszyn, K., Wyszomirski, T., and Maleszewski, M. (2021). Developmental capacity is unevenly distributed among single blastomeres of 2-cell and 4-cell stage mouse embryos. *Scientific Reports*, **11** (1), 21422. doi: [10.1038/s41598-021-00834-1](https://doi.org/10.1038/s41598-021-00834-1)

Kretschmar, K., and Clevers, H. (2016). Organoids : Modeling Development and the Stem Cell Niche in a Dish. *Developmental Cell*, **38** (6), 590–600. doi: [10.1016/j.devcel.2016.08.014](https://doi.org/10.1016/j.devcel.2016.08.014)

Kuroda, T., Tada, M., Kubota, H., Kimura, H., Hatano, S., Suemori, H., Nakatsuji, N., and Tada, T. (2005). Octamer and Sox Elements Are Required for Transcriptional cis Regulation of Nanog Gene Expression. *Molecular and Cellular Biology*, **25** (6), 2475–2485. doi: [10.1128/MCB.25.6.2475](https://doi.org/10.1128/MCB.25.6.2475)

L

Labosky, P. A., Barlow, D. P., and Hogan, B. L. M. (1994). Mouse embryonic germ (EG) cell lines: Transmission through the germline and differences in the methylation imprint of insulin-like growth factor 2 receptor (Igf2r) gene compared with embryonic stem (ES) cell lines. *Development*, **120** (11), 3197–3204. doi: [10.1242/dev.120.11.3197](https://doi.org/10.1242/dev.120.11.3197)

Lancaster, M. A., Renner, M., Martin, C. A., Wenzel, D., Bicknell, L. S., Hurles, M. E., Homfray, T.,

- Penninger, J. M., Jackson, A. P., and Knoblich, J. A. (2013). Cerebral organoids model human brain development and microcephaly. *Nature*, **501** (7467), 373–379. doi: [10.1038/nature12517](https://doi.org/10.1038/nature12517)
- Langfelder, P., and Horvath, S. (2008). WGCNA: An R package for weighted correlation network analysis. *BMC Bioinformatics*, **9**, 559. doi: [10.1186/1471-2105-9-559](https://doi.org/10.1186/1471-2105-9-559)
- Larman, M. G., Katz-Jaffe, M. G., McCallie, B., Filipovits, J. A., and Gardner, D. K. (2011). Analysis of global gene expression following mouse blastocyst cryopreservation. *Human Reproduction*, **26** (10), 2672–2680. doi: [10.1093/humrep/der238](https://doi.org/10.1093/humrep/der238)
- Lee Jr, J., and McCubrey, J. (2002). The Raf/MEK/ERK signal transduction cascade as a target for chemotherapeutic intervention in leukemia. *Leukemia 2002 16:4*, **16** (4), 486–507. doi: [10.1038/sj.leu.2402460](https://doi.org/10.1038/sj.leu.2402460)
- Lee, K. H., Chuang, C. K., Guo, S. F., and Tu, C. F. (2012). Simple and efficient derivation of mouse embryonic stem cell lines using differentiation inhibitors or proliferation stimulators. *Stem Cells and Development*, **21** (3), 373–383. doi: [10.1089/scd.2011.0021](https://doi.org/10.1089/scd.2011.0021)
- Leitch, H. G., Blair, K., Mansfield, W., Ayetey, H., Humphreys, P., Nichols, J., Surani, M. A., and Smith, A. (2010). Embryonic germ cells from mice and rats exhibit properties consistent with a generic pluripotent ground state. *Development*, **137** (14), 2279–2287. doi: [10.1242/dev.050427](https://doi.org/10.1242/dev.050427)
- Li, B., and Dewey, C. N. (2011). RSEM: Accurate transcript quantification from RNA-Seq data with or without a reference genome. *BMC Bioinformatics*, **12**, 323. doi: [10.1186/1471-2105-12-323](https://doi.org/10.1186/1471-2105-12-323)
- Li, M., and Izpisua-Belmonte, J. C. (2017). Ground rules of the pluripotency gene regulatory network. *Nature Reviews Genetics*, **18** (3), 180–191. doi: [10.1038/nrg.2016.156](https://doi.org/10.1038/nrg.2016.156)
- Li, R., and Izpisua Belmonte, J. C. (2021). Protocol for the generation of blastocyst-like structures from mouse extended pluripotent stem cells. *STAR Protocols*, **2** (3), 100745. doi: [10.1016/j.xpro.2021.100745](https://doi.org/10.1016/j.xpro.2021.100745)
- Li, R., Zhong, C., Yu, Y., Liu, H., Sakurai, M., Yu, L., Min, Z., Shi, L., Wei, Y., Takahashi, Y., Liao, et al. (2019). Generation of blastocyst-like structures from mouse embryonic and adult cell cultures. *Cell*, **179**

(3), 687–702. doi: [10.1016/j.cell.2019.09.029](https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.09.029).

Liu, G., David, B. T., Trawczynski, M., and Fessler, R. G. (2020). Advances in Pluripotent Stem Cells: History, Mechanisms, Technologies, and Applications. *Stem Cell Reviews and Reports*, **16** (1), 3–32. doi: [10.1007/s12015-019-09935-x](https://doi.org/10.1007/s12015-019-09935-x)

Llames, S., Garcia-Pérez, E., Meana, A., Larcher, F., and del Rio, M. (2015). Feeder Layer Cell Actions and Applications. *Tissue Engineering*, **21** (4), 345–353. doi: [10.1089/ten.teb.2014.0547](https://doi.org/10.1089/ten.teb.2014.0547)

Lorthongpanich, C., Doris, T. P. Y., Limviphuvadh, V., Knowles, B. B., and Solter, D. (2012). Developmental fate and lineage commitment of singled mouse blastomeres. *Development (Cambridge)*, **139** (20), 3722–3731. doi: [10.1242/dev.086454](https://doi.org/10.1242/dev.086454)

Lorthongpanich, C., Yang, S.-H., Piotrowska-Nitsche, K., Parnpai, R., and Chan, A. W. S. (2008a). Chemical Enhancement in Embryo Development and Stem Cell Derivation from Single Blastomeres. *Cloning and Stem Cells*, **10** (4), 503–512. doi: [10.1089/clo.2008.0035](https://doi.org/10.1089/clo.2008.0035)

Lorthongpanich, C., Yang, S. H., Piotrowska-Nitsche, K., Parnpai, R., and Chan, A. W. S. (2008b). Development of single mouse blastomeres into blastocysts, outgrowths and the establishment of embryonic stem cells. *Reproduction*, **135** (6), 805–813. doi: [10.1530/REP-07-0478](https://doi.org/10.1530/REP-07-0478)

Louvet, S., Aghion, J., Maria, S. A., Mangeat, P., and Maro, B. (1996). Ezrin becomes restricted to outer cells following asymmetric division in the preimplantation mouse embryo. *Biology of the Cell*, **177** (2), 568–579. doi: [10.1016/dbio.1996.0186](https://doi.org/10.1016/dbio.1996.0186)

Love, M. I., Huber, W., and Anders, S. (2014). Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biology*, **15** (12), 550. doi: [10.1186/S13059-014-0550-8](https://doi.org/10.1186/S13059-014-0550-8)

M

Ma, Y., Gu, J., Li, C., Wei, X., Tang, F., Shi, G., Jiang, J., Kuang, Y., Li, J., Wang, Z. et al. (2012). Human foreskin fibroblast produces interleukin-6 to support derivation and self-renewal of mouse embryonic stem cells. *Stem Cell Research and Therapy*, **3** (4), 29. doi: [10.1186/scrt120](https://doi.org/10.1186/scrt120)

Macfarlan, T. S., Gifford, W. D., Driscoll, S., Lettieri, K., Rowe, H. M., Bonanomi, D., Firth, A., Singer, O.,

- Trono, D., and Pfaff, S. L. (2012). Embryonic stem cell potency fluctuates with endogenous retrovirus activity. *Nature*, **487** (7405), 57–63. doi: [10.1038/nature11244](https://doi.org/10.1038/nature11244)
- Maemura, M., Taketsuru, H., Nakajima, Y., Shao, R., Kakihara, A., Nogami, J., Ohkawa, Y., and Tsukada, Y. (2021). Totipotency of mouse zygotes extends to single blastomeres of embryos at the four-cell stage. *Scientific Reports*, **11** (1): 11167. doi: [10.1038/s41598-021-90653-1](https://doi.org/10.1038/s41598-021-90653-1)
- Mahla, R. S. (2016). Stem cells applications in regenerative medicine and disease therapeutics. *International Journal of Cell Biology*, **2016**: 6940283. doi: [10.1155/2016/6940283](https://doi.org/10.1155/2016/6940283)
- Maître, J. L., Niwayama, R., Turlier, H., Nedelec, F., and Hiiragi, T. (2015). Pulsatile cell-autonomous contractility drives compaction in the mouse embryo. *Nature Cell Biology*, **17** (7), 849–855. doi: [10.1038/ncb3185](https://doi.org/10.1038/ncb3185)
- Malik, V., and Wang, J. (2022). Pursuing totipotency: authentic totipotent stem cells in culture. *Trends in Genetics*, **38** (7):632-636. doi: [10.1016/j.tig.2022.03.012](https://doi.org/10.1016/j.tig.2022.03.012)
- Martello, G., Bertone, P., and Smith, A. (2013). Identification of the missing pluripotency mediator downstream of leukaemia inhibitory factor. *EMBO Journal*, **32** (19), 2561–2574. doi: [10.1038/emboj.2013.177](https://doi.org/10.1038/emboj.2013.177)
- Martello, G., and Smith, A. (2014). The Nature of Embryonic Stem Cells. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, **30**, 647–675. doi: [10.1146/annurev-cellbio-100913-013116](https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-100913-013116)
- Martin, G. R. (1981). Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **78** (12), 7634–7638. doi: [10.1073/pnas.78.12.7634](https://doi.org/10.1073/pnas.78.12.7634)
- Masui, S., Nakatake, Y., Toyooka, Y., Shimosato, D., Yagi, R., Takahashi, K., Okochi, H., Okuda, A., Matoba, R., Sharov, A. A. et al. (2007). Pluripotency governed by Sox2 via regulation of Oct3/4 expression in mouse embryonic stem cells. *Nature Cell Biology*, **9** (6), 625–635. doi: [10.1038/ncb1589](https://doi.org/10.1038/ncb1589)
- Matoba, R., Niwa, H., Masui, S., Ohtsuka, S., Carter, M. G., Sharov, A. A., and Ko, M. S. H. (2006).

Dissecting Oct3/4-regulated gene networks in embryonic stem cells by expression profiling. *PLoS ONE*, **1** (1), e26. doi: [10.1371/journal.pone.0000026](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0000026)

Matsuda, T., Nakamura, T., Nakao, K., Arai, T., Katsuki, M., Heike, T., and Yokota, T. (1999). STAT3 activation is sufficient to maintain an undifferentiated state of mouse embryonic stem cells. *EMBO Journal*, **18** (15), 4261–4269. doi: [10.1093/emboj/18.15.4261](https://doi.org/10.1093/emboj/18.15.4261)

Matsui, Y., Toksoz, D., Nishikawa, S., Nishikawa, S. I., Williams, D., Zsebo, K., and Hogan, B. L. M. (1991). Effect of Steel factor and leukaemia inhibitory factor on murine primordial germ cells in culture. *Nature*, **353** (6346), 750–752. doi: [10.1038/353750a0](https://doi.org/10.1038/353750a0)

Meilhac, S. M., Adams, R. J., Morris, S. A., Danckaert, A., Le Garrec, J. F., and Zernicka-Goetz, M. (2009). Active cell movements coupled to positional induction are involved in lineage segregation in the mouse blastocyst. *Developmental Biology*, **331** (2), 210–221. doi: [10.1016/j.ydbio.2009.04.036](https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2009.04.036)

Meloche, S., and Pouysségur, J. (2007). The ERK1/2 mitogen-activated protein kinase pathway as a master regulator of the G1- to S-phase transition. *Oncogene*, **26** (22), 3227–3239. doi: [10.1038/sj.onc.1210414](https://doi.org/10.1038/sj.onc.1210414)

Menchero, S., Rollan, I., Lopez-Izquierdo, A., Andreu, M. J., De Aja, J. S., Kang, M., Adan, J., Benedito, R., Rayon, T., Hadjantonakis, A. K. et al. (2019). Transitions in cell potency during early mouse development are driven by notch. *ELife*, **8**, e42930. doi: [10.7554/eLife.42930](https://doi.org/10.7554/eLife.42930)

Merrill, B. J., Gat, U., DasGupta, R., and Fuchs, E. (2001). Tcf3 and Lef1 regulate lineage differentiation of multipotent stem cells in skin. *Genes and Development*, **15** (13), 1688–1705. doi: [10.1101/gad.891401](https://doi.org/10.1101/gad.891401)

Merrill, B. J., Pasolli, H. A., Polak, L., Rendl, M., García-García, M. J., Anderson, K. V., and Fuchs, E. (2004). Tcf3: A transcriptional regulator of axis induction in the early embryo. *Development*, **131** (2), 263–274. doi: [10.1242/dev.00935](https://doi.org/10.1242/dev.00935)

Mihajlovic, A. I., Thamodaran, V., and Bruce, A. W. (2015). The first two cell-fate decisions of preimplantation mouse embryo development are not functionally independent. *Scientific Reports*, **5**: 15034 doi: [10.1038/srep15034](https://doi.org/10.1038/srep15034)

- Mirzaei, H., Sahebkar, A., Sichani, L. S., Moridikia, A., Nazari, S., Nahand, J. S., Salehi, H., Stenvang, J., Masoudifar, A., Mirzaei, H. R. et al. (2018). Therapeutic application of multipotent stem cells. *Journal of Cellular Physiology*, **233** (4), 2815–2823. doi: [10.1002/JCP.25990](https://doi.org/10.1002/JCP.25990)
- Mitsui, K., Tokuzawa, Y., Itoh, H., Segawa, K., Murakami, M., Takahashi, K., Maruyama, M., Maeda, M., and Yamanaka, S. (2003). The homeoprotein nanog is required for maintenance of pluripotency in mouse epiblast and ES cells. *Cell*, **113** (5), 631–642. doi: [10.1016/S0092-8674\(03\)00393-3](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(03)00393-3)
- Miura, K., Okada, Y., Aoi, T., Okada, A., Takahashi, K., Okita, K., Nakagawa, M., Koyanagi, M., Tanabe, K., Ohnuki, M. et al. (2009). Variation in the safety of induced pluripotent stem cell lines. *Nature Biotechnology*, **27** (8), 743–745. doi: [10.1038/nbt.1554](https://doi.org/10.1038/nbt.1554)
- Morris, S. A., Guo, Y., and Zernicka-Goetz, M. (2012). Developmental Plasticity Is Bound by Pluripotency and the Fgf and Wnt Signaling Pathways. *Cell Reports*, **2** (4), 756–765. doi: [10.1016/j.celrep.2012.08.029](https://doi.org/10.1016/j.celrep.2012.08.029)
- Morris, S. A., Teo, R. T. Y., Li, H., Robson, P., Glover, D. M., and Zernicka-Goetz, M. (2010). Origin and formation of the first two distinct cell types of the inner cell mass in the mouse embryo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **107** (14), 6364–6369. doi: [10.1073/pnas.0915063107](https://doi.org/10.1073/pnas.0915063107)
- Motosugi, N., Bauer, T., Polanski, Z., Solter, D., and Hiiragi, T. (2005). Polarity of the mouse embryo is established at blastocyst and is not prepatterned. *Genes and Development*, **19** (9), 1081–1092. doi: [10.1101/gad.1304805](https://doi.org/10.1101/gad.1304805)

N

-
- Nagafuchi, S., Katsuta, H., Kogawa, K., Akashi, T., Kondo, S., Sakai, Y., Tsukiyama, T., Kitamura, D., Niho, Y., and Watanabe, T. (1999). Establishment of an embryonic stem (ES) cell line derived from a non-obese diabetic (NOD) mouse : in vivo differentiation into lymphocytes and potential for germ line transmission. *Federation of European Biochemical Societies Letters*, **455** (1-2), 101–104. doi: [10.1016/S0014-5793\(99\)00801-7](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(99)00801-7).
- Najm, F. J., Chenoweth, J. G., Anderson, P. D., Nadeau, J. H., Redline, W., McKay, R. D. G., and Tesar, P.

- J. (2011). Isolation of epiblast stem cells from pre-implantation mouse embryos. *Cell Stem Cell*, **8** (3), 318–325. doi: [10.1016/j.stem.2011.01.016](https://doi.org/10.1016/j.stem.2011.01.016).
- Nakagawa, M., Koyanagi, M., Tanabe, K., Takahashi, K., Ichisaka, T., Aoi, T., Okita, K., Mochiduki, Y., Takizawa, N., and Yamanaka, S. (2008). Generation of induced pluripotent stem cells without Myc from mouse and human fibroblasts. *Nature Biotechnology*, **26** (1), 101–106. doi: [10.1038/nbt1374](https://doi.org/10.1038/nbt1374)
- Nakaki, F., Hayashi, K., Ohta, H., Kurimoto, K., Yabuta, Y., and Saitou, M. (2013). Induction of mouse germ-cell fate by transcription factors in vitro. *Nature*, **501** (7466), 222–226. doi: [10.1038/NATURE12417](https://doi.org/10.1038/NATURE12417)
- Nakatake, Y., Fukui, N., Iwamatsu, Y., Masui, S., Takahashi, K., Yagi, R., Yagi, K., Miyazaki, J., Matoba, R., Ko, M. S. H. et al. (2006). Klf4 cooperates with Oct3/4 and Sox2 to activate the Lefty1 core promoter in embryonic stem cells. *Molecular and Cellular Biology*, **26** (20), 7772–7782. doi: [10.1128/mcb.00468-06](https://doi.org/10.1128/mcb.00468-06)
- Navarro, P., Festuccia, N., Colby, D., Gagliardi, A., Mullin, N. P., Zhang, W., Karwacki-Neisius, V., Osorno, R., Kelly, D., Robertson, M. et al. (2012). OCT4/SOX2-independent Nanog autorepression modulates heterogeneous Nanog gene expression in mouse ES cells. *EMBO Journal*, **31** (24), 4547–4562. doi: [10.1038/emboj.2012.321](https://doi.org/10.1038/emboj.2012.321)
- Neagu, A., Genderen, E. Van, Escudero, I., Verwegen, L., Kurek, D., Lehmann, J., Stel, J., Dirks, R. A. M., Mierlo, G. Van, Maas, A. et al. (2020). In vitro capture and characterization of embryonic rosette-stage pluripotency between naive and primed states. *Nature Cell Biology*, **22** (5), 534–545. doi: [10.1038/s41556-020-0508-x](https://doi.org/10.1038/s41556-020-0508-x)
- Nguyen, H. T., Jacobs, K., and Spits, C. (2018). Human pluripotent stem cells in regenerative medicine: Where do we stand? *Reproduction*, **156** (5), R143–R153. doi: [10.1530/REP-18-0291](https://doi.org/10.1530/REP-18-0291)
- Nichols, J., Silva, J., Roode, M., and Smith, A. (2009). Suppression of Erk signalling promotes ground state pluripotency in the mouse embryo. *Development*, **136** (19), 3215–3222. doi: [10.1242/dev.038893](https://doi.org/10.1242/dev.038893)

- Nichols, J., and Smith, A. (2009). Naive and Primed Pluripotent States. *Cell Stem Cell*, **4** (6), 487–492. doi: [10.1016/j.stem.2009.05.015](https://doi.org/10.1016/j.stem.2009.05.015)
- Nichols, J., and Smith, A. (2012). Pluripotency in the embryo and in culture. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, **4** (8), a008128. doi: [10.1101/cshperspect.a008128](https://doi.org/10.1101/cshperspect.a008128)
- Nichols, J., Zevnik, B., Anastassiadis, K., Niwa, H., Klewe-nebenius, D., Chambers, I., and Smith, A. (1998). Formation of Pluripotent Stem Cells in the Mammalian Embryo Depends on the POU Transcription Factor Oct4. *Cell*, **95** (3), 379–391. doi: [10.1016/s0092-8674\(00\)81769-9](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)81769-9).
- Nicola, N. A., and Babon, J. J. (2015). Leukemia Inhibitory Factor (LIF). *Cytokine Growth Factor Rev.*, **26** (5), 533–544. doi: [10.1016/j.cytogfr.2015.07.001](https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2015.07.001)
- Nishioka, N., Inoue, K. ichi, Adachi, K., Kiyonari, H., Ota, M., Ralston, A., Yabuta, N., Hirahara, S., Stephenson, R. O. et al. (2009). The Hippo Signaling Pathway Components Lats and Yap Pattern Tead4 Activity to Distinguish Mouse Trophectoderm from Inner Cell Mass. *Developmental Cell*, **16** (3), 398–410. doi: [10.1016/j.devcel.2009.02.003](https://doi.org/10.1016/j.devcel.2009.02.003)
- Niwa, H. (2007). How is pluripotency determined and maintained? *Development*, **134** (4), 635–646. doi: [10.1242/dev.02787](https://doi.org/10.1242/dev.02787)
- Niwa, H., Burdon, T., Chambers, I., and Smith, A. (1998). Self-renewal of pluripotent embryonic stem cells is mediated via activation of STAT3. *Genes and Development*, **12** (13), 2048–2060. doi: [10.1101/gad.12.13.2048](https://doi.org/10.1101/gad.12.13.2048)
- Niwa, H., Masui, S., Chambers, I., Smith, A. G., and Miyazaki, J. (2002). Phenotypic Complementation Establishes Requirements for Specific POU Domain and Generic Transactivation Function of Oct-3 / 4 in Embryonic Stem Cells. *Molecular and Cellular Biology*, **22** (5), 1526–1536. doi: [10.1128/MCB.22.5.1526](https://doi.org/10.1128/MCB.22.5.1526)
- Niwa, H., Miyazaki, J., and Smith, A. G. (2000). Quantitative expression of Oct-3 / 4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells. *Nature Genetics*, **24** (4), 372–376. doi: [10.1038/74199](https://doi.org/10.1038/74199).

Niwa, H., Ogawa, K., Shimosato, D., and Adachi, K. (2009). A parallel circuit of LIF signalling pathways maintains pluripotency of mouse ES cells. *Nature*, **460** (7251), 118–122. doi: [10.1038/nature08113](https://doi.org/10.1038/nature08113)

O

Ogawa, K., Matsui, H., Ohtsuka, S., and Niwa, H. (2004). A novel mechanism for regulating clonal propagation of mouse ES cells. *Genes to Cells*, **9** (5), 471–477. doi: [10.1111/j.1356-9597.2004.00736.x](https://doi.org/10.1111/j.1356-9597.2004.00736.x)

Ogawa, K., Saito, A., Matsui, H., Suzuki, H., Ohtsuka, S., Shimosato, D., Morishita, Y., Watabe, T., Niwa, H., and Miyazono, K. (2006). Activin-Nodal signaling is involved in propagation of mouse embryonic stem cells. *Journal of Cell Science*, **120** (1), 55–65. doi: [10.1242/jcs.03296](https://doi.org/10.1242/jcs.03296)

Ohtsuka, S., Nakai-Futatsugi, Y., and Niwa, H. (2015). LIF signal in mouse embryonic stem cells. *JAK-STAT*, **4** (2), e1086520. doi: [10.1080/21623996.2015.1086520](https://doi.org/10.1080/21623996.2015.1086520)

Ohtsuka, S., and Niwa, H. (2015). The differential activation of intracellular signaling pathways confers the permissiveness of embryonic stem cell derivation from different mouse strains. *Development*, **142** (3), 431–437. doi: [10.1242/dev.112375](https://doi.org/10.1242/dev.112375)

Okita, K., Nakagawa, M., Hyenjong, H., Ichisaka, T., and Yamanaka, S. (2008). Generation of mouse induced pluripotent stem cells without viral vectors. *Science*, **322** (5903), 949–953. doi: [10.1126/science.1164270](https://doi.org/10.1126/science.1164270)

Okumura-Nakanishi, S., Saito, M., Niwa, H., and Ishikawa, F. (2005). Oct-3/4 and Sox2 regulate Oct-3/4 gene in embryonic stem cells. *Journal of Biological Chemistry*, **280** (7), 5307–5317. doi: [10.1074/jbc.M410015200](https://doi.org/10.1074/jbc.M410015200)

Orkin, S. H., and Hochedlinger, K. (2011). Chromatin connections to pluripotency and cellular reprogramming. *Cell*, **145** (6), 835–850. doi: [10.1016/j.cell.2011.05.019](https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.05.019)

P

Pain, B. (2021). Organoids in domestic animals: with which stem cells? *Veterinary Research*, **52** (1), 38.

doi: [10.1186/s13567-021-00911-3](https://doi.org/10.1186/s13567-021-00911-3)

- Papatsenko, D., Waghray, A., and Lemischka, I. R. (2018). Feedback control of pluripotency in embryonic stem cells: Signaling, transcription and epigenetics. *Stem Cell Research*, **29**, 180–188. doi: [10.1016/j.scr.2018.02.012](https://doi.org/10.1016/j.scr.2018.02.012)
- Pauken, C. M., and Capco, D. G. (1999). Regulation of cell adhesion during embryonic compaction of mammalian embryos: Roles for PKC and β -catenin. *Molecular Reproduction and Development*, **54** (2), 135–144. doi: [10.1002/\(SICI\)1098-2795\(199910\)54:2<135::AID-MRD5>3.0.CO;2-A](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-2795(199910)54:2<135::AID-MRD5>3.0.CO;2-A)
- Pink, R. C., Wicks, K., Caley, D. P., Punch, E. K., Jacobs, L., and Carter, D. R. F. (2011). Pseudogenes: pseudo-functional or key regulators in health and disease? *RNA*, **17** (5), 792–798. doi: [10.1261/RNA.2658311](https://doi.org/10.1261/RNA.2658311)
- Piotrowska-Nitsche, K., Perea-Gomez, A., Haraguchi, S., and Zernicka-Goetz, M. (2005). Four-cell stage mouse blastomeres have different developmental properties. *Development*, **132** (3), 479–490. doi: [10.1242/dev.01602](https://doi.org/10.1242/dev.01602)
- Piras, V., Tomita, M., and Selvarajoo, K. (2014). Transcriptome-wide variability in single embryonic development cells. *Scientific Reports*, **4**, 7137. doi: [10.1038/srep07137](https://doi.org/10.1038/srep07137)
- Plusa, B., Hadjantonakis, A. K., Gray, D., Piotrowska-Nitsche, K., Jedrusik, A., Papaioannou, V. E., Glover, D. M., and Zernicka-Goetz, M. (2005). The first cleavage of the mouse zygote predicts the blastocyst axis. *Nature*, **434** (7031), 391–395. doi: [10.1038/nature03388](https://doi.org/10.1038/nature03388)
- Posfai, E., Schell, J. P., Janiszewski, A., Rovic, I., Murray, A., Bradshaw, B., Yamakawa, T., Pardon, T., El Bakkali, M., Talon, I. et al. (2021). Evaluating totipotency using criteria of increasing stringency. *Nature Cell Biology*, **23** (1), 49–60. doi: [10.1038/s41556-020-00609-2](https://doi.org/10.1038/s41556-020-00609-2)

R

-
- Rayon, T., Menchero, S., Nieto, A., Xenopoulos, P., Crespo, M., Cockburn, K., Cañon, S., Sasaki, H., Hadjantonakis, A.-K., de la Pompa, J. L. et al. (2014). Notch and Hippo converge on Cdx2 to specify

the trophoctoderm lineage in the mouse blastocyst. *Developmental Cell*, **30** (4), 410–422. doi: [10.1016/j.devcel.2014.06.019](https://doi.org/10.1016/j.devcel.2014.06.019).

Rebuzzini, P., Zuccotti, M., and Garagna, S. (2021). Building Pluripotency Identity in the Early Embryo and Derived Stem Cells. *Cells*, **10** (8), 2049. doi: [10.3390/cells10082049](https://doi.org/10.3390/cells10082049).

Resnick, J. L., Bixler, L. S., Cheng, L., and Donovan, P. J. (1992). Long-term proliferation of mouse primordial germ cells in culture. *Nature*, **359** (6395), 550–551. doi: [10.1038/359550a0](https://doi.org/10.1038/359550a0)

Rivron, N. C., Frias-Aldeguer, J., Vrij, E. J., Boisset, J. C., Korving, J., Vivié, J., Truckenmüller, R. K., Van Oudenaarden, A., Van Blitterswijk, C. A., and Geijsen, N. (2018). Blastocyst-like structures generated solely from stem cells. *Nature*, **557**(7703), 106–111. doi: [10.1038/s41586-018-0051-0](https://doi.org/10.1038/s41586-018-0051-0)

Rodriguez-Terrones, D., Gaume, X., Ishiuchi, T., Weiss, A., Kopp, A., Kruse, K., Penning, A., Vaquerizas, J. M., Brino, L., and Torres-Padilla, M. E. (2018). A molecular roadmap for the emergence of early-embryonic-like cells in culture. *Nature Genetics*, **50** (1), 106–119. doi: [10.1038/s41588-017-0016-5](https://doi.org/10.1038/s41588-017-0016-5)

Rosàs-Canyelles, E., Modzelewski, A. J., Geldert, A., He, L., and Herr, A. E. (2020). Assessing heterogeneity among single embryos and single blastomeres using open microfluidic design. *Science Advances*, **6** (17), eaay1751. doi: [10.1126/sciadv.aay1751](https://doi.org/10.1126/sciadv.aay1751)

Rossant, B. J. (1976). Postimplantation development of blastomeres isolated from 4- and 8-cell mouse eggs. *Journal of Embryology and Experimental Morphology*, **36** (2), 283–290. doi: [10.1038/172240b0](https://doi.org/10.1038/172240b0)

S

Saini, D., and Yamanaka, Y. (2018). Cell Polarity-Dependent Regulation of Cell Allocation and the First Lineage Specification in the Preimplantation Mouse Embryo. *Current Topics in Developmental Biology*, **128**, 11–35. doi: [10.1016/bs.ctdb.2017.10.008](https://doi.org/10.1016/bs.ctdb.2017.10.008)

Saiz, N., Williams, K. M., Seshan, V. E., and Hadjantonakis, A. K. (2016). Asynchronous fate decisions by single cells collectively ensure consistent lineage composition in the mouse blastocyst. *Nature*

Communications, **7**, 13463. doi: [10.1038/ncomms13463](https://doi.org/10.1038/ncomms13463)

- Sakai, Y., Yoshiura, Y., and Nakazawa, K. (2011). Embryoid body culture of mouse embryonic stem cells using microwell and micropatterned chips. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, **111** (1), 85–91. doi: [10.1016/j.jbiosc.2010.08.014](https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2010.08.014)
- Sasaki, H. (2017). Roles and regulations of Hippo signaling during preimplantation mouse development. *Development Growth and Differentiation*, **59** (1), 12–20. doi: [10.1111/dgd.12335](https://doi.org/10.1111/dgd.12335)
- Scholer, H. R., Ruppert, S., Suzuki, N., Chowdhury, K., and Gruss, P. (1990). New type of POU domain in germ line-specific protein Oct-4. *Nature*, **344** (6265), 435–439. doi: [10.1038/344435a0](https://doi.org/10.1038/344435a0).
- Shen, H., Yang, M., Li, S., Zhang, J., Peng, B., Wang, C., Chang, Z., Ong, J., and Du, P. (2021). Mouse totipotent stem cells captured and maintained through spliceosomal repression. *Cell*, **184** (11), 2843–2859.e20. doi: [10.1016/j.cell.2021.04.020](https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.04.020)
- Shen, M. M. (2007). Nodal signaling: Development roles and regulation. *Development*, **134** (6), 1023–1034. doi: [10.1242/dev.000166](https://doi.org/10.1242/dev.000166)
- Shi, J., Chen, Q., Li, X., Zheng, X., Zhang, Y., Qiao, J., Tang, F., Tao, Y., Zhou, Q., and Duan, E. (2015). Dynamic transcriptional symmetry-breaking in pre-implantation mammalian embryo development revealed by single-cell RNA-seq. *Development (Cambridge)*, **142** (20), 3468–3477. doi: [10.1242/dev.123950](https://doi.org/10.1242/dev.123950)
- Shi, W., Wang, H., Pan, G., Geng, Y., Guo, Y., and Pei, D. (2006). Regulation of the Pluripotency Marker Rex-1 by Nanog and Sox2. *Journal of Biological Chemistry*, **281** (33), 23319–23325. doi: [10.1074/jbc.M601811200](https://doi.org/10.1074/jbc.M601811200)
- Shi, Y., and Massagué, J. (2003). Mechanisms of TGF- β signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell*, **113** (6), 685–700. doi: [10.1016/S0092-8674\(03\)00432-X](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(03)00432-X)
- Shimizu, T., Ueda, J., Ho, J. C., Iwasaki, K., Poellinger, L., Harada, I., and Sawada, Y. (2012). Dual Inhibition of Src and GSK3 Maintains Mouse Embryonic Stem Cells , Whose Differentiation Is Mechanically Regulated by Src Signaling. *Stem Cells*, **30** (7), 1394–1404. doi: [10.1002/stem.1119](https://doi.org/10.1002/stem.1119)

- Shin, M. R., Choi, H. W., Kim, M. K., Lee, S. H., Lee, H. S., and Lim, C. K. (2011). In vitro development and gene expression of frozen-thawed 8-cell stage mouse embryos following slow freezing or vitrification. *Clinical and Experimental Reproductive Medicine*, **38** (4), 203–209. doi: [10.5653/cerm.2011.38.4.203](https://doi.org/10.5653/cerm.2011.38.4.203)
- Silva, J., Barrandon, O., Nichols, J., Kawaguchi, J., Theunissen, T. W., and Smith, A. (2008). Promotion of reprogramming to ground state pluripotency by signal inhibition. *PLoS Biology*, **6** (10), e253. doi: [10.1371/journal.pbio.0060253](https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0060253)
- Silva, J., Nichols, J., Theunissen, T. W., Guo, G., van Oosten, A. L., Barrandon, O., Wray, J., Yamanaka, S., Chambers, I., and Smith, A. (2009). Nanog Is the Gateway to the Pluripotent Ground State. *Cell*, **138** (4), 722–737. doi: [10.1016/j.cell.2009.07.039](https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.07.039)
- Sim, Y. J., Kim, M. S., Nayfeh, A., Yun, Y. J., Kim, S. J., Park, K. T., Kim, C. H., and Kim, K. S. (2017). 2i Maintains a Naive Ground State in ESCs through Two Distinct Epigenetic Mechanisms. *Stem Cell Reports*, **8** (5), 1312–1328. doi: [10.1016/j.stemcr.2017.04.001](https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2017.04.001)
- Simon, C. S., Rahman, S., Raina, D., Schröter, C., and Hadjantonakis, A. K. (2020). Live Visualization of ERK Activity in the Mouse Blastocyst Reveals Lineage-Specific Signaling Dynamics. *Developmental Cell*, **55** (3), 341–353.e5. doi: [10.1016/j.devcel.2020.09.030](https://doi.org/10.1016/j.devcel.2020.09.030)
- Smith, A. (2017). Formative pluripotency: the executive phase in a developmental continuum. *Development*, **144** (3), 365–373. doi: [10.1242/dev.142679](https://doi.org/10.1242/dev.142679)
- Smith, A. G., Heath, J. K., Donaldson, D. D., Wong, G. G., Moreau, J., Stahl, M., and Rogers, D. (1988). Inhibition of pluripotential embryonic stem cell differentiation by purified polypeptides. *Nature*, **336** (6200), 688–690. doi: [10.1038/336688a0](https://doi.org/10.1038/336688a0)
- Sobhani, A., Khanlarkhani, N., Baazm, M., Mohammadzadeh, F., Najafi, A., Mehdinejadani, S., and Aval, F. S. (2017). Multipotent Stem Cell and Current Application. *Acta Medica Iranica*, **55** (1), 6–23.
- Sohn, I. P., Ahn, H. J., Park, D. W., Gye, M. C., Jo, H., Kim, S. Y., Min, K., and Kwon, H. C. (2002). Amelioration of Mitochondrial Dysfunction and Apoptosis of Two-Cell Mouse Embryos after Freezing and Thawing by the High Frequency Liquid Nitrogen Infusion. *Molecular Cells*, **13** (2),

272–280.

- Sokol, S. Y. (2011). Maintaining embryonic stem cell pluripotency with Wnt signaling. *Development*, **138** (20), 4341–4350. doi: [10.1242/DEV.066209](https://doi.org/10.1242/DEV.066209)
- Stadtfeld, M., Nagaya, M., Utikal, J., Weir, G., and Hochedlinger, K. (2008). Induced pluripotent stem cells generated without viral integration. *Science*, **322** (5903), 945–949. doi: [10.1126/science.1162494](https://doi.org/10.1126/science.1162494).
- Stewart, C. L., Gadi, I., and Bhatt, H. (1994). Stem cells from primordial germ cells can reenter the germ line. *Developmental Biology*, **161** (2), 626–628. doi: [10.1006/dbio.1994.1058](https://doi.org/10.1006/dbio.1994.1058)
- Strelchenko, N., Verlinsky, O., Kukhareenko, V., and Verlinsky, Y. (2004). Morula-derived human embryonic stem cells. *Reproductive BioMedicine Online*, **9** (6), 623–629. doi: [10.1016/S1472-6483\(10\)61772-5](https://doi.org/10.1016/S1472-6483(10)61772-5)
- Stuart, H. T., Stirparo, G. G., Lohoff, T., Bates, L. E., Kinoshita, M., Lim, C. Y., Sousa, E. J., Maskalenka, K., Radzishchanskaya, A., Malcolm, A. A. et al. (2019). Distinct Molecular Trajectories Converge to Induce Naive Pluripotency. *Cell Stem Cell*, **25** (3), 388–406.e8. doi: [10.1016/j.stem.2019.07.009](https://doi.org/10.1016/j.stem.2019.07.009)
- Sutherland, A. E., Speed, T. P., and Calarco, P. G. (1990). Inner cell allocation in the mouse morula: The role of oriented division during fourth cleavage. *Developmental Biology*, **137** (1), 13–25. doi: [10.1016/0012-1606\(90\)90003-2](https://doi.org/10.1016/0012-1606(90)90003-2)
- Suwińska, A., Czołowska, R., Ozdzeński, W., and Tarkowski, A. K. (2008). Blastomeres of the mouse embryo lose totipotency after the fifth cleavage division: Expression of Cdx2 and Oct4 and developmental potential of inner and outer blastomeres of 16- and 32-cell embryos. *Developmental Biology*, **322** (1), 133–144. doi: [10.1016/j.ydbio.2008.07.019](https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2008.07.019)

T

-
- Tabansky, I., Lenarcic, A., Draft, R., Loulier, K., Keskin, D., Rosains, J., Rivera-Feliciano, J., Lichtman, J., Livet, J., Stern, J. et al. (2013). Developmental bias in cleavage-stage mouse blastomeres. *Current*

Biology, **23** (1), 21–31. doi: [10.1016/J.CUB.2012.10.054](https://doi.org/10.1016/J.CUB.2012.10.054)

Tachibana, M., Amato, P., Sparman, M., Gutierrez, N. M., Tippner-Hedges, R., Ma, H., Kang, E., Fulati, A., Lee, H. S., Sritanaudomchai, H. et al. (2013). Human embryonic stem cells derived by somatic cell nuclear transfer. *Cell*, **153** (6), 1228–1238. doi: [10.1016/j.cell.2013.05.006](https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.05.006)

Taei, A., Hassani, S. N., Eftekhari-Yazdi, P., Rezazadeh Valojerdi, M., Nokhbatolfoghahai, M., Masoudi, N. S., Pakzad, M., Gourabi, H., and Baharvand, H. (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. *Human Reproduction*, **28** (10), 2661–2671. doi: [10.1093/humrep/det309](https://doi.org/10.1093/humrep/det309)

Taher, L., Pfeiffer, M. J., and Fuellen, G. F. (2014). Bioinformatics approaches to singleblastomere transcriptomics. *Molecular Human Reproduction*, **21** (2), 115–125. doi: [10.1093/molehr/gau083](https://doi.org/10.1093/molehr/gau083)

Tai, C. I., and Ying, Q. L. (2013). Gbx2, a LIF/Stat3 target, promotes reprogramming to and retention of the pluripotent ground state. *Journal of Cell Science*, **126** (5), 1093–1098. doi: [10.1242/jcs.118273](https://doi.org/10.1242/jcs.118273)

Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K., and Yamanaka, S. (2007). Induction of Pluripotent Stem Cells from Adult Human Fibroblasts by Defined Factors. *Cell*, **131** (5), 861–872. doi: [10.1016/j.cell.2007.11.019](https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.11.019)

Takahashi, K., and Yamanaka, S. (2006). Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. *Cell*, **126** (4), 663–676. doi: [10.1016/j.cell.2006.07.024](https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.07.024)

Takahashi, S., Kobayashi, S., and Hiratani, I. (2018). Epigenetic differences between naive and primed pluripotent stem cells. *Cellular and Molecular Life Sciences*, **75** (7), 1191–1203. doi: [10.1007/s00018-017-2703-x](https://doi.org/10.1007/s00018-017-2703-x)

Taleahmad, S., Hassani, S. N., Salekdeh, G. H., and Baharvand, H. (2018). Metabolic Signature of Pluripotent Stem Cells. *Cell Journal*, **20** (3), 388–395. doi: [10.22074/cellj.2018.5514](https://doi.org/10.22074/cellj.2018.5514).

- Taleahmad, S., Mirzaei, M., Parker, L. M., Hassani, S., Mollamohammadi, S., Sharifi-zarchi, A., Haynes, P. A., Baharvand, H., and Salekdeh, G. H. (2015). Proteome Analysis of Ground State Pluripotency. *Scientific Reports*, **5**, 17985. doi: [10.1038/srep17985](https://doi.org/10.1038/srep17985)
- Tamm, C., Böwer, N., and Annerén, C. (2011). Regulation of mouse embryonic stem cell self-renewal by a Yes-YAP-TEAD2 signaling pathway downstream of LIF. *Journal of Cell Science*, **124** (7), 1136–1144. doi: [10.1242/jcs.075796](https://doi.org/10.1242/jcs.075796)
- Tamm, C., Pijuan Galito, S., and Annere, C. (2013). A Comparative Study of Protocols for Mouse Embryonic Stem Cell Culturing. *PLoS ONE*, **8** (12), e81156. doi: [10.1371/journal.pone.0081156](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0081156)
- Tanaka, T., Kanatsu-Shinohara, M., Hirose, M., Ogura, A., and Shinohara, T. (2015). Pluripotent cell derivation from male germline cells by suppression of Dmrt1 and Trp53. *Journal of Reproduction and Development*, **61** (5), 473–484. doi: [10.1262/jrd.2015-059](https://doi.org/10.1262/jrd.2015-059)
- Tarkowski, A. K., Suwińska, A., Czolowska, R., and Ozdzezski, W. (2010). Individual blastomeres of 16- and 32-cell mouse embryos are able to develop into fetuses and mice. *Developmental Biology*, **348** (2), 190–198. doi: [10.1016/j.ydbio.2010.09.022](https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2010.09.022)
- Tarkowski, A. K., and Wróblewska, J. (1967). Development of blastomeres of mouse eggs isolated at the 4- and 8-cell stage. *Journal of Embryology and Experimental Morphology*, **18** (1), 155–180. doi: [10.1242/dev.18.1.155](https://doi.org/10.1242/dev.18.1.155)
- Ten Dijke, P., and Arthur, H. M. (2007). Extracellular control of TGFβ signalling in vascular development and disease. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, **8** (11), 857–869. doi: [10.1038/nrm2262](https://doi.org/10.1038/nrm2262)
- Tesar, P. J. (2005). Derivation of germ-line-competent embryonic stem cell lines from preblastocyst mouse embryos. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **102** (23), 8239–8244. doi: [10.1073/pnas.0503231102](https://doi.org/10.1073/pnas.0503231102)
- Tesar, P. J., Chenoweth, J. G., Brook, F. A., Davies, T. J., Evans, E. P., Mack, D. L., Gardner, R. L., and McKay, R. D. G. (2007). New cell lines from mouse epiblast share defining features with human embryonic stem cells. *Nature*, **448** (7150), 196–199. doi: [10.1038/nature05972](https://doi.org/10.1038/nature05972)

- Thomson, J. A. (1998). Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*, **282** (5391), 1145–1147. doi: [10.1126/science.282.5391.1145](https://doi.org/10.1126/science.282.5391.1145)
- Tighe, A., Ray-Sinha, A., Staples, O. D., and Taylor, S. S. (2007). GSK-3 inhibitors induce chromosome instability. *BMC Cell Biology*, **8**, 34. doi: [10.1186/1471-2121-8-34](https://doi.org/10.1186/1471-2121-8-34)
- Torres-Padilla, M. E., Parfitt, D. E., Kouzarides, T., and Zernicka-Goetz, M. (2007). Histone arginine methylation regulates pluripotency in the early mouse embryo. *Nature*, **445** (7124), 214–218. doi: [10.1038/nature05458](https://doi.org/10.1038/nature05458)
- Toyooka, Y. (2020). Trophoblast lineage specification in the mammalian preimplantation embryo. *Reproductive Medicine and Biology*, **19** (3), 209–221. doi: [10.1002/rmb2.12333](https://doi.org/10.1002/rmb2.12333).
- Trounson, A., and Dewitt, N. D. (2016). Pluripotent stem cells progressing to the clinic. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, **17** (3), 194–200. doi: [10.1038/nrm.2016.10](https://doi.org/10.1038/nrm.2016.10)
- Trounson, A., and McDonald, C. (2015). Stem Cell Therapies in Clinical Trials: Progress and Challenges. *Cell Stem Cell*, **17** (1), 11–22. doi: [10.1016/j.stem.2015.06.007](https://doi.org/10.1016/j.stem.2015.06.007)
- Tsunoda, Y., and McLaren, A. (1983). Effect of various procedures on the viability of mouse embryos containing half the normal number of blastomeres. *Journal of Reproduction and Fertility*, **69** (1), 315–322. doi: [10.1530/JRF.0.0690315](https://doi.org/10.1530/JRF.0.0690315)

V

-
- van den Berg, D. L. C., Zhang, W., Yates, A., Engelen, E., Takacs, K., Bezstarosti, K., Demmers, J., Chambers, I., and Poot, R. A. (2008). Estrogen-Related Receptor Beta Interacts with Oct4 To Positively Regulate Nanog Gene Expression. *Molecular and Cellular Biology*, **28** (19), 5986–5995. doi: [10.1128/mcb.00301-08](https://doi.org/10.1128/mcb.00301-08)
- Van Der Jeught, M., Heindryckx, B., O’Leary, T., Duggal, G., Ghimire, S., Lierman, S., Van Roy, N., Chuva De Sousa Lopes, S., Deroo, T. et al. (2014). Treatment of human embryos with the TGFβ inhibitor SB431542 increases epiblast proliferation and permits successful human embryonic stem cell derivation. *Human Reproduction*, **29** (1), 41–48. doi: [10.1093/HUMREP/DET400](https://doi.org/10.1093/HUMREP/DET400)

- Van Der Jeught, M., O'Leary, T., Ghimire, S., Lierman, S., Duggal, G., Versieren, K., Deforce, D., Chuva De Sousa Lopes, S., Heindryckx, B., and De Sutter, P. (2013). The combination of inhibitors of FGF/MEK/Erk and GSK3 β 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 and Development*, **22** (2), 296–306. doi: [10.1089/scd.2012.0256](https://doi.org/10.1089/scd.2012.0256)
- Veillard, A. C., Marks, H., Bernardo, A. S., Jouneau, L., Laloë, D., Boulanger, L., Kaan, A., Brochard, V., Tosolini, M., Pedersen, R. et al. (2014). Stable methylation at promoters distinguishes epiblast stem cells from embryonic stem cells and the in vivo epiblasts. *Stem Cells and Development*, **23** (17), 2014–2029. doi: [10.1089/scd.2013.0639](https://doi.org/10.1089/scd.2013.0639)
- Vestweber, D., and Kemler, R. (1984). Some structural and functional aspects of the cell adhesion molecule uvomorulin. *Cell Differentiation*, **15** (2–4), 269–273. doi: [10.1016/0045-6039\(84\)90084-8](https://doi.org/10.1016/0045-6039(84)90084-8)
- Vila-Cejudo, M., Alonso-Alonso, S., Pujol, A., Santaló, J., and Ibáñez, E. (2020). Wnt pathway modulation generates blastomere-derived mouse embryonic stem cells with different pluripotency features. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, **37** (12), 2967–2979. doi: [10.1007/s10815-020-01964-7](https://doi.org/10.1007/s10815-020-01964-7)
- Vila-Cejudo, M., Massafret, O., Santaló, J., and Ibáñez, E. (2019). Single blastomeres as a source of mouse embryonic stem cells: effect of genetic background, medium supplements, and signaling modulators on derivation efficiency. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, **36** (1), 99–111. doi: [10.1007/s10815-018-1360-9](https://doi.org/10.1007/s10815-018-1360-9)
- Vinot, S., Le, T., Ohno, S., Pawson, T., Maro, B., and Louvet-Vallée, S. (2005). Asymmetric distribution of PAR proteins in the mouse embryo begins at the 8-cell stage during compaction. *Developmental Biology*, **282** (2), 307–319. doi: [10.1016/j.ydbio.2005.03.001](https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2005.03.001)

W

- Wakayama, S., Hikichi, T., Suetsugu, R., Sakaide, Y., Bui, H.-T., Mizutani, E., and Wakayama, T. (2007). Efficient Establishment of Mouse Embryonic Stem Cell Lines from Single Blastomeres and Polar Bodies. *Stem Cells*, **25** (4), 986–993. doi: [10.1634/stemcells.2006-0615](https://doi.org/10.1634/stemcells.2006-0615)

- Wakayama, T., Tabar, V., Rodriguez, I., Perry, A. C. F., Studer, L., and Mombaerts, P. (2001). Differentiation of embryonic stem cell lines generated from adult somatic cells by nuclear transfer. *Science*, **292** (5517), 740–743. doi: [10.1126/science.1059399](https://doi.org/10.1126/science.1059399)
- Wang, Q., and Latham, K. E. (1997). Requirement for protein synthesis during embryonic genome activation in mice. *Molecular Reproduction and Development*, **47** (3), 265–270. doi: [10.1002/\(SICI\)1098-2795\(199707\)47:3<265::AID-MRD5>3.0.CO;2-J](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-2795(199707)47:3<265::AID-MRD5>3.0.CO;2-J)
- Wang, X., Xiang, Y., Yu, Y., Wang, R., Zhang, Y., Xu, Q., Sun, H., Zhao, Z., and Jiang, X. (2021). Formative pluripotent stem cells show features of epiblast cells poised for gastrulation. *Cell Research*, **31** (5), 526–541. doi: [10.1038/s41422-021-00477-x](https://doi.org/10.1038/s41422-021-00477-x)
- Warren, L., Manos, P. D., Ahfeldt, T., Loh, Y., Li, H., Daley, Q., Brack, A. S., Collins, J. J., Cowan, C., Schlaeger, T. M. et al. (2010). Highly efficient reprogramming to pluripotency and directed differentiation of human cells using synthetic modified mRNA. *Cell Stem Cell*, **7** (5), 618–630. doi: [10.1016/j.stem.2010.08.012](https://doi.org/10.1016/j.stem.2010.08.012).
- Watabe, T., and Miyazono, K. (2009). Roles of TGF- β family signaling in stem cell renewal and differentiation. *Cell Research*, **19** (1), 103–115. doi: [10.1038/cr.2008.323](https://doi.org/10.1038/cr.2008.323)
- Watanabe, Y., Miyasaka, K. Y., Kubo, A., Kida, Y. S., Nakagawa, O., Hirate, Y., Sasaki, H., and Ogura, T. (2017). Notch and Hippo signaling converge on Strawberry Notch 1 (Sbno1) to synergistically activate Cdx2 during specification of the trophectoderm. *Scientific Reports*, **7**, 46135. doi: [10.1038/srep46135](https://doi.org/10.1038/srep46135)
- Weinberger, L., Ayyash, M., Novershtern, N., and Hanna, J. H. (2016). Dynamic stem cell states: Naive to primed pluripotency in rodents and humans. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, **17** (3), 155–169. doi: [10.1038/nrm.2015.28](https://doi.org/10.1038/nrm.2015.28)
- White, M. D., Angiolini, J. F., Alvarez, Y. D., Kaur, G., Zhao, Z. W., Mocskos, E., Bruno, L., Bissiere, S., Levi, V., and Plachta, N. (2016). Long-Lived Binding of Sox2 to DNA Predicts Cell Fate in the Four-Cell Mouse Embryo. *Cell*, **165** (1), 75–87. doi: [10.1016/j.cell.2016.02.032](https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.02.032)
- White, M. D., & Plachta, N. (2020). Specification of the first mammalian cell lineages in vivo and in vitro.

Cold Spring Harbor Perspectives in Biology, **12** (4), a035634. doi: [10.1101/cshperspect.a035634](https://doi.org/10.1101/cshperspect.a035634)

Wickham, H. (2009). *Ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis*. New York: Springer-Verlag. doi: [10.1007/978-0-387-98141-3](https://doi.org/10.1007/978-0-387-98141-3)

Wigger, M., Kisielewska, K., Filimonow, K., Plusa, B., Maleszewski, M., and Suwińska, A. (2017). Plasticity of the inner cell mass in mouse blastocyst is restricted by the activity of FGF/MAPK pathway. *Scientific Reports*, **7** (1), 15136. doi: [10.1038/S41598-017-15427-0](https://doi.org/10.1038/S41598-017-15427-0)

Williams, R. L., Hilton, D. J., Pease, S., Willson, T. A., Stewart, C. L., Gearing, D. P., Wagner, E. F., Metcalf, D., Nicola, N. A., and Gough, N. M. (1988). Myeloid leukaemia inhibitory factor maintains the developmental potential of embryonic stem cells. *Nature*, **336** (6200), 684–687. doi: [10.1038/336684a0](https://doi.org/10.1038/336684a0)

Wray, J., Kalkan, T., Gomez-Lopez, S., Eckardt, D., Cook, A., Kemler, R., and Smith, A. (2012). Inhibition of glycogen synthase kinase-3 alleviates Tcf3 repression of the pluripotency network and increases embryonic stem cell resistance to differentiation. *Nature Cell Biology*, **13** (7), 838–845. doi: [10.1038/ncb0512-555a](https://doi.org/10.1038/ncb0512-555a)

Wuidart, A., Ousset, M., Rulands, S., Simons, B. D., Van Keymeulen, A., and Blanpain, C. (2016). Quantitative lineage tracing strategies to resolve multipotency in tissue-specific stem cells. *Genes and Development*, **30** (11), 1261–1277. doi: [10.1101/gad.280057.116](https://doi.org/10.1101/gad.280057.116)

Y

Yagi, M., Kishigami, S., Tanaka, A., Semi, K., Mizutani, E., Wakayama, S., Wakayama, T., Yamamoto, T., and Yamada, Y. (2017). Derivation of ground-state female ES cells maintaining gamete-derived DNA methylation. *Nature*, **548** (7666), 224–227. doi: [10.1038/nature23286](https://doi.org/10.1038/nature23286)

Yagi, R., Kohn, M. J., Karavanova, I., Kaneko, K. J., Vullhorst, D., DePamphilis, M. L., and Buonanno, A. (2007). Transcription factor TEAD4 specifies the trophectoderm lineage at the beginning of mammalian development. *Development*, **134** (21), 3827–3836. doi: [10.1242/dev.010223](https://doi.org/10.1242/dev.010223)

Yamada, M., Johannesson, B., Sagi, I., Burnett, L. C., Kort, D. H., Prosser, R. W., Paull, D., Nestor, M. W.,

- Freeby, M., Greenberg, E. et al. (2014). Human oocytes reprogram adult somatic nuclei of a type 1 diabetic to diploid pluripotent stem cells. *Nature*, **510** (7506), 533–536. doi: [10.1038/nature13287](https://doi.org/10.1038/nature13287)
- Yamaji, M., Ueda, J., Hayashi, K., Ohta, H., Yabuta, Y., Kurimoto, K., Nakato, R., Yamada, Y., Shirahige, K., and Saitou, M. (2013). PRDM14 ensures naive pluripotency through dual regulation of signaling and epigenetic pathways in mouse embryonic stem cells. *Cell Stem Cell*, **12** (3), 368–382. doi: [10.1016/j.stem.2012.12.012](https://doi.org/10.1016/j.stem.2012.12.012)
- Yamanaka, Y., Lanner, F., and Rossant, J. (2010). FGF signal-dependent segregation of primitive endoderm and epiblast in the mouse blastocyst. *Development*, **137** (5), 715–724. doi: [10.1242/dev.043471](https://doi.org/10.1242/dev.043471)
- Yang, H., Qiu, Y., Zeng, X., Ding, Y., Zeng, J., Lu, K., and Li, D. (2016). Effect of a feeder layer composed of mouse embryonic and human foreskin fibroblasts on the proliferation of human embryonic stem cells. *Experimental and Therapeutic Medicine*, **6**, 2321–2328. doi: [10.3892/etm.2016.3204](https://doi.org/10.3892/etm.2016.3204)
- Yang, J., Ryan, D. J., Wang, W., Tsang, J. C. H., Lan, G., Masaki, H., Gao, X., Antunes, L., Yu, Y., Zhu, Z. et al. (2017). Establishment of mouse expanded potential stem cells. *Nature*, **550** (7676), 393–397. doi: [10.1038/nature24052](https://doi.org/10.1038/nature24052)
- Yang, L., Han, Y., Nilsson-Payant, B. E., Gupta, V., Wang, P., Duan, X., Tang, X., Zhu, J., Zhao, Z., Jaffre, F. et al. (2020). A Human Pluripotent Stem Cell-based Platform to Study SARS-CoV-2 Tropism and Model Virus Infection in Human Cells and Organoids. *Cell Stem Cell*, **27** (1), 125–136. doi: [10.1016/j.stem.2020.06.015](https://doi.org/10.1016/j.stem.2020.06.015).
- Yang, M., Yu, H., Yu, X., Liang, S., Hu, Y., Luo, Y., Izsvák, Z., Sun, C., and Wang, J. (2022). Chemical-induced chromatin remodeling reprograms mouse ESCs to totipotent-like stem cells. *Cell Stem Cell*, **29** (3), 400–418.e13. doi: [10.1016/j.stem.2022.01.010](https://doi.org/10.1016/j.stem.2022.01.010)
- Yang, Y., Liu, B., Xu, J., Wang, J., Wu, J., Shi, C., Xu, Y., Dong, J., Wang, C., Lai, W. et al. (2017). Derivation of Pluripotent Stem Cells with In Vivo Embryonic and Extraembryonic Potency. *Cell*, **169** (2), 243–257.e25. doi: [10.1016/j.cell.2017.02.005](https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.02.005)

- Yao, C., Zhang, W., and Shuai, L. (2019). The first cell fate decision in pre-implantation mouse embryos. *Cell Regeneration*, **8** (2), 51–57. doi: [10.1016/j.cr.2019.10.001](https://doi.org/10.1016/j.cr.2019.10.001)
- Ye, S., Li, P., Tong, C., and Ying, Q. L. (2013). Embryonic stem cell self-renewal pathways converge on the transcription factor Tfcp2l1. *EMBO Journal*, **32** (19), 2548–2560. doi: [10.1038/emboj.2013.175](https://doi.org/10.1038/emboj.2013.175)
- Yeo, J. C., Jiang, J., Tan, Z. Y., Yim, G. R., Ng, J. H., Göke, J., Kraus, P., Liang, H., Gonzales, K. A. U., Chong, H. C. et al. (2014). Klf2 is an essential factor that sustains ground state pluripotency. *Cell Stem Cell*, **14** (6), 864–872. doi: [10.1016/j.stem.2014.04.015](https://doi.org/10.1016/j.stem.2014.04.015)
- Yeo, J. C., and Ng, H. H. (2013). The transcriptional regulation of pluripotency. *Cell Research*, **23** (1), 20–32. doi: [10.1038/cr.2012.172](https://doi.org/10.1038/cr.2012.172)
- Yi, F., Pereira, L., Hoffman, J. A., Shy, B. R., Yuen, C. M., Liu, D. R., and Merrill, B. J. (2011). Opposing Effects of Tcf3 and Tcf1 Control Wnt-Stimulation of Embryonic Stem Cell Self Renewal. *Nature Cell Biology*, **13** (7), 762–770. doi: [10.1038/ncb2283](https://doi.org/10.1038/ncb2283)
- Yildirim, E., Bora, G., Onel, T., Talas, N., and Yaba, A. (2021). Cell fate determination and Hippo signaling pathway in preimplantation mouse embryo. *Cell and Tissue Research*, **386** (3), 423–444. doi: [10.1007/s00441-021-03530-8](https://doi.org/10.1007/s00441-021-03530-8)
- Ying, Q.-L., Wray, J., Nichols, J., Batlle-Morera, L., Doble, B., Woodgett, J., Cohen, P., and Smith, A. (2008). The ground state of embryonic stem cell self-renewal. *Nature*, **453** (7194), 519–523. doi: [10.1038/nature06968](https://doi.org/10.1038/nature06968)
- Ying, Q. L., Nichols, J., Chambers, I., and Smith, A. (2003). BMP induction of Id proteins suppresses differentiation and sustains embryonic stem cell self-renewal in collaboration with STAT3. *Cell*, **115** (3), 281–292. doi: [10.1016/S0092-8674\(03\)00847-X](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(03)00847-X)
- Yoshida-Koide, U., Matsuda, T., Saikawa, K., Nakanuma, Y., Yokota, T., Asashima, M., and Koide, H. (2004). Involvement of Ras in extraembryonic endoderm differentiation of embryonic stem cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **313** (3), 475–481. doi: [10.1016/j.bbrc.2003.11.138](https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2003.11.138)

Yu, J., Vodyanik, M. A., Smuga-Otto, K., Antosiewicz-Bourget, J., Frane, J. L., Tian, S., Nie, J., Jonsdottir, G. A., Ruotti, V., Stewart, R. et al. (2007). Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science*, **318** (5858), 1917–1920. doi: [10.1126/science.1151526](https://doi.org/10.1126/science.1151526)

Yuan, H., Corbi, N., Basilico, C., and Dailey, L. (1995). Developmental-Specific activity of the FGF-4 enhancer requires the synergistic action of Sox2 and Oct-3. *Genes and Development*, **9** (21), 2635–2645. doi: [10.1101/gad.9.21.2635](https://doi.org/10.1101/gad.9.21.2635).

Z

Zalzman, M., Falco, G., Sharova, L. V., Nishiyama, A., Thomas, M., Lee, S. L., Stagg, C. A., Hoang, H. G., Yang, H. Te, Indig, F. E. et al. (2010). Zscan4 regulates telomere elongation and genomic stability in ES cells. *Nature*, **464** (7290), 858–863. doi: [10.1038/nature08882](https://doi.org/10.1038/nature08882)

Zdravkovic, T., Nazor, K. L., Larocque, N., Gormley, M., Donne, M., Hunkapillar, N., Giritharan, G., Bernstein, H. S., Wei, G., Hebrok, M. et al. (2015). Human stem cells from single blastomeres reveal pathways of embryonic or trophoblast fate specification. *Development*, **142** (23), 4010–4025. doi: [10.1242/dev.122846](https://doi.org/10.1242/dev.122846)

Zenker, J., White, M. D., Gasnier, M., Alvarez, Y. D., Lim, H. Y. G., Bissiere, S., Biro, M., and Plachta, N. (2018). Expanding Actin Rings Zipper the Mouse Embryo for Blastocyst Formation. *Cell*, **173** (3), 776-791.e17. doi: [10.1016/j.cell.2018.02.035](https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.02.035)

Zhang, K., Li, L., Huang, C., Shen, C., Tan, F., Xia, C., Liu, P., Rossant, J., and Jing, N. (2010). Distinct functions of BMP4 during different stages of mouse ES cell neural commitment. *Development*, **137** (13), 2095–2105. doi: [10.1242/dev.049494](https://doi.org/10.1242/dev.049494)

Zhang, X., Li, T., Zhang, L., Jiang, L., Cui, T., Yuan, X., Wang, C., Liu, Z., Zhang, Y., Li, W., and Zhou, Q. (2018). Individual blastomeres of 4- and 8-cell embryos have ability to develop into a full organism in mouse. *Journal of Genetics and Genomics*, **45** (12), 677–680. doi: [10.1016/j.jgg.2018.07.012](https://doi.org/10.1016/j.jgg.2018.07.012)

Zhang, X., Zhang, J., Wang, T., Esteban, M. A., and Pei, D. (2008). Esrrb activates Oct4 transcription and sustains self-renewal and pluripotency in embryonic stem cells. *Journal of Biological Chemistry*,

283 (51), 35825–35833. doi: [10.1074/jbc.M803481200](https://doi.org/10.1074/jbc.M803481200)

Zhang, Y., Parmigiani, G., and Johnson, W. E. (2020). ComBat-seq: batch effect adjustment for RNA-seq count data. *NAR Genomics and Bioinformatics*, **2** (3), lqaa078. doi: [10.1093/nargab/lqAA078](https://doi.org/10.1093/nargab/lqAA078)

Zhao, B., Li, L., Lu, Q., Wang, L. H., Liu, C. Y., Lei, Q., and Guan, K. L. (2011). Angiomotin is a novel Hippo pathway component that inhibits YAP oncoprotein. *Genes and Development*, **25** (1), 51–63. doi: [10.1101/gad.2000111](https://doi.org/10.1101/gad.2000111)

Zhou, X., Sasakit, H., Lowe, L., Hogant, B. L. M., and Kuehn, M. R. (1993). Nodal is a novel TGF-beta-like gene expressed in the mouse node during gastrulation. *Nature*, **361** (6412), 543–547. doi: [10.1038/361543a0](https://doi.org/10.1038/361543a0).