

Departamento de Biología
Facultad de Ciencias
Universidad de Chile

UCH-FC
MAB-B
T275
C.1

ORGANIZACION SUBCELULAR DEL EMBRION CENTRIFUGADO DE RATON

Tesis presentada a la
Universidad de Chile en
cumplimiento parcial de los
requisitos para optar al grado
de Magister en Ciencias Biológicas

M. VERONICA TELLEZ NEUBAUER



Director de tesis: Dr. Luis Izquierdo

ABRIL, 1985

INFORME DE APROBACION
TESIS DE MAGISTER

Se informa a la comisión de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Magister presentada por la candidata

MARIA VERONICA TELLEZ NEUBAUER

ha sido aprobada por la comisión informante de Tesis como requisito de Tesis para optar al grado de Magister en Ciencias Biológicas con mención en Biología Celular.

Director de Tesis :

Luis Izquierdo

Luis Izquierdo

Comisión informante de Tesis :

Juan Fernández

Juan Fernández

Mónica Dabiké

Mónica Dabiké

Federico Leighton

Federico Leighton



A mis padres
A Francisco, Rowena y Alejandra



AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mis agradecimientos a todas las personas que me ayudaron durante la realización de mi tesis, particularmente:

Al doctor Luis Izquierdo, por su valiosa dirección y su disposición a ayudarme en todo momento.

Al doctor Carlos Doggenweiler.

A Victor Monasterio.

A mis amigas: María Inés Becker, Eugenia Díaz, Soledad Fernández, Teresa López, Cecilia Matte, Carmen Rivas y Ana Valdés, que siempre estuvieron cerca, me ayudaron y apoyaron cuando lo necesité.

A Luis Oñate y Juan Silva.

Y muy especialmente a mi amiga Soledad Sepúlveda, cuya preocupación constante y ayuda, se la agradezco inmensamente.



INDICE

	Pág.
Agradecimientos.....	ii
Indice.....	iii
Resumen.....	1
Summary.....	4
Introducción.....	7
Material y Métodos.....	14
Resultados.....	18
-Descripción general de embriones centrifugados.....	18
-Descripción de los estratos.....	19
-Reordenamiento despues de la centrifugación obser- vado con microscopia de luz.....	21
-Efecto de la centrifugación en el desarrollo hasta blastocisto.....	22
-Efecto de inhibidores de microtubulos y microfila- mentos: observaciones preliminares con microscopia de luz.....	22
-Tabla 1.....	24
-Figuras.....	25
Discusión.....	34
-Estratificacion de componentes citoplasmaticos.....	34
-Reordenamiento espacial despues de la centrifuga- cion.....	39
-Desarrollo de embriones centrifugados.....	43
Referencias.....	46

RESUMEN

En el desarrollo preimplantacional de ratón la primera diferenciación celular ocurre al formarse el blastocisto, en el que se distinguen dos tipos celulares: la masa celular interna, que dará origen al embrión propiamente tal y a algunos tejidos extraembrionarios y el trofoblasto, que originará tejidos extraembrionarios solamente. La aparición de estos dos tipos celulares y el posterior desarrollo de los diferentes tejidos embrionarios podrían derivar de componentes citoplasmáticos discretos que se encuentran organizados espacialmente en el embrión desde el comienzo del desarrollo. De ser así, las alteraciones en la organización espacial del huevo podrían generar defectos del desarrollo normal.

Para obtener una redistribución de los componentes citoplasmáticos, hemos estratificado embriones de dos células centrifugándolos a 15.000 g, 30.000 g, 50.000 g, 70.000 g, 90.000 g y 120.000 g, por una hora. El material fue fijado de inmediato y observado con microscopio de luz o electrónico para estudiar el efecto de la centrifugación sobre la estructura. Alternativamente los embriones centrifugados fueron cultivados por distintos lapsos para estudiar su efecto sobre la regulación y desarrollo. Experimentos semejantes se realizaron utilizando inhibidores de microtúbulos y microfilamentos.

Los resultados obtenidos muestran que los embriones centrifugados a fuerzas centrifugas mayores que 30.000 g

presentan una estratificación del citoplasma en la que se distinguen desde el polo centripeto al centrifugo los siguientes estratos: material lipídico (reconocido con ácido ósmico y Sudan), una zona de vesículas y membranas (que presenta actividad de fosfatasa ácida), una zona homogénea sin elementos figurados y un estrato en el que se encuentran mitocondrias, complejos de Golgi, cuerpos multivesiculares y abundante material fibrilar. El núcleo no se desplaza de su lugar si no que se deforma alargándose desde el centro del huevo hacia el polo centrifugo. El nucléolo se ubica en ese extremo del núcleo. Utilizando fuerzas centrifugas superiores a 70.000 g aparece un nuevo estrato formado por cuerpos cristaloides ubicado hacia el extremo centrifugo del huevo. En todas las condiciones ensayadas se conserva, sin aparente alteración, la capa cortical del huevo.

El cultivo de los embriones centrifugados muestra que éstos logran formar blastocistos normales en un porcentaje sólo algo menor que los controles, independientemente de la magnitud de la centrifugación. La recuperación en el tiempo es muy rápida, reordenándose el citoplasma en menos de una hora, antes que el embrión alcance los estados 3 o 4. El nucléolo vuelve a su posición original y los organelos son redistribuidos en el citoplasma; solamente los lípidos permanecen segregados más tiempo y son casi indetectables en el estado de mórula avanzada.

Las observaciones preliminares de embriones centrifugados en presencia de Citocalasina D y Colcemid

señalan que una estratificación semejante se obtiene con menos fuerza centrífuga y que la recuperación requiere más tiempo.

Aunque no se puede descartar una redistribución pasiva de los componentes citoplasmáticos, los resultados sugieren la existencia de una estructura celular relativamente elástica que reubica los organelos en su posición original. Esta hipotética estructura, que podría corresponder al citoesqueleto, no sería esencialmente alterada por la fuerza centrífuga y mantendría la organización espacial del embrión que es responsable de su desarrollo normal.

SUMMARY

The first cellular differentiation during mouse preimplantational development occurs when the blastocyst is formed. At this time, two cell types are differentiated: those of the inner cell mass, which will originate the embryo and some extra-embryonal tissues, and those of the trophoblast, which will originate extra-embryonic tissues only. Apposition of these two cell types, and their posterior development into different embryonic tissues, could proceed from discrete cytoplasmic components which are spatially organized in the embryo since the beginning of development. If this is true, alterations in the spatial organization of the egg could generate alterations in normal development.

In order to study the effect of centrifugation on cell structure, two-cell embryos were stratified by centrifugation at 15,000 g, 30,000 g, 50,000 g, 70,000 g, 90,000 g and 120,000 g during an hour. After centrifugation the material was immediately fixed and observed under light and electron microscopy. In addition, some embryos were further cultivated to study the effect of centrifugation on their development. Similar experiments were also performed utilizing microtubule and microfilament inhibitors.

Results indicated that embryos centrifuged at more than 30,000 g present a stratification of the cytoplasm in which

the following strata can be visualized, from the centripetal to the centrifugal pole: lipid material (recognized after osmic acid and Sudan Black staining), zone of vesicles and membranes (which show acid phosphatase activity), a homogeneous zone lacking structured elements, and a stratum in which mitochondria, Golgi complexes, multivesicular bodies and abundant fibrillar material are found. The nucleus is not displaced but is deformed, expanding in length from the center of the egg toward the centrifugal pole. The nucleolus is located at that end of the nucleus.

By using centrifugal forces higher than 70,000 g, a new layer formed by crystalloid bodies appears located toward the centrifugal end of the egg. In all the conditions tested, the cortical layer of the egg remains apparently unchanged.

Independently of the magnitude of the centrifugal force, cultured centrifuged embryos show that they form normal blastocysts at rates slightly lower than the controls. Recovery of centrifuged embryos is very fast, the cytoplasm becomes reorganized in less than an hour, that is before the embryo reaches state 3 or 4. The nucleolus goes back to its original position and the organelles are redistributed in the cytoplasm. Only the lipids remain segregated for longer time and are almost undetectable in advanced morulae.

Preliminary observations of embryos treated with cytoskeletal inhibitors show, that a similar stratification is obtained with lower centrifugal forces and that recovery requires a longer period of time.

Results suggest the existence in the embryos of a relatively elastic cellular structure which rearranges the organelles into their original position after centrifugation. The nucleus is the most firmly anchored element and is not displaced by the centrifugal force. This hypothetic structure, that may correspond to the cytoskeleton, would not be altered by the centrifugal force and would maintain the spatial organization of the embryo during normal development.

INTRODUCCION

Estudiando experimentalmente la iniciación del desarrollo en distintas especies animales, desde comienzos del siglo se han distinguido dos clases extremas de embriones: los determinados o en mosaico y los indeterminados o reguladores. Se denomina determinados a aquellos que al iniciar la segmentación ya presentan una organización espacial fija y que por lo tanto al ser perturbados experimentalmente se desarrollan en forma anormal. En cambio se denomina reguladores a los embriones que después de una perturbación experimental son capaces de reestablecer su organización espacial y formar un animal relativamente normal. Puesto en otros términos: las partes de un embrión determinado tienen un destino normal o significado prospectivo igual a su desarrollo potencial en tanto que las de un embrión regulador tienen un desarrollo potencial mayor que su destino normal o significado prospectivo. Entre las clases extremas así definidas hay un sinnúmero de clases intermedias de embriones cuyo desarrollo es más o menos afectado según el modo de la intervención experimental y el estado del desarrollo en que se practique. Véase historia del problema en Raven, 1959; Köhn, 1971; Davidson, 1976.

De lo anterior puede concluirse que la distinción entre embriones determinados y embriones reguladores se funda en resultados experimentales y por lo tanto, antes que fuera posible manipular y cultivar *in vitro* los embriones

iniciales de mamíferos no había certeza respecto de su capacidad o incapacidad de regular. Por analogía con embriones determinados de invertebrados marinos (especies de protocordados, moluscos y anélidos) que revelan localizaciones citoplasmáticas en sus huevos fecundados, se supuso que ciertas propiedades citoquímicas del huevo de mamíferos señalarían un ordenamiento espacial de factores morfogénéticos que serían distribuidos durante la segmentación y determinarían la diferenciación de masa celular interna y trofoblasto (Dalcq, 1957, 1965). Sin embargo las observaciones citoquímicas relativas a la distribución de RNA, de proteínas que se determinan por la reacción de Millon-Pollister, de fosfatasa ácida y de adenosintrifosfatasa no fueron concluyentes (véase discusión en Cerisola & Izquierdo, 1969) y son inconciliables con las observaciones de regulación en embriones de mamíferos publicadas por Tarkowski (1959), Mintz (1964) y Mulnard (1965).

La normalización que se aprecia al aislar blastómeros o agregar mórulas parece incompatible con una organización espacial determinada, a menos que ésta sea muy lábil. En tal caso, es necesario invocar un mecanismo de regulación (véase discusión en Izquierdo, 1977). El modelo más aceptado para explicar el desarrollo normal y la regulación en embriones de mamíferos hasta el estado de blastocisto es el llamado adentro-afuera, propuesto en su forma más consistente por Tarkowski y Wróblewska (1967). Este puede

resumirse en que la diferenciación hacia la masa celular interna o el trofoblasto del blastocisto es consecuencia de la posición central o periférica que tienen las células en la mórula. Lo que el modelo no especifica es que debe entenderse en términos moleculares o subcelulares por adentro y afuera. En forma analógica, cómo "sabe" una célula que se encuentra al centro o en la periferia de la mórula? y en forma fisiológica, cómo las presumibles diferencias de microambiente modifican la actividad bioquímica de las células?

Aun cuando se ignore el mecanismo de acción, el modelo adentro-afuera explica en forma adecuada la regulación embrionica de los mamíferos; sin embargo, no excluye la existencia de una organización espacial intrínseca que controle normalmente el desarrollo hasta blastocisto. Además, es necesario tener presente las limitaciones del modelo. Por una parte, no parece posible generalizarlo a todas las especies de mamíferos y no da cuenta de ciertas observaciones de organización espacial, particularmente evidentes en el embrión de rata (Izquierdo & Vial, 1962; Lois & Izquierdo, 1984); por otra parte, no considera suficientemente el factor tiempo expresado por el reloj morfogénico y se remite principalmente a interpretar el resultado de experimentos de aislamiento, agregación y translocación de blastómeros. [Véase revisiones críticas en Izquierdo (1977) y Johnson (1981)].

La estratificación del citoplasma por centrifugación es un método que se ha utilizado con buen éxito desde los

albores de la embriología experimental. Boveri (1899) lo empleó para desplazar localizaciones citoplasmáticas en el huevo de *Ascaris* (nematodo), demostrando que las "granulaciones polares" protegen los cromosomas de la disminución y determinan la línea germinal. Sus resultados han sido confirmados más tarde por otros autores, en especial por Guerrier (1967). También en *Xenopus* (anfibio) se ha desplazado por centrifugación las "granulaciones polares" evitando así que la irradiación del polo vegetativo esterilice los embriones (Tanabe & Kotani, 1974). Pero no solo ha sido posible centrifugar determinantes de línea germinal sino también otras localizaciones de valor morfogenético; por ejemplo, se ha inducido por centrifugación el desarrollo de embriones bicefálicos y bicaudados del insecto *Chironomus* (Yajima, 1960).

No obstante dichos resultados positivos, desde que se inició la embriología experimental también se ha observado desarrollo normal de huevos centrifugados; de por ejemplo, el equinodermo *Arbacia* (Lyon, 1907; Harvey, 1956) [aunque resultados posteriores no han sido muy claros] (Anderson, 1970), el celenterado *Hydractinia* (Beckwith, 1914), los anélidos *Chaetopterus* y *Nereis* (Lillie, 1902), los moluscos *Physa* y *Limnaea* (Conklin, 1910), *Cumingia* (Morgan, 1927), *Ilyanassa* (Clement, 1968), *Dentalium* (Verdonk, 1968), el crustáceo partenogenético *Daphnia* (Kaudewitz, 1950) y el tunicado *Styela* (Conklin, 1931). En atención a estos resultados y otros semejantes, la embriología experimental

clásica concluyó que la organización polar del huevo, sea éste determinado o regulador, no reside en el ordenamiento de componentes citoplasmáticos discretos que pueden reconocerse con el microscopio de luz y estratificarse por centrifugación, sino en la arquitectura fundamental del protoplasma y del cortex celular (véase Watterson, 1955).

Esta conclusión tan general, sin embargo, merece algunas reservas. Primero: la centrifugación ha demostrado efectivamente que puede desplazar localizaciones citoplasmáticas como los determinantes de la línea germinal y de la organización general, tal cual se ha resumido más arriba. Segundo: es preciso tener en cuenta la magnitud del campo gravitacional, el tiempo que éste aplica y el medio en que se suspende el material, ya que estas condiciones son muy variables de uno a otro autor y no tienen más límite que la resistencia del huevo, la cual depende a su vez del estado del desarrollo, como lo demostraron los clásicos experimentos de Harvey (1932). Tercero: también debe considerarse la velocidad con que se recupera el orden espacial del huevo después de la centrifugación y su relación con los planos de segmentación; por ejemplo, al reordenarse el plasma polar después de la centrifugación del huevo del anélido *Tubifex* se normaliza el desarrollo, pero si antes sobreviene la segmentación y dicho plasma no alcanza a incorporarse a los somatoblastos, el embrión resulta defectuoso (Lehmann, 1945).

La centrifugación de huevos no se ha usado solamente para estudiar el efecto sobre el desarrollo del

desplazamiento de localizaciones citoplasmáticas que pudieran tener función morfogénica, sino también para analizar la estructura de las células (Harvey, 1931; Gross et al. 1965) o para concentrar los componentes citoplasmáticos en estratos homogéneos según su densidad y analizar sus propiedades. Es el caso de las investigaciones sobre granulaciones metacromáticas en los huevos de los moluscos *Barnea* y *Gryphasa* o de los equinodermos *Psammechinus* y *Arbacea* (Mulnard, 1959; Mulnard, Auclair & Marsland, 1959), así como también aquellos estudios realizados en *Phycomycetes* (Zalokar, 1969). En los mamíferos, se ha centrifugado los ovarios de Rata, Hamster y Topo con el propósito de distinguir citológica y citoquímica propiedades del citoplasma que pudieran tener relación con una presunta polaridad del oocito (Dalca & Van Egmond, 1953). La primera y única investigación en que se ha combinado centrifugación y desarrollo *in vitro* fue realizada por Mulnard (1970). Centrifugando oviductos que contenían embriones de ratón con dos células, durante 20 minutos a 50.000 g, observó el depósito en el polo centrifugo de un material obscuro y cuando cultivó los embriones centrifugados observó un desarrollo relativamente normal hasta el estado de blastocisto. Pero se trata sólo de algunas experiencias preliminares que forman parte de una investigación más extensa dedicada a un análisis cinematográfico del desarrollo de embriones fusionados.

En el presente trabajo se estudia el problema de regulación en el embrión de ratón por medio de la centrifugación, describiendo un ordenamiento espacial de componentes subcelulares y analizando el efecto que tiene la estratificación del citoplasma en el desarrollo. Se propone: primero, centrifugar embriones de ratón de dos células y estudiar por microscopía electrónica y técnicas citoquímicas la composición citológica de los estratos; segundo, analizar el reordenamiento eventual de los distintos componentes celulares después de la centrifugación; tercero, relacionar magnitud del campo centrifugo y estratificación, con regulación y desarrollo in vitro hasta el estado de blastocisto. El proyecto está acotado por ciertas limitaciones que impone el material, entre las cuales debe destacarse la gran dificultad de cultivar in vitro embriones de una célula y el riesgo de ruptura de los blastómeros cuando se intenta emplear fuerzas centrifugas elevadas.

La hipótesis que fundamenta la investigación puede resumirse así: la gran capacidad de regulación del embrión de mamíferos perturbado experimentalmente podría estar ocultando la existencia de un patrón morfogenético espacial que guíe el desarrollo normal y que por ser previo a la diferenciación adentro-afuera de la mórula pudiera no reconocerse con experimentos de translocación celular pero si detectarse translocando los componentes celulares cuando se inicia el desarrollo.

MATERIAL Y METODOS

Se utilizaron embriones de ratón cepa CF1 en estado de dos células, de hembras superovuladas. La superovulación se provocó con una inyección de 5 unidades internacionales de suero de yegua preñada (PMS) y 44 horas más tarde con 4 unidades internacionales de gonadotropina coriónica humana (HCG). Ambas drogas fueron adquiridas en Sigma. La edad de los embriones se estimó considerando como momento de iniciación del desarrollo, las 0 horas del día en que apareció el tapón vaginal. Los embriones se obtuvieron por perfusión de los oviductos con un medio de cultivo descrito por Biggers (Biggers, Whitten & Whittingham, 1971), conteniendo 4 mg/ml de albúmina de suero de bovino (BSA) (Calbiochem).

Centrifugación de los embriones

Fue necesario realizar numerosos ensayos preliminares, utilizando diferentes gradientes de concentración y distintos tiempos de centrifugación para establecer las condiciones óptimas.

Los embriones fueron centrifugados en un gradiente discontinuo de dextrán (PM 40.000) (Sigma) en medio de cultivo Biggers, compuesto de cuatro capas de concentraciones de 11%, 13%, 15% y 17% P/V de 0.2 ml cada una, a pH 7.2 - 7.4 y a temperatura variable entre 13 C y 18 C aproximadamente. Se utilizaron tubos de nitrocelulosa de 0.8 ml y una ultracentrifuga Beckman modelo L, con un

rotor SW 39. Las fuerzas centrifugas usadas fueron: 15.000 g, 25.000 g, 30.000 g, 40.000 g, 50.000 g, 60.000 g, 70.000 g, 90.000 g, 120.000 g, durante 60 min.

Microscopia de luz

Para la observación in toto y el reconocimiento del material lipídico, los embriones fueron fijados inmediatamente después de la centrifugación o luego de diversos tiempos de cultivo in vitro. Se utilizó glutaraldehído al 3 % en tampón cacodilato de sodio 0.1 M pH 7.4, a temperatura ambiente durante 1 h. Se lavaron en tampón cacodilato de sodio 0.05 M y se postfijaron durante 1 h en oscuridad con tetróxido de Osmio al 1 % (v/v) en tampón cacodilato de sodio 0.1 M y luego se lavaron en el mismo tampón. Los embriones fueron montados en una gota de glicerol y observados con un microscopio Zeiss.

Los lípidos se reconocieron por su mayor osmofilia y por tinciones con "Red Oil" y "Sudan Black" (Casselmann, 1959).

El reconocimiento de la actividad de fosfatasa ácida, se realizó procesando embriones según el método de Gomori modificado por Weissenfels, 1967 (Pearse, 1968).

Para el reconocimiento de DNA, se fijó el material con alcohol-formol-ácido acético (8.5: 1 : 0.5) y posteriormente se empleó el método modificado de Feulgen (Pearse, 1968).

Microscopia electrónica

Se utilizó el mismo método de fijación y postfijación empleado para la observación con microscopio de luz. La

deshidratación se realizó poniendo los embriones en concentraciones crecientes de acetona desde 30 % a 100 % (v/v) en agua. Luego fueron incluidos en acetona-Spurr (Polyscience) 2:1 y 1:1 (v/v) durante 15 min cada vez y en Spurr solo, durante 30 min. Posteriormente fueron puestos en cápsulas de inclusión con Spurr y dejados toda la noche a 70 ° C para que éste polimerizara.

Con un ultramicrotomo Sorvall Porter Blum MT2-B se hicieron cortes finos (entre 600 Å y 800 Å de espesor) y se recogieron en grillas de cobre de 200 mesh. Posteriormente el material fue teñido con acetato de uranilo al 4 % en metanol por 90 seg, lavado con agua bidestilada y luego teñido por 10 min en gotas de citrato de plomo al 0.25 % rodeadas de pastillas de KOH, lavado en agua bidestilada y finalmente en metanol puro. Los cortes fueron observados en un microscopio electrónico Philips 300.

Cultivo in vitro

El contenido del tubo de centrifuga fue aspirado por capas con una micropipeta y vaciado en una cápsula embriológica de la cual fueron recogidos los embriones y lavados en medio de cultivo. Luego los embriones se colocaron en gotas de medio de Biggers (Biggers, Whitten & Whittingham, 1971) que previamente habían sido depositadas en el fondo de una cápsula bajo una capa de vaselina líquida. La cápsula se puso en una cámara de cultivo a 37 ° C y el pH del medio fue llevado a 7.4 gasificando con una mezcla de CO₂ al 5 % en aire.

Uso de inhibidores del citoesqueleto

Como inhibidor de polimerización de microfilamentos se utilizó Citocalasina D y como inhibidor de polimerización de microtúbulos se utilizó Colcemid. La concentración utilizada para ambos inhibidores fue de 0.5 µg/ml. Colcemid fue adquirido en Sigma y Cytochalasin D fue donado por el Dr. M. Flashner de la Universidad de New York. Los embriones fueron tratados con los dos inhibidores simultáneamente y para esto fueron cultivados previamente en medio de Biggers con inhibidores 30 min con el fin de asegurar que se encontraran bajo el efecto de las drogas en el momento de la centrifugación. Posteriormente fueron centrifugados a distintos g, en presencia de los inhibidores y fijados inmediatamente o cultivados por diferentes periodos de tiempo, en medio de Biggers con inhibidores. Como control se sometieron embriones a las mismas condiciones experimentales pero omitiendo el uso de inhibidores.

RESULTADOS

Descripción general de embriones centrifugados

Los embriones de 2 células fueron centrifugados durante 1 hora en un gradiente de dextran/Biggers aplicando fuerzas centrifugas comprendidas entre 15.000 g y 120.000 g. Con fuerzas superiores a 30.000 g se observó estratificación de los componentes citoplasmáticos y con 120.000 g ya se observó fragmentación de algunos embriones. Luego de la centrifugación los embriones fueron recuperados de la franja correspondiente a la concentración de 15% (p/v) de dextran en medio Biggers. De 32 experimentos exitosos de centrifugación con 620 embriones, 40 embriones fueron examinados detenidamente con microscopio de luz. La mayoría de los experimentos se han realizado centrifugando a 70.000 g o 90.000 g, porque en esas condiciones se obtiene una estratificación bien definida y no se afecta la integridad del embrión.

Observando con microscopio de luz los embriones recién centrifugados, se ven los blastómeros alargados en el sentido de la fuerza centrifuga, aplanados entre sí y ocasionalmente algo acinturados. Con raras excepciones, los embriones se orientan respecto de la fuerza centrifuga y la estratificación del citoplasma es perpendicular al plano que separa los blastómeros. El polocito se ubica más frecuentemente en el polo centrifugo.

En el polo centripeto se reconoce en cada blastómero un casquete de material homogéneo que se tiene intensamente

cuando el material es postfijado con osmio o cuando se emplea colorantes que se disuelven en lípidos, como "Sudan Black" o "Red oil". Bajo el casquete de lípidos se observa una zona hialina y luego una de apariencia más granulosa que se extiende hasta el polo centrifugo. Usando óptica de Nomarski se observa el núcleo alargado desde el centro del blastómero hacia el polo centrifugo, donde se reconoce el nucléolo. Con el método de Feulgen no se observó fragmentos nucleares que contuvieran DNA (figs. 1-3).

A diferencia del embrión centrifugado, el estado de dos células normal, tiene un núcleo central con uno o más nucléolos y una distribución homogénea de sus componentes citoplasmáticos. Para mayores detalles de la citología y ultraestructura del embrión de dos células de ratón, véase el trabajo de Calarco y Brown (1969).

Descripción de los estratos

Luego de centrifugar se pueden distinguir con el microscopio electrónico, desde el polo centripeto al centrifugo, cinco estratos citoplasmáticos que contienen los siguientes componentes: 1) material lipídico, 2) vesículas y membranas, 3) material homogéneo, 4) mitocondrias y fibrillas, 5) cuerpos cristaloides. El primer estrato corresponde al casquete de lípidos observado con el microscopio de luz, los dos siguientes a la zona hialina y los dos últimos a la zona granulosa (fig. 5). En esta parte del texto también describiremos el cortex celular y el

núcleo. Se observó con el microscopio electrónico un total de 61 embriones recién centrifugados.

Estrato de material lipídico. Está formado por la acumulación de numerosas gotas de lípidos que no son distintas de las que se encuentran normalmente esparcidas en el citoplasma de embriones preimplantacionales. El espesor del estrato es proporcional a la fuerza centrífuga aplicada, observándose escasa acumulación a 25.000 g y máxima acumulación a 70.000 g o más (fig. 6). No se encuentran en este estrato otros elementos, a excepción de algunas escasas vesículas y mitocondrias vesiculadas tal como se observa en embriones normales (Calarco & Brown, 1969) (figs. 6 y 7).

Estrato de vesículas y membranas. Está formado por vesículas de diversos tamaños, independientes o asociadas en unidades mayores y además, cisternas aplanadas que parecen corresponder a retículo endoplásmico liso (figs. 7 y 8). Con el microscopio de luz, se reconoce actividad de fosfatasa ácida (fig. 4) en la parte más centripeta de la zona hialina que coincide con este estrato, lo cual sugiere que algunas vesículas sean lisosomas o componentes del GERL.

Estrato homogéneo. Se observa en este un material granular fino uniformemente distribuido y con densidad electrónica mediana, que no incluye elementos figurados (fig. 8)

Estrato de mitocondrias y material fibrilar En este estrato se observan las mitocondrias, complejos de Golgi y vesículas asociadas al Golgi de menor tamaño que las acumuladas en el estrato de vesículas, además de cuerpos

multivesiculosos y abundante material fibrilar (figs. 9 y 10).

Estrato de cuerpos cristaloides. Estos solo son evidentes cuando se centrifuga a 70.000 g o más. Estos cuerpos no se encuentran o son muy escasos en embriones de 2 células no centrifugados y al parecer se forman por la apilación de material fibrilar durante la centrifugación (fig. 11, 12 y 13).

"Córtez." No parece estar alterado por efecto de la centrifugación por cuanto presenta una densidad electrónica semejante a los embriones normales y conserva un grosor uniforme en torno de cada blastómero. El material cortical tiene la apariencia de una malla que en general excluye organelos citoplasmáticos (figs. 11 y 13). Con fuerzas centrifugas superiores a 90.000 g, los blastómeros frecuentemente se observan acinturados o se fragmentan a nivel de la zona homogénea (fig. 23)

Núcleo. Se encuentra en medio del estrato de mitocondrias y material fibrilar pero se deforma por efecto de la centrifugación y se alarga hacia el polo centrifugo conteniendo el o los nucléolos condensados en ese extremo. El extremo centripeto del núcleo permanece en el centro del blastómero y se pueden reconocer ahí digitaciones, que parecen anclarlo (figs. 14 y 15). Esta región no la hemos estudiado suficientemente para identificar los elementos de citoesqueleto que pudieran estar comprometidos.

Reordenamiento después de la centrifugación observado con microscopia de luz

Después de la centrifugación durante 1 hora a 70.000 g o 90.000 g, los componentes citoplasmáticos tardan 30 a 40 minutos en reordenarse, tal como se infiere de la desaparición de los estratos observada con microscopia de luz y por la recuperación de la posición central del nucléolo en el blastómero. El casquete de lípidos es la única excepción; permanece en posición polar. Durante el clivaje el casquete de lípidos se redistribuye, entre los blastómeros hasta que en la mórula avanzada es casi imperceptible. Aunque los surcos de segmentación de 2 a 4 blastómeros generalmente bisectan los casquetes de lípidos, suele ocurrir que el plano de segmentación sea paralelo a los casquetes y queden 2 de los 4 blastómeros sin éstos (figs. 16, 17, 18 y 19). En total se cultivaron 66 embriones que fueron fijados entre 30 min y 4 h después de centrifugarlos a 70.000 g.

Efecto de la centrifugación en el desarrollo hasta blastocisto

Cuando se cultivan in vitro los embriones centrifugados se observa un desarrollo hasta el estado de blastocisto en un porcentaje algo menor que en los controles, pero sin diferencias significativas en relación con la fuerza centrífuga (Tabla 1). Se distinguen embriones centrifugados y controles en que los primeros tardan aproximadamente 8 horas más en formar blastocistos. No

hemos observado retardo en la compactación.

Efecto de inhibidores de microtúbulos y microfilamentos:

observaciones preliminares con microscopía de luz

Cuando se centrifugaron embriones en presencia de citochalasin D y colcemid, se observó una menor resistencia a la fuerza centrífuga. Observaciones en 180 embriones demuestran que a 70.000 g los embriones son deformados y un 30% se fragmenta entre la zona hialina y la granulosa, en tanto que a 90.000 g la deformación es mayor y la fragmentación alcanza el 60% del material. Para comparación téngase en cuenta que embriones no tratados, centrifugados a 120.000 g se fragmentan en un 10 % de los casos (figs. 20-23). El orden de estratificación es semejante en embriones tratados y no tratados, pero en los tratados es suficiente una centrifugación de 30.000 g para lograr resultados similares a los obtenidos en embriones no tratados centrifugados a 50.000 g. En cuanto al reordenamiento después de la centrifugación, tarda más de 2 horas para completarse en embriones tratados con inhibidores, cuando los controles solo requieren 30 min (figs. 24-27).

TABLA I: Efecto de la centrifugación en el desarrollo hasta blastocisto

Fuerza centrífuga (60 min)	Desarrollo de blastocistos/embriones totales		% de blastulación centrifugados/ % blastulación Controles
	Centrifugados	Controles	
50.000	45/103	42/75	43.7/56.0 = 78.0
70.000	87/116	38/43	75.0/88.4 = 84.8
90.000	128/215	43/57	59.5/75.4 = 78.9

Figura 1 Embrión centrifugado 1 h a 70.000 g, fijado 10 min después de la centrifugación. Observe desde polo centripeto a centrifugo los siguientes estratos: casquete de lípidos (L), zona hialina (H), zona granulosa (G). Barra representa: 5 μ m

Figura 2 Embrión centrifugado 1 h a 90.000 g, fijado 10 min después. Óptica de Nomarski. En estrato hialino se reconocen vesículas coalescentes (flecha) que se observan con microscopía electrónica (figs. 7 y 8). Se reconoce núcleo alargado hacia polo centrifugo, región donde se ubica el nucléolo (cabeza de flecha). Barra representa 5 μ m

Figura 3 Embrión centrifugado 1 h a 70.000 g y fijado 10 min después. Reacción de Feulgen revela localización de DNA en núcleo alargado y en polocito, en polo centripeto. Barra representa: 5 μ m

Figura 4 Embrión centrifugado 1 h a 70.000 g y fijado 20 min después. Reacción de Gomori revela fosfatasa ácida (flecha) en estrato de vesículas y membrana (ver microscopía electrónica, figs. 5, 7 y 8). Barra representa: 5 μ m

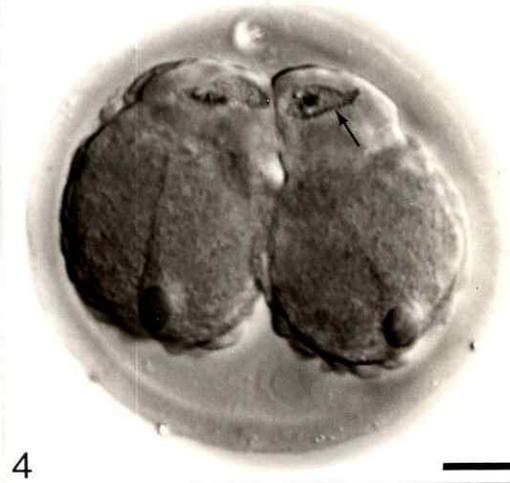
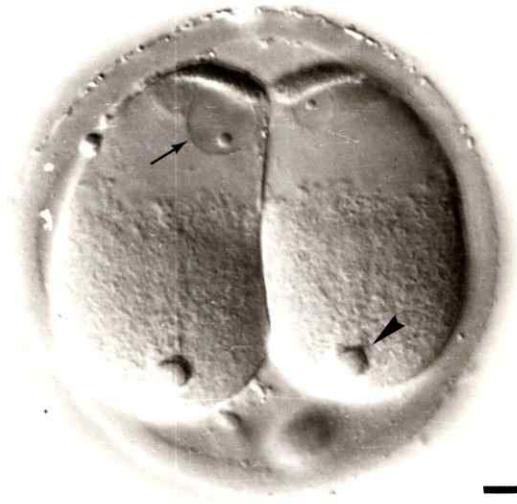
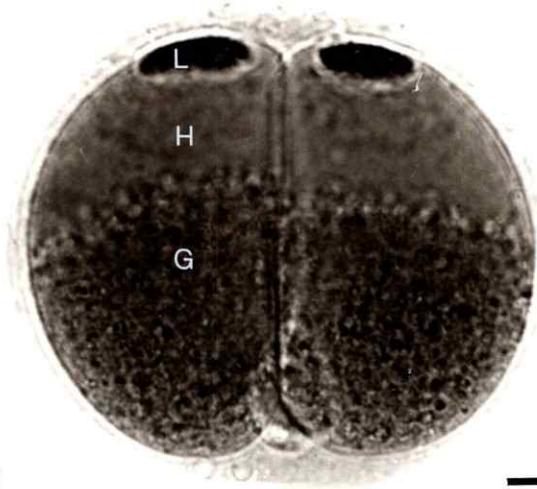


Figura 5 Embrión centrifugado 1 h a 90.000 g y fijado 10 min después. Microscopia electrónica panorámica. Se observa desde polo centripeto a centrifugo: estrato de lípidos (L); zona hialina (de microscopia de luz) dividida es estrato de vesículas y membranas (VM) y estrato homogéneo (H); zona granulosa (de microscopia de luz) que corresponde a estrato de mitocondrias y material fibrilar (MF). Se reconoce núcleo alargado (n). Barra representa: 2 μ m

Figura 6 Iguales condiciones que en fig. 5. En el polo centripeto del huevo se observa el "còrtex" y el estrato de lípidos. Se reconoce zona pelúcida (zp) y cortex (co). Barra representa: 0.5 μ m

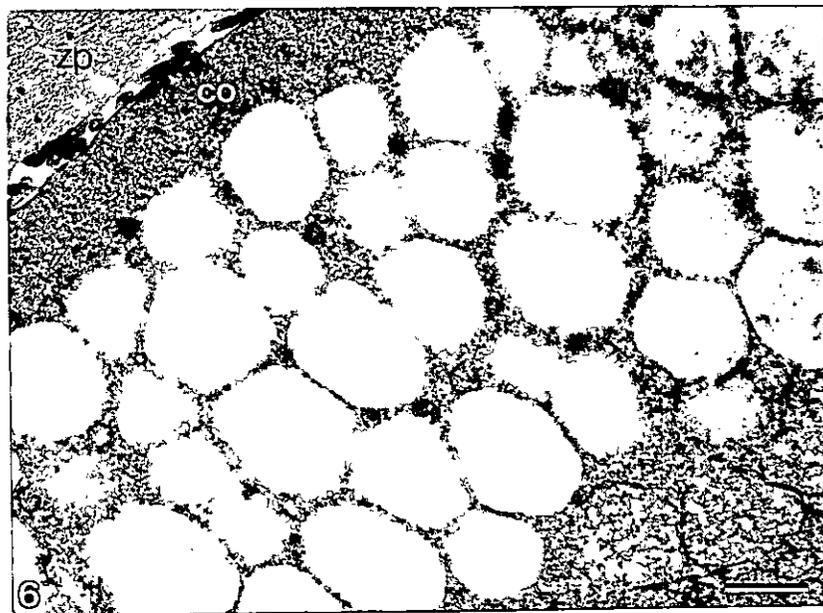
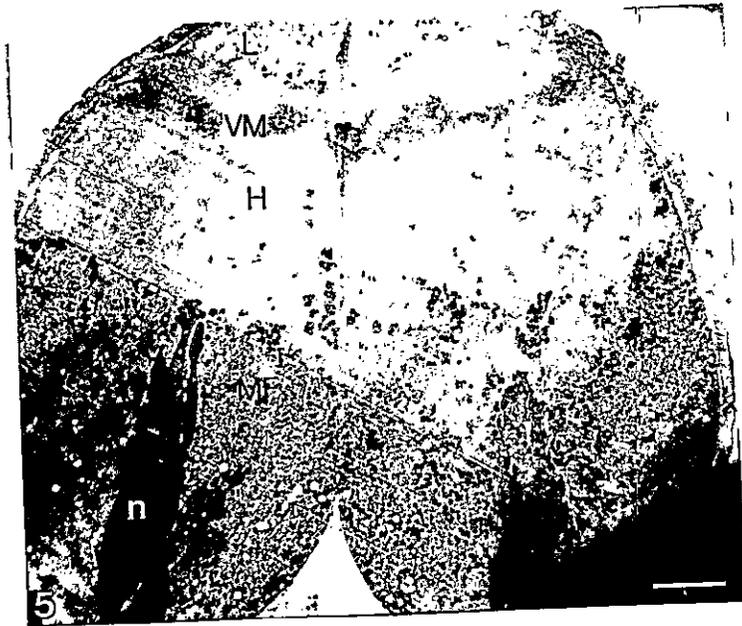


Figura 7 Embrión centrifugado 1 h a 70.000 g y fijado 10 min después. Se observa zona pelúcida (zp), estrato de lípidos (L) y estrato de vesículas y membranas (VM). Se reconocen cisternas aplanadas (flecha). Barra representa: 1 μ m

Figura 8 Iguales condiciones que en fig. 7. Estrato de vesículas y membranas. Se observa vesícula circular coalescente (flecha). Barra representa: 1 μ m

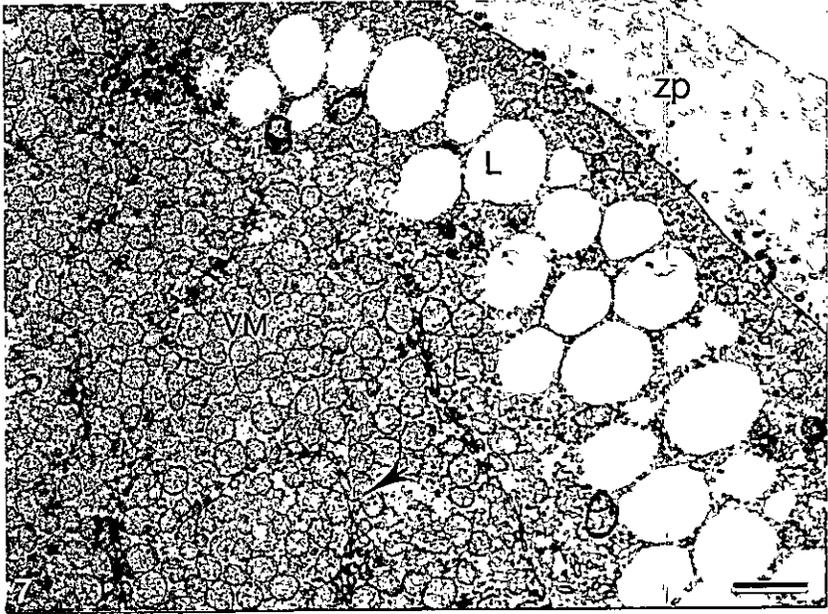


Figura 9 Iguales condiciones que en fig. 7. Estrato de mitocondrias y material fibrilar. Se observa zona pelúcida (zp), material fibrilar (f), mitocondrias (m), sustancia de Golgi (g) y cuerpos multivesiculares (*). Flecha indica el polo centrifugo. Barra representa: 1 μ m

Figura 10 Iguales condiciones que en fig. 7. Estrato de mitocondrias y material fibrilar. Obsérvese espacio interblastomérico (punta de flecha), mitocondrias (m), material fibrilar (f), sustancia de Golgi (g) y cuerpos multivesiculares (*). Flecha indica el polo centrifugo. Barra representa: 1 μ m

Figura 11 Embrión centrifugado 1 h a 70.000 g y fijado 20 min después. Parte centrifuga de estrato de mitocondrias y material fibrilar y estrato de cuerpos cristaloides. Obsérvese material fibrilar (f), cuerpos cristaloides (c) y "còrtex" (co). El corte es tangencial y en un sector se observa la superficie del huevo con microvellosidades (punta de flecha). Flecha indica el polo centrifugo. Barra representa: 0.5 μ m

Figura 12 Iguales condiciones que en fig. 11. Se observa material fibrilar (f), cuerpos cristaloides (c) y "còrtex" (co). El limite entre "còrtex" y estrato de cuerpos cristaloides esta subrayado por depósito de sustancia no identificada (cabeza de flecha). Barra representa: 0.2 μ m

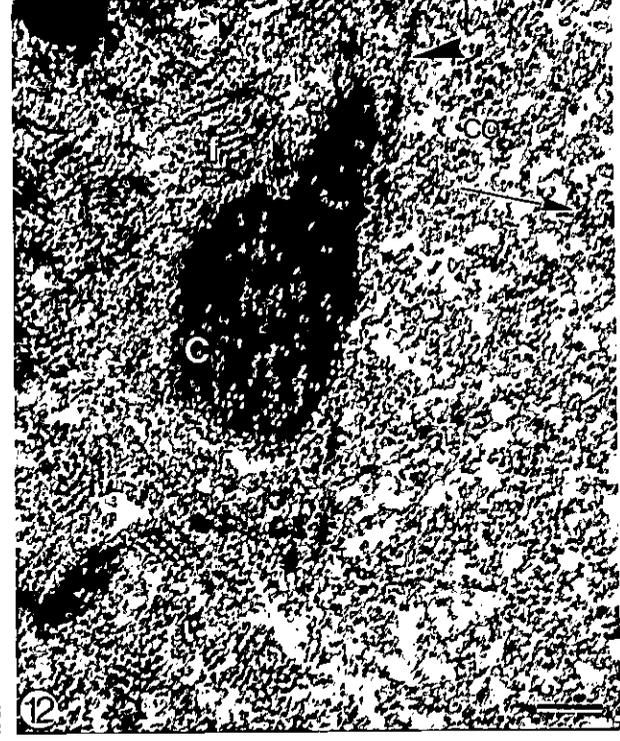
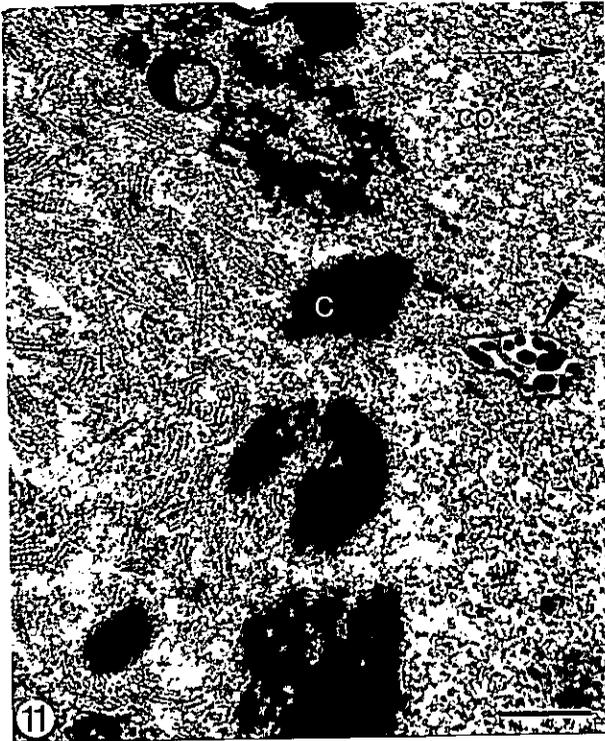
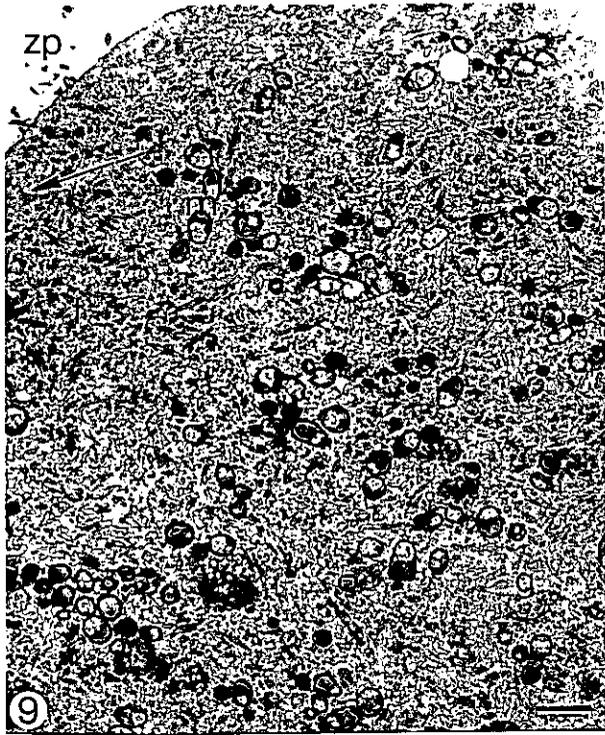


Figura 13 Iguales condiciones que en fig. 11. Corte tangencial por polo centrifugo. Se observa material fibrilar (f), cuerpos cristaloides (c), "còrtex" (co) y zona pelúcida (zp). Flecha indica la direcciòn de la fuerza centrifuga. Barra representa: 1 μ m

Figura 14 Iguales condiciones que en fig. 7. Extremo centripeto del núcleo (n), en estrato de mitocondrias y material fibrilar. Obsèrvese digitaciones. que sugieren su anclaje en el citoesqueleto. Barra representa: 1 μ m

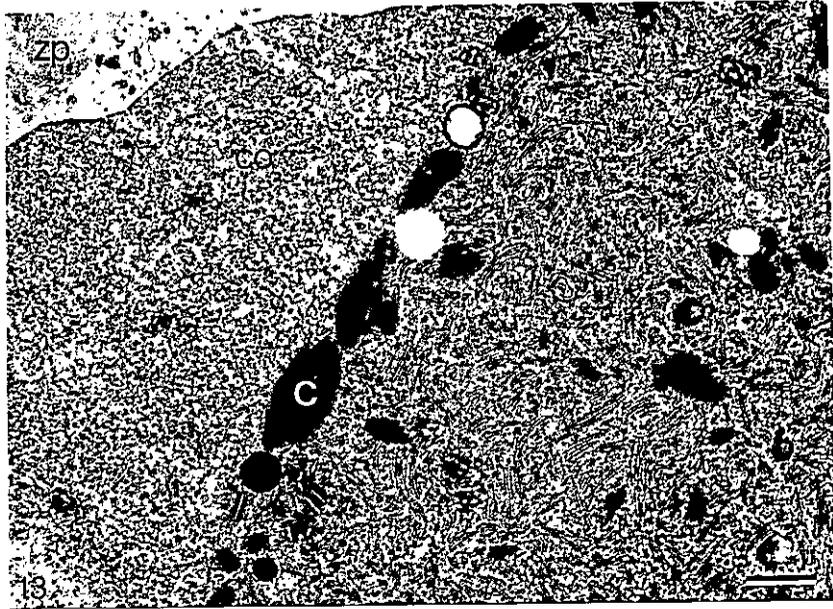
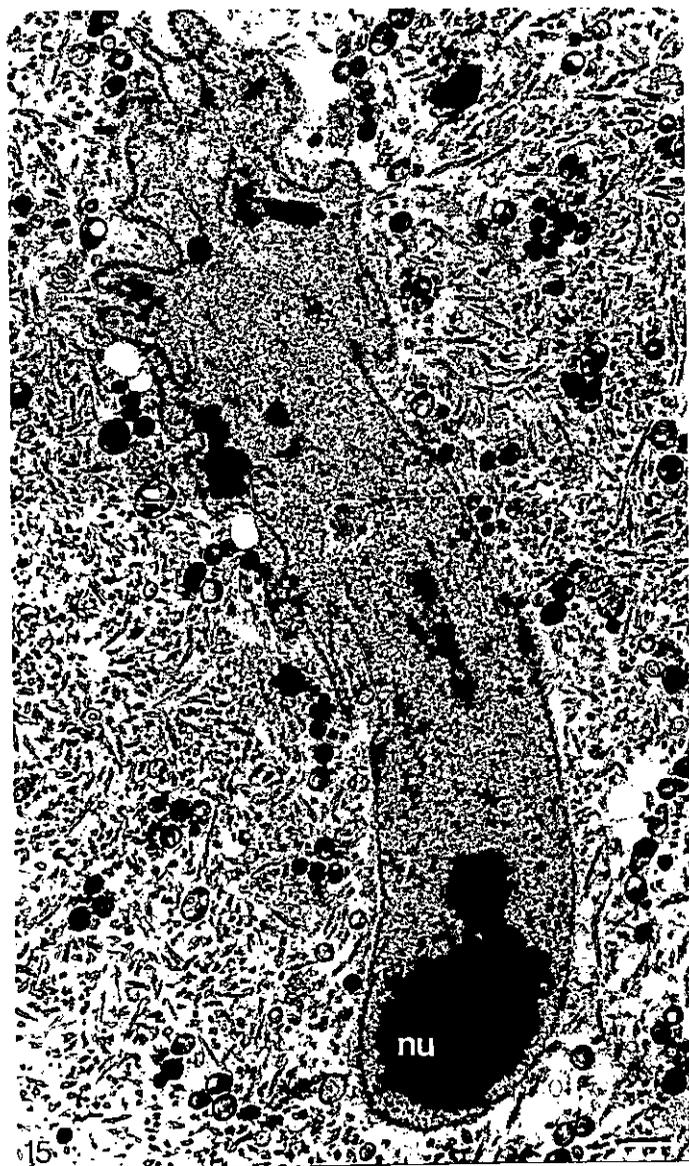
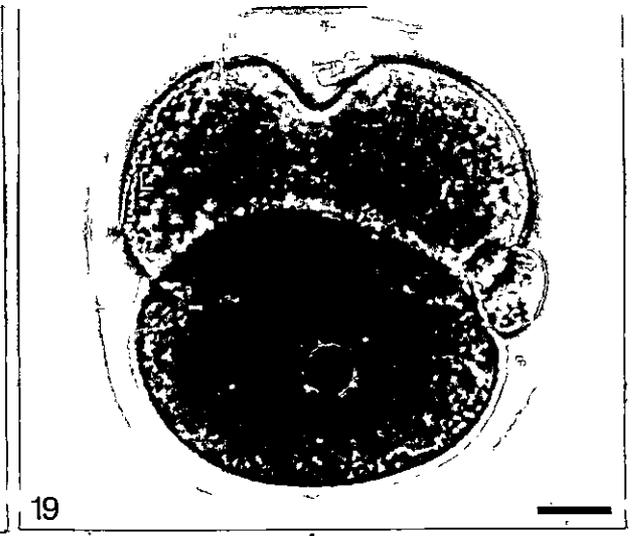
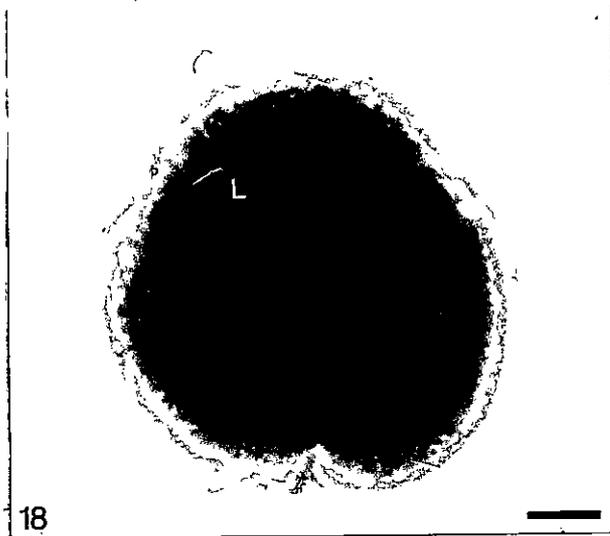


Figura 15 Embrión centrifugado 1 h a 90.000 g y fijado 15 min después. Núcleo alargado que contiene nucléolo (nu) en su extremo centrifugo. Barra representa: 1 μ m



Figuras 16-19

Embriones centrifugados 1 h a 70.000 g y fijados después de 10 min (16) 40 min (17) 2 h (18) y 4 h (19). En fig. 17 se observa reordenamiento del citoplasma y nucléolo, aunque se conserva porción del casquete de lípidos. En fig. 18 se observa segmentación de un blastómero que bisectará el casquete de lípidos (L). En fig. 19, el plano de segmentación es paralelo al casquete de lípidos (L). Barra representa: 5 μ m

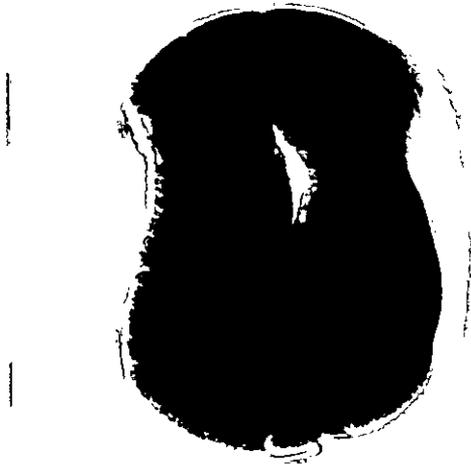


Figuras 20 y 21

Embriones tratados simultáneamente con citocalasina D y colcemid, centrifugados a 70.000 g por 1 h y fijados 20 min después. Microscopia de Nomarski. Obsérvese deformación de blastómeros y fragmentación de uno de ellos en fig. 21. Barra representa: 5 μ m

Figura 22 Embrión tratado con citocalasina D y colcemid, centrifugado a 90.000 g por 1 h. Microscopia de Nomarski. Obsérvese fragmentación de blastómeros. Barra representa: 5 μ m

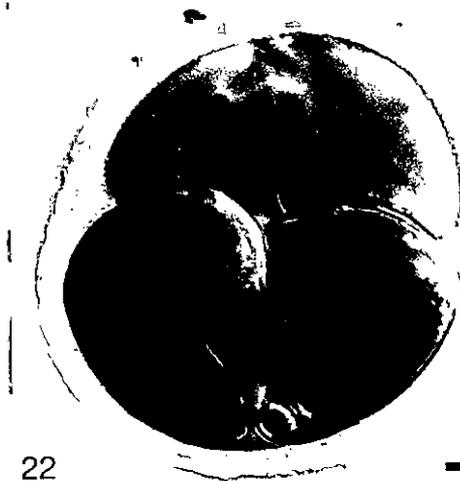
Figura 23 Embrión no tratado con inhibidores, centrifugado a 120.000 g por 1 h. Obsérvese iniciación de fragmentación. Barra representa: 5 μ m



20



21



22



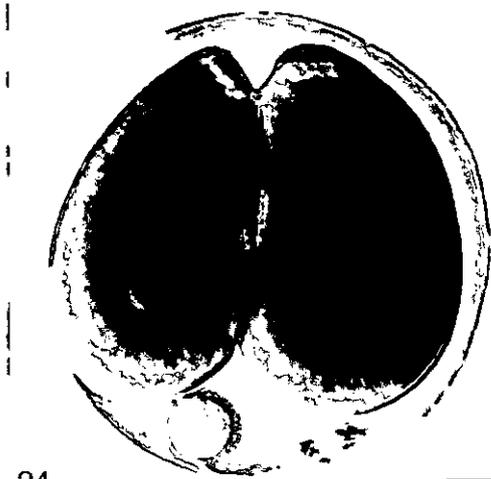
23

Figuras 24 y 25

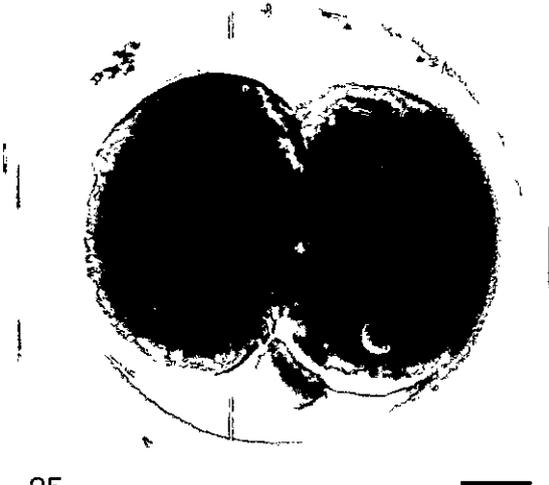
Embriones tratados simultáneamente con citocalasina D y colcemid y centrifugados 1 h a 70.000 g. Fijados 1 h después (fig. 24) y 2 h después (fig. 25) de la centrifugación. Microscopía de Nomarski. Obsérvese el cambio de forma de los blastómeros y la redistribución parcial de sus componentes. Barra representa: 5 μ m

Figuras 26 y 27

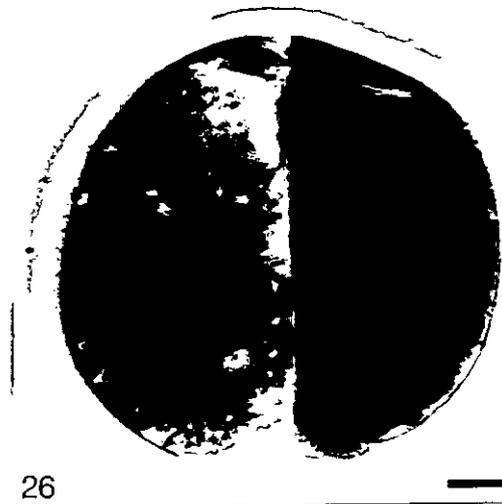
Embriones tratados simultáneamente con citocalasina D y colcemid y centrifugados 1 h a 90.000 g. Fijados 2 h después (fig. 26) y 4 h después (fig. 27) de la centrifugación. Microscopía de Nomarski. En fig. 26 todavía se observa estratificación y en fig. 27, el núcleo aún está alargado. Barra representa: 5 μ m



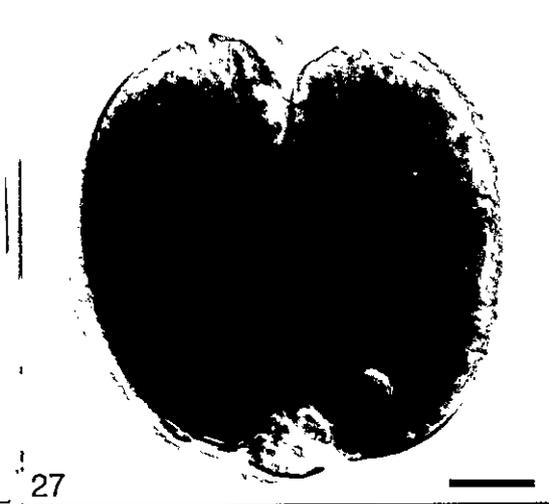
24



25



26



27

DISCUSION

1. Estratificación de componentes citoelasmáticos

1.1. Polaridad del huevo

La observación en el polo centripeto del casquete de lípidos, con óptica de Nomarski, tinciones especiales y microscopia electrónica, revela que el embrión de dos células se orienta en el campo de tal forma que el vector centrifugo pasa siempre por el plano que separa los blastómeros y la información disponible no permite afirmar que la orientación corresponda, aunque sea parcialmente, a un eventual eje intrínseco de polaridad del huevo o que sea solamente un efecto de la centrifugación, ya que el huevo podría ser orientado al iniciarse una estratificación paralela en cada blastómero. La segunda división de segmentación ocurre en un plano meridional vertical al primero y por esta razón sólo muy raras veces se observa un estado de cuatro células en que éstas presenten casquetes de lípidos muy desiguales.

1.2. Citología de los estratos

Es fácil distinguir un orden constante de estratificación cuando se centrifuga sobre 70.000 g pero es muy difícil la identificación de los organelos presentes en cada estrato porque la citología del embrión inicial de mamíferos presenta muchos vacíos a pesar de los trabajos citoquímicos con microscopia de luz publicados por Dalca (1953, 1965), Mulnard (1955, 1965), Izquierdo (1955, 1967),

Borghese (1957), Mintz (1964), Izquierdo & Roblero (1965), Cerisola & Izquierdo (1969), Izquierdo & Marticorena (1970, 1975), Izquierdo & Ortiz (1975), Ishiyama & Izquierdo (1977) y los trabajos con microscopio electrónico publicados por Sotelo & Porter (1959), Izquierdo & Vial (1962), Schlafke & Enders (1967), Calarco & Brown (1969), Hillman & Tasca (1969), Enders (1971), Szollosi (1971), Van Blerkom, Manes & Daniel (1973), Panigel, Kraemer, Kalter, Smith & Heberling (1975), Calarco & McLaren (1976), Ducibella (1977), Izquierdo (1977), Grant, Nilsson & Bergstrom (1977), Vorbrodt, Konwinski, Solter & Koprowski (1977), Mulnard & Huygens (1978), Izquierdo, López & Marticorena (1980), Izquierdo & Ebensperger (1982), Lois & Izquierdo (1984).

La dificultad radica en que los organelos y componentes figurados del citoplasma se han definido en tejidos diferenciados y no siempre presentan rasgos morfológicos o una ubicación tan evidente que sea posible reconocerlos en cualquier tipo celular y particularmente, en células embrionarias. El principal problema de clasificación, en los primeros estados de desarrollo de mamíferos, se refiere a la familia de cuerpos multivesiculares que son muy numerosos, se encuentran en todas las regiones de la célula y adoptan formas muy variadas. La centrifugación ha permitido distinguir aquí por densidad al menos dos clases de cuerpos multivesiculosos: una clase de cuerpos livianos que se disponen bajo el casquete de lípidos y comprende, entre otros, elementos que presentan actividad de fosfatasa ácida y otra clase de cuerpos más pesados que se encuentran

entremezclados con mitocondrias y complejos de Golgi. Gracias a la estratificación sería posible distinguir más precisamente éstas y otras clases de cuerpos vesiculares por sus propiedades citoquímicas. En general, combinando los métodos de estratificación y citoquímica se podría conocer mejor la citología de los embriones iniciales de mamíferos.

1.3. Cristaloides y material fibrilar

Con el microscopio electrónico se ha descrito en embriones preimplantacionales de diversas especies de mamíferos, cuerpos que miden generalmente menos de 1 μm , presentan estructura paracristalina, dan reacción positiva para proteína y frecuentemente para fosfatasa alcalina y se observan en mórulas avanzadas asociados al retículo endoplásmico rugoso (Hadek & Swift, 1960; Calarco & Brown, 1969; Moskalewski, Sawicki, Gabara & Koprowski, 1972; Van Blerkom, Manes & Daniel, 1973; Izquierdo, López & Marticorena, 1980). En huevos de dos células de ratón estos cuerpos cristaloides son muy escasos pero aumentan cuando se los cultiva en presencia de citocalasina B (Moskalewski, Sawicki, Gabara & Koprowski, 1972; Perry & Snow, 1975) y también durante el desarrollo normal hacia el blastocisto.

El material fibrilar, que es abundante desde el comienzo del desarrollo, se caracteriza por su estriación transversal (Weakley, 1968; Calarco & Brown, 1969; Van Blerkom & Runner, 1976). Se observa en el ratón pero no en otras especies como conejo u oveja, ni tampoco en los primates (Baker & Franchi, 1967; Van Blerkom, Manes & Daniel, 1973; Panigel,

Kraemer, Kalter, Smith & Heberling, 1975; Calarco & McLaren, 1976). Los estudios citoquímicos, que revelan un contenido en RNA y proteínas, así como la observación de extendidos con el microscopio electrónico, sugieren que el material fibrilar podría corresponder a polirribosomas almacenados para ser utilizados durante el clivaje (Weakley, 1967; Schlafke & Enders, 1967; Burkholder, Comings & Okada, 1971; Bachvarova & De Leon, 1977).

Basándose en la existencia de cuerpos cristaloides descompactados, que aparentemente se continúan en material fibrilar, y también en el análisis de la periodicidad se ha propuesto que se trata de dos formas de organización de una misma estructura (Doggenweiler, Campos, Monasterio & Sepúlveda, 1980). Los resultados del presente trabajo apoyan esa interpretación por cuanto revelan la concentración de material fibrilar en el polo centrifugo del huevo donde forma grandes estructuras semejantes a la de cuerpos cristaloides, aunque estos son poco frecuentes en este estado de desarrollo del ratón. Sería posible con este método un análisis citoquímico y ultraestructural acucioso del depósito de material que parece muy homogéneo.

1.4. Núcleo y nucléolo

La disposición del núcleo entre el centro de la célula y el polo centrifugo podría interpretarse como un ordenamiento de sus componentes, paralelo a la estratificación del citoplasma, de acuerdo con diferencias de densidad. Sin embargo, la alta densidad del material nucleolar y la forma

irregular del extremo centripeto, sugieren que el núcleo se alarga al ser traccionado por el nucléolo y estar anclado en el citoesqueleto. En muy diversos otros tipos celulares se ha podido apreciar que los microtúbulos se extienden desde el "còrtex" hasta la zona nuclear pero es muy probable que los microfilamentos (Tucker, 1981) y los filamentos intermedios, en especial vimentina (Lazarides, 1982) estén comprometidos en la mantención de la forma celular y la disposición espacial de los organelos.

Utilizando inmunofluorescencia, en embriones preimplantacionales de ratón se ha localizado tubulina en todo el citoplasma aunque más concentrada en torno del núcleo, actina y alfa-actinina especialmente concentradas en el citoplasma periférico (Lehtonen & Badley, 1980). No se ha reconocido filamentos intermedios (Jackson, Grund, Schmid, Bürki, Franke & Illmensee, 1980) excepto al parecer de queratina (Lehtonen, Lehto, Vartio, Badley & Virtanen, 1983). En consecuencia, es posible que el núcleo esté insertado en el andamiaje de microtúbulos, pero sería necesario un estudio más especializado del citoesqueleto de huevos centrifugados para considerar esta conjetura.

2. Reordenamiento espacial después de la centrifugación

2.1. Casquete de lípidos

Este es el único estrato que después de la centrifugación conserva su lugar y la paulatina desaparición podría atribuirse, no tanto a un reordenamiento en función de la densidad relativa, como a su utilización metabólica. Durante el desarrollo preimplantacional, los embriones de ratón pierden alrededor de 25 % de su peso y contenido proteico (Brinster, 1967) tal como podía presumirse de una etapa de activa multiplicación y diferenciación celular, pero no se sabe que contribución hacen los fosfolípidos al metabolismo energético. En el mismo periodo, la cantidad total de colesterol aumenta tres veces y aunque está demostrado que los embriones de ratón desde el estado de dos células sintetizan y modifican los esteroides de la membrana plasmática, no se conoce el pool interno de precursores (Pratt, Keith & Chakraborty, 1980; Pratt, 1982). Es posible que el casquete de lípidos contenga parte de dichos precursores. Conviene tener en cuenta, sin embargo, que la redistribución entre las células del material contenido en el casquete, durante el clivaje, impide estimar fácilmente su disminución de volumen.

2.2. El "còrtex"

Hemos observado que el "còrtex" no parece ser afectado por la centrifugación y que tanto el espesor como la densidad electrónica de éste son aproximadamente semejantes

en ambos polos. Estos resultados confirman las observaciones clásicas citadas en la Introducción y también otras algo más recientes y particularmente detalladas como las que fueron realizadas en el molusco *Lymnae* (Raven & Bretschneider, 1942; Raven, 1959; Clement, 1968). Sin embargo, la función morfogenética del "còrtex" es todavía poco definida y también lo es su relación estructural con la membrana plasmática por una parte y con el resto del citoesqueleto por otra (véase revisión en Jacobson, 1983). Pero se han descrito bien precisamente algunos cambios corticales que ocurren en el desarrollo inicial de diversas especies (revisión en Vacquier, 1981). Algunas de estas propiedades también han sido observadas recientemente en el huevo de mamíferos; entre ellas conviene destacar la localización de miosina y su modulación por los contactos celulares (Sobel, 1983a, 1983b) y la actividad cortical autónoma (Waksmundzka, Krysiak, Karasiewicz, Czolowska & Tarkowski, 1984). El conjunto de estas observaciones sugiere fuertemente la existencia de una organización integrada del citoesqueleto, un andamiaje fundamental que conservaría su organización espacial en las condiciones del presente trabajo.

2.3. Los organelos

El reordenamiento de los organelos después de terminada la centrifugación podría interpretarse como el resultado de una difusión pasiva, al azar, de acuerdo con su densidad, tamaño y el medio en que están inmersos o el resultado de una asociación selectiva por afinidad reversible de los

componentes citoplasmáticos. Otra interpretación de las observaciones es que esta redistribución sea un retorno activo de los organelos a su posición original. Si se trata de un retorno pasivo por difusión o por afinidad selectiva de los componentes citoplasmáticos, sería necesario explicar por qué no ocurre lo mismo con los lípidos que contiene el casquete. En el caso de un retorno activo, es necesario postular un sistema de comportamiento elástico al cual los organelos se encuentran ligados o asociados permitiendo así su pronta redistribución en el citoplasma. La diferencia observada para los lípidos podría deberse a que éstos no se encuentran rodeados de una membrana, por lo que no son comparables a los otros componentes citoplasmáticos, especialmente para el caso de un retorno activo, mediado por una estructura elástica, que podría corresponder al citoesqueleto de alguna forma anclado a la superficie del organelo.

La matriz citoplasmática efectivamente no es solamente viscosa si no que tiene también un comportamiento elástico, como fue determinado por medio del método de partículas magnéticas en fibroblastos de pollo (Crick & Hughes, 1950). En ese entonces, Crick descartó la posibilidad de un citoesqueleto, asumiendo que la elasticidad encontrada por él indicaba la existencia de una estructura establecida por relaciones temporales producidas por fuerzas coloidales entre los componentes citoplasmáticos. Actualmente la existencia de un citoesqueleto es evidente y aunque

establezca relaciones espaciales en la célula, no es necesario considerarlo como un sistema rígido y permanente. Por el contrario, el citoesqueleto tiene suficiente plasticidad, modulada por la presencia de proteínas regulatorias asociadas respondiendo a los cambios internos y externos a los que está sometida la célula, y sus propiedades corresponden bien a un sistema de relaciones temporales, como lo entendió Crick. Estas asociaciones temporales no necesariamente se pueden entender como aleatorias y efectivamente, se han descrito en muchas células, centros o puntos fijos a partir de los cuales se organiza el citoesqueleto, al menos para el caso de microtúbulos, en determinados momentos del ciclo celular (Brooks & Richmond, 1983).

No podemos por consiguiente excluir ninguna de las alternativas propuestas para explicar la redistribución de los componentes citoplasmáticos, ni estas son excluyentes entre si. Cualquiera sea el mecanismo o los mecanismos comprometidos en el reordenamiento después de la centrifugación, sería necesario que dieran cuenta de situaciones tan opuestas como la del casquete de lípidos que permanece desplazado y la del núcleo que no se desplaza.

2.4. Efecto de citocalasina D y colcemid

Aunque esta serie experimental sea muy preliminar y sólo se haya utilizado microscopía de luz sugiere que embriones tratados con citocalasina D y colcemid experimentan la misma estratificación observada en embriones no tratados con menores fuerzas centrifugas y que el reordenamiento requiere

más tiempo. Sin embargo, no es posible adelantar conclusiones por diversas razones. Primero, no se ha ensayado más que Colcemid y Citochalasina D. Segundo, se ha empleado concentraciones de ambas drogas que son aproximadamente semejantes a las utilizadas por otros autores (Siracusa, Whittingham & De Felici, 1980; Pratt, Chakraborty & Surani, 1981; Kimber & Surani, 1981; Izquierdo, López & Panuncio, 1984) pero no se ha estudiado la relación dosis-efecto. Tercero, con estas dosis es posible impedir la segmentación pero no desaparecen los microfilamentos de las microvellosidades (Pratt, Ziomek, Reeve & Johnson, 1982; Izquierdo, López & Panuncio, 1984) y aunque no se observe microtúbulos, dosis semejantes de Colcemid no son suficientes para suprimirlos en las células 3T3 (Brooks & Richmond, 1983). En consecuencia nuestros experimentos sugieren una participación del citoesqueleto en el reordenamiento del citoplasma. Además se puede afirmar que el uso de inhibidores de distintos componentes del citoesqueleto y la descripción morfológica de éste en embriones centrifugados son aproximaciones realistas al análisis de la estratificación y reordenamiento de los componentes celulares.

3. Desarrollo de embriones centrifugados

El desarrollo hasta el estado de blastocisto parecería indicar que la estratificación de componentes celulares es

regulable o no altera el plan morfogénético. Aunque los embriones centrifugados que alcanzan el estado de blastocisto son menos que los controles igualmente cultivados in vitro, no se observa proporción entre la magnitud de la fuerza centrífuga y el porcentaje de blastulación. Por lo tanto es razonable atribuir el menor desarrollo de los embriones centrifugados a la manipulación más prolongada y al ambiente gaseoso no controlado durante la centrifugación que podría producir una discreta alcalinización del medio de cultivo.

Por otra parte, el rápido reordenamiento de los componentes celulares sugiere la existencia de una estructura fundamental que no es mayormente modificada por la centrifugación; sin embargo, se ha observado que en los embriones centrifugados la blastulación está algo retardada. Es posible, incluso, que en esta etapa del desarrollo no exista todavía un plan morfogénético y que este sólo aparezca más tarde como una diferencia entre las células internas y periféricas de la mórula (véase introducción). Si este fuera el caso, el reordenamiento de los componentes celulares no tendría relación directa con el fenómeno de regulación.

Finalmente, el desarrollo de blastocistos a partir de embriones centrifugados no representa necesariamente una regulación completa o normalización del desarrollo. No se ha demostrado en forma indiscutible la localización de determinantes citoplasmáticos más que de la línea germinal, como el citoplasma polar de insectos (Mahowald et. al,

1979), pero en varias otras especies se ha descrito determinantes análogos, incluso en mamíferos (véase Eddy, 1975). Si la centrifugación hubiese traslocado irreversiblemente determinantes citoplasmáticos que se expresan en estados más avanzados que el blastocisto, hubiera sido necesario para reconocer su efecto haber inyectado los embriones en una hembra pseudoprenada y haber esperado el desarrollo de la cría hasta la pubertad antes de tener una razonable certeza de que la regulación fue completa.

Los resultados expuestos no responden, por lo tanto, en forma irredargüible a la hipótesis que dió origen a este trabajo.

Aunque se ha revelado una organización espacial que mantiene el orden de los componentes celulares, no es posible demostrar que esta organización sea responsable de la regulación y solo puede afirmarse que los embriones centrifugados regulan, en cuanto se defina regulación como desarrollo hasta el estado de blastocisto.

REFERENCIAS

- ANDERSON, E. (1970) A cytological study of the centrifuged whole half, and quarter eggs of the sea urchin *Arbacea punctulata*. *J. Cell Biol.* 47: 711-733.
- BACHVAROVA, R. DE LEON, V. (1977). Stored and polysomal ribosomes of mouse ova. *Dev. Biol.* 58: 248-254.
- BAKER, T. G. & FRANCHI, L.L. (1967). The fine structure of oogonia and oocytes in human ovaries. *J. Cell Sci.* 2: 213-224.
- BECKWITH, C.I. (1914). The genesis of the plasma-structure in the egg of *Hydractinia echinata*. *J. Morph.* 25 (citado en Kühn).
- BIGGERS, J.D.; WHITTEN, W.K. & WHITTINGHAM, D.G. (1971). The culture of mouse embryos in vitro. En: "Methods in Mammalian Embryology" (J.C. Daniel, ed.) pp. 86-116. Freeman, San Francisco.
- BORGHESE, E. (1957). Recent histochemical results of studies on embryos of some birds and mammals. *Inter. Rev. Cytol.* 6: 289.
- BOVERI, T. (1899). Die Entwicklung von *Ascaris megalocephala* mit besonderer Rücksicht auf die Kernverhältnisse. F.C. Kämpfer, Jena (citado por Davidson).
- BRINSTER, R.L. (1967). Protein content of the mouse embryo during the first five days of development. *J. Reprod. Fert.* 13: 413-420.

- BROOKS, R.F. & RICHMOND, F.N. (1983). Microtubule-organizing centres during the cell cycle of 3T3 cells. *J. Cell Sci.* 61: 231-245.
- BURKHOLDER, G.D.; COMINGS, D.E. & OKADA, T.A. (1971). A storage form of ribosomes in mouse oocytes. *Exp. Cell Res.* 69: 361-371.
- CALARCO, P.G. & BROWN, E.H. (1969). An structural and cytological study of preimplantation development of the mouse. *J. Exp. Zool.* 171: 253-283.
- CALARCO, P.G. & McLAREN, A. (1976). Ultrastructural observations of preimplantation stages of the sheep. *J. Embryol. exp. Morph.* 36: 609-622.
- CASSELMAN, W.G.B. (1959). *Histochemical technique.* Methuen Co. London.
- CERISOLA, H. & IZQUIERDO, L. (1969). Distribución de RNA y embriogénesis en el ratón. *Arch. Biol. Med. Exp.* 6: 10-16.
- CLEMENT, A.C. (1968). Development of the vegetal half of the *Ilyanassa* egg after removal of most of the yolk by centrifugal force, compared with the development of animal halves of similar visible composition. *Dev. Biol.* 17: 165.
- CONKLIN, E.G. (1910). The effects of centrifuged force upon the organization and development of the eggs of fresh water pulmonates. *J. Exp. Zool.* 9: 417-454. (citado por Watterson)
- CONKLIN, E.G. (1931). The development of centrifuged eggs of ascidians. *J. Exp. Zool.* 60: 1-119. (citado por

- Watterson).
- CRICK, F.H. & HUGHES, A.F.W. (1950) The physical properties of cytoplasm. A study by means of the magnetic particle method. Part I. Exp. Cell Res. 37: 37-80.
- DALCQ, A.M. (1953). Modifications nucleaires et chimiodifferentiation dans la segmentation et le debut de la morphogenese chez les petits mammiferes. Ann. Soc. Roy. Zool. Belg. 84: 283-292.
- DALCQ, A.M. (1957). Introduction to general embryology. Oxford Univ. Press. London. pp. 103-128.
- DALCQ, A.M. (1965). Cytochimie des premiers stades du développement chez quelques Mammiferes. Ann. Biol. 4: 129-155.
- DALCQ, A.M. & VAN EGMOND, M. (1953). Effets de la centrifugation sur l'oocyte de trois Mammifères (Rat, Hamster, Taupe). Arch. Biol. (Liège) 64: 311.
- DAVIDSON, E.H. (1976). Gene activity in early development. Academic Press, New York.
- DOGGENWEILER, C.; CAMPOS, F.; MONASTERIO, V. & SEPULVEDA, M.S. (1980). Distribución de cuerpos cristaloides en embriones de ratón. Arch. Biol. Med. Exp. 13: R-62.
- DUCIBELLA, T. (1977). Surface of the developing trophoblast cell. En: "Development in mammals" (M. H. Johnson, ed.) 1: 5-30. North Holland, Amsterdam.
- EDDY, E.M. (1975). Germ plasm and the differentiation of the germ line. Inter. Rev. Cytol. 43.

- ENDERS, A.C. (1971). The fine structure of the blastocyst.
En: The biology of the blastocyst. pp. 71-94.
University of Chicago Press, Chicago.
- GRANT, P.; NILSSON, B.O. & BERGSTROM, S. (1971). The
ultrastructure of preimplantation hamster blastocyst
developed in vivo and in vitro. Fert. Steril. 28: 866-870
- GROSS, P.R.; PHILPOTT, D.E. & NASS, S. (1965) Electron
microscopy of the centrifuged sea urchin egg with a note
on the structure of the ground cytoplasm. J. Bioph.
Biochem. Cytol. 7: 135-153.
- GUERRIER, P. (1967). Les facteurs de polarisation dans
les premiers stades du développement chez *Parascaris*
equorum. J. Embryol. exp. Morph. 18: 121.
- HADDEK, R. & SWIFT, H. (1960). A crystalloid inclusion in
the rabbit blastocyst. J. Biophys. Biochem. Cytol. 8:
836-841.
- HARVEY, E.B. (1932). The development of half and quarter
eggs of *Arbacia punctata* and of strongly centrifuged
whole eggs. Biol. Bull. 62. (citado por Kühn).
- HARVEY, E.B. (1956) The American Arbacea and other sea
urchins. Princeton University Press, Princeton, New
Jersey.
- HARVEY, E.N. (1931) Structure of cells as revealed by
centrifuged force. Arch. Exp. Zellforsch. Besonders
Gewebezencht 22: 463-476.
- HILLMAN, N. & TASCIA, R.J. (1969). Ultrastructural and
autoradiographic studies of mouse cleavage stages. Am.
J. Anat. 126: 151-174.

- ISHIYAMA, V. & IZQUIERDO, L. (1977). The onset of phosphatase activity in early mammalian embryos. *J. Embryol. exp. Morph.* 42: 305-308.
- IZQUIERDO, L. (1955). Fixation des oeufs de rat colorés vitalement par le bleu de toluidine. Technique et observations cytologiques. *Arch. Biol.* 66: 403-438.
- IZQUIERDO, L. (1967). Cytochemical observations on tubal ova. Proceedings of the eighth International Conference of the "International planned parenthood federation". Santiago, Chile 9-15 April.
- IZQUIERDO, L. (1977). Cleavage and differentiation. In: Development in mammals (M.H. Johnson, ed.) vol. 2, pp. 99-118. North Holland Publ., Amsterdam.
- IZQUIERDO, L. & EBENSPERGER, C. (1982). Cell membrane regionalization in early mouse embryos as demonstrated by 5'-nucleotidase activity. *J. Embryol. exp. Morph.* 69: 115-126.
- IZQUIERDO, L. & MARTICORENA, P. (1970). Basic proteins of mouse ova and blastocysts. *Experientia* 26: 646-647.
- IZQUIERDO, L. & MARTICORENA, P. (1975). Alkaline phosphatase in preimplantation mouse embryos. *Expl. Cell Res.* 92: 399-402.
- IZQUIERDO, L. & ORTIZ, M.E. (1975). Differentiation in the mouse morulae. *W. Roux's Archiv.* 177: 67-74.
- IZQUIERDO, L. & ROBLERO, L. (1965). The incorporation of labelled nucleosides by mouse morulae. *Experientia* 21: 532.

- IZQUIERDO, L. & VIAL, J. (1962). Electron microscope observations on the early development of the rat. *Z. Zellforsch.* 56: 157.
- IZQUIERDO, L., LOPEZ, T. & MARTICORENA, P. (1980) Cell membrane regions in preimplantation mouse embryos. *J. Embryol. exp. Morph.* 59: 89-102.
- IZQUIERDO, L., LOPEZ, T. & PANUNCIO, A. (1984). Plasma membrane regionalization and compaction of mouse cleaving embryos: effect of microtubule and microfilament inhibitors. *Arch. Biol. Med. Exp.* 17: 29-39.
- JACKSON, B.W.; GRUND, C.; SCHMID, E.; BURKI, K.; FRANKE, W.W.; ILLMENSEE, K. (1980). Formation of cytoskeletal elements during mouse embryogenesis. Intermediate filaments of the cytokeratin types and desmosomes in preimplantation embryos. *Differentiation* 17: 161-179.
- JACOBSON, B. (1983) Interaction of the plasma membrane with the cytoskeleton: An overview. *Tissue & Cell* 15: 829-852.
- JOHNSON, M.H. (1981). Membrane events associated with the generation of the blastocyst. *Int. Rev. Cytol. Suppl.* 12: 1-37.
- KAUDEWITZ, F. (1950). Zur Entwicklungsphysiologie von *Daphnia pulex*. *Roux's Arch. Entwickl. mech. organ.* 144. (citado por Kühn).
- KIMBER, S.J. & SURANI, M.A.H. (1981). Morphogenetic analysis of changing cell associations following release of 2-cell and 4-cell mouse embryos from cleavage arrest. *J. Embryol. exp. Morph.* 61: 331-345.

- KÄHN, A. (1971). Lectures on developmental physiology. 2a edición. Springer Verlag. New York.
- LAZARIDES, E. (1982) Intermediated filaments: A chemically heterogenous developmentally regulated class of proteins. Ann. Rev. Biochem. 51: 219-250.
- LEHMANN, F.E. (1945). Einführung in die physiologische embryologie, Basel. (citado por Raven).
- LEHTONEN, E. & BADLEY, R.A. (1980). Localization of cytoskeletal proteins in preimplantation mouse embryos. J. Embryol. exp. Morph. 55: 211-225
- LEHTONEN, E., LEHTO, V.P., BADLEY, R.A. & VIRTANEN, I. (1983). Expression of cytokeratin polypeptides in mouse oocytes and preimplantation embryos. Dev. Biol. 100: 158-165.
- LILLIE, F.R. (1902). Differentiation without cleavage in the egg of the annelid Chaetopterus pergamentaceus. Roux Arch Entw mech 14: 477-499. (citado por Watterson).
- LOIS, P. & IZQUIERDO, L. (1984). Cell membrane regionalization and cytoplasm polarization in the rat early embryo. Roux's Arch. Dev. Biol. 193: 205-210.
- LYON, E.P. (1907) Results of centrifugalizing eggs. Arch. Entwicklungsmech. Organismen 23: 151-173.
- MAHOWALD, A.P.; ALLIS, C.D.; KARRER, M.K.; UNDERWOOD, E.M. & WARING, G.L. (1979). Germ plasm and pole cells of Drosophila. En: "Determinants of spatial organization". (Subtelny, S. & Konisberg, I.R., eds.). Academic Press, New York. pp. 127-146.

- MINTZ, B. (1964). Synthetic process and early development in the mammalian egg. *J. Exp. Zool.* 157: 85-100.
- MORGAN, T.H. (1927). *Experimental Embryology*. Columbia Univ. Press, New York.
- MOSKALEWSKI, S.; SAWICKI, W.; GABARA, B. & KOPROWSKI, H. (1972). Crystalloid formation in unfertilized mouse ova under influence of cytochalasin B. *J. Exp. Zool.* 180: 1-12.
- MULNARD, J. (1955). Contribution a' la connaissance des enzymes dans l'ontogénèse. Les phosphomonoestérases acide et alcaline dans le développement du rat et de la souris. *Arch. Biol. (Liege)* 66: 525-685.
- MULNARD, J. (1959). La metachromasie in vivo et son analyse cytochimique dans l'oeuf de l'annelide *Chaetopterus pergamentaceus*. Extrait des *Arch. de Biol.* Tomo LXIX, pp. 645-685.
- MULNARD, J. (1965). Aspects cytochimiques de la regulation in vitro de l'oeuf de souris apres destruction d'un des blastomeres du stade II. 1. La phosphomonodiesterase acide. *Bull. Acad. r. Méd. Belg.* 2e sér. 5: 35.
- MULNARD, J. (1970). Manipulation of cleaving mammalian embryos with special reference to a time-lapse cinematographic analysis of centrifuged and fused mouse eggs. *Adv. Biosci.* 6: 255-274.
- MULNARD, J.; AUCLAIR, W. & MARSLAND, D. (1959). Metachromasia observed in the living eggs of *Larbacia punctulata* and its cytochemical analysis. *J. Embryol. exp. Morph.* 7: 223-240.

- MULNARD, J. & HUYGENS, R. (1978). Ultrastructural localization of non-specific alkaline phosphatase during cleavage and blastocyst formation in the mouse. *J. Embryol. exp. Morph.* 44: 121-131.
- PANIGEL, M.; KRAEMER, D.C.; KALTER, S.S; SMITH, F.C. & HEBERLING, R.L. (1975). Ultrastructure of cleavage stage and preimplantation embryos of the baboon. *Anat. Embryol.* 147: 45-62.
- PEARSE, A.G.E. (1968). *Histochemistry. Volume I.* Churchill Ltda. London.
- PERRY, M.M & SNOW, M.H.L. (1975). The blebbing response of 2-4 cell stage mouse embryos to cytochalasin B. *Dev. Biol.* 45: 372-377.
- PRATT, H.P.M. (1982). Preimplantation mouse embryos synthesize membrane sterols. *Dev. Biol.* 89: 101-110.
- PRATT, H.P.M.; CHAKRABORTY, J. & SURANI, M.A.H. (1981). Molecular and morphological differentiation of the mouse blastocyst after manipulation of compaction using cytochalasin D. *Cell* 26: 279-292.
- PRATT, H.P.M.; KEITH, J. & CHAKRABORTY, J. (1980). Membrane sterols and the development of the preimplantation mouse embryo. *J. Embryol. exp. Morph.* 60: 303-319.
- PRATT, H.P.M.; ZIOMEK, C.A.; REEVE, W.J.D. & JOHNSON, M.H. (1982). Compaction of the mouse embryo: an analysis of its components. *J. Embryol. exp. Morph.* 70: 113-132.
- RAVEN, C.D. (1959). *An outline of developmental physiology.* Pergamon Press, London.

- RAVEN, C.D. & BRETSCHNEIDER, R. (1942). (citado por Raven).
- SCHLAFKE, S. & ENDERS, A.C. (1967). Cytological changes during cleavage and blastocyst formation in the rat. *J. Anat.* 102: 13-32.
- SIRACUSA, G.; WHITTINGHAM, D.G. & DE FELICI, M. (1980). The effect of microtubule and microfilament-disrupting drugs on preimplantation mouse embryo. *J. Embryol. exp. Morph.* 60: 71-82.
- SOBEL, J.S. (1983a). Localization of myosin in the preimplantation mouse embryo. *Dev. Biol.* 95: 227-231.
- SOBEL, J.S. (1983b). Cell-cell contact modulation of myosin organization in the early mouse embryo. *Dev. Biol.* 100: 207-213.
- SOTELO, J.R. & PORTER, K.R. (1959). An electron microscopic study of the rat ovum. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 5: 327-341.
- SZOLLOSI, D. (1971). Nucleoli and ribonucleoprotein particles in the preimplantation conceptus of the rat and mouse. En: "The biology of the blastocyst" (R.J. Blandau, ed.). University of Chicago Press, Chicago & London.
- TANABE, & KOTANI, . (1974). Relationship between the amount of the "germinal plasm" and the number of primordial germ cells in *Xenopus laevis*. *J. Embryol. exp. Morph.* 31: 89.
- TARKOWSKI, A.K. (1959). Experiments of the development of isolated blastomeres of mouse eggs. *Nature* 184: 1286-

1287.

- TARKOWSKI, A.K. & WROBLEWSKA, J. (1967). Development of blastomeres of mouse eggs isolated at the 4- and 8-cell stage. *J. Embryol. exp. Morph.* 18: 155-180.
- TUCKER, J.B. (1981). Cytoskeletal coordination and intercellular signalling during metazoan embryogenesis. *J. Embryol. exp. Morph.* 65: 1-25.
- VACQUIER, V.D. (1981). Dynamic changes of the egg cortex. *Dev. Biol.* 84: 1-26.
- VAN BLERKOM, J.; MANES, C. & DANIEL, J.C. (1973). Development of preimplantation rabbit embryos in vivo and in vitro. I. An structural comparison. *Dev. Biol.* 35: 262-282.
- VAN BLERKOM, J. & RUNNER, M.N. (1976). The fine structural development of preimplantation mouse parthenotes. *J. Exp. Zool.* 196: 113-123.
- VERDONK, N.H. (1968). The effect of removing the polar lobe in centrifuged eggs of *Dentalium*. *J. Embryol. exp. Morph.* 19: 33. (citado por Davidson).
- VORBRODT, KONWINSKI, SOLTER & KOPROWSKI (1977). Ultrastructural cytochemistry of membrane-bound phosphatases in preimplantation mouse embryos. *Dev. Biol.* 55: 117-134.
- WAKSMUNDZKA, M.; KRYSIAK, E.; KARASIEWICZ, J.; CZOLOWSKA, R. & TARKOWSKI, A.K. (1984). Autonomous cortical activity in mouse eggs controlled by a cytoplasmic clock. *J. Embryol. exp. Morph.* 79: 77-96.

- WATTERSON, R.L. (1955). Selected invertebrates. En:
"Analysis of development". (Willier, Weiss &
Hamburger, eds.). Saunders, London. pp. 315-336.
- WEAKLEY, B.S. (1967). Investigations into the structure
and fixation properties of cytoplasmic lamellae in the
hamster oocyte. Z. Zellforsch. mikrosk. Anat. 81: 91-99.
- WEAKLEY, B.S. (1968). Comparison of cytoplasmic lamellae
and membranous elements in the oocytes of five mammalian
species. Z. Zellforsch. mikrosk. Anat. 85: 109-123.
- YAJIMA, (1960). Studies on embryonic determination of
the harlequin-fly, *Chironomus dorsalis*. I. Effects of
centrifugation and its combination with constriction and
puncturing. J. Embryol. exp. Morph. 8: 198.
- ZALOKAR, M. (1969) Intracellular centrifugal separation of
organelles in *Phycomices*. J. Cell Biol. 41: 494-509.