

Departamento de Biología
Facultad de Ciencias
Universidad de Chile

REGULACION EMBRIONICA RECONOCIDA POR MICROSCOPIA DE BARRIDO
EN EMBRIONES DESAGREGADOS Y AGREGADOS

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

M. SOLEDAD SEPULVEDA JIMENEZ

Directores de tesis: Dr. Carlos Doggenweiler
Dr. Luis Izquierdo

ABRIL, 1985

Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.

INFORME DE APROBACION
TESIS DE MAGISTER

Se informa a la Comisión de Posgrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Magister presentada por la candidata

M. SOLEDAD SEPULVEDA JIMENEZ

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

Directores de Tesis:

Carlos Doggenweiler

Luis Izquierdo

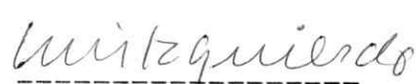
Comisión informante de Tesis:

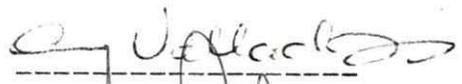
Luis Valladares

Jorge Garrido

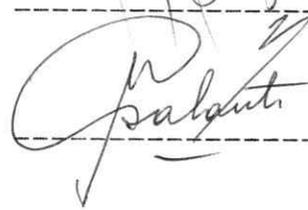
Norbel Galanti











A mis padres

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Carlos Doggenweiler por su estímulo y apoyo durante mi permanencia en el laboratorio.

Al Dr. Luis Izquierdo por su constante y valiosa, orientación ayuda y dedicación, durante este trabajo de tesis.

A Margarita Cortés y Luis Omate, por hacerme partícipes de todos sus "secretos técnicos".

A Victor Monasterio por su ayuda desinteresada y su experiencia brindada en la parte experimental.

A Lilio Yanez por el buen trabajo fotográfico realizado.

A todos mis amigos del laboratorio: Sole, Tere, M. Inés, Vero, Lyn, Ani, Pablo y Juan Muro, por su afecto, amistad y estímulo.

A mi amiga Cecilia Matte por su apoyo y tolerancia durante todos mis años de estudio en la Facultad.

A la infinita paciencia y comprensión de Ariel.

INDICE

	Pàg.
Agradecimientos.....	ii
Indice.....	iii
Resumen.....	1
Summary.....	2
Introducción.....	3
Material y Métodos.....	7
Resultados.....	12
- Microvellosidades en la superficie de blastómeros desagregados de embriones de 2 a 16 células.....	12
- Microvellosidades en el sitio de contacto de embriones agregados.....	13
- Microvellosidades en el sitio de contacto de embriones vivos agregados con embriones fijados.....	15
- Tabla 1.....	17
- Tabla 2.....	18
- Figuras.....	19
Discusión.....	24
- Blastómeros desagregados.....	25
- Agregación de embriones tempranos.....	27
- Adhesión y compactación.....	28
- Agregación de mórulas avanzadas.....	30
Referencias.....	32

RESUMEN

Blastómeros aislados de embriones de 8 y 16 células muestran una superficie lisa en el contacto con otros blastómeros y una superficie libre microvellosa. Las microvellosidades reaparecen completamente sobre la superficie libre del 52 % de los 1/8 de embrión y parcialmente sobre el 88 % de los 1/16 de embrión si son cultivados in vitro por 6 h. Cuando embriones de 2 a 8 células son agregados a embriones de 8 células y separados después de 1-3 h, la superficie de contacto de los embriones de 8 células se vuelve lisa. Embriones fijados de 8 células son también capaces de inducir la desaparición de microvellosidades sobre la superficie de contacto de embriones de 8 células. Agregados de mórulas avanzadas no muestran desaparición completa de microvellosidades en sus superficies de contacto si no más bien un aflojamiento de sus blastómeros periféricos.

Nuestros resultados muestran que 1/8 y 1/16 tienden a recuperarse de la regionalización, que el proceso de agregación de embriones con 8 células o menos es similar a la compactación y que embriones con más de 8 células parecen agregarse por reordenamiento celular. Mostramos que la regionalización de blastómeros, que depende del contacto célula-célula puede ser la base espacial de la regulación embriónica y de la diferenciación normal adentro-afuera de embriones tempranos de ratón.

SUMMARY

Blastomeres isolated from 8- and 16-cell embryos show a smooth surface at their contact with other blastomeres and a microvillous free surface. Microvilli reappear completely on the smooth surface of 52 % of 1/8 embryos and partially on 88% of 1/16 embryos if cultured in vitro for 6 h. When 2- to 8-cell embryos are aggregated to 8-cell embryos and forced apart after 1-3 h, the contact surface of the 8-cell embryos has become smooth. Fixed 8-cell embryos are also able to induce complete disappearance of microvilli on the contact surface of a living 8-cell embryo. Embryos having more than 8 cells do not induce complete disappearance of microvilli on the contact surface of 8-cell embryos. Aggregates of late morulae do not show complete disappearance of microvilli at their contact surfaces but rather a loosening of their peripheral blastomeres.

Our results show that isolated 1/8 and 1/16 embryos tend to recover from regionalization, that the process of aggregation of embryos having 8 cells or less is similar to compaction and that embryos having more than 8 cells seem to aggregate by cell sorting. We submit that blastomere regionalization, which depends on cell-cell contact, may be the spatial basis of embryonic regulation and of the inside-outside normal differentiation of early mouse embryos.

INTRODUCCION

La propiedad que algunos organismos tienen de desarrollar formas completas a pesar de la perturbación experimental de sus estados embrionarios, conocida como regulación embriónica, es notable en los mamíferos.

Blastómeros aislados de embriones de ratón de 4 y 8 células tienen el potencial de desarrollar pequeños blastocistos completos aunque 1/8 de embriones forman, más frecuentemente, vesículas trofoblásticas. Esto último, sin embargo, no implica una restricción de potencialidad puesto que las células, siendo pocas, podrían estar todas situadas en la periferia de la mórula cuando ocurre la blastulación y así diferenciarse en trofoectodermo, como lo predice el modelo adentro-afuera (Tarkowski & Wróblewska, 1967; Hillman, Sherman & Graham, 1972). De estas observaciones se ha inferido que la posición interna o externa de los blastómeros en la mórula determina su diferenciación en masa celular interna y trofoblasto del blastocisto, respectivamente. La totipotencialidad de 1/8 de embrión también ha sido revelada por su agregación a embriones completos del mismo estado, donde se desarrollan diferenciándose en diversos tejidos; estas observaciones son consistentes con aquellas de mórulas tempranas agregadas, que se desarrollan sin entremezclamiento de células (Garner & McLaren, 1974; Kelly, 1977).

Los resultados descritos, por supuesto, no excluyen el

desarrollo gradual de un patrón espacial en embriones no modificados. Realmente, en el estado de 4 células, el primer blastómero que se divide estará localizado preferencialmente en la masa celular interna del blastocisto (Kelly, Mulnard & Graham, 1978) y en el mismo estado, partes centrales y periféricas de los blastómeros ya son diferentes como puede reconocerse por la actividad enzimática regionalizada de sus membranas plasmáticas (Izquierdo, López & Marticorena, 1980; Izquierdo & Ebensperger, 1982).

En el estado de 8 células los embriones se compactan (Ducibella & Anderson, 1975). Hasta entonces los blastómeros eran aproximadamente esféricos, solo presentaban contactos puntuales entre si y el acoplamiento iónico entre las células se debía a los puentes citoplasmáticos remanentes de la división celular (Lo & Gilula, 1979). Durante la compactación los blastómeros adyacentes se aplastan unos contra otros, extendiéndose así las áreas de contacto y reduciéndose considerablemente los espacios intercelulares; las uniones celulares especializadas comienzan a establecerse (Ducibella, 1977; Lo & Gilula, 1979; McLachlin, Caveney & Kidder, 1983) y las microvellosidades desaparecen de las membranas plasmáticas en aposición. Esta última característica servirá en este trabajo como una definición operacional de compactación.

Los mecanismos involucrados en la compactación no son conocidos y las investigaciones hasta ahora muestran que el proceso ocurre tanto in vivo como in vitro, que es reversiblemente inhibido por ausencia de calcio o por

tratamiento con citocalasina B (Ducibella & Anderson, 1975) y que no es inhibido por la depolimerización previa de los microtúbulos (Ducibella, 1982). Además anticuerpos preparados contra tumores embrionarios inhiben la compactación en su forma Fab (Kemler et al., 1977) o en su forma completa (Ducibella, 1980).

En el estado de 16 células pueden ser identificadas 2 poblaciones celulares distintas: una consiste de pequeñas células internas con microvellosidades escasas y uniformemente distribuidas; la otra consiste de células grandes externas con microvellosidades concentradas en su polo apical (Johnson & Ziomek, 1982). Estos distintos linajes, sin embargo, están aún indeterminados y se puede observar experimentalmente que células internas pueden diferenciarse en trofoblasto mientras que células externas pueden contribuir a masa celular interna (Rossant & Lis, 1979; Rossant & Vihj, 1980).

Aunque se pierda la capacidad de regulación embriónica de los blastómeros aislados de mórulas compactadas de 16 células, no se pierde la capacidad de regular de las propias mórulas, las cuales fusionadas constituyen blastocistos gigantes que se desarrollan como quimeras (Mintz, 1965). Puesto que por agregación de mórulas se producen quimeras viables hasta unas pocas horas antes de la blastulación (Burgoyne & Ducibella, 1977) es posible que en estas condiciones células externas en el sitio de contacto lleguen a ser masa celular interna. Alternativamente es posible que

las células externas se extiendan sobre la superficie mientras las células internas de ambos embriones se juntan. Aunque ambos casos revelarían regulación embrionaria, el reordenamiento no implica totipotencia de las células, es decir regulación de blastómeros individuales.

En la búsqueda del mecanismo que provoca la regulación embrionaria en blastómeros desagregados o embriones agregados, antes, durante y después de la compactación, una aproximación razonable es estudiar las modificaciones de la superficie celular. Aquí nos proponemos estudiar con el microscopio electrónico de barrido la superficie de los blastómeros para observar que modificaciones ocurren en las zonas de contacto cuando se desagregan blastómeros antes, durante y después de la compactación y las modificaciones que ocurren en zonas de contacto artificial cuando se agregan embriones del mismo o de distintos estados.

Si la desagregación de blastómeros causara una modificación de la superficie distinta de la causada por la agregación, o si, las modificaciones fueran semejantes pero su cinética fuera diferente, sería posible comparar los mecanismos que gatillan la regulación embrionaria por pérdida y por adquisición de contactos.

Los resultados, especialmente los que se refieren a modificaciones de la superficie por contactos, contribuirán no solo a comprender mejor la regulación embrionaria si no, también la compactación durante el desarrollo normal.

MATERIAL Y METODOS

1. Obtención de embriones

Se utilizaron 867 embriones preimplantacionales obtenidos por ovulación espontánea de ratones hembra de la cepa Suizo-Rockefeller y 1764 embriones obtenidos por superovulación de hembras de ratón de la cepa CF 1. Resultados con ambos métodos y cepas fueron idénticos y no se presentan separadamente.

Para la superovulación, las hembras fueron inyectadas con 5 unidades internacionales (UI) de suero de yegua preñada (PMS) (Sigma) y, 44 horas más tarde, con 4 UI de gonadotropina coriónica humana (HCG) (Sigma).

La cópula se reconoció por la presencia del tapón vaginal, y la edad de los embriones se estimó tomando como momento de iniciación del desarrollo las 0 horas del día en que se reconoció el tapón. Las hembras fecundadas se sacrificaron por dislocación cervical y se extrajeron los oviductos. Los embriones se obtuvieron por perfusión con el medio descrito por Biggers (Biggers, Whitten & Whittingham, 1971) conteniendo 4 mg/ml de albúmina de suero de bovino (BSA) (Calbiochem).

1.1 Composición del medio de Biggers (Biggers et al., 1971)

NaCl 94.59 mM, KCl 4.78 mM, KH₂PO₄ 1.19 mM, MgSO₄ 7H₂O 1.19 mM, NaHCO₃ 25.07 mM, Piruvato de Sodio 0.25 mM, Lactato de

Calcio 1.71 mM, Lactato de Sodio 21.58 mM, Glucosa 5.56 mM,
Penicilina 100.000 UI/ml, Streptomycin 0.050 mg/ml.

2. Eliminación de la zona pelúcida

La zona pelúcida de los embriones fue digerida por incubación en solución de pronasa (Calbiochem) al 0.5 % (p/v) en medio Biggers sin albúmina por 5 a 7 minutos o por incubación en medio salino ácido (pH 2.8) descrito por Ducibella (Ducibella, 1980) durante 15 a 20 segundos. Luego, los embriones se lavaron varias veces en medio Biggers con albúmina.

2.1 Composición de la solución ácida (Ducibella, 1980)

NaCl 140.0 mM, NaH₂PO₄ · H₂O 0.73 mM, Na₂HPO₄ 0.86 mM, KCl
4.8 mM, MgSO₄ · 7H₂O 1.2 mM, CaCl₂ 1.7 mM, Polivinil-
pirrolidona 0.4 %.

3. Desagregación de mórulas para obtener blastómeros aislados

Nomenclatura: Blastómeros aislados de embriones de 2, 4, 8 y 16 células serán llamados 1/2, 1/4, 1/8 y 1/16, respectivamente.

Para obtener 1/2 o 1/4, embriones de 2 o 4 células luego de la postfijación (véase más adelante), se pipetearon enérgicamente. En algunas series experimentales se procedió igualmente con embriones de 8 células para obtener 1/8.

Para obtener 1/8 y 1/16 se colocaron embriones de 8 y 16 células sin zona pelúcida en medio Biggers a 37 C, libre de Calcio y Magnesio, los que fueron reemplazados por Sodio (Cloruro de Sodio). Después de 5 a 10 minutos de incubación los blastómeros fueron separados por pipeteo, lavados en medio Biggers normal, fijados o cultivados por intervalos de tiempo que variaron de 5 minutos a 16 horas y finalmente procesados para microscopía electrónica de barrido. El número de células se precisó en embriones desagregados y la integridad de los blastómeros, luego del cultivo, se determinó por su resistencia a la tinción con eosina amarillenta (yellowish eosine) al 0.5 % (p/v) en solución de Biggers.

4. Agregación de embriones

4.1 Embrión vivo más embrión vivo

Embriones sin zona pelúcida fueron apareados, utilizando para ello una micropipeta de vidrio pulida a la llama. Se formaron pares en distintas combinaciones: 2+2, 2+8, 4+8, 4+16, 8+8, 8+16, 8+Blastocisto (B1), 16+16. Los pares fueron cultivados en contacto por intervalos de tiempo que variaron entre 15 minutos y 3 horas. Los embriones que no se adhirieron en ese lapso de tiempo fueron descartados y los otros fueron separados por pipeteo antes o después de la fijación.

4.2 Embrión vivo más embrión fijado

Se procedió al apareamiento igual que en 4.1 pero uno de los embriones fue previamente fijado. Para esto se empleó glutaraldehído al 3 % (p/v) o paraformaldehído al 2.5 % (p/v) en buffer fosfato 0.1 M pH 7.4 por tiempos que variaron entre 15 y 60 minutos a temperatura ambiente; luego el embrión fue lavado varias veces en buffer y en medio Biggers durante al menos 1 hora.

5. Cultivo

Los blastómeros aislados o los pares de embriones fueron cultivados en gotas de medio Biggers con albúmina, bajo aceite mineral, a 37 °C, en una atmósfera de CO₂ al 5 % en aire húmedo. Los tiempos de cultivo se especifican en las diferentes series experimentales.

6. Microscopía electrónica de barrido

Las muestras fueron fijadas en glutaraldehído al 3 % (p/v) en buffer cacodilato de sodio 0.1 M pH 7.4 a temperatura ambiente por 30 minutos. Luego fueron lavados en el mismo buffer 0.05 M y postfijados en tetróxido de osmio al 1 % (p/v) en el buffer cacodilato de sodio por 90 minutos a temperatura ambiente en obscuridad. Después de un lavado en buffer cacodilato 0.05 M el material fue montado bajo acetona al 30 % (v/v) en planchetas de aluminio cubiertas con gelatina al 1 % (p/v) en agua. Se deshidrató pasando por una secuencia de acetonas de concentración

creciente y luego se procedió al secado por punto crítico en CO_2 según el método de Anderson (Anderson, 1951). Las ² muestras fueron cubiertas con una capa de oro de 30 nm de espesor en un equipo Polaron E 5000 y examinadas con la unidad de barrido instalada en un microscopio electrónico Philips 300. En el curso de este trabajo se empleó indistintamente placas Polaroid 52 o película de 35 mm Panatomic.

RESULTADOS

Microvellosidades en la superficie de blastómeros desagregados de embriones de 2 a 16 células

Treinta y cinco embriones de 2 y 4 células fueron fijados y postfijados antes de la desagregación y el mismo procedimiento fue aplicado a 40 embriones de 8 células. Sobre la superficie de blastómeros desagregados de embriones de 2 o 4 células las microvellosidades estaban uniformemente distribuidas (fig. 1) mientras que sobre embriones de 8 células, comenzando la compactación, las áreas de aposición celular eran aplanadas y presentaban microvellosidades muy cortas (fig. 2). En estados avanzados de compactación esta regionalización de la superficie celular fue más evidente puesto que las áreas de aposición eran más grandes y su superficie era totalmente lisa (fig. 3, 4, 5, 6).

Blastómeros de 150 embriones de 8 células compactados, que fueron desagregados y cultivados in vitro, recuperan una forma esférica después de unos pocos minutos (fig. 7). Una a cuatro horas más tarde se reconocen relieves en la zona lisa que estuvo en contacto, los que por su grosor parecerían microvellosidades haciendo eminencia en la membrana; más hacia la periferia de la zona, se observa microvellosidades tendidas sobre la superficie (fig. 8, 9) y después de 6 h en cultivo, la superficie celular que estuvo en aposición se veía casi tan microvellosa como la superficie que era libre (fig. 10). Esta recuperación total,

sin embargo, fue observada en el 52 % de los blastómeros mientras que el resto no mostraba recuperación o solo una recuperación parcial de las microvellosidades (tabla 1). No seguimos la reaparición de microvellosidades sobre 1/8 más allá de 6 h en cultivo.

Noventa y cuatro embriones de 16 células fueron desagregados. Los blastómeros externos de 20 embriones fueron fijados después de minutos y los blastómeros de 74 embriones fueron cultivado in vitro por 3 a 16 h antes de la fijación.

Blastómeros desagregados de la periferia de embriones de 16 células y cultivados in vitro por 10 minutos muestran una superficie lisa que es proporcionalmente más grande que la de 1/8. Esta superficie lisa esta rodeada por un anillo de microvellosidades, que se observan más largas y en mayor densidad que las de la superficie libre (figs. 11, 12). Durante el cultivo in vitro de 1/16 las microvellosidades reaparecen gradualmente sobre la superficie lisa pero después de 16 h en cultivo, cuando la mayoría de los 1/16 se han dividido en 2/32, la superficie celular que estuvo en aposición todavía es menos microvellosa que la superficie que era libre (fig. 13, 14; tabla 1).

Microvellosidades en el sitio de contacto de embriones agregados

Embriones de 2 células que fueron agregados y luego separados muestran que las microvellosidades en el sitio de



contacto se han colapsado sobre la superficie celular (fig. 15). Una descripción similar se aplica a la superficie de contacto de embriones de 2 o 4 células que han sido apareados con mórulas de 8 células (fig. 16). El efecto es completamente diferente sobre la superficie de mórulas de 8 células, precompactadas o compactadas, que fueron apareadas con embriones de 2, 4 u 8 células. Las microvellosidades en el sitio de contacto sobre estas mórulas han desaparecido y la superficie es lisa, semejante a las áreas de aposición celular normal entre blastómeros de mórulas compactadas (figs. 17, 18, 19). Tenemos dudas sobre cuales son los estados más tempranos de desarrollo que responden a la agregación por la desaparición total de microvellosidades en el sitio de contacto porque no hemos examinado embriones con más de 4 y menos de 8 células.

La agregación de embriones de 8 células con embriones con más de 8 células revela que la superficie del embrión de 8 células se vuelve lisa parcialmente, cuando se ha apareado con una mórula de 16 células y menos aún cuando se ha apareado con un blastocisto temprano (fig. 21). Por otra parte, la superficie de contacto de mórulas de 16 células no se vuelve lisa cuando se agrega con embriones de 4, 8, 16 células o blastocistos (figs. 22, 23). En cambio, la agregación por 3 horas o más, de embriones de 16 células, muestra un aflojamiento de las células periféricas que permiten visualizar las células internas (fig. 24).

Resumiendo: la capacidad de inducir por agregación la desaparición de microvellosidades en la superficie de

contacto de un embrión de 8 células no cambia apreciablemente desde el estado de 2 células hasta el estado de 8 células y declina en estados más avanzados mientras que la capacidad para responder a la agregación por la desaparición de microvellosidades en el sitio de contacto es notable en embriones de 8 células y más reducida en estados más tempranos o tardíos (tabla 2).

De 785 pares de embriones cultivados por 1 a 3 h, sólo alrededor de la mitad se agregó. El éxito en la agregación no depende del tiempo de cultivo y aun 30 min bastan para causar agregación. Estados tempranos sincrónicos se agregan más frecuentemente que estados asincrónicos y que mórulas avanzadas o blastocistos tempranos (tabla 2)

Por microscopía de barrido hemos examinado 333 embriones en diferentes estados que fueron agregados y luego separados (tabla 2).

Microvellosidades en el sitio de contacto de embriones vivos agregados con embriones fijados

Estos experimentos fueron hechos por apareamiento de embriones de 8 células vivos con embriones de 8 células que habían sido previamente fijados y lavados. Para distinguir, durante el experimento el embrión vivo del fijado, usamos mórulas en compactación. Como en estas condiciones el embrión vivo completaba este proceso durante el cultivo, era fácil distinguirlo del fijado con el microscopio de luz. La respuesta de los embriones vivos en el sitio de contacto

fue notablemente similar a la respuesta, ya descrita, inducida por embriones vivos (fig. 20). En la mórula fijada, obviamente, no se reconocen modificaciones de las microvellosidades. Apareamos 371 embriones fijados con embriones vivos y después de 2 h, sólo el 35 % de los pares se agregó. No se reconocen variaciones significativas en este porcentaje cuando se comparan diferentes tiempos de cultivo y distintos fijadores.

Tabla 1 Porcentaje de reaparición de microvellosidades (*) sobre la superficie libre de blastómeros aislados de embriones de 8 y 16 células (1/8 y 1/16).

estado	1/8	1/16	1/8	1/16	1/8	1/16	1/8	1/16	1/8	2/32
Número de blastómeros observados	95	32	32	--	14	50	114	16	--	24
sin recuperación	100%	100%	13%	--	14%	36%	24%	13%	--	4%
recuperación parcial	0%	0%	87%	--	86%	64%	24%	88%	--	96%
recuperación completa	0%	0%	0%	--	0%	0%	52%	0%	--	0%
Horas de cultivo in vitro	0	1-2	3-4	6	16					

(*) Blastómeros sin recuperación son ilustrados en la fig. 7; con recuperación parcial en la fig. 9; con recuperación completa en la fig. 10.

Tabla 2 Efecto de la agregación sobre la superficie de contacto en diferentes combinaciones de embriones

Combinación	Superficie (*)	num.embriones observados	num.de pares	% agreg. (**)
2 + 2	microvellosa	56	75	80
2 + 8	microvellosa lisa	28 34	85	55
4 + 8	microvellosa o parcialmente microvell. lisa	9 4	15	60
4 + 16	microvellosa o parcialmente microvell. parcialmente microvell.	20 27	88	50
8 + 8	lisa	57	170	77
8 + 16	lisa o parcialmente microvell. parcialmente microvell.	6 7	41	43
8 + B1	parcialmente microvell. microvellosa o parcialmente microvell.	13 14	49	40
16 + 16	parcialmente microvell.	58	262	35

* Superficie microvellosa es ilustrada por fig. 15 o 16; parcialmente microvellosa por figs. 21-23 y lisa por figs. 17-19.

** Corresponde al número de pares (columna 4) que resiste al pipeteo después de haber sido cultivado por 1-3 h.

Figura 1 Blastómero de un embrión de 2 células desagregado después de la fijación. La superficie de contacto con el otro blastómero (sc) y con el polocito (punta de flecha) presentan microvellosidades como en la superficie libre.

Barra representa: 10 um

Figura 2 Blastómero de una mórula de 8 células en compactación desagregado después de la fijación. Se observa 3 zonas de contacto celular como superficies aplanadas con microvellosidades reducidas. EL resto de la superficie esta cubierto de microvellosidades.

Barra representa: 5 um

Figuras 3, 4, 5 y 6

Cuatro blastómeros de una misma mórula compactada de 8 células que fue fijada y luego desagregada. Se observa zonas de contacto celular, de forma aplanada y carentes de microvellosidades. Estas zonas son de mayor extensión que las que se observan en la fig. 2. El resto de la superficie esta cubierto de microvellosidades.

Barra representa: 5 um

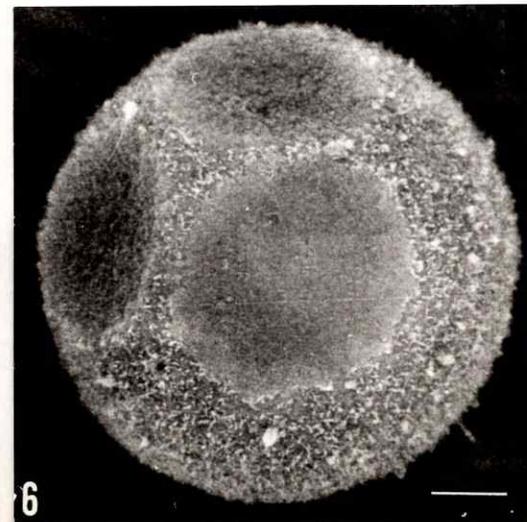
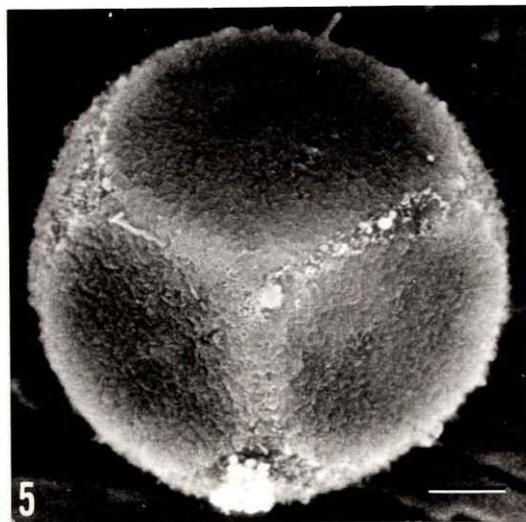
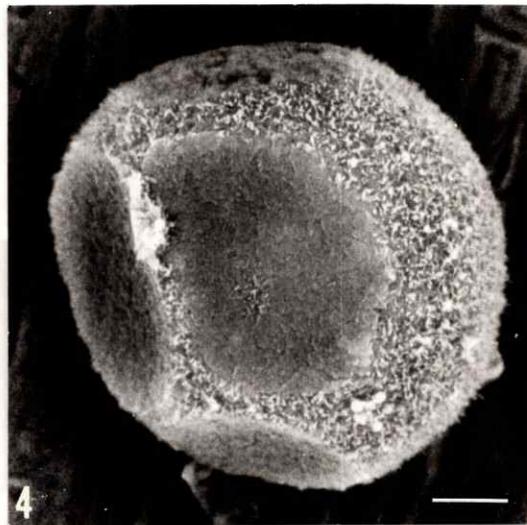
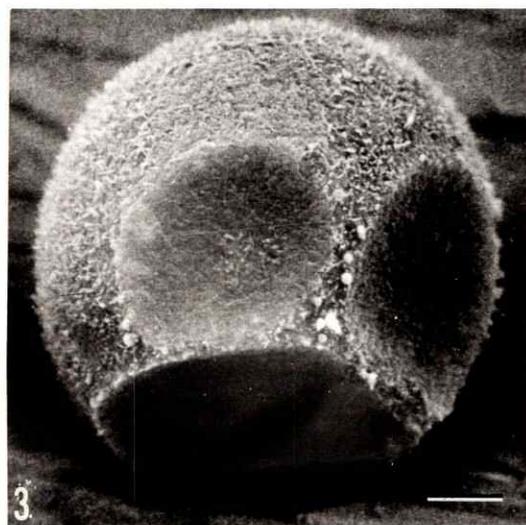
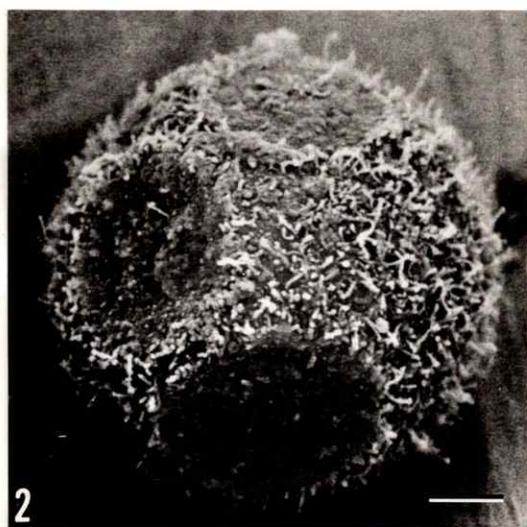
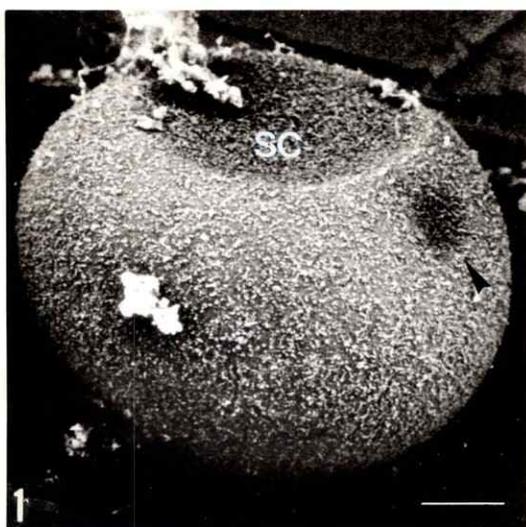


Figura 7 Blastómero desagregado de una mórula compactada de 8 células que fue fijado aproximadamente después de 10 min en cultivo. Ha recuperado la forma esférica y se observa una zona lisa que correspondería a más de un contacto.

Barra representa: 5 μ m

Figura 8 Blastómero desagregado de una mórula compactada de 8 células que fue cultivado por 1 hora, antes de ser fijado. La membrana correspondiente a la zona de contacto muestra relieves semejantes a microvellosidades y ya no es tan fácil distinguirla de la zona libre (flechas).

Barra representa: 5 μ m

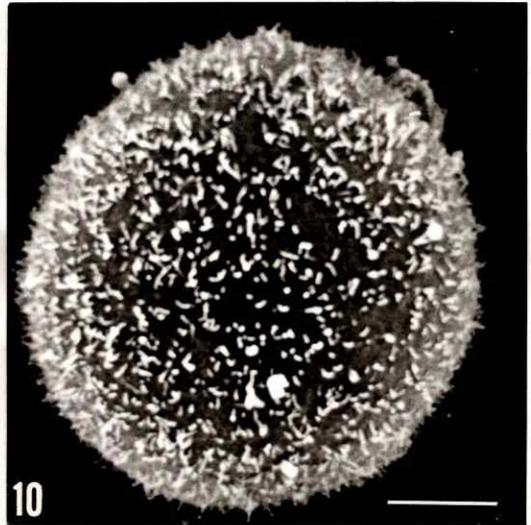
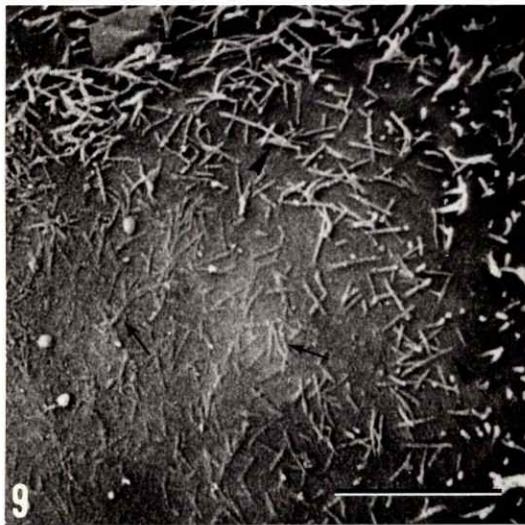
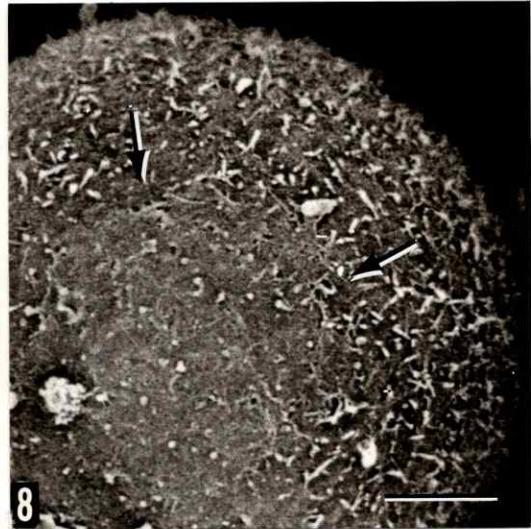
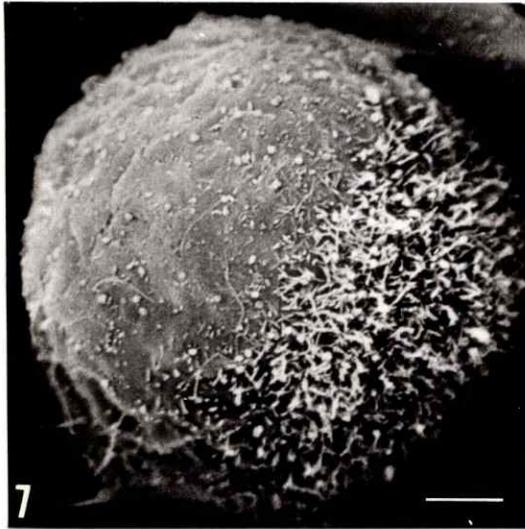
Figura 9 Blastómero desagregado de una mórula compactada de 8 células que fue cultivado por 4 horas antes de la fijación. Obsérvese en la periferia de la zona que estuvo en contacto, microvellosidades de longitud y diámetro normal aplicadas contra la superficie (puntas de flecha) y hacia el centro de la zona de contacto, relieves que sugieren microvellosidades emergiendo.

(flechas).

Barra representa: 5 μ m

Figura 10 Blastómero desagregado de una mórula compactada de 8 células que fue cultivado por 6 horas antes de la fijación. Se ve toda la célula cubierta de microvellosidades.

Barra representa: 5 μ m



Figuras 11 y 12

Blastómeros aislados de mórulas de 16 células y fijados después de 10 min de cultivo. Entre la zona libre y la zona de contacto, se observa un anillo caracterizado por una mayor densidad de microvellosidades, las que se observan más largas que en la zona libre (flechas).

Barra representa: 2 μ m

Figuras 13 y 14

Blastómeros aislados de mórulas de 16 células y cultivados por 11 y 16 horas respectivamente antes de la fijación. Ambos blastómeros se han dividido y se observa recuperación parcial de las microvellosidades en la zona que estuvo en contacto (asteriscos).

Barra representa: 2 μ m

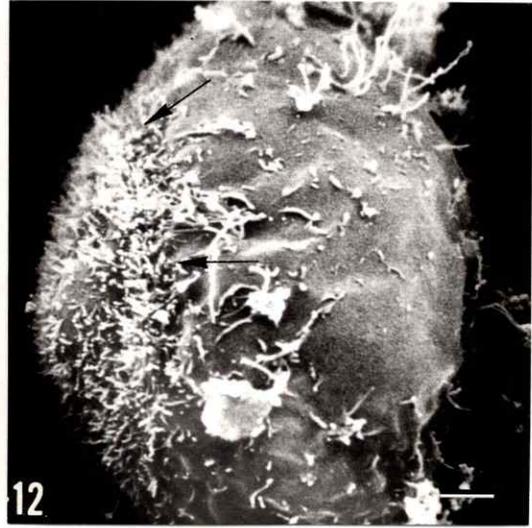
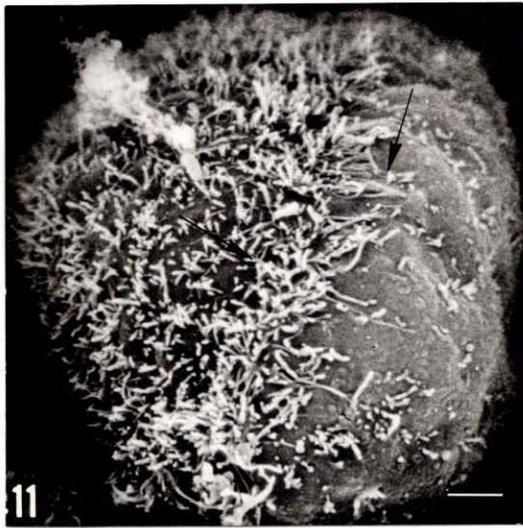


Figura 15 Superficie de contacto entre 2 embriones de 2 células que fueron agregados por 3 h y separados después de la fijación. Se observa la superficie cubierta de microvellosidades aunque algo colapsadas.

Barra representa: 5 μ m

Figura 16 Superficie de contacto de un embrión de 2 células que fue agregado con un embrión de 8 células por 3 h y separado después de la fijación. Las microvellosidades se observan como en la fig. 15.

Barra representa: 5 μ m

Figura 17 Dos mórulas de 8 células que fueron agregadas por 1 h y separadas después de la fijación. Ambas mórulas presentan superficies de contacto complementarias lisas que comprenden varios blastómeros (puntas de flecha).

Barra representa: 20 μ m

Figura 18 Aumento de la mórula inferior de la fig. 17. La diferencia entre la superficie de contacto y la superficie libre es evidente.

Barra representa: 5 μ m

Figura 19 Superficie de contacto de una mórula de 8 células que fue agregada con un embrión de 2 células por 3 h, fijada y separada. Obsérvese carencia de microvellosidades.

Barra representa: 5 μ m

Figura 20 Mórula de 8 células que fue agregada con una mórula de 8 células previamente fijada (glutaraldehído al 3 % por 1 h) y separada después de 3 h en cultivo. La superficie de contacto (puntas de flecha) es lisa, como en las figs. 17-19.

Barra representa: 10 μ m

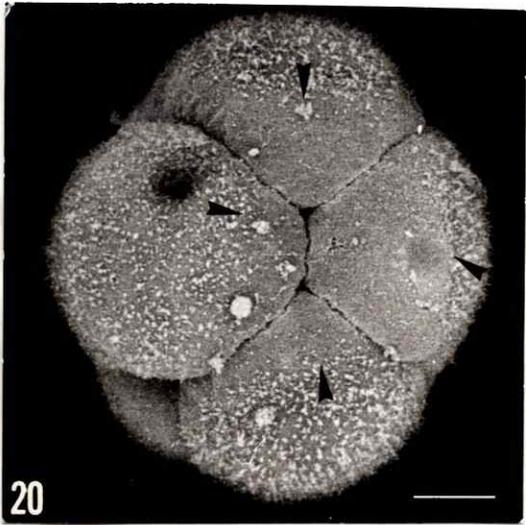
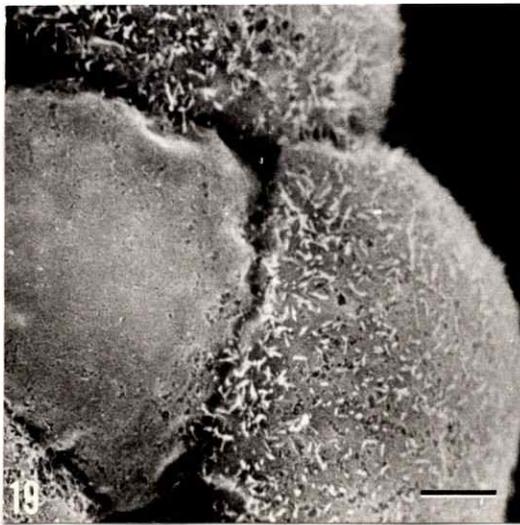
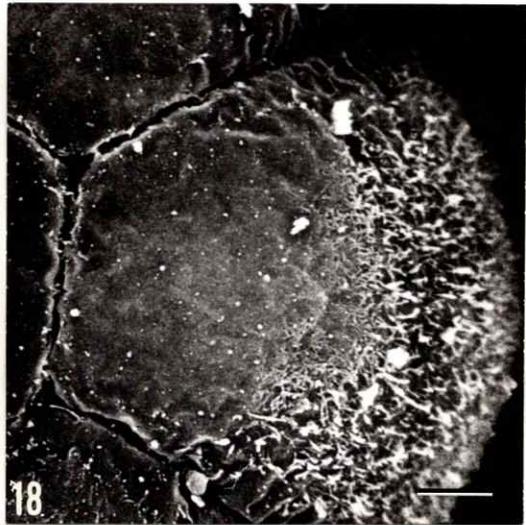
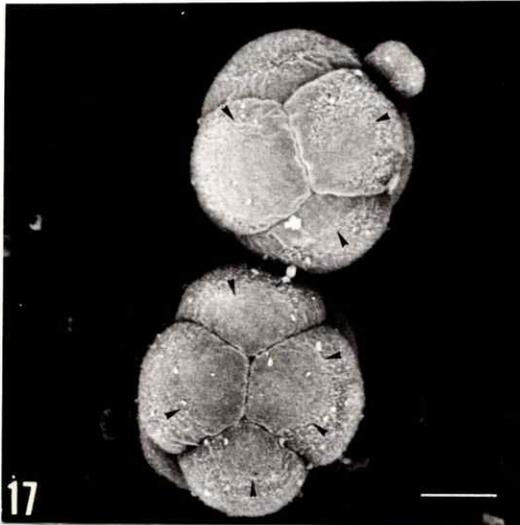
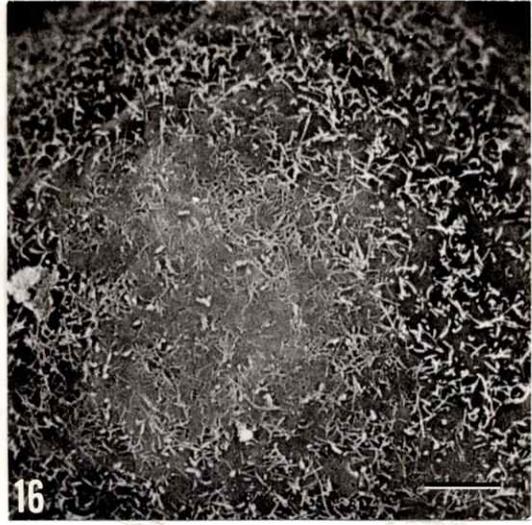


Figura 21 Dos blastómeros de un embrión de 8 células que fue agregado con un blastocisto y separado después de la fijación. La superficie de contacto (sc) sobre uno de los blastómeros se observa parcialmente microvellosa.

Barra representa: 2 um

Figura 22 Embrión de 16 células que fue agregado con un embrión de 4 células por 3 h y separado después de la fijación. La superficie de contacto (puntas de flecha) es parcialmente microvellosa.

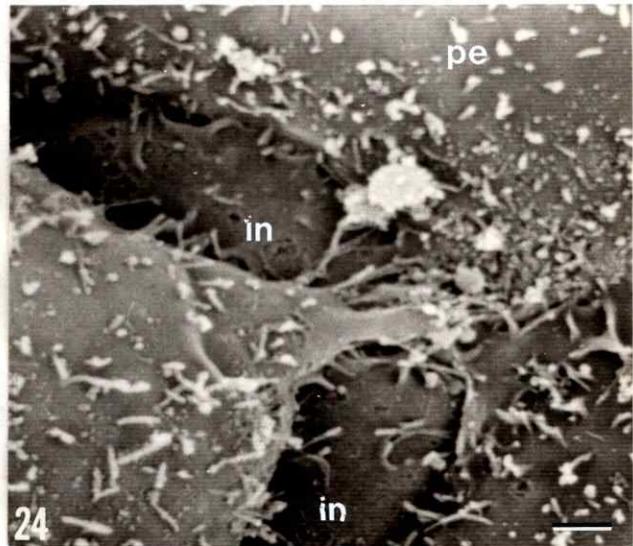
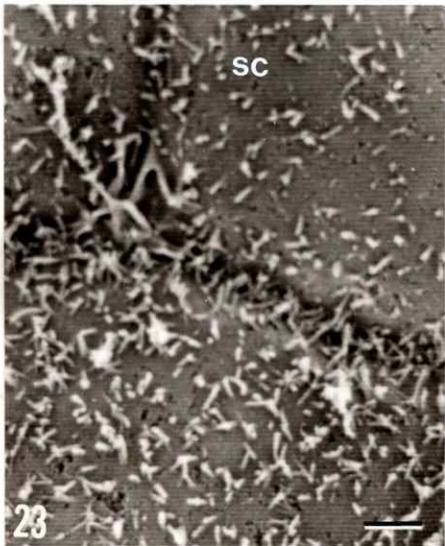
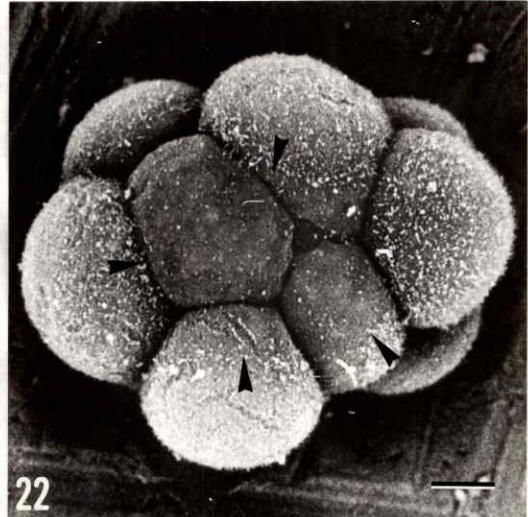
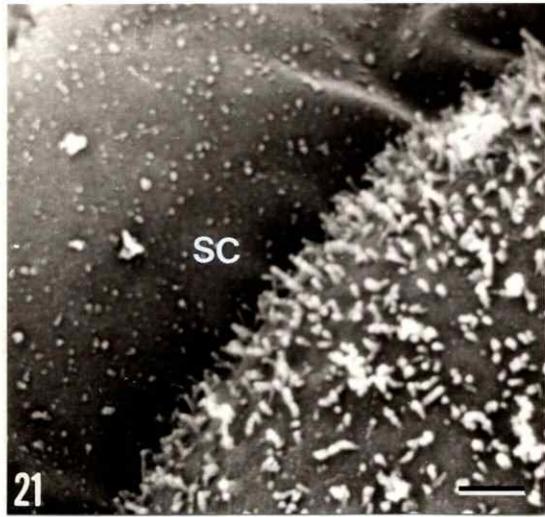
Barra representa: 10 um

Figura 23 Embrión de 16 células que fue agregado con otro embrión de 16 células por 2 h, fijado y separado. La superficie de contacto (sc) se observa parcialmente microvellosa.

Barra representa: 2 um

Figura 24 Superficie de contacto de un embrión de 16 células que fue agregado con otro embrión de 16 células por 3 h, fijado y separado. Los blastómeros periféricos (pe) están desplazados y los blastómeros internos (in) son visibles.

Barra representa: 2 um



DISCUSION

Los resultados muestran que blastómeros desagregados de embriones de 8 células y de la periferia de embriones tempranos de 16 células, esto es $1/8$ y $1/16$ de embrión, presentan una polarización de microvellosidades ya que estas están presentes sobre la superficie libre y ausentes sobre las superficies celulares que estaban en aposición. Después de 6 horas en cultivo, las superficies lisas de aproximadamente la mitad de los $1/8$ han recuperado las microvellosidades completamente mientras que las superficies lisas de $1/16$ se han recuperado solo parcialmente después de 16 horas en cultivo. Cuando se agrega embriones de 8 células, las microvellosidades sobre la superficie de contacto desaparecen en menos de 1 hora y la membrana celular se torna lisa como en las superficies entre blastómeros de una mórula compactada normal. La superficie de contacto de embriones de 2 y 4 células, en cambio, permanece microvellosa cuando ellos son agregados con embriones del mismo estado o con mórulas de 8 células. La superficie de contacto sobre dichas mórulas, sin embargo, se alisa rápidamente, sugiriendo así que embriones de 2 a 8 células son igualmente capaces de inducir la desaparición de microvellosidades mientras que solo mórulas en compactación o recién compactados responden a la agregación con la desaparición de microvellosidades en su sitio de contacto. La existencia de una "señal de compactación" es sugerida también por experimentos en que embriones fijados inducen la

desaparición de microvellosidades sobre mórulas vivas.

Blastómeros desagregados

Nuestra descripción de microvellosidades sobre la superficie de blastómeros que fueron desagregados y fijados inmediatamente, es muy similar a la mostrada antes por Reeve y Ziomek (1981) pero la descripción de la superficie de blastómeros que fueron cultivados in vitro antes de la fijación, es diferente a lo informado por Ziomek y Johnson (1980, 1981).

La reaparición de microvellosidades sobre la superficie lisa de 1/8 está de acuerdo con el vasto potencial de diferenciación atribuido a ellos (véase Introducción). Resultados expuestos aquí sugieren que la regulación embrionica podría ser provocada por la pérdida de contactos celulares que permiten la reaparición de microvellosidades y como resultado, la pérdida de regionalización que puede haber informado a los blastómeros sobre su posición en el embrión. En 1/16 la regionalización disminuye durante el cultivo in vitro sin regresar completamente y no conocemos casos de blastómeros aislados de embriones de 16 células que lleguen a diferenciarse en blastocistos. Esta afirmación no implica que los 1/16 estén ya determinados puesto que grupos de células internas o externas de una mórula de 16 células pueden formar blastocistos completos (Rossant & Lis, 1979; Rossant & Vijn, 1980; Ziomek, Johnson & Handyside, 1982).

Las observaciones sobre blastómeros aislados parecen estar en conflicto con resultados de Ziomek y Johnson (1980,

1981) puesto que ellos informan que los 1/8 se polarizan en cultivo y que los 1/16 mantienen su polarización, reconocida por la distribución de ligandos fluorescentes sobre su superficie. Esta discrepancia podría basarse en que el patrón de tinción que ellos detectan con ligandos fluorescentes estaría correlacionado con la alta densidad de microvellosidades (Reeve & Ziomek, 1981) por lo tanto, lo que ellos llaman polo microvelloso sería recíproco a lo que aquí se llama superficie lisa. En efecto, el campo microvelloso que observamos es más grande que el polo que ellos describen y además, Ziomek y Johnson (1980, 1981) describen polarización del 55 % de los 1/8 después de 6-7 h en cultivo y la mantención de la polarización en el 100 % de los 1/16 después de 9-10 h mientras que nosotros observamos recuperación completa de las microvellosidades en el 52 % de los 1/8 y recuperación parcial en el 88 % de los 1/16 después de 6 h en cultivo. Diferencias en porcentajes recíprocos, por supuesto, podrían ser ignorados en vista de diversos criterios y métodos, sin embargo, es difícil reconciliar la descripción que ellos hacen de una tendencia a la polarización durante el cultivo in vitro con nuestras observaciones, en condiciones similares, de una tendencia definida a la reaparición de microvellosidades sobre las superficies lisas, lo cual corresponde a una despolarización.

Agregación de embriones tempranos

Según Johnson y Ziomek (1981) los 1/8 polarizan cuando son puestos en contacto con otro blastómero del mismo estado y algo menos cuando son puestos en contacto con blastómeros aislados de estados más tempranos. Nuestros resultados con embriones agregados confirman los suyos sobre blastómeros agregados y considerando lo que hemos observado en 1/8 y 1/16 aislados, concluiríamos que la desaparición y la reaparición de microvellosidades depende, en estos estados, del contacto celular. Agregando embriones en diferentes combinaciones observamos que la desaparición de microvellosidades en el sitio de contacto es completa y deja una superficie lisa, solo en embriones de 8 células mientras que la capacidad para inducir esta respuesta es mostrada claramente por embriones de 2 a 8 células y menor en estados más avanzados. El estado de 8 células revela una capacidad máxima para responder y probablemente también para emitir "señales de compactación".

Trabajos de este laboratorio han mostrado una regionalización de la membrana plasmática que es reconocida por la demostración citoquímica de fosfatasa alcalina y 5'-nucleotidasa sobre las membranas celulares en contacto desde el estado de 4 células tardío hacia adelante y por lo tanto, precediendo la compactación (Izquierdo, López & Marticorena, 1980; Izquierdo & Ebensperger, 1982). Esta precedencia es observada también cuando se usa inhibidores de microtúbulos y microfilamentos para detener el clivaje (Izquierdo, López & Panuncio, 1984); además, observaciones preliminares

nuestras (no publicadas) muestran que la agregación de dos embriones de 8 células provoca actividad de fosfatasa alcalina entre ellos en menos de 1 h. En consecuencia, pensamos que el proceso de compactación comienza en el estado de 4 células cuando el contacto entre blastómeros induce su regionalización y continúa en el estado de 8 células cuando las microvellosidades desaparecen sobre las superficies en contacto. Esto sugiere que la agregación de embriones con 8 células o menos procede en una forma similar a la compactación normal.

Adhesión y compactación

El mecanismo de compactación es aun poco claro, aunque un aumento en la adhesividad célula-célula durante el desarrollo ofrece una explicación razonable. Diversos autores han descrito mecanismos de adhesión celular dependientes e independientes de Ca^{++} en una variedad de tejidos embrionicos tumorales y diferenciados (Takeichi, Atsumi, Yoshida, Uno & Okada, 1981; Magnani, Thomas & Steinberg, 1981; Thomas & Steinberg, 1981; Thomas, Thomson, Magnani & Steinberg, 1981; Grunwald, Bromberg, Crowley & Lilien, 1981; Grunwald, Pratt & Lilien, 1982; Ogou, Okada & Takeichi, 1982). La compactación es reversiblemente inhibida por bajas concentraciones de Ca^{++} (Ducibella, 1977). Por otra parte, anticuerpos monoclonales contra células de teratocarcinoma han sido usados exitosamente para detectar antígenos de superficie involucrados en el efecto del Ca^{++} sobre la compactación (Hyafil, Babinet & Jacob,

1981; Shirayoshi, Okada & Takeichi, 1983; Yoshida-Noro, Suzuki & Takeichi, 1984). Estos anticuerpos, sin embargo, también inhiben la adhesión de diversos tipos de células epiteliales diferenciadas y el fragmento Fab anti-TC-F9 es igualmente efectivo sobre la agregación de embriones de 8 células o menos (Ogou, Okada & Takeichi, 1982). Por lo tanto, la adhesión célula-célula mediada por Ca⁺⁺ podría ser una causa necesaria pero no suficiente de la compactación.

Señales de inducción y respuestas específicas de ciertos estados de desarrollo también merecen ser analizadas. Ya que embriones con más de 8 células presentan una capacidad reducida para inducir la desaparición de microvellosidades se puede sugerir la existencia de una señal específica. Esta podría investigarse por la extracción selectiva de componentes de la superficie de embriones fijados que, como hemos demostrado, retienen su capacidad inductiva. Por otra parte, una respuesta específica a esta señal hipotética, podría ser investigada tratando embriones con inhibidores de diferentes elementos de su sistema contráctil (Siracusa, Whittingham & De Felici, 1980; Pratt, Chakraborty & Surani, 1981; Kimber & Surani, 1981; Izquierdo, López & Panuncio, 1984). Otra aproximación al problema es el reconocimiento espacial de los componentes del sistema contráctil. Capas corticales de actina y alfa-actinina han sido descritas en blastómeros de ratón (Lehtonen & Badley, 1980) y la miosina cortical desaparece

como consecuencia del contacto célula-célula (Sobel, 1983). Obviamente, receptores en la superficie celular, específicos de estado de desarrollo también podrían estar involucrados.

Agregación de mórulas avanzadas

Nuestras observaciones sugieren que la agregación de embriones con más de 8 células no se desarrolla similarmente a la compactación; en lugar de eso las células externas comienzan a aflojarse y probablemente se extiendan sobre la superficie mientras las células internas de ambos embriones llegan a juntarse. El tiempo requerido para la agregación de mórulas avanzadas es más largo que para mórulas jóvenes (Burgoyne & Ducibella, 1977) y no se tiene información suficiente sobre el grado de entremezclamiento de células como para alcanzar una conclusión. La extensión y el reordenamiento celular podrían depender de una adhesividad diferencial (Kimber, Surani & Barton, 1982; Kimber & Surani, 1982; Surani & Handyside, 1983). Si los blastómeros de mamífero presentaran dominios adhesivos y no-adhesivos, como se describe para blastómeros de anfibios (Roberson, Armstrong & Armstrong, 1980), la adhesividad baso-lateral de los blastómeros periféricos y la adhesividad en todo el contorno de los blastómeros internos podría ser la clave para su reordenamiento.

Finalmente, proponemos que la regionalización de la membrana plasmática de los blastómeros, reconocida por actividad de fosfatasa alcalina y 5'-nucleotidasa, la desaparición de microvellosidades y probablemente la

adhesividad, aparecen epigenéticamente como una consecuencia del contacto célula-célula y puede ser la base espacial de la regulación embriónica y de la diferenciación normal adentro-afuera de embriones tempranos de ratón.

REFERENCIAS

- ANDERSON, T. (1951) Techniques for the preservation of three dimensional structure in preparing specimens for the electron microscope. Trans. N. Y. Acad. Sci. 13: 130.
- 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.
- BURGOYNE, P.S. & DUCIBELLA, T. (1977) Changes in the properties of the developing trophoblast of preimplantation mouse embryos as revealed by aggregating studies. J. Embryol. exp. Morph. 40: 143-157.
- DUCIBELLA, T. (1977) Surface changes of the developing trophoblast cell. En: Development in mammals (Johnson, M.H., ed.). volume 1, pp. 5-30. North Holland, Amsterdam.
- DUCIBELLA, T. (1980) Divalent antibodies to mouse embryonal carcinoma cells inhibit compaction in the mouse embryo. Dev. Biol. 79: 356-366.
- DUCIBELLA, T. (1982) Depolymerization of microtubules prior to compaction. Exp. Cell Res. 138: 31-38.
- DUCIBELLA, T. & ANDERSON, E. (1975). Cell shape and membrane changes in the eight-cell mouse embryo: prerequisites for morphogenesis of the blastocysts. Dev. Biol. 47: 45-58.

- GARNER, W. & McLAREN, A. (1974) Cell distribution in chimaeric mouse embryos before implantation. *J. Embryol. exp. Morph.* 32: 495-503.
- GRUNWALD, G.B.; BRONBERG, R.E.M.; CROWLEY, N.J. & LILIENTHAL, J. (1981) Enzymatic dissection of embryonic cell adhesive mechanism. II. Developmental regulation of an endogenous adhesive system in the chick neural retina. *Dev. Biol.* 86: 327-338.
- GRUNWALD, G.B.; PRATT, R.S. & LILIENTHAL, J. (1982) Enzymic dissection of embryonic cell adhesive mechanism. III. Immunological identification of a component of the calcium-dependent adhesive system of embryonic chick neural retina cells. *J. Cell Sci.* 55: 69-83.
- HYAFIL, F.; BABINET, C. & JACOB, F. (1981) Cell-cell interactions in early embryogenesis: a molecular approach to the role of calcium. *Cell* 26: 447-454.
- HILLMAN, N.M.; SHERMAN, M.I. & GRAHAM, C.F. (1972) The effect of spatial arrangement on cell determination during mouse development. *J. Embryol. exp. Morph.* 28: 263-278.
- IZQUIERDO, L. & EBENSBERGER, C. (1982) Cell membrane regionalization in early mouse embryos as demonstrated by 5'-nucleotidase activity. *J. Embryol. exp. Morph.* 69: 115-126.
- 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.

JOHNSON, M.H. & ZIOMEK, C.A. (1981) Induction of polarity in mouse 8-cell blastomeres, specificity, geometry and stability. J. Cell Biol. 91: 303-308.

JOHNSON, M.H. & ZIOMEK, C.A. (1982) Cell subpopulations in the late morula and early blastocyst of the mouse. Dev. Biol. 91: 431-439.

KELLY, S. (1977) Studies of the developmental potential of 4- and 8-cell stage mouse blastomeres. J. Exp. Zool. 200: 365-376.

KELLY, S.J.; MULNARD, J.G. & GRAHAM, C.F. (1978) Cell division and cell allocation in early mouse development. J. Embryol. exp. Morph. 48: 37-51.

KEMLER, R.; BABINET, C.; EISEN, H. & JACOB, F. (1977) Surface antigen in early differentiation. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74: 4449-4452.

KIMBER, S.J. & SURANI, M.A.H. (1981) Morphogenetic analysis of changing cell association following release of 2-cell and 4-cell mouse embryos from cleavage arrest. J. Embryol. exp. Morph. 61: 331-345.

KIMBER, S.J. & SURANI, M.A.H. (1982) Spreading of blastomeres from 8-cell mouse embryos on lectin coated beads. J. Cell Sci. 56: 191-206.

KIMBER, S.J.; SURANI, M.A.H. & BARTON, S.C. (1982)

- Interactions of blastomeres suggest changes in cell surface adhesiveness during the formation of inner cell mass and trophectoderm in the preimplantation mouse embryo. *J. Embryol. exp. Morph.* 70: 133-152.
- LEHTONEN, E. & BADLEY, R. (1980) Localization of cytoskeletal proteins in preimplantation mouse embryos. *J. Embryol. exp. Morph.* 55: 211-225.
- LO, C.W. & GILULA, N.B. (1979) Gap junctional communication in the preimplantation mouse embryo. *Cell* 18: 399-409.
- MAGNANI, J.L.; THOMAS, W.A. & STEINBERG, M.S. (1981) Two distinct adhesion mechanisms in embryonic neural retina cells. I. A kinetic analysis. *Dev. Biol.* 81: 96-105.
- McLACHLIN, J.R.; CAVENEY, S. & KIDDER, G.M. (1983) Control of gap junction formation in early mouse embryos. *Dev. Biol.* 98: 155-164.
- MINTZ, B. (1965) Experimental genetic mosaicism in the mouse. En: *Preimplantation stages of pregnancy*. CIBA Foundation Symposium (Wolstenhilme, G.E.W. & O'Connor, M., eds.) pp. 194-207. Churchill, London.
- OGOU, S.; OKADA, T.S. & TAKEICHI, M. (1982) Cleavage stage mouse embryos share a common cell adhesion system with teratocarcinoma cells. *Dev. Biol.* 92: 521-528.
- PRATT, H.P.M.; CHAKRABORTY, J. & SURANI, M.A.H. (1981) Molecular and morphological differentiation of the mouse blastocyst after manipulations of compaction with cytochalasin D. *Cell* 26: 279-292.
- REEVE, W.J.D. & ZIOMEK, C.A. (1981) Distribution of

- microvilli on dissociated blastomeres from mouse embryos: Evidence for surface polarization at compaction. *J. Embryol. exp. Morph.* 62: 339-350.
- ROBERSON, M.; ARMSTRONG, J. & ARMSTRONG, P. (1980) Adhesive and non-adhesive membrane domains of a amphibian embryo cells. *J. Cell Sci.* 44: 19-31.
- ROSSANT, J. & LIS, W.J. (1979) Potential of isolated mouse inner cell masses to form trophectoderm derivatives in vivo. *Dev. Biol.* 70: 255-261.
- ROSSANT, J. & VIJH, K.M. (1980) Ability of outside cells from preimplantation mouse embryos to form inner cell mass derivatives. *Dev. Biol.* 76: 475-482.
- SHIRAYOSHI, Y.; OKADA, T.S. & TAKEICHI, M. (1983) The calcium-dependent cell-cell adhesion system regulates inner cell mass formation and cell surface polarization in early mouse development. *Cell* 35: 631-638.
- SIRACUSA, G.; WHITTINGHAM, D.G. & DE FELICI, M. (1980) The effect of microtubule and microfilament disrupting drugs on preimplantation mouse embryos. *J. Embryol. exp. Morph.* 60: 71-82.
- SOBEL, S. (1983) Cell-cell contact modulation of myosin organization in the early mouse embryo. *Dev. Biol.* 100: 207-213.
- SURANI, M.A.H. & HANDYSIDE, AH (1983) Reassortment of cells according to position in mouse morulae. *J. Exp. Zool.* 225: 505-511.

- TAKEICHI, M.; ATSUMI, T.; YOSHIDA, C.; UNO, K. & OKADA, P.S. (1981) Selective adhesion of embryonal carcinoma cells by Ca⁺⁺-dependent sites. Dev. Biol. 87: 340-350.
- 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.
- THOMAS, W.A. & STEINBERG, M.S. (1981) Two distinct adhesion mechanisms in embryonic neural retina cells. II. An immunological analysis. Dev. Biol. 81: 106-114.
- THOMAS, W.A.; THOMSON, J.; MAGNANI, J.L. & STEINBERG, M.S. (1981) Two distinct adhesion mechanisms in embryonic neural retina cells. III. Functional specificity. Dev. Biol. 81: 379-385.
- YOSHIDA-NORO, C.; SUZUKI, N. & TAKEICHI, M. (1984) Molecular nature of the calcium-dependent cell-cell adhesion system in mouse teratocarcinoma and embryonic cells studied with a monoclonal antibody. Dev. Biol. 101: 19-27.
- ZIOMEK, C.A. & JOHNSON, M.H. (1980) Cell surface interaction induces polarization of mouse 8-cell blastomeres at compaction. Cell 21: 935-942.
- ZIOMEK, C.A. & JOHNSON, M.H. (1981) Properties of polar and apolar cells from the 16-cell mouse morula. W. Roux's Arch. Dev. Biol. 190: 287-296.
- ZIOMEK, C.A.; JOHNSON, M.H. & HANDYSIDE, A.H. (1982) The developmental potential of mouse 16-cell blastomeres. J. Exp. Zool. 221: 345-355.