

DESARROLLO INICIAL DE MAMIFEROS: EFECTO DE LA INHIBICION DEL
CAMBIO DE FORMA CELULAR Y DE LA REPLICACION DEL DNA, SOBRE EL
PATRON DE SINTESIS PROTEICA.

UCH - FC
DOC - B
M473
C.1

TESIS ENTREGADA A LA FACULTAD DE CIENCIAS DE LA UNIVERSIDAD DE
CHILE, EN CUMPLIMIENTO PARCIAL DE LOS REQUISITOS PARA OPTAR AL
GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS CON MENCIÓN EN BIOLOGIA.

ROBERTO ALFONSO MAYOR CARD

Noviembre de 1989

Director de Tesis: Dr. Luis Izquierdo
Laboratorio de Biología del Desarrollo
Facultad de Ciencias
Universidad de Chile



FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE CHILE

INFORME DE APROBACION DE TESIS DE DOCTORADO

Se informa a la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias,
que la Tesis de Doctorado presentada por el candidato

ROBERTO ALFONSO MAYOR CARO

ha sido aprobada por la Comisión Informante de Tesis, para el
grado de Doctor en Ciencias con Mención en Biología.

Director de Tesis:

Dr. Luis Izquierdo

Luis Izquierdo
.....

Comisión Informante de Tesis:

Dr. Marco Tulio Nuñez

Marco Tulio Nuñez
.....

Dr. Hermann Niemeyer

Hermann Niemeyer
.....

Dr. Manuel Krauskopf

.....

Dr. Eugenio Spencer

.....

Dr. Tito Ureta

Tito Ureta
.....



INDICE DE MATERIAS

INTRODUCCION	1
1. Descripción del desarrollo preimplantacional de ratón	1
1.1 Los cambios celulares: regionalización y diferenciación	1
1.2 Los cambios moleculares: expresión génica	5
2. Consideraciones generales e hipótesis de trabajo	13
MATERIALES Y METODOS	15
1. Material biológico	15
1.1 Obtención de embriones preimplantacionales	15
1.2 Obtención de ovocitos	16
1.3 Cultivo de embriones	16
1.4 Sincronización por selección de embriones	17
1.5 Inmunocirugía de blastocistos	21
1.6 Tratamientos de los embriones	22
1.6.1 Inhibición de la compactación	22
1.6.2 Inhibición de la actividad nuclear	23
2. Marcaciones <u>in vivo</u>	24
2.1 Marcación de proteínas	24
2.2 Marcación de DNA	24
3. Análisis de los productos marcados	25
3.1 Análisis de la síntesis de proteínas	25
3.1.1 Geles unidimensionales	25
3.1.2 Geles bidimensionales	26
3.1.3 Fluorografía de geles	28



LISTA DE ABREVIATURAS

α -La:	Alfa lactalbúmina
CCD:	Citochalasina D
Con A:	Concanavalina A
EGTA:	Acido etilenglicol bis(oxietilen nitrilo) tetracético
FSH:	Hormona folículo estimulante
hC:	Horas de compactación
HRP:	Peroxidasa de rábano
hsp:	"Heat shock protein"
IEF:	Isoelectroenfoque
LDH:	Deshidrogenasa láctica
LH:	Hormona luteinizante
MCI:	Masa celular interna
POPOP:	p-bis(2-(5-feniloxazolil)-benzeno)
PPO:	2,5-difeniloxazola
SDS:	Dodecil sulfato de sodio
TE:	Trofoblasto
Tris:	Tris (hidroximetil) aminometano
UI:	Unidades internacionales
V:	Volts
WGA:	Aglutinina de gérmen de trigo

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1: Sincronización de embriones.
- FIGURA 2: Análisis de los cambios temporales durante el desarrollo preimplantacional de ratón.
- FIGURA 3: Análisis de los cambios espaciales en blastocistos de ratón.
- FIGURA 4: Densitograma del gel de la Figura 2b.
- FIGURA 5: Cinética de la inhibición de la compactación.
- FIGURA 6: Efectos morfológicos de la inhibición de la compactación.
- FIGURA 7-10: Efecto de la inhibición de la compactación sobre la síntesis de proteínas.
- FIGURA 11: Efecto de Con A sobre la síntesis de proteínas.
- FIGURA 12: Efecto de Con A sobre la síntesis de proteínas: autorradiografía de gel bidimensional de embriones con 24 hC.
- FIGURA 13: Síntesis de los geles bidimensionales.
- FIGURA 14: Efecto morfológico de la inhibición de la actividad nuclear.
- FIGURA 15-17: Efecto de la inhibición de la actividad nuclear sobre la síntesis de proteínas.
- FIGURA 18: Replicación del DNA de embriones preimplantacionales.
- FIGURA 19: Resumen de los efectos de los tratamientos descompactantes sobre la síntesis de proteínas.
- FIGURA 20: Autorradiografía de los densitogramas de las

Figuras 7-10.

FIGURA 21: Autorradiografía de los densitogramas de la Figura 11.

FIGURA 22: Autorradiografía de los densitogramas de las Figuras 15-17.

FIGURA 23-26: Autorradiografías de geles bidimensionales.

3.1.4	Análisis de geles unidimensionales	29
3.1.5	Análisis de geles bidimensionales	29
3.1.6	Análisis de la incorporación de ³⁵ S-metionina .	30
3.2	Análisis de la síntesis de DNA	30
RESULTADOS		32
1.	Síntesis de proteínas durante el desarrollo preimplantacional	32
2.	Modificación de la forma celular: inhibición de la compactación	40
2.1	Efectos morfológicos	46
2.2	Efectos en la síntesis de proteínas	51
3.	Modificaciones de la actividad nuclear	65
3.1	Efectos morfológicos	65
3.2	Efectos sobre la síntesis de proteínas	68
DISCUSION		75
REFERENCIAS		87
APENDICE I		103
APENDICE II		112
APENDICE III		115
APENDICE IV		118
APENDICE V		123

RESUMEN

Durante el desarrollo preimplantacional de los mamíferos ocurren al menos dos procesos morfogénéticos importantes: compactación y blastulación. El primero se reconoce en el embrión de 8 células porque cada una pierde su forma esférica al aumentar el área de contacto con sus vecinas llegándose a formar un embrión esférico.

El segundo, blastulación o formación del blastocisto, se reconoce en el embrión de 24 a 50 células por el desarrollo de una cavidad interna circundada por dos poblaciones celulares, masa interna y trofotoderma, que se diferencian por su morfología y destino. Antes de la formación del blastocisto no hay diferenciación celular en el sentido convencional de diferenciación espacial ya que las células del embrión son iguales entre sí por su morfología y determinación; sin embargo, hay diferenciación temporal puesto que las propiedades de las células en cada ciclo son diferentes de las propiedades de las células del ciclo anterior.

La diferenciación temporal, simultánea con cambios morfológicos, como multiplicación celular y compactación, se reconoce por cambios en el patrón de síntesis protéica.

Se han propuesto y examinado experimentalmente distintos mecanismos reguladores de la síntesis de proteínas en el embrión preimplantacional de ratón y ha podido descartarse la participación de las divisiones celulares, las divisiones nucleares, el número de células, el tamaño del embrión y la relación núcleo/citoplasma. En esta Tesis proponemos otros dos

mecanismos posibles de regulación:

1) La síntesis de proteínas podría ser regulada por los cambios de los contactos o de la forma celular que ocurren durante la compactación. Esta proposición se basa en que en otros sistemas se ha descrito que una gran variedad de proteínas es regulada tanto a nivel transcripcional como traduccional por los cambios de forma o el establecimiento de contactos celulares, sugiriéndose que el mecanismo de regulación involucra al citoesqueleto.

2) La síntesis de proteínas podría ser regulada a nivel transcripcional o por los ciclos de replicación del DNA o por ambos a la vez. La regulación transcripcional de la síntesis de proteínas está bien comprobada y la necesidad de replicación del DNA para que la síntesis protéica sea normal ha sido demostrado en distintos sistemas, incluido el embrión preimplantacional de ratón aunque sólo durante el estado de una a dos células.

Con el fin de poner a prueba las distintas proposiciones hemos establecido métodos para sincronizar el desarrollo de una población de embriones y observar las modificaciones durante la compactación. Luego se inhibió con diferentes procedimientos cada uno de los dos mecanismos reguladores propuestos y se analizó por electroforesis uni o bidimensional en geles de poliacrilamida, el efecto de la inhibición sobre el patrón de proteínas sintetizadas por embriones previamente incubados con ^{35}S -metionina.

Nuestros resultados pueden resumirse como sigue:

1) Inhibición de la compactación.

EGTA, un quelante de Ca^{2+} , inhibe la compactación y modifica

en forma bastante generalizada el patrón de síntesis de proteínas, retrasando o inhibiendo totalmente la síntesis de diversos polipéptidos. Es posible que parte del efecto de EGTA sea inespecífico, al modificar procesos celulares dependientes de Ca^{2+} que no están relacionados con la compactación.

Concanavalina A (Con A), una lectina que se une a moléculas de superficie e interfiere con la compactación, induce cambios mucho más definidos en el patrón de síntesis de proteínas. Como algunos de estos cambios no se observan con los otros agentes descompactantes, podrían estar asociados a la activación por Con A de receptores de superficie que afectan la regulación de la síntesis de proteínas independientemente de la compactación.

Citochalasina, (CCD), α -Lactalbúmina (α -La), que interfieren con la compactación al inhibir el citoesqueleto y la β -galactosiltransferasa respectivamente, indujeron cambios semejantes (aumento o disminución) en el 75% de los 141 polipéptidos analizados en geles bidimensionales, de lo cual puede concluirse que el 25% de las proteínas restantes probablemente son afectadas por estos tratamientos en una forma independiente de la compactación. Del total de polipéptidos analizados, hubo 14 cuya síntesis cambió durante la compactación, y de éstos sólo uno fue afectado cuando la compactación era inhibida por CCD o por α -La, lo que sugiere que este polipéptido podría ser regulado por la compactación. Como este caso admite otras interpretaciones puede concluirse que el conjunto de nuestros resultados revelan que los cambios de forma celular durante la compactación probablemente no representan un mecanismo regulador del patrón de síntesis de proteínas por nosotros

estudiado.

2) Inhibición de la actividad nuclear.

Los experimentos de inhibición de la transcripción por α -amanitina sugieren que entre las 0 y las 6 horas después de la compactación se sintetizan proteínas utilizando mRNAs transcritos previamente, puesto que no se observó efecto del inhibidor, lo cual implica que los mRNAs pueden ser de larga vida y se traducen más tarde. Sin embargo, cuando la replicación del DNA fue inhibida por afidicolina durante el mismo período, el patrón de síntesis de proteína se modificó notablemente. Esto significa que dicho patrón podría estar regulado por ciclos de replicación en una forma independiente de la transcripción.

Cuando el tratamiento con afidicolina se prolongó hasta 24 horas después de la compactación, los embriones dejaron de sintetizar las proteínas que sintetizan los controles y además sintetizaron otras nuevas. Esto sugiere que el presunto "reloj" de la síntesis de proteínas, que regularía los cambios temporales, no es detenido al detener la replicación del DNA sino que funciona anormalmente, lo cual sugiere que la regulación de la síntesis de proteínas sería dependiente, pero no en forma exclusiva, de los ciclos de replicación del DNA.

En conclusión:

- 1) Una regulación de la síntesis de proteínas por cambios de los contactos o de la forma celular que ocurren durante la compactación no es confirmada por nuestros resultados.
- 2) Una regulación de la síntesis de proteínas por ciclos de replicación del DNA es compatible con nuestros resultados.

SUMMARY

During early development of mammals, at least two important morphogenetic processes are detected: compaction and blastulation. The former is recognized in 8-cell embryos because blastomeres lose their semispherical form as they flatten against each other and the embryo acquires a spherical contour. The latter is recognized in embryos having 24 - 50 cells as a blastocoel is formed surrounded by inner mass cells and trophoblast cells, which are different regarding their actual properties and their fate. Prior to blastulation there is no cell differentiation, in the conventional sense of spatial differentiation, but temporal differentiation becomes evident if cell properties in successive cell cycles are compared. This temporal differentiation has been detected by changes in the pattern of protein synthesis.

Diverse mechanisms involved in the regulation of protein synthesis in preimplantation embryos have been suggested and later discarded experimentally. Among these, the role of cell division, nuclear division, number of cells, embryo size and nucleus/cytoplasm ratio. Here we examine the role of changes in cell form or contact and the role of transcription or replication.

1. The effect of changes in cell form or cell contact on protein synthesis, through transcriptional or post-transcriptional mechanisms, has been described in a variety of cell types in vitro and the cytoskeleton seems to be basically involved; a regulation of this kind might operate during compaction. 2- The

effect of DNA replication on protein synthesis has also been described in different models, including in the mouse embryo at the 2-cell stage, and this kind of regulation might also operate in later stages.

In order to test these two proposals we have first established methods that synchronize development during compaction. In synchronized embryos we tested the effect of drugs that interfere with compaction and drugs that interfere with DNA replication or with transcription. The pattern of protein synthesis was studied by incubating embryos with ^{35}S -methionine and performing one- and two-dimensional electrophoresis.

Our results can be summarized as follows.

1. Inhibition of compaction.

EGTA affects the pattern of protein synthesis by retarding or preventing the synthesis of several polypeptides. However, these effects might be due to chelation of Ca^{2+} and not to specific changes in cell form or contact.

Con A interferes with compaction and causes precise changes in the pattern of protein synthesis. However, since some of the changes are not observed with other decompacting agents, all changes may not be ascribed to changes in form but rather to activation of Con A receptors on the cell surface.

Cytochalasin D (CCD) and alpha-lactalbumin (α -La), which interfere with compaction through inhibition of the cytoskeleton and of β -galactosyltransferase, respectively, induce similar changes in 75% of the polypeptides analyzed and therefore, other proteins changes may not be caused by decompaction. Of all

polypeptides analyzed, only the synthesis of 14 changes during compaction and out of these only 1 is affected similarly by CCD or α -La thus suggesting that its synthesis might be regulated by compaction. However, this observation also fits in with other possible interpretations and we would conclude that changes in cell form during compaction probably do not regulate the pattern of protein synthesis.

2. Inhibition of DNA replication or transcription.

Inhibition of transcription by α -amanitin suggest that proteins synthesis between 0 and 6 h postcompaction is based on mRNA's transcribed previously as the inhibitor does not affect the pattern. However, the inhibition of DNA replication by aphidicolin during the same period causes a distinct change of the pattern which means that its regulation by DNA replication does not depend on transcription. When aphidicolin treatment is extended up to 24 h postcompaction, the proteins found in control embryos are not detected but other proteins are observed thus suggesting that the developmental clock which probably regulates temporal differentiation works abnormally but is not completely arrested by the drug.

Our results allow us to conclude:

1. That we have not observed a distinct effect on the pattern of protein synthesis caused by changes in cell form or cell contacts during compaction.
2. That cycles of DNA replication are probably involved in the regulation of the patterns of protein synthesis.

INTRODUCCION

1. DESCRIPCION DEL DESARROLLO PREIMPLANTACIONAL DE RATON

1.1. Los cambios celulares: regionalización y diferenciación

El comienzo del desarrollo de los mamíferos ha sido descrito en diversas especies pero sólo en algunos animales de laboratorio, principalmente el ratón, se han analizado experimentalmente los procesos implicados. Sin embargo, la gran semejanza morfológica que se aprecia en los casos descritos, autoriza extrapolar a otros embriones los resultados experimentales obtenidos en algunas pocas especies (revisiones en 50, 62).

El huevo, rodeado por la zona pelúcida, se divide en dos blastómeros, aproximadamente 24 horas después de la fecundación y luego cada blastómero continúa dividiéndose, asincrónicamente, cada 10 a 12 horas (38). En esta etapa, denominada segmentación, aparecen los primeros contactos celulares, los cuales establecen una interacción celular que presumiblemente especifica un orden espacial en el embrión. De hecho, se observa que el citoesqueleto de la zona de contacto carece de miosina (106) y es en esa zona donde se detecta por primera vez espectrina (107).

Desde el estado de 4 células en embriones de ratón, ya sea incubados in situ o in vitro, y también en embriones de rata y de hamster in situ, es posible reconocer mediante técnicas citoquímicas la distribución regionalizada de algunas proteínas de la membrana plasmática como fosfatasa alcalina y 5'-nucleotidasa (51,53,71). Así puede distinguirse en los

blastómeros la región de contacto de la región expuesta al medio. Una regionalización similar de la membrana puede observarse usando lectinas y análogos de lípidos (42). La distribución en el espacio de estos componentes muestra que durante el comienzo del desarrollo, aunque no haya diferencias de destino entre células puesto que son equivalentes (totipotentes), hay un orden espacial reconocido por diferencias entre las partes de cada células (63, 72). Este fenómeno, que se ha denominado regionalización o especificación regional, puede observarse durante el desarrollo inicial de diversas clases animales y referirse tanto a partes celulares como a partes del embrión (104). La importancia de la regionalización en el embrión de mamífero radica en que una distribución espacial heterogénea de los componentes celulares parece ser necesaria para explicar la diferenciación celular observada más tarde en el blastocisto.

Antes de la blastulación, cuando el embrión tiene sólo 8 células, ocurre el proceso de compactación que es requisito para las etapas que siguen. La compactación se caracteriza morfológicamente por una pérdida de la forma esférica de los blastómeros y una disminución drástica de los espacios intercelulares. En una mórula no compactada es posible distinguir claramente los blastómeros; pero una vez ocurrida la compactación es difícil reconocer los límites celulares con el microscopio de luz y la mórula que tenía un contorno lobulado, adquiere uno esférico (27, 28). Con la compactación, la regionalización de la membrana plasmática se hace morfológicamente evidente y es posible distinguir una zona

apical de una baso-lateral en los blastómeros. Mediante microscopía electrónica de barrido se observa que las regiones con escasas microvellosidades corresponden a las áreas en contacto celular y las con abundantes microvellosidades a las áreas expuestas al medio exterior (103).

Durante la compactación los microtúbulos y los microfilamentos son redistribuidos (27, 59), las mitocondrias llegan a ocupar la región cortical (27) y se detecta una distribución polarizada de actividad de HRP en el citoplasma (98). Además, la participación del citoesqueleto en la compactación también se ha demostrado experimentalmente con modificadores del estado de polimerización de microtúbulos y microfilamentos. Es posible concluir que el cambio de forma necesita de activa polimerización de microfilamentos de actina, mientras que la participación de los microtúbulos es menos definida y dependería de la fase del ciclo celular (78). El citoesqueleto experimenta durante la compactación un cambio importante de organización espacial que probablemente explica las diferencias entre las etapas que pueden distinguirse con tratamientos descompactantes (véase Resultados, punto 2). Dicho cambio consiste en el establecimiento de conexiones formadas por microfilamentos de actina, que se observan con microscopía electrónica de barrido, extendiéndose entre los citoesqueletos de blastómeros adyacentes (véase detalle en Apéndice I).

Desde el punto de vista fisiológico, uno de los rasgos más notables de la compactación es el establecimiento de las primeras uniones celulares. Estas son de tipo 'gap junction',

como se reconoce por su ultraestructura típica al microscopio electrónico, por el acoplamiento iónico que demuestran los estudios electrofisiológicos y por el paso de péptidos fluorescentes entre los blastómeros (27, 36, 70, 76, 80).

Durante la compactación ocurren cambios en la adhesividad de los blastómeros que corresponden a la expresión de algunas glicoproteínas cuya función depende de la presencia de Ca^{2+} en el medio como la ovomorulina (48) o la β -galactosiltransferasa (5).

El conjunto de los cambios descritos define a lo menos dos regiones distintas en cada célula: la región que corresponde a la periferia del embrión y la región que corresponde al centro del embrión. Este orden espacial parece anticipar la primera diferenciación celular detectada al día siguiente, cuando las células periféricas de la mórula formarán el trofoblasto del blastocisto y las células centrales su masa celular interna (revisión en 50).

Cinco a seis horas antes de la formación del blastocisto las regiones apicales de los blastómeros externos de la mórula avanzada se sellan entre sí mediante complejos de unión, que comprenden 'tight junction' (52) y desmosomas, los cuales tienen asociados manojos de filamentos intermedios (55). Con el sellamiento entre los blastómeros periféricos, el embrión se hace impermeable y ya no penetran al interior trazadores como el lantano (52). Luego aparece el blastocelo, una cavidad que se expande por el vaciamiento de líquido acumulado en el citoplasma de los blastómeros y también por el transporte activo de iones hacia el interior del embrión (7).

El blastocisto se forma normalmente cuando el embrión tiene entre 24 y 30 células (30b, 115).

Johnson y colaboradores (62) han propuesto que la polarización de los blastómeros durante el estado de 8 células da cuenta del establecimiento de los dos linajes celulares que se reconocen por primera vez en el blastocisto, suponiendo que las divisiones celulares son paralelas a la superficie de la mórula compactada, lo que generaría células externas e internas distintas.

Como consecuencia de la multiplicación celular y del sellamiento, los blastómeros centrales de la mórula quedan en un microambiente diferente del medio externo, al cual no están expuestos los blastómeros periféricos. La diferencia de microambiente o la sola diferencia de posición de los blastómeros en la mórula se ha invocado como causa de la diferenciación de las células externas hacia trofoblasto y de las internas hacia masa celular. Este modelo, que se ha denominado "adentro-afuera" fue formulado primeramente por Tarkowski y Wróblewska (112).

1.2. Los cambios moleculares: expresión génica.

En la sección anterior se describieron algunas moléculas que aparecen o se redistribuyen durante el desarrollo preimplantacional. A continuación se describirán los cambios moleculares que tienen una relación más directa con la actividad génica; es decir, cambios en los niveles de mRNA que son producto de la transcripción de genes del embrión o de la degradación del RNA materno y cambios en la síntesis de

proteínas traducidas a partir de mRNAs sintetizados durante la ovogénesis o sintetizados por el embrión.

Se ha observado usando geles uni y bidimensionales que el patrón electroforético de las proteínas del embrión cambia durante todo el desarrollo preimplantacional y se han encontrado también algunos polipéptidos que corresponderían a distintas etapas del desarrollo (75). Estos polipéptidos han sido identificados como el complejo de proteínas de 68/70 Kd llamado hsp ("heat shock protein") que aparecen en una fase temprana del estado de 2 células (8), las proteínas ribosomales que aumentan más de 11 veces entre el huevo no fertilizado y la mórula compactada (69), la tubulina y la actina cuya síntesis crece notablemente después del estado de 8 células (1). Sin embargo hay un número muy grande de polipéptidos, cercano a 50, de los cuales se sabe que su síntesis cambia durante el desarrollo preimplantacional pero que no han sido identificados, conociéndose de ellos sólo su peso molecular, su punto isoeléctrico y su ubicación nuclear o citoplasmática (47).

Hasta la blastulación, cuando se diferencian la masa celular interna del trofoblasto, los cambios de expresión génica en el curso del tiempo no se observan a través del espacio; por lo tanto, se trata de una diferenciación temporal, en que las células se distinguen de sus progenitoras y no de una diferenciación espacial, en que las células se distinguen de células contemporáneas en diferente localización. La diferenciación temporal se comprueba comparando eventos del desarrollo inicial y el análisis se dirige a los mecanismos que

regulan el orden temporal o dicho de otra manera, se analiza el "reloj del desarrollo" que señala cuándo debe ocurrir cada evento. Los eventos iniciales - como división celular, regionalización, compactación - se comparan por referencia a lo que en este campo se denomina patrón de síntesis protéica que describe el resultado final de la expresión génica teniendo en cuenta los cambios más destacados.

Los cambios generales en el patrón de síntesis protéica son muy parecidos entre las distintas especies estudiadas y se encuentran escasas diferencias entre ratones, conejos y humanos (16,115); pero debe tenerse en cuenta que los estudios más acuciosos se han limitado al primer y segundo ciclo celular del embrión de ratón.

Durante el estado de 1 célula hay poca o ninguna síntesis detectable de RNA (94,119) y la enucleación física o química no afecta algunos de los cambios moleculares que han sido reconocidos antes del estado de 2 células (15, 31, 46, 91, 101, 114). Estas observaciones sugieren que dichos cambios podrían ser regulados exclusivamente a nivel postranscripcional, presumiblemente utilizando componentes maternos heredados del ovocito. Así, el ovocito maduro ovulado, puede considerarse una célula altamente especializada, preparada para operar el mecanismo del control postranscripcional que gobierna el desarrollo del estado temprano de 2 células. Este mecanismo podría entrar en operación por la fecundación y producir cambios moleculares y morfológicos que conducen a la primera división celular y a la activación del genoma embrionario.

Durante el segundo ciclo celular, siempre en el ratón, ocurre la transición del control del desarrollo desde el genoma materno al embrionario (94), con lo que el control del desarrollo deja de ser sólo postranscripcional, como en el ciclo anterior, pasando a depender también de los cambios transcripcionales. Se ha establecido que la activación transcripcional procede en dos fases. La primera, sensible a α -amanitina, ocurre una hora después de la primera segmentación y causa la síntesis inmediata del complejo de polipéptidos de peso molecular de 68/70 Kd identificados como hsp (8), la cual es independiente de la replicación del DNA (45). La segunda fase de actividad transcripcional ocurre 8 a 9 horas después del clivaje, durante G2, causando un importante cambio en la síntesis protéica que es necesaria para la segunda división de segmentación (13, 31, 35). Los cambios en esta segunda fase son independientes de la replicación del DNA inmediatamente precedente (segunda replicación), (13, 92); sin embargo, experimentos con inhibidores de la síntesis de DNA como fluoro-desoxiuridina y afidicolina muestran que esta segunda fase tiene un requerimiento absoluto de la primera replicación del DNA (la fase S del ciclo precedente), aunque la primera división celular sea innecesaria (45).

Alrededor de un 40 % del RNA materno presente en el huevo ovulado es degradado en el estado de 2 células y otro 30% lo es en el estado de blastocisto temprano (6). Después de un pequeño aumento inicial siguiendo la fecundación, el total del contenido de poli A decae alrededor de un 70% durante el

estado de 2 células tardío, seguido por un aumento aproximado de 5 veces entre el estado de 2 células y el estado de blastocisto temprano (74, 94). El aumento en el contenido de poli A desde el estado de 2 células en adelante coincide con un aumento similar en el contenido de RNA total, como resultado de una mayor velocidad de síntesis del RNA embrionario, y de un aumento de alrededor de 5 veces de la estabilidad del mensajero embrionario durante la transición mórula-blastocisto (19, 20, 66, 74, 94). Aunque el mRNA embrionario recién sintetizado aparentemente de cuenta de sólo un tercio del RNA poliadenilado presente al final del estado de 2 células (21) y la cantidad de mRNA sin poli A es desconocida, no hay evidencias directas para un rol del mRNA materno durante estados más avanzados.

El uso de las técnicas de DNA recombinante ha demostrado la existencia de mRNA de actina y de histona H3 en el huevo no fecundado. Estos mRNAs disminuyen notablemente en el estado de 2 células tardías y desde el estado de 8 células al estado de blastocisto se observa un progresivo aumento en su contenido por embrión, aunque proporcional al número de células. Además, el mRNA de actina es parcialmente degradado en el estado de 1 célula y cae cerca del límite de detección en el estado de 2 células tardío, mientras que el mRNA de hipoxantina fosforibosiltransferasa no muestra ningún cambio en el embrión de 2 células inicial y declina durante el estado de 2 células avanzado. De estos resultados se concluye que cada mRNA tiene su propio patrón de cambio, expresado en la longitud de la cola de poli A y en su degradación, durante

el período de control materno de la síntesis de proteínas y, que en general, los mRNAs maternos remanentes en el embrión de 2 células temprano son degradados a bajos niveles en el estado de 2 células tardío (35, 39, 88).

Una serie de fenómenos celulares han sido invocados para dar cuenta de los cambios moleculares iniciales y en estados más avanzados del desarrollo preimplantacional. Entre ellos destacan las divisiones celulares, las divisiones nucleares, la relación núcleo/citoplasma, el tamaño del embrión y el número de células.

Si el clivaje de un huevo de ratón fertilizado es inhibido con citochalasin, este se hace tetraploide durante el siguiente día de cultivo. Sin embargo, el patrón electroforético bidimensional de las proteínas que estos embriones sintetizan coincide con el de los embriones controles, lo cual sugiere que la traducción estado específica en estos embriones es independiente de la división y de las interacciones celulares (92). Si los huevos fertilizados son continuamente expuestos a afidicolina, el clivaje y la replicación del DNA son inhibidos, manteniéndose la síntesis de proteínas como en los huevos fecundados; sólo unos pocos polipéptidos nuevos aparecen después de un día y en los días siguientes estos huevos detienen completamente la traducción. Estos resultados se han interpretado como evidencia de un control de la traducción estado específico que es dependiente de replications de DNA y no lo es de un reloj citoplasmático; pero es muy difícil descartar un efecto inhibitorio inespecífico de la afidicolina sobre la síntesis

proteica en tratamientos tan prolongados (93).

Si se hacen quimeras de 2, 4, 8 y 16 embriones con 3 días de desarrollo, modificándose el número de células, las interacciones entre ellas y el tamaño del embrión, no se altera la activación de los genes embrionicos de LDH, lo cual sugiere que ninguno de estos factores modificarían la expresión de estos genes (102).

En embriones de Xenopus laevis se ha mostrado que una determinada razón núcleo/citoplasma es requerida para los eventos de transición de mórula a blástula y para la activación del genoma embrionico (84). También se ha encontrado en el desarrollo temprano de *Drosophila*, que cuatro ciclos antes de la división del blastodermo terminal, la razón núcleo/citoplasma determina, a través de la duración de los ciclos mitóticos, la transcripción en el embrión (29).

En huevos de ratón, la razón núcleo/citoplasma ha sido modificada por extracción o inyección de citoplasma o por bisección de huevos para dejar ambos pronúcleos en la mitad del citoplasma. Cuando el patrón electroforético de las proteínas sintetizadas es analizado por electroforesis en geles bidimensionales se observa que los embriones bisectados de 2 y 4 células con razones núcleo/citoplasma doble y normal expresan patrones de síntesis de proteínas equivalentes a los de los embriones controles; tampoco se modifica la expresión del antígeno de superficie estado específico SSEA-1, el cual aparece normalmente en el estado de 6-8 células. Estos resultados se han interpretado como que la actividad génica característica del estado, en el ratón es independiente de la

razón núcleo/citoplasma (90).

Además de los cambios moleculares temporales que hasta aquí se han descrito ocurren cambios moleculares espaciales, los que son coincidentes con las diferenciaciones celulares observadas por primera vez en el blastocisto. Cuando se estudian las proteínas del trofoblasto, aislado por microcirugía, y las de la masa celular interna aislada por inmunocirugía, se observa que cada uno de estos tejidos contiene algunos polipéptidos comunes y otros exclusivos. Los polipéptidos exclusivos de la masa celular interna aparecen en morúlas de 3,5 días de edad, ubicados en las células internas del embrión. Cuando grupos de células internas son aislados por inmunocirugía y cultivados in vitro, son capaces de generar las proteínas del trofoblasto, revelando así las propiedades de regulación embrionaria características de la masa celular interna. Estos resultados sugieren que la diferenciación celular observada en el blastocisto empieza por lo menos en el estado de mórula y que las células internas de ésta mórula se diferencian en las células de la masa celular interna, aunque dicha diferenciación sea reversible (41, 58, 116).

Hasta ahora no se han identificado los agentes causales de los cambios moleculares espaciales y temporales que ocurren en el desarrollo preimplantacional del embrión, pero en general se ha propuesto que estos cambios estarían dirigidos por un programa de desarrollo probablemente ubicado en el DNA nuclear.

2. CONSIDERACIONES GENERALES E HIPOTESIS DE TRABAJO

Los fenómenos que ocurren durante el desarrollo inicial han sido seleccionados, analizados y agrupados en una tesis general, no siempre explícita, que sostiene lo siguiente: **el desarrollo es una secuencia lineal de eventos relacionados entre sí por un programa genético que los ordena temporalmente.**

Hay evidencias experimentales y argumentos teóricos para sugerir que dicha tesis no ofrece una explicación satisfactoria del desarrollo (ver Apéndice II).

Como alternativa a las ideas arriba analizadas se puede plantear que **los distintos eventos del desarrollo se inscriben en una red (o malla) de relaciones causales con carácter histórico.**

El carácter general de estos conceptos alternativos impide que puedan ser probados experimentalmente, sin embargo, al entender el desarrollo inicial de mamíferos como un proceso histórico - por oposición a programático - de relaciones causales reticulares - por oposición a relaciones causales lineales -, podría predecirse que la actividad génica controla distintos procesos del desarrollo los que a su vez modifican la actividad génica.

Hay muchas demostraciones experimentales de que los procesos de actividad génica regulan distintos eventos del desarrollo (27, 33, 40, 82), y recientemente también se ha acumulado una gran cantidad de información que sugiere la relación inversa: los contactos y cambios de forma celular modularían la actividad génica.

Se ha observado que distintos tipos celulares, como células

Hela, fibroblastos 3Te, células T, condrocitos, células gliales, o hepatocitos, sintetizan una variedad de productos génicos (c-myc, c-fos, rRNAs, mRNA de actina, receptor de interleuquina 2, proteoglicanos, mRNA de glutamina sintetasa, etc.) dependiendo de los contactos o la forma de las células (11, 23, 25, 67, 83, 97, 117). Se ha sugerido que en el mecanismo de estos procesos participarían elementos del citoesqueleto los que dependiendo de su estructura o composición regularían la biosíntesis de proteínas (3, 72, 87).

Sobre la base de los conceptos alternativos nos apoyamos para proponer dos explicaciones que podrían dar cuenta de los cambios en síntesis de proteína que ocurren después de la compactación del embrión de ratón.

1) Los cambios de síntesis protéica son modulados por los cambios de los contactos o de la forma celular que se observan en la compactación.

2) Los cambios de síntesis protéica son modulados por actividades nucleares y en especial por ciclos de replicación del DNA.

Con el objeto de analizar experimentalmente estas proposiciones estudiamos los cambios en la síntesis de proteínas de los embriones después de la compactación, tanto en condiciones normales como en aquéllos en que se ha inhibido la compactación (explicación 1), o de los ciclos de replicación del DNA (explicación 2).

MATERIALES Y METODOS

I. MATERIAL BIOLÓGICO.

1.1 Obtención de embriones preimplantacionales.

Hembras de ratón de 6 a 8 meses de edad de la cepa CF1 (adquiridas en el Instituto de Salud Pública) fueron inducidas a superovular con una inyección intraperitoneal de 4 UI de gonadotropina de suero de yegua preñada (Sigma), seguida 44 h después por una inyección intraperitoneal de 5 UI de gonadotropina coriónica humana (Sigma). Las hembras se cruzaron con machos Swiss-Rockefeller o con machos CF1. Se reconoció la fecundación por la presencia del tapón vaginal. Las hembras fueron sacrificadas por dislocación cervical y se expuso la vía genital para aislar el oviducto o el útero. Se recolectaron embriones de 1, 2, 4 y 8 células y mórulas avanzadas por perfusión de los oviductos, o blastocistos por perfusión del útero, con medio Biggers (12) suplementado con 4 mg de BSA por ml. Para determinar la edad de los embriones se definió como inicio del desarrollo la hora 0 del día en que se observó el tapón vaginal. Embriones de 1, 2, 4 y 8 células, mórulas avanzadas y blastocistos de 2 edades distintas se colectaron a las 12, 26, 36, 50, 56, 58 y 92 horas de desarrollo respectivamente.

Composición del medio Biggers (12).

NaCl 94,59 mM; KCl 4,78 mM; KH_2PO_4 1,19 mM; MgSO_4 1,19 mM; NaHCO_3 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; Estreptomina 0,050 mg/ml.

1.2 Obtención de ovocitos

Hembras inducidas a superovular como se describió en el párrafo anterior fueron sacrificadas 22 a 26 horas después de la inyección de gonadotropina coriónica humana. Se perfundió el oviducto con medio Biggers y los cúmulos liberados que contenían los ovocitos se incubaron con 300 $\mu\text{g/ml}$ de hialuronidasa en Biggers para despojarlos de las células foliculares. Los ovocitos fueron lavados y cultivados en Biggers suplementado con albúmina en la misma forma que el resto de los embriones.

1.3 Cultivo de embriones

Los embriones obtenidos en los distintos estados preimplantacionales se cultivaron con microgotas de medio Biggers con albúmina bajo aceite mineral a 37°C en una atmósfera húmeda con 5% de CO_2 durante distintos períodos de tiempo según el protocolo experimental. En algunos casos la microgota contenía además uno de los inhibidores ensayados.

Los cambios morfogénéticos, como compactación y blastulación, fueron observados bajo un microscopio estereoscópico en la misma cápsula de cultivo. Los embriones

fueron sincronizados y seleccionados según la compactación, como se describirá en la sección **Resultados**, por lo cual, en las series experimentales se expresa el tiempo en horas desde la compactación (hC), que es el tiempo contado después que ha ocurrido la compactación en el 50% de los embriones controles. Los embriones se fotografiaron en un microscopio Zeiss usando óptica de Nomarski.

1.4 Sincronización de embriones

Puesto que uno de nuestros objetivos es relacionar el proceso morfogénético de la compactación (Fig. 1a, b) con los cambios en el patrón de la síntesis de proteínas, hemos diseñado diversos métodos cuyas ventajas e inconvenientes hemos comparado sistemáticamente con el propósito de establecer el método óptimo para sincronizar precisamente los embriones en esa etapa del desarrollo.

Cuando se extrajeron los embriones, a las 55-60 horas post coitum, provenientes de un grupo de hembras que han sido inducidas simultáneamente a superovular y se observó el porcentaje de embriones compactados, se comprobó que el lapso de compactación de la población, es decir, el tiempo que transcurrió entre que se compactan los primeros y los últimos embriones, fue de 5 a 6 horas (Fig. 1c). Este lapso es función del tiempo que demora en compactarse cada embrión y también de la asincronía en el desarrollo de éstos. En vista de que un lapso de compactación de la población mucho mayor que el lapso de compactación de cada embrión podía introducir cierta ambigüedad en las observaciones, diseñamos tres métodos de sincronización con el propósito de

acortarlo, cuyos resultados se informan a continuación.

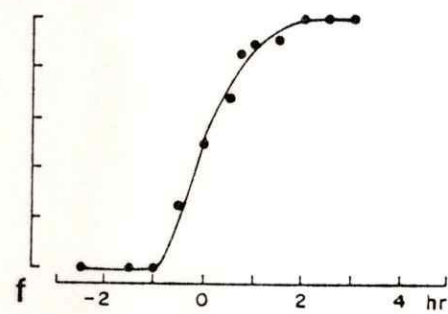
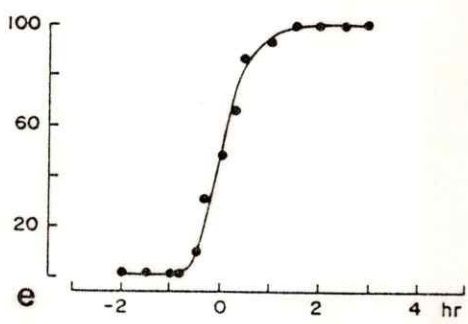
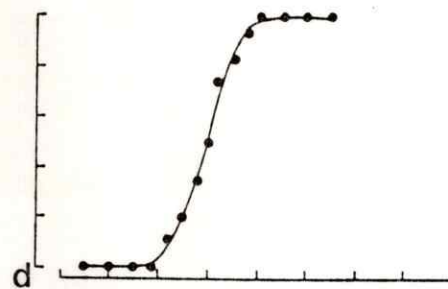
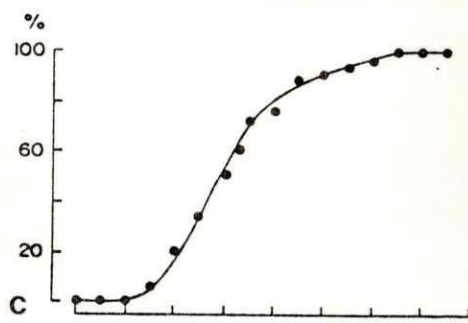
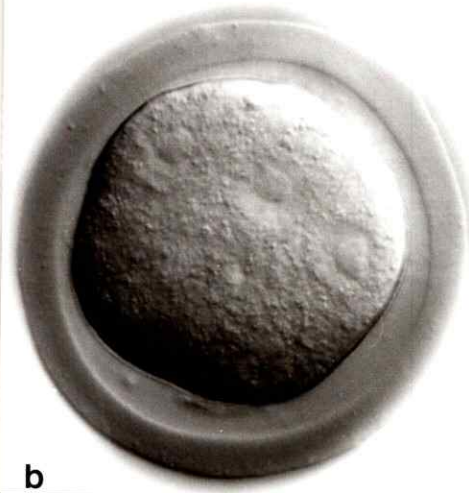
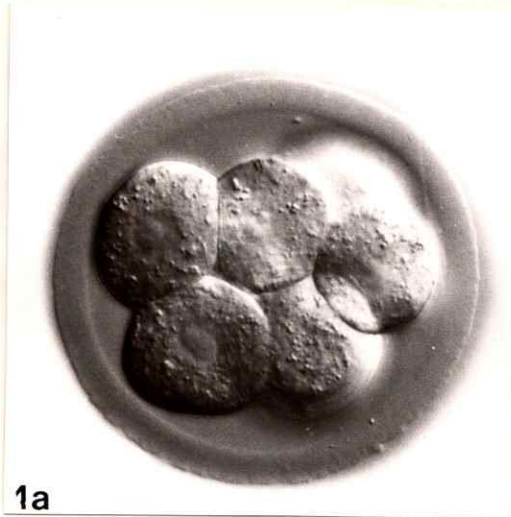
1.4.1 Sincronización por selección de los embriones por compactación en un lapso determinado.

Observando la compactación de embriones proveniente de hembras superovuladas se comprobó que a las 2 horas desde que se compactaron los primeros embriones se había compactado entre un 50 y 70% de la población. La sincronización consistió en eliminar los embriones no compactados en ese plazo (aproximadamente un 40%, Fig. 1d). En esta serie se realizaron 7 ensayos independientes con un total de 87 embriones.

1.4.2 Sincronización de los embriones según el momento de la segunda división celular.

En embriones obtenidos de hembras ovuladas en el estado de dos células tardío (40 horas post coitum) se observó la aparición del estado de 3 células al producirse la división de uno de los dos primeros blastómeros. La sincronización consistió en seleccionar los embriones en los que el estado de 3 células había ocurrido en el plazo máximo de una hora. Estos se cultivaron in vitro hasta el estado de 8 células y se observó la compactación, encontrándose que el lapso de compactación de la población fue de aproximadamente 2 horas (Fig. 1e). En esta serie se realizaron 5 ensayos con un total de 30 embriones. Aún cuando el método sirvió para sincronizar el desarrollo, el porcentaje de embriones que se divide en el plazo fijado corresponde solamente al 20 a 30% de la población.

Figura 1. **SINCRONIZACION DE EMBRIONES.** (a) Embrión de 8 células no compactado; (b) Embrión de 8 células compactado. Diámetro aproximado del embrión incluyendo zona pelúcida 75 μm . Ordenada: % de embriones compactados; abscisa: tiempo relativo momento de la compactación; (c) Compactación en una población asincrónica de embriones; (d) Compactación de una población embriones sincronizada por eliminación de los embriones compactados en el lapso de 2 horas; se realizaron 7 ensayos con un total de 83 embriones. (e) Compactación de una población embriones sincronizados por selección de los embriones en los que ocurre la segunda segmentación en el lapso de 1 hora; se realizaron 5 ensayos con un total de 30 embriones. (f) Compactación de una población de embriones provenientes de una sola hembra; se realizaron 3 ensayos con un total de 30 embriones.



1.4.3 Sincronización por utilización de los embriones obtenidos solamente de una hembra.

Observando la compactación de embriones provenientes de cada hembra por separado encontramos que el tiempo de compactación de cada grupo fue algo mayor que 2 horas (Fig. 1g). Para estas observaciones realizamos 3 ensayos con un total de 40 embriones. Aunque este método de sincronización de la compactación es eficaz, el número de embriones provenientes de una sola hembra es muy escaso (15 a 20 embriones) e insuficiente para algunos experimentos.

En base a estas comparaciones elegimos el método 1.4.1, la sincronización por selección de los embriones compactados en un lapso determinado, ya que además de ser de fácil realización entrega un número suficiente de embriones sincronizados para nuestros experimentos de marcación de proteínas. Hemos adoptado una medida de tiempo, denominada horas de compactación (hC) que se basa en definir como hora 0 (0hC) el momento en que ha compactado el 50% de los embriones controles sincronizados por el método 1.4.1.

1.5 Inmunocirugía (108) de Blastocistos

Blastocistos de aproximadamente 68 horas de desarrollo fueron incubados a 37°C por 30 minutos en 50 μ l de Biggers con BSA más 50 μ l de anticuerpos monoclonales, luego fueron lavados en Biggers con albúmina e incubados, por 4 minutos a 37°C, en 90 μ l de Bigger BSA más 5 μ l de complemento. Una vez que se observó la lisis de las células de trofoblasto, las masas celulares internas fueron lavadas en Biggers para eliminar los restos de

células trofoblásticas. Los anticuerpos monoclonales, cedidos por María Inés Becker, fueron obtenidos por inmunización de ratones con células de teratocarcinoma y seleccionados por su reactividad cruzada con embriones preimplantacionales de ratón.

1.6 Tratamientos de los embriones

En todos los tratamientos con inhibidores, los embriones que habían sido cultivados en medio Biggers normal fueron lavados por aproximadamente 1 minuto en Biggers que contenía el inhibidor y luego cultivados en microgotas del mismo medio bajo aceite mineral en las condiciones descritas. La viabilidad de las células después de cada tratamiento fue comprobada con la tinción vital de eosina amarillenta.

1.6.1 Inhibición de la compactación

La compactación se modificó con los siguientes agentes, cuyo mecanismo inhibitorio es explicado en la sección Resultados: EGTA, citocalasina D (CCD), concanavalina A (Con A), alfa lactalbúmina (α -La).

En el tratamiento con EGTA se reemplazó Ca^{2+} por Na^+ en el medio de Biggers suplementado con albúmina. Sin embargo, debido a las trazas de calcio que contamina muchos reactivos, esta solución de Biggers sin Ca^{2+} tiene aún alrededor de 9 μM de calcio (Apéndice I), lo que es suficiente para permitir la compactación, aún cuando ésta sea retardada. Al agregar EGTA a este medio, fue quelado el calcio contaminante dejando así un medio en que los embriones no se compactan o se descompactan si estaban previamente compactados.

Se probaron distintas concentraciones de EGTA y se encontró que la viabilidad de los embriones disminuía a concentraciones sobre 1 mM y que la velocidad de descompactación disminuía a concentraciones bajo 0,5 mM. En definitiva se usó 0,5 mM de EGTA, solución en la cual una población de embriones recién compactados se descompacta en menos de 1 minuto y no causa muerte celular en cultivos de hasta 24 horas.

En el tratamiento con DCD se usó 0,5 µg/ml, que era la menor concentración que inhibía la segmentación (54). La incubación con Con A fue hecha con 100 µg/ml según Reewe (99).

En el caso de α-La, que ha sido descrito como inhibidor de la adhesión en teratocarcinomas (5), se usó un 0,2% en Biggers que tenía 2 o 4 mg/ml de albúmina. No encontramos diferencias en la compactación o blastulación entre estas dos concentraciones de albúmina, por lo que en los siguientes experimentos usamos 9 mg/ml.

1.6.2 Inhibición de la actividad nuclear

Las actividades nucleares inhibidas fueron la replicación y la transcripción.

La replicación fue inhibida con 2,5 µg/ml de afidicolina como describen Spindle y colaboradores (109). Nosotros comprobamos que la droga inhibía totalmente la incorporación de ³H-timidina en blastocistos.

Para inhibir la transcripción se usaron dos concentraciones de α-amanitina, 1 y 15 µg/ml, que han sido utilizadas como inhibidores de las RNA polimerasas II y II + III respectivamente (73, 100). También se observó, midiendo la incorporación de ³H-

timidina al DNA, si los tratamientos con α -amanitina modificaban la replicación.

Durante estos dos tratamientos de inhibición de la actividad nuclear se observó la morfología de los embriones tratados al tiempo en que los embriones controles se compactaban o blastulaban.

2. MARCACIONES IN VIVO

2.1 Marcación de proteínas

En cada uno de los tratamientos los embriones fueron incubados bajo aceite mineral en microgotas de 30 μ l de Biggers que contenía 2 μ Ci/ μ l de 35 S-metionina (actividad específica 1000-1400 Ci/mmol, Amersham). Para geles unidimensionales se incubaron grupos de 20 embriones durante 2 horas y para bidimensionales grupos de 40 embriones durante 4 horas. Después de la incubación los embriones fueron lavados varias veces en medio Biggers a 37°C para eliminar la albúmina del cultivo y puestos en grupos de 5 a 7 embriones en 10 μ l de Tampón de muestra para los geles unidimensionales y en grupos de 30 a 40 embriones en 10 μ l de Tampón de lisis para los geles bidimensionales. Estas muestras fueron guardadas a -70°C hasta el momento de usarlas.

2.2 Marcación de DNA

Grupos de 40 embriones en estado temprano de 8 células fueron incubados bajo aceite mineral en gctas de 50 μ l de Biggers con 1 μ Ci/ml de 3 H-timidina (actividad específica de 20 Ci/mmol, Amersham) durante 24 horas en cada uno de los tratamientos. Al

final de la incubación los embriones fueron lavados y fijados sobre portaobjetos por la técnica de secado al aire (111). Para el análisis de la síntesis de DNA ver sección 3.2 de Materiales y Métodos.

3. ANALISIS DE LOS PRODUCTOS MARCADOS

3.1 Análisis de la síntesis de proteínas

3.1.1 Geles unidimensionales

En ensayos preliminares se hicieron geles de poliacrilamida-SDS (68) en gradientes de 7 a 15% y se determinó que la mayor cantidad de proteínas de embriones preimplantacionales podría resolverse en geles al 10%.

También se comparó la resolución de geles convencionales de 15 cm con minigeles de 7 cm, encontrándose que aún cuando los geles de mayor tamaño eran más resolutivos la diferencia no era significativa en cuanto al patrón de síntesis de proteínas.

Los geles unidimensionales que más frecuentemente usamos fueron geles de poliacrilamida-SDS al 10% de 0,04 cm de espesor, 5,5 cm el gel separados y 1,5 cm el gel concentrador.

Las muestras que habían sido congeladas en Tampón de muestra fueron congeladas y descongeladas por 3 veces, denaturadas por ebullición durante 5 min y corridas en el gel a 100 V y 150 V por aproximadamente 2 horas.

Tampón de muestra

Tris HCl 0,0625 M (pH 6,8); SDS 2%; 2-mercaptoetanol 5%; glicerol 10%; azul de bromofenol 0,002%.

Junto con las muestras se corrió un patrón de proteínas preteñidas: α 2-macroglobulina, 180 Kd; β -galactosidasa, 116 Kd; fructosa-6-P-quinasa, 84 Kd; piruvato quinasa, 58 Kd; fumarasa, 48,5 Kd; deshidrogenasa láctica, 36,5 Kd; triosa-P-isomerasa, 26,6 Kd; (Sigma).

3.1.2 Geles bidimensionales

La primera dimensión se corrió, con algunas modificaciones de la técnica de O'Farrell (86), en tubos cilíndricos de 12 cm de largo y 0,3 cm de diámetro interior. Los tubos fueron lavados en mezcla sulfocrómica, agua destilada, etanol y secados al aire a temperatura ambiente; luego se llenaron con la mezcla para isoelectroenfoque, la que se dejó polimerizar por aproximadamente 15 horas cubriendo la parte superior del gel con agua destilada.

Después que el gel polimerizó se retiró el agua de la parte superior y se reemplazó por Tampón 0 durante 1 hora, luego se aspiró este tampón y se equilibró con Tampón de lisis (20 μ l) más 10 μ l de agua durante otra hora.

Se lavó con agua y se colocó en la cámara de electroforesis con H_3PO_4 10 mM en cámara inferior (polo positivo) y NaOH 20 mM en la superior (polo negativo). Se cargaron 25 μ l de Tampón de

lisis y se recorrió 15 min a 200 V, 30 min a 300 V y 30 min a 400 V. Después se retiró el NaOH de la cámara superior y se cargó la muestra, previamente congelada y descongelada por tres veces, cubriéndola de 10 μ l de Tampón D. Se rellenó la cámara superior con NaOH y la electroforesis se corrió a 325 V por 16 horas y 800 V por una hora.

Después de estas operaciones, los geles fueron equilibrados por dos períodos de 1 hora en 5 ml de Tampón de muestra-SDS. Algunos geles fueron guardados en este Tampón a -20°C .

La segunda dimensión se corrió en un gel de poliacrilamida-SDS de 0,8 cm de grosor, compuesto por un gel separador de 10% y un gel concentrador de 4% de 10 y 4 cm de largo respectivamente.

El gel de la primera dimensión fue sellado sobre el gel concentrador con agarosa al 1% en Tampón de muestra-SDS.

La electroforesis se corrió a 20 mA por alrededor de 4 horas.

Mezcla para isoelectroenfoque

Urea (Merck) 2,75 g; acrilamida 28,38%-bisacrilamida 1,52% (Biorad) 0,67 ml; Nonidet P-40 10% (Sigma) 1 ml; anfolitos (pH 5-8, Sigma), 0,2 ml; anfolitos (pH 3,5-10, Sigma), 0,98 ml de agua, 0,05 ml; Temed (Merck) 3 μ l; persulfato de amonio 10% (Merck) 5 μ l.

Tampón D

Urea, 9 M; anfolitos (pH 5-8), 0,8%; anfolitos (pH 3,5-10) 0,2%;
2-mercaptoetanol (Sigma) 5%.

Tampón de lisis

Urea, 9,5 M; anfolitos (pH 5-8) 1,6%; anfolitos (pH 3,5-10),
0,2%; 2-mercaptoetanol 5%; Nonidet P-40 2%.

Tampón de muestra- SDS

SDS, 2,3%; 2-mercaptoetanol, 5%; glicerol, 10%; Tris HCl (pH
6,8), 62,5 mM.

3.1.3 Fluorografía de geles

Los geles uni o bidimensionales fueron puestos en ácido acético por dos periodos de 30 min cada uno, luego en 4 volúmenes de PFO (Sigma) en ácido acético al 20% (w/w) por 3 horas y finalmente colocados en agua por 1 hora (14).

Los geles se secaron entre hojas de papel celofán a 40°C por alrededor de 3 horas y se expusieron a una película de rayos X (Kodak X-Omat R) a -20°C.

La exposición a la película de rayos X se realizó por distintos periodos de tiempo para encontrar el tiempo óptimo.

3.1.4 Análisis de geles unidimensionales

Los geles fueron revelados por las técnicas convencionales y se midió la absorbancia de las bandas con un densitómetro Gelman ACD-15.

Para hacer un análisis cualitativo del patrón electroforético total se analizó la incorporación de ³⁵S-metionina a algunas proteínas definidas por su migración electroforética, para estas proteínas se comparó su área en el densitograma en relación con su área total, analizando las variaciones de estos valores con el tiempo de desarrollo y cada uno de los tratamientos (para detalles véase Apéndice III). El análisis de estas proteínas tiene valor sólo como una representación de los rasgos distintivos del patrón electroforético total, por lo que no hemos hecho una interpretación de los resultados obtenidos para cada proteína por separado.

3.1.5 Análisis de geles bidimensionales

La película de rayos X fue revelado por las técnicas convencionales después de exposiciones variables al gel por 5 a 60 días. Como el patrón electroforético total observado por series bidimensionales resulta de una gran complejidad nosotros analizamos las proteínas individuales sintetizadas. Para el análisis de las proteínas sintetizadas por los controles las placas (de 3 a 4 para un mismo tiempo de desarrollo) fueron copiadas en transparencias y luego sobrepuestas para eliminar los polipéptidos que no estaban presentes en todas. Con este procedimiento se eliminaron cerca de 30 marcas de un total de 170

que aparecían en los controles. Las 140 proteínas restantes sirvieron para construir una matriz con la que se compararon las transparencias construidas de cada uno de los tratamientos (2 a 3 placas para un mismo tipo y tiempo de tratamiento).

Por este procedimiento sólo detectamos presencia o ausencia de proteínas. La presencia de una determinada marca indica una cierta proteína que fue sintetizada o que se desplazó en el gel por haber sido modificada postraduccionalmente. La ausencia de una marca indica que esa proteína ha sido modificada postraduccionalmente dejando de ocupar su lugar original en el gel o que la velocidad de su síntesis es muy baja. En los casos en que se observó una gran disminución de proteínas con algún tratamiento, el tiempo de exposición del gel fue aumentado hasta 12 veces el tiempo del control para detectar las bandas menos intensas.

3.1.6 Análisis de la incorporación de ^{35}S -Metionina

Los embriones fueron incubados en ^{35}S -metionina como se describió anteriormente, lavados y congelados-descongelados por 3 veces, disueltos en una base orgánica en un medio de tolueno (NCS, Nuclear-Chicago) y contado en PPO/POPOP disuelto en tolueno en un contador de centelleo β por 0,5 minutos con una eficiencia de alrededor de 70%. Cada experimento se hizo por triplicado.

3.2 Análisis de la síntesis de DNA

Los embriones incubados con ^3H -timidina fueron transferidos a 0,5 ml de citrato de sodio (0,5%) por 2 a 5 min, puestos en un portaobjeto y fijados en él con metanol/ácido acético (2:1),

luego se secaron al aire y se lavaron a 4°C en 10% de ácido tricloroacético (109). Después de esto se expusieron a una emulsión fotográfica (Kodak NTB-2) y fueron guardados en una cámara oscura con desecante por el tiempo adecuado.

El revelado se hizo por las técnicas convencionales. Los núcleos fueron teñidos con azul de toluidina, deshidratados en una serie creciente de etanol, xilol y montados en Permount para microscopía de luz.

RESULTADOS

1. Síntesis de proteínas durante el desarrollo preimplantacional

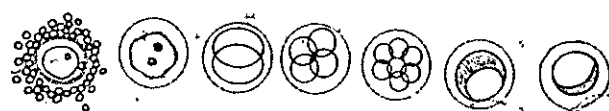
Durante el desarrollo preimplantacional se han descrito cambios en el patrón electroforético de la síntesis de proteínas que coinciden con cambios en la morfogénesis y diferenciación celular (véase Introducción). Por lo tanto, uno de nuestros primeros pasos fue reproducir estos resultados, para validar los resultados ajenos y establecer un control general de los experimentos que se harían a continuación. Además, quisimos poner a prueba nuestra técnica de geles unidimensionales procurando distinguir los patrones de síntesis de proteínas de la masa celular interna y el trofoblasto, cuyas diferencias sólo se han observado en geles bidimensionales.

En la Figura 2 se observa el desarrollo preimplantacional de ratón y los cambios en el patrón de proteínas sintetizadas en los distintos estados, que confirman los descritos en la literatura (ver Introducción). La interpretación de estos patrones electroforéticos ha sido compleja ya que se ha tenido que tomar en cuenta parámetros como la captación de aminoácidos exógenos, la presencia de aminoácidos endógenos y los cambios en el metabolismo y disponibilidad de ATP que ocurren durante este período (14a, 29b, 35a); considerando estos parámetros se ha concluido que después de la fecundación hay una leve disminución en las proteínas sintetizadas, llegando a valores mínimos en el estado de 2 células; más tarde, cuando el embrión tiene 4 células la síntesis de proteínas empezaría a aumentar alcanzándose valores notablemente más altos en el estado de blastocisto, sin

embargo el aumento en este estado depende también del mayor transporte de aminoácidos (14a). Junto con estos cambios cuantitativos se han observado cambios cualitativos durante todo este período de desarrollo: algunas bandas desaparecen en ciertas etapas mientras que otras aparecen. Sin embargo, hay que tener presente que cada banda individual del patrón electroforético puede corresponder a un gran número de polipéptidos del mismo peso molecular. Teniendo en cuenta esta precaución en la interpretación y habiéndose logrado identificar algunas de las proteínas cuya síntesis cambia se ha concluido que habrían cambios cualitativos y cuantitativos en la síntesis de proteínas durante el desarrollo preimplantacional (8, 69).

Además de esta diferenciación temporal en la síntesis de proteínas ocurre una diferenciación espacial, la que ha sido reconocida desde el estado de blastocisto mediante el análisis de las proteínas en geles bidimensionales (116). En la Figura 3a se muestra un esquema del procedimiento para aislar la masa celular interna por inmunocirugía, y en la Figura 3b se presentan en geles unidimensionales patrones de síntesis protéica equivalentes a los publicados por otros autores en geles bidimensionales. Se puede observar que tanto el trofoblasto como la masa celular interna sintetizan con distinta velocidad algunas proteínas específicas, lo cual es puesto en evidencia por el densitograma (Fig. 4). Nuestro estudio se refiere a etapas anteriores a la blastulación y comienza con un análisis de los cambios temporales en el patrón electroforético de las proteínas sintetizadas. Con ese propósito examinamos las proteínas que sintetizan los embriones en tiempos muy precisos del desarrollo, para lo cual

Figura 2. ANALISIS DE LOS CAMBIOS TEMPORALES DURANTE EL DESARROLLO PREIMPLANTACIONAL DE RATON. (a) Esquema de los cambios morfológicos. (b) Autorradiografía de gel de poliacrilamida SDS al 10%. Proteínas sintetizadas por embriones de las siguientes horas de desarrollo: A= 0, B = 12; C= 26; D= 36; E= 50; F= 68; G= 92. A-E: 5 embriones por canal. F,G: 3 embriones por canal. Los huevos no fecundados (A) fueron tratados con hialuronidasa para eliminar las células foliculares. Para más detalles experimentales ver Materiales y Métodos.



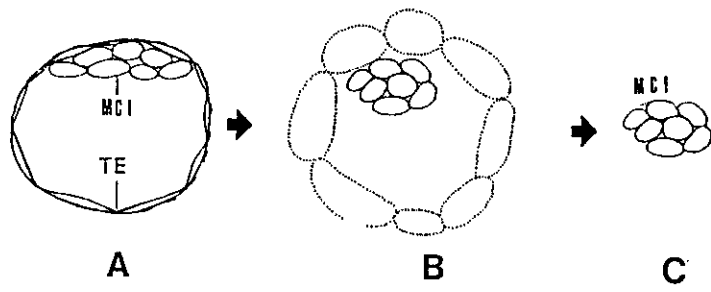
2a

A B C D E F G

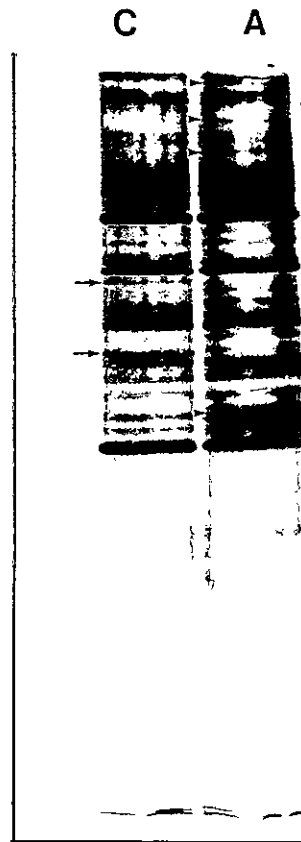


b

Figura 3. ANALISIS DE LOS CAMBIOS ESPACIALES EN BLASTOCISTO DE RATON. (A) Esquema de inmunocirugía que muestra el aislamiento de la masa celular interna (MCI) por lisis del trofoblasto (TE). A: Blastocisto intacto; B: blastocisto sometido a inmunocirugía con células de TE lisadas; C: MCI aislada después del lavado de B. (b) Electroforesis de MCI con procedimiento igual a Fig. 1 (C) y de TE (A); se muestran las proteínas enriquecidas en el trofoblasto (▶) y las enriquecidas en la MCI (↔). En canal C, 1 MCI; en A, 5 blastocistos.

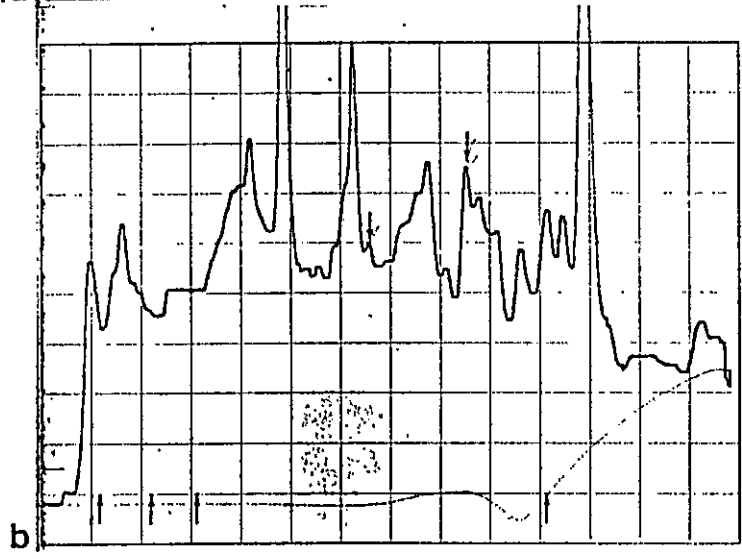
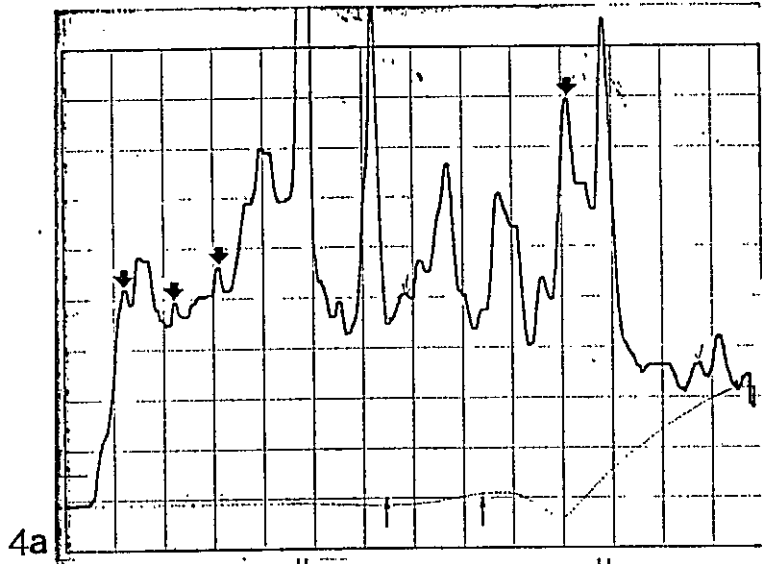


3a



b

Figura 4. DENSITOGRAMA DEL GEL DE LA FIGURA 2b. (a) Densitograma de gel de blastocisto; (b) densitograma de gel de MCI. ↓- proteínas exclusivas del TE; †- Proteínas enriquecidas de la MCI.



sincronizamos poblaciones de embriones según el procedimiento descrito en Materiales y Métodos.

2. Modificación de la forma celular: inhibición de la compactación

La compactación es un proceso complejo en que intervienen tanto componentes de la superficie celular como del interior de la célula, los cuales operan en distintas etapas.

La participación del citoesqueleto en este proceso se ha estudiado con el uso de drogas que afectan el estado de polimerización de microtúbulos y microfilamento, llegándose a sugerir la participación de ambos en este proceso (ver Introducción). Nosotros encontramos recientemente que durante la compactación ocurrían cambios estructurales importantes en el citoesqueleto. La observación por microscopía electrónica de barrido de mórulas reveló que largos procesos citoplasmáticos conectan los blastómeros entre sí. En embriones extraídos con Tritón X-100 se reconocen estas conexiones desde aproximadamente 4 horas después del comienzo de la compactación, alrededor de la región de contacto celular, entre los citoesqueletos corticales de blastómeros adyacentes. Microscopía electrónica de transmisión, tratamientos con DNAsa. I y decoración con meromiosina pesada, demuestran que las conexiones del citoesqueleto contienen haces de microfilamentos de actina. Sin embargo, puesto que las conexiones del citoesqueleto aparecen 4 horas después que los embriones se han compactado, éstas no podrían participar en este cambio de forma celular en sus

primeras etapas. Se ha propuesto, en base a evidencia experimental descrita más adelante, que dichas conexiones participarían en una segunda etapa de la compactación. Las observaciones resumidas más arriba se detallan en el Apéndice I.

Se han descrito dos moléculas de adhesividad celular, la uvomorulina y la β -galactosiltransferasa, que participarían en el cambio de forma de las células. La uvomorulina se encuentra regionalizada en las superficies de contacto y su función puede ser inhibida con anticuerpos específicos dirigidos contra ella. Cuando embriones de 8 células compactados son incubados con estos anticuerpos se observa inhibición de la compactación en una etapa temprana y compactación de los embriones, aún en presencia del anticuerpo, en una etapa tardía (48, 64). Esto ha llevado a proponer que la compactación podría dividirse en dos etapas y que la uvomorulina actuaría en la primera. La uvomorulina une Ca^{2+} y es protegida de degradación proteolítica por la presencia de esta ión (48), lo cual sugiere que la unión con Ca^{2+} induce algún cambio conformacional en esta proteína. Por lo tanto, la descompactación de los embriones en presencia de EGTA podría explicarse por la quelación del Ca^{2+} de la uvomorulina. Utilizamos el EGTA como un inhibidor de la compactación, consiguiendo un 100% de inhibición (Fig. 5a). Este agente descompactante se usó en 9 ensayos con alrededor de 10 embriones en cada uno.

Durante la etapa tardía de la compactación, que ocurre 4 a 6 horas después de la temprana, se ha detectado un aumento significativo de la actividad de una enzima de superficie, la β -galactosiltransferasa, que actuaría en el proceso de adhesividad

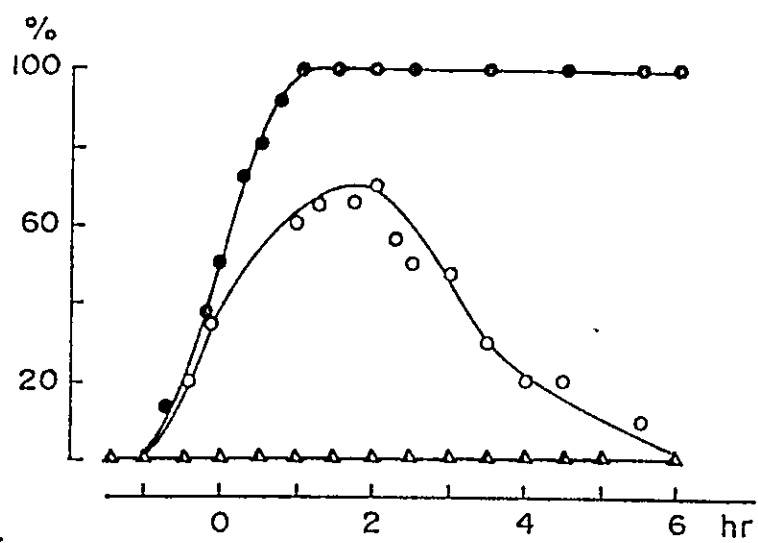
celular (5). Los embriones preimplantacionales incubados con un anticuerpo dirigido contra esa enzima, se compactan normalmente en una primera etapa pero 4 a 6 horas después se descompactan, probablemente por inhibición del mecanismo de la etapa tardía de la compactación (5). Como se ha demostrado en cultivo de células (Ref.) que esta enzima puede ser específicamente inhibida por α -lactalbúmina (α -La), incubamos con α -La un total de 50 embriones no compactados en 5 ensayos y observamos que en la primera etapa se alcanzaba hasta un 70% de compactación y que en la segunda etapa estos embriones se descompactaban (Fig. 5a).

Algunas de las moléculas de superficie que participan en la compactación contienen carbohidratos cuya función puede ser alterada con lectinas (99). La lectina Concanavalina A (Con A) inhibió la compactación en un 100%, cuando la probamos con un total de 60 embriones en 3 ensayos independientes (Fig. 5a).

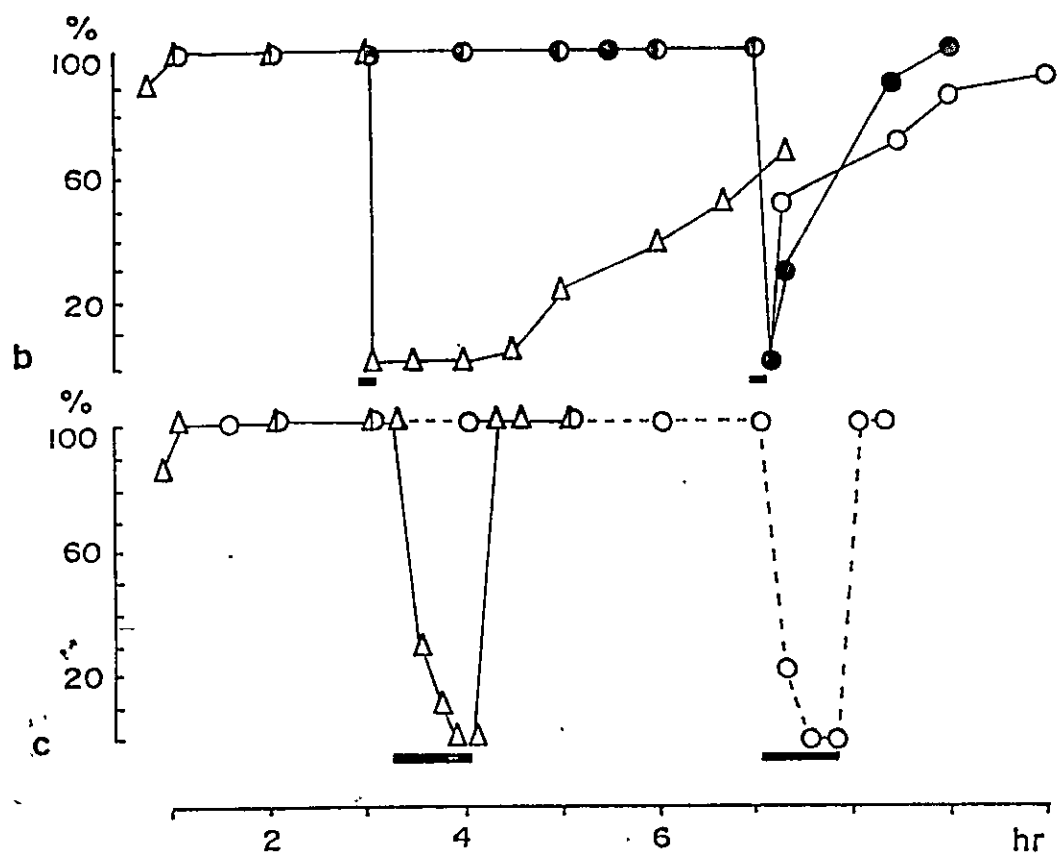
Como se mencionó anteriormente, otro de los componentes que participan en la compactación son los microfilamentos de actina y los microtúbulos del citoesqueleto. El rol de los microtúbulos no ha sido aclarado con precisión porque las drogas que modifican su estado de polimerización actúan en forma dependiente del ciclo celular (26, 44, 54, 78). En cambio se ha demostrado la participación de los filamentos de actina en la compactación. Por incubación de embriones con inhibidores de la polimerización de estos microfilamentos, se observa inhibición de la compactación en embriones no compactados y descompactación en los ya compactados (54). Hemos tratado un total de 60 embriones no compactados en 5 ensayos con citóchalasina D (CCD), observando un 100% de inhibición de la compactación (Fig. 5a).

Disponemos pues de 4 métodos para inhibir la compactación, los que actúan a través de distintos mecanismos afectando en forma diferencial cada una de las etapas descritas en la literatura para este proceso morfogenético. Como se ha expuesto más arriba, α -La sólo inhibe la segunda etapa de la compactación pero no se han descrito otros efectos diferenciales entre los tratamientos descompactantes en cuanto a etapas de compactación. Hemos diseñado un método que permite analizar la cinética de recompactación y así detectado diferencias entre los tratamientos con EGTA y con CCD. Para ésto, poblaciones de embriones previamente sincronizadas fueron descompactadas con EGTA o CCD tanto en una etapa temprana (3 hC) como en una etapa tardía (7 hC) y luego se observó la recompactación en medio de cultivo normal. Los resultados con EGTA que se muestran en la Fig. 5b, indican que el EGTA modifica las dos etapas de la compactación, pero la cinética de recompactación en la etapa temprana es más lenta que en la etapa tardía lo que nos sugiere que el Ca^{2+} , probable sitio de acción del EGTA, actuaría en forma distinta en cada etapa. Esta diferencia, además, no es dependiente de la síntesis proteica, ya que tratamientos con cicloheximida no la modifican (Fig. 5b). Nuestras observaciones sobre el establecimiento de conexiones citoesqueléticas (véase Introducción y Apéndice I) pueden relacionarse con la diferencia entre ambas etapas si se atribuye al Ca^{2+} un efecto de contracción del citoesqueleto y a las conexiones una función de tensores. Por otra parte, la descompactación con CCD no produce diferencias en la cinética de recompactación en las distintas etapas mencionadas, lo cual sugiere que los microfilamentos de

Figura 5. CINETICA DE LA INHIBICION DE LA COMPACTACION Y DE LA RECOMPACTACION EN EMBRIONES DE RATON. Ordenada: % de embriones compactados; abscisa: tiempo relativo al momento de la compactación en los controles (hC). (a) La compactación normal de una población de embriones sincronizados (●) fue inhibida por los siguientes tratamientos: 0,5 mM de EDTA (▲); 0,5 µg/ml de CCD (△); 0,2% α-La (o). Se estudiaron 83 embriones controles en 7 ensayos, 90 embriones tratados con EDTA en 9 ensayos, 50 embriones tratados con α-La en 5 ensayos y 60 embriones tratados con CCD en 5 ensayos. (b) Recompactación después de descompactar una población de embriones sincronizados, por tratamiento con 0,5 mM de EGTA por 10 minutos. Observe que las mórulas compactadas por 3 horas (▲) se recompactan lentamente después de un retardo, mientras que las mórulas compactadas por 7 hrs (o) se recompactan inmediatamente. Las mórulas tratadas con 50 µg/ml de cicloheximida desde 3 hC (●) muestran una cinética de recompactación similar a la de las mórulas tardías no tratadas. (c) Recompactación después de descompactar en 0,5 µg/ml de CCD. Observe que las mórulas tempranas (△) y tardías (o) muestran una cinética de recompactación similar. En (b) y (c) los puntos son un promedio de 3 experimentos con grupos de 30 embriones.



5a



actina (probable sitio de acción de CCD) participarían en forma semejante en ambas etapas (Fig. 5b).

Sobre la base de los antecedentes y observaciones señaladas, hemos elegido EGTA, α -La, CCD y Con A, para alterar el cambio de forma que ocurre durante la compactación.

2.1 Efectos morfológicos

Aún cuando cada uno de los inhibidores recién mencionados alteró la compactación, sus efectos morfológicos fueron distintos y por lo tanto, a continuación se describirán brevemente las modificaciones causadas por cada uno de los tratamientos recién descritos.

El tratamiento con EGTA afectó drásticamente la forma celular. Embriones compactados, tanto en la primera como en la segunda etapa de la compactación, se descompactaron totalmente en pocos minutos de tratamiento con EGTA. La forma descompactada, tanto de éstos embriones como de los embriones en los que se impidió la compactación tratándolos con EGTA desde antes que ésta ocurriera, era distinta a la forma precompactada normal (compárese Fig. 1a con Fig. 6c).

Los embriones normales antes de compactarse presentan células que no son totalmente esféricas ya que están algo aplanadas entre sí; este aplanamiento no es consecuencia de la contención y presión de la zona pelúcida, puesto que cuando esta se elimina los blastómeros persisten aplanados. Cuando los embriones precompactados fueron tratados con EGTA sus blastómeros adoptaron una forma más esférica, sugiriendo que antes de la compactación hay una adhesividad celular suficiente para mantener

algo aplanados a los blastómeros entre sí pero insuficiente para producir el cambio de forma celular característico de la compactación. Al tiempo en que los embriones controles se compactaron (Fig. 6a), los tratados con EGTA mantuvieron sus blastómeros esféricos con contactos intercelulares casi puntuales (Fig. 6c); esta morfología se conservó tanto en la primera como en la segunda etapa de la compactación. Después de 24 horas de iniciada la compactación los embriones controles inician la blastulación, durante la cual en cada blastómero se acumula líquido intracelular que luego se vacía a un espacio extracelular común, la cavidad blastocélica. El resultado es un blastocisto compuesto por células externas aplanadas (trofoblasto), células internas (masa celular) y la cavidad blastocélica (Fig. 6b). Los embriones que fueron mantenidos durante este tiempo con EGTA no experimentaron ningún cambio morfológico evidente: sus células se conservaron esféricas y no se dividieron; tampoco lo hicieron sus núcleos y no se observó la acumulación de líquido intracelular característico de la blastulación (Fig. 6d).

El tratamiento de los embriones con CCD afectó la compactación en una forma muy parecida al tratamiento con EGTA aún cuando la descompactación con CCD fue más lenta y los blastómeros no resultaron siempre tan esféricos (Fig. 6e). Pero, al igual que en los embriones tratados con EGTA, la forma esferoidal de las células se conservó durante todo el tratamiento. Al tiempo en que los embriones controles blastularon los tratados con la droga no lo hicieron y tampoco se observó acumulación de líquido intracelular, pero se observaron deformaciones de los blastómeros (Fig. 6f). CCD inhibe las



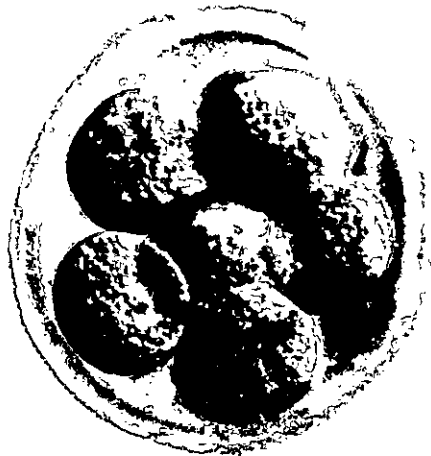
6a



b



c



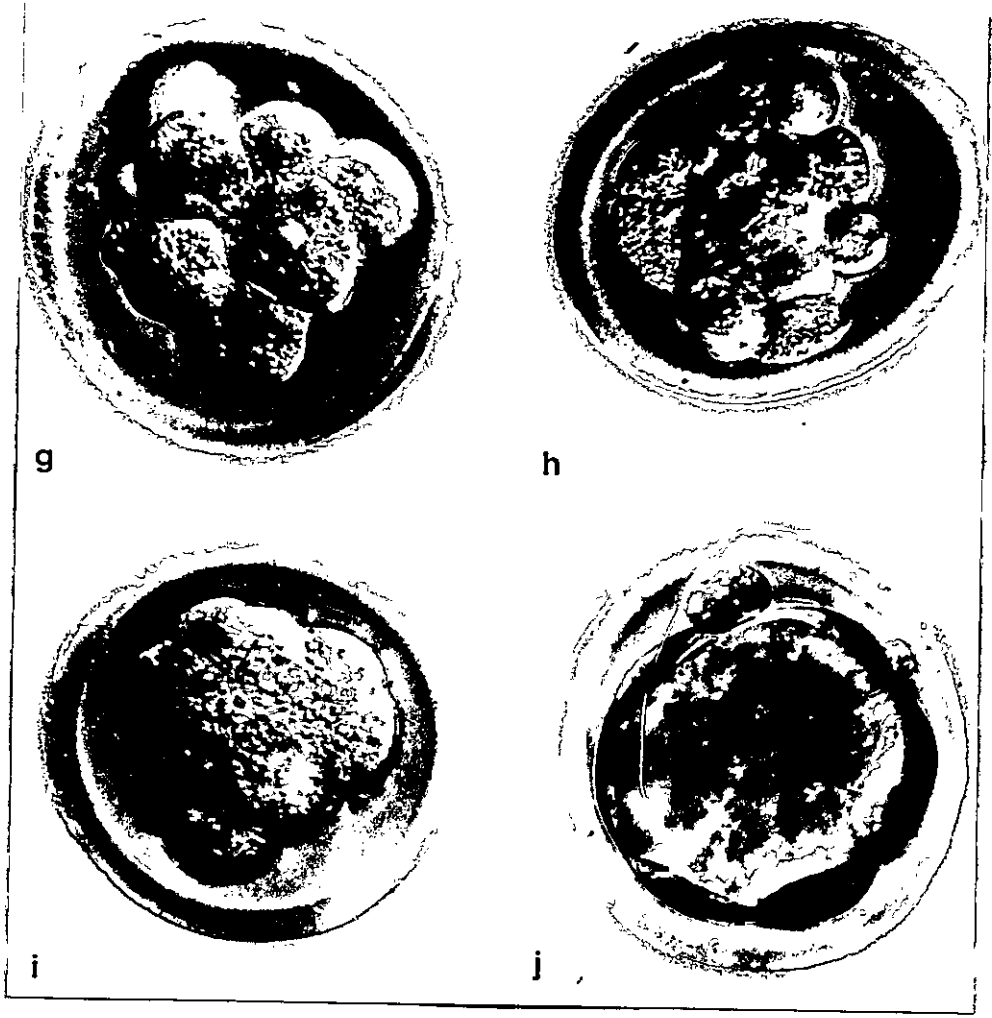
d



e



f



divisiones celulares porque impide la formación del anillo contráctil de la citoquinesis formado por microfilamentos, pero no inhibe las divisiones nucleares, por lo que es posible distinguir células multinucleadas en los tratamientos prolongados.

El tratamiento mediante Con A conservó a los embriones descompactados, aún cuando fue posible observar algún aplanamiento interblastomérico (Fig. 6g). Cuando el tratamiento se prolongó por 24 horas, se encontró que algunos blastómeros estaban parcialmente deformados y se habían dividido, pero no hubo compactación ni blastulación (Fig. 6h).

El tratamiento descompactante con α -La sólo inhibió la segunda etapa de la compactación y la forma de los blastómeros descompactados aparece bastante aplanada (Fig. 6i). Más tarde, los embriones volvieron a compactarse, lo cual sugiere que habría una tercera fase de la compactación, independiente de las dos primeras, que no ha sido descrita. Por los tratamientos con α -La no hubo cambios apreciables en la velocidad de división celular, división nuclear, ni blastulación, observándose estos procesos en forma paralela y semejante a los controles (Fig. 6j). En esta tesis no se presentará un análisis de los resultados descritos en relación con los mecanismos morfogenéticos de compactación y blastulación, sólo nos referiremos a su relación con el patrón de síntesis de proteínas.

2.2 Efectos en la síntesis de proteínas

Recapitulando, nuestra estrategia experimental consiste en comparar las modificaciones del patrón de síntesis de proteína

que causan distintas drogas descompactantes con el propósito de descartar los efectos que les sean específicos y reconocer los efectos comunes que pueden razonablemente atribuirse al cambio de la forma celular.

Se comparó el patrón de proteínas sintetizadas por los embriones controles y por los embriones sometidos a cada uno de los tratamientos descompactantes. Estas observaciones fueron realizadas a las 0, 4, 7 y 24 hC en geles unidimensionales. Se hicieron 3 geles para los embriones controles y dos geles para cada uno de los tratamientos.

A continuación se expondrá el análisis del patrón electroforético total de las proteínas sintetizadas por los controles y los embriones tratados. Para este análisis hemos elegido en base a las mediciones densitográficas (véase Apéndice III) 5 bandas distintivas del patrón electroforético, lo cual no implica que correspondan a polipéptidos específicos de un estado de desarrollo o a marcadores de diferenciación celular. Es decir, este análisis es significativo en cuanto se refiere a una representación del patrón electroforético total, puesto que las variaciones de intensidad o el desplazamiento de ciertas bandas pueden deberse a modificaciones postraduccionales de algunas proteínas y no interesan aquí, si no afectan las bandas distintivas, a menos que modifiquen la configuración del conjunto.

En las Figuras 7 a 10 se observa que el patrón de proteínas sintetizadas por los embriones controles (C) cambió después de la compactación, como se comprueba comparando los densitogramas C de las Figuras 7, 8, 9 y 10.

La mayoría de estos cambios persistieron con los tratamientos en los que se había inhibido la compactación, como se reconoce en las Figs. 7 a 10 comparando en los densitogramas de las Figuras 7, 8, 9 y 10 cada uno de los tratamientos: EGTA, CCD y α -La. Los geles de estos tratamientos se muestran en el Apéndice IV.

El efecto de Con A se distingue del efecto de los otros agentes descompactantes estudiados. El patrón de electroforesis de las proteínas sintetizadas se muestra en el densitograma de la Fig. 11 y el gel en el Apéndice IV. A diferencia de los tratamientos con EGTA, CCD y α -La hubo un marcado cambio en las proteínas sintetizadas después de 24 horas de tratamiento por comparación con los controles. Aparecieron 9 bandas nuevas, de las cuales las más evidentes son A, C, D, F, I, K y desaparecieron 5 bandas de las cuales dos (a, e) corresponden a proteínas que aparecían con el desarrollo normal y las otras tres (G, H y K) corresponden a proteínas que se encuentran normalmente desde antes de la compactación. Cambios similares fueron observados en geles bidimensionales (Fig. 12), pero la equivalencia no es evidente porque en estos experimentos se procesaron 8 veces más embriones y el tiempo de incubación con ^{35}S -metionina fue 2 veces mayor. Como estos cambios masivos en el patrón de proteínas sintetizadas fueron inducidos sólo por Con A y no por los otros tratamientos descompactantes es probable que esta lectina no haya afectado sólo la compactación, sino que además haya modificado otros procesos dependientes de receptores superficiales activables por Con A. Tampoco podemos descartar que estos cambios correspondan a modificaciones postraduccionales

Figuras 7-10. EFECTO DE LA INHIBICION DE LA COMPACTACION SOBRE LA SINTESIS DE PROTEINAS. Densitogramas de la autorradiografía de geles de embriones controles o sometidos a tratamientos descompactantes por 2 horas antes de las 0 hC (7); por 4 horas desde las 0 hC (8); por 7 horas desde las 0 hC (9); por 24 horas desde las 0 hC (10). Las proteínas fueron marcadas por incubación con ^{35}S -metionina durante las 2 últimas horas de tratamiento. C: control; tratamientos: 0,5 mM EGTA; 0,5 $\mu\text{g/ml}$ CCD; 0,2% α -La. Para las proteínas a, e, i, o, u, descritas en Resultados, se indica su ausencia (\uparrow), en presencia y disminución (\downarrow), presencia y aumento (\downarrow).

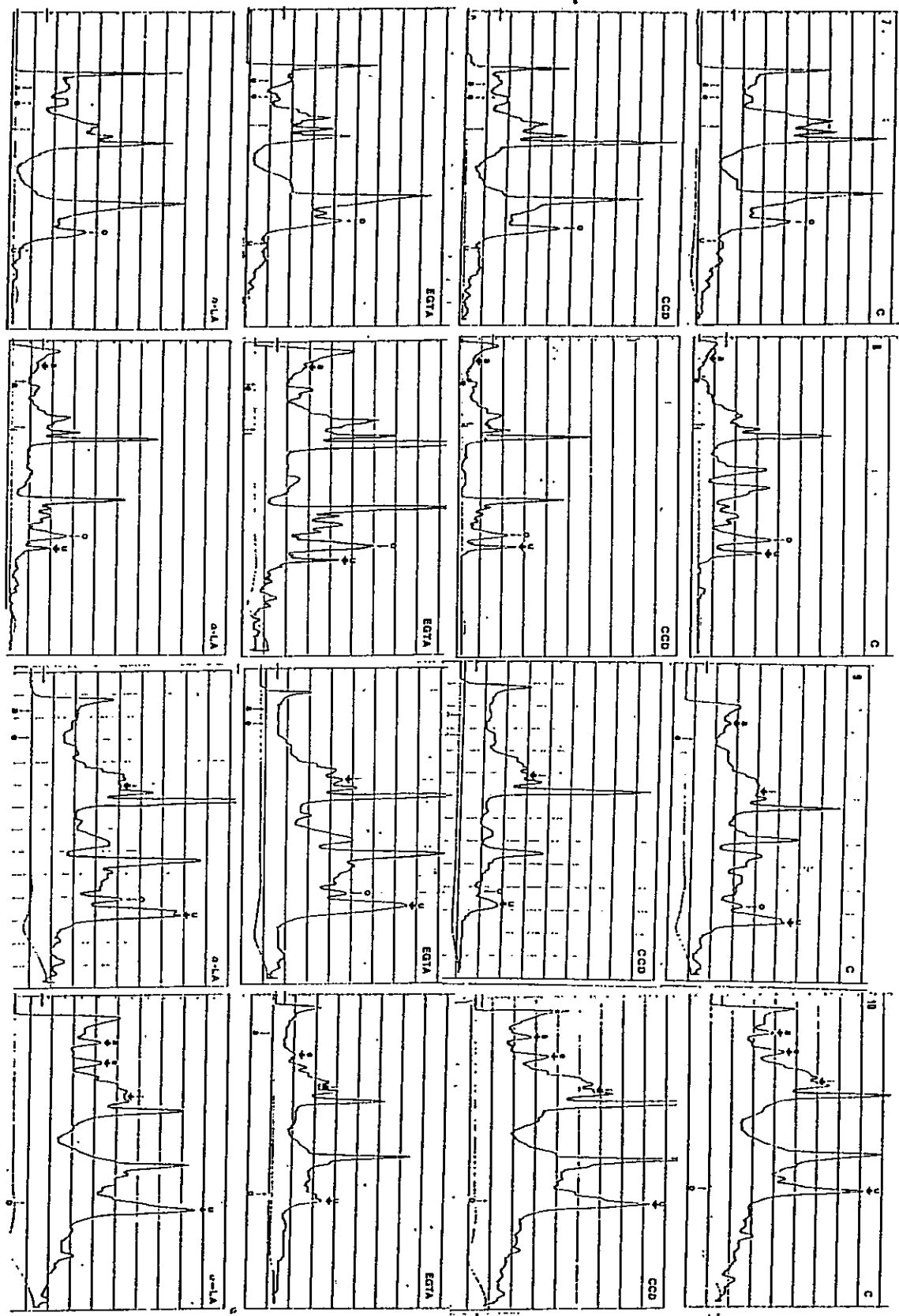


Figura 11. EFECTO DE CON A SOBRE LA SINTESIS DE PROTEINAS. Densitogramas de autorradiografías de geles de embriones controles (C) o tratados desde antes de la compactación (aproximadamente 0 hC) con 100 µg/ml de Con A (Con) por 2 horas (0) y por 24 horas (24). Para las proteínas a, e, i, o, u, descritas en Resultados, se indica la ausencia (↑), presencia y aumento (↕), presencia y disminución (↓). También se indican los cambios inducidos por 24 horas de tratamiento en las proteínas a, e, A-K. Los embriones fueron marcados durante las 2 últimas horas con ³⁵S-metionina; se usaron 7 embriones por canal.

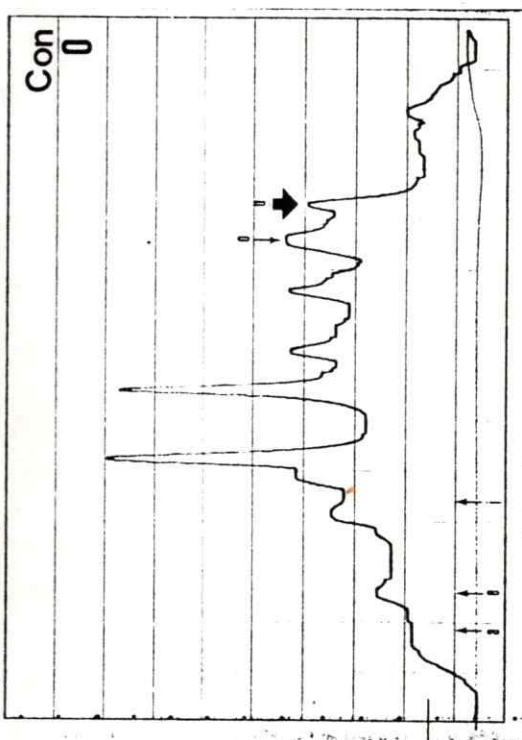
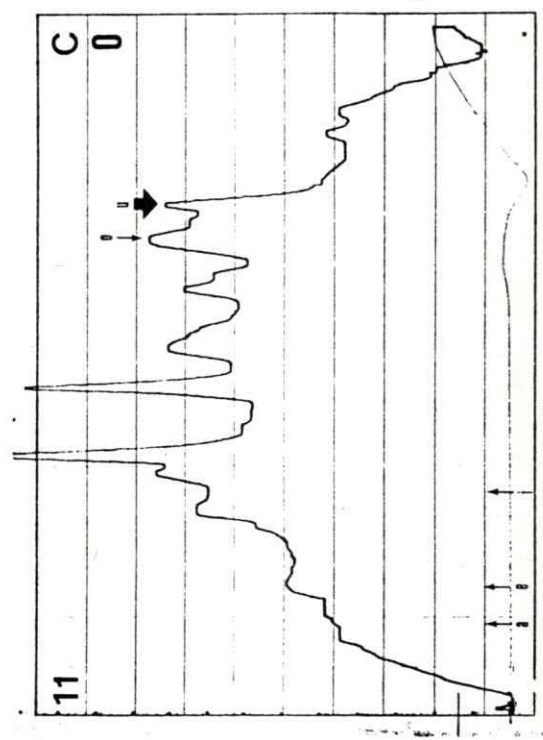
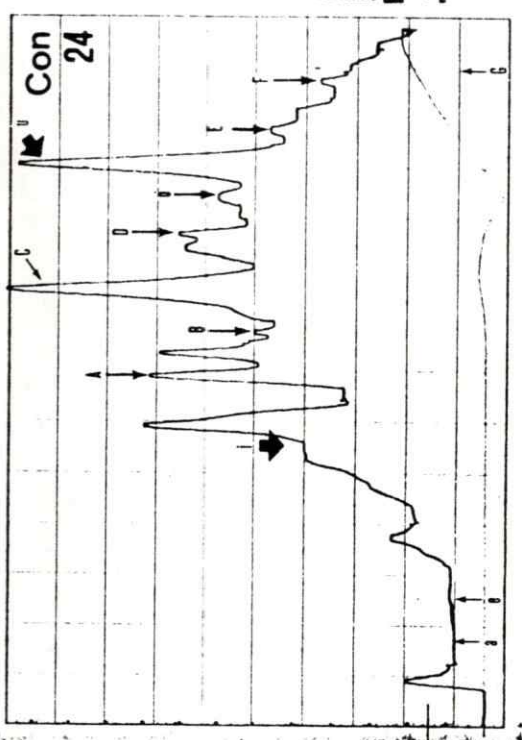
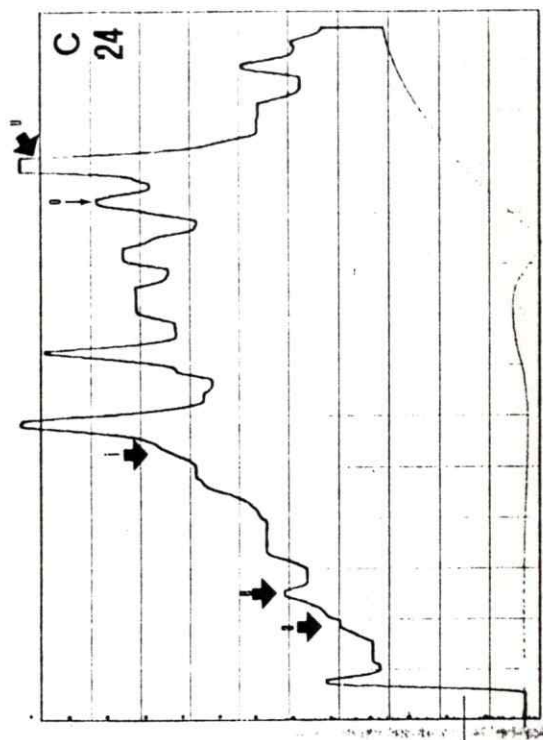
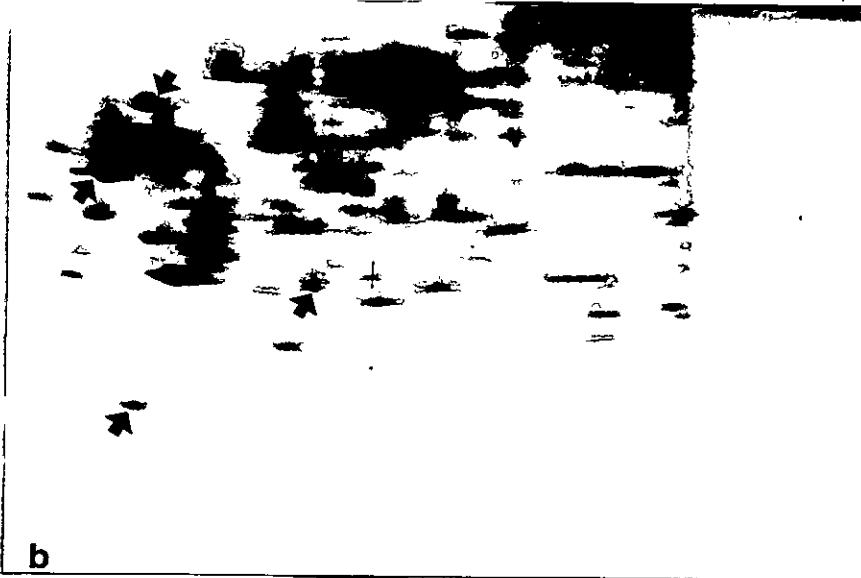


Figura 12. EFECTO DE CON A SOBRE LA SINTESIS DE PROTEINAS:
AUTORRADIOGRAFIA DE GEL BIDIMENSIONAL DE EMBRIONES CON 24 hC.

(a) Control; (b) Tratado durante 24 horas con Con A 100 µg/ml.
Las diferencias inducidas por los tratamientos son señaladas por flechas. La incubación con ³⁵S-metionina se hizo durante las últimas 4 horas.



12a



b

o incluso a degradaciones proteolíticas.

En resumen, se pudo observar que ni CCD, ni α -La indujeron cambios detectables en la síntesis de proteínas aún cuando ambos inhibieron la compactación. EGTA en cambio, disminuyó en forma generalizada la síntesis de proteínas de alto peso molecular, siendo su efecto mayor a las 24 horas. El efecto de Con A por su parte, se expresa en una modificación específica de las bandas correspondientes a diversas proteínas (un resumen de las mediciones densitográficas de los polipéptidos distintivos se muestra en el Apéndice III).

Sin embargo, es necesario tener presente que cualquier banda individual puede estar compuesta de numerosos polipéptidos con pesos moleculares semejantes, y consecuentemente, cambios cualitativos en esa población, tanto en la síntesis como en modificaciones postraduccionales, pueden no reconocerse por cambios evidentes en la intensidad neta de una banda. Además, aún cuando la resolución de las proteínas es buena, sólo pueden observarse aquéllas proteínas que están presentes, colectiva e individualmente, en altas concentraciones. Las proteínas presentes en el embrión en cantidades insuficientes para ser detectadas individualmente, probablemente producen el fondo gris entre las bandas de la autorradiografía, por lo tanto, decidimos estudiar con más acuciosidad el efecto de los tratamientos que no causaron modificaciones evidentes del patrón en geles unidimensionales (CCD, α -La) o que causaron modificaciones que parecían ser inespecíficas (EGTA). Con este fin utilizamos la electroforesis bidimensional (primera dimensión: isoelectroenfoque; segunda dimensión: SDS) que permite una mayor

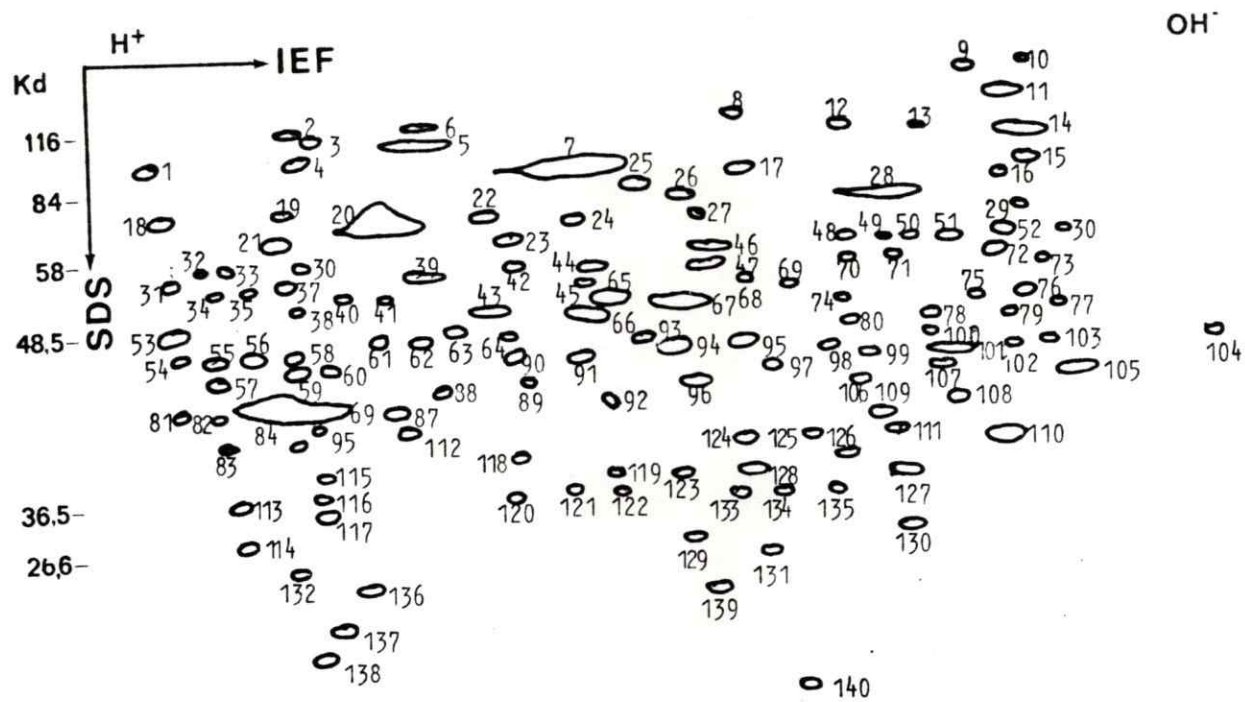
resolución de las proteínas. Los geles bidimensionales se muestran en el Apéndice VI y un resumen de éstos se representa en la Fig. 13 (ver Materiales y Métodos). En la Fig. 13a se muestran las 141 proteínas analizadas por esta técnica (Materiales y Métodos) y en la Fig. 13b se ordenan estos polipéptidos señalando su presencia con cuadrados negros, tanto antes de la compactación (columnas O) como 24 horas después de ella (columnas 24).

Se compararon las proteínas sintetizadas en embriones controles (columna A), tratados con CCD (columna B), con α -La (columna C) o con EGTA (columna D). No todas las proteínas distintivas (a, e, i, o, u), descritas para geles en una dimensión pueden identificarse fácilmente en geles bidimensionales, ya que las condiciones de marcación con ^{35}S -metionina no fueron equivalentes; como los geles bidimensionales son más resolutivos y hay menos probabilidad de superposición de bandas que en los unidimensionales, aumentamos al doble el tiempo de incubación con ^{35}S -metionina para poder detectar proteínas que se sintetizaban a velocidades menores, por lo que la comparación entre proteínas observadas en geles uni y bidimensionales debe hacerse con precaución. Las proteínas e, i probablemente corresponden a los polipéptidos 33 o 38 y 68 o 73, la proteína o puede corresponder al polipéptido 94, la proteína u probablemente corresponda a un doblete formado por los polipéptidos 109 y 111.

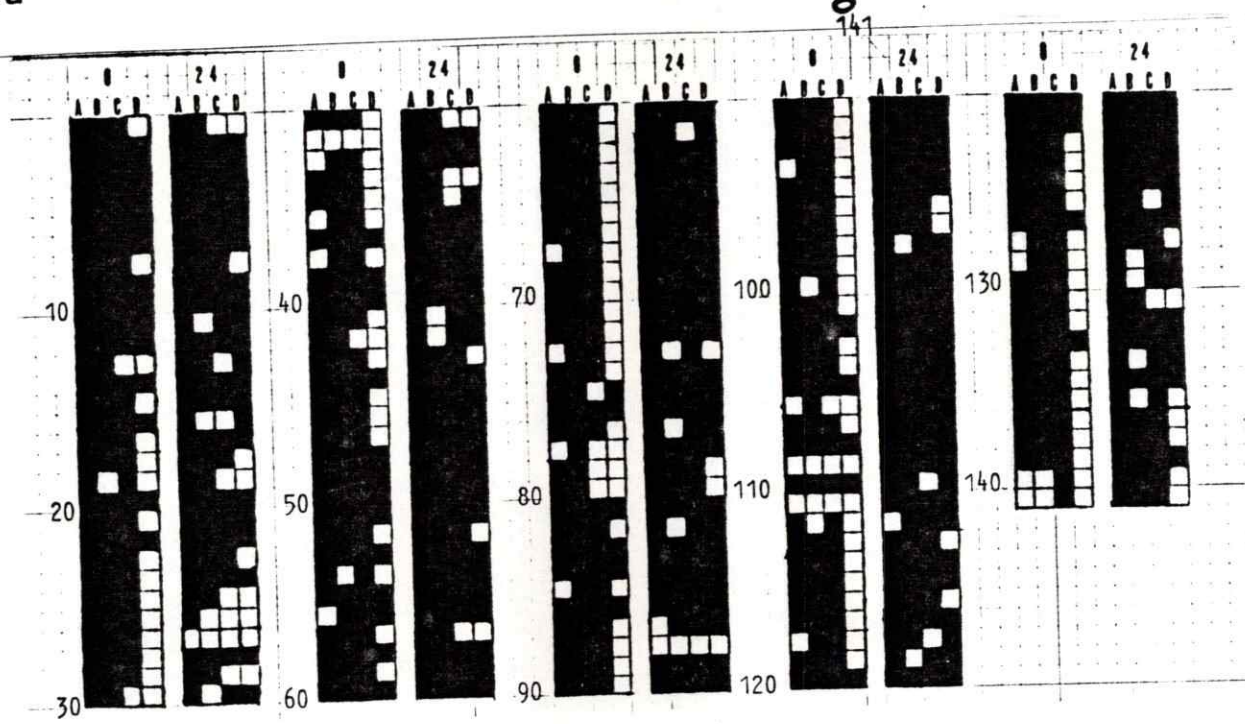
De los resultados en geles bidimensionales se puede concluir que EGTA causa una disminución generalizada de la síntesis de proteínas, lo que confirma la observación en geles unidimensionales. EGTA retrasó la síntesis de 54 proteínas,

Figura 13. SINTESIS DE LOS RESULTADOS MOSTRADOS EN FIGURAS 16-20.

(a) Esquema de los polipéptidos analizados en geles bidimensionales, la primera dimensión fue isoelectroenfoque (IEF) y la segunda fue un gel desnaturalante con SDS. La numeración de los polipéptidos está ordenada de arriba a abajo y de izquierda a derecha (ver Materiales y Métodos para detalles sobre la elaboración del esquema). (b) Lista de los polipéptidos analizados en los que se indica su presencia (■) o ausencia (□) antes de la compactación (0) o 24 horas después (24) para cada uno de los tratamientos. A: Control; B: tratamiento con CCD; C: tratamiento con α -La; D: tratamiento con EGTA. La numeración de los polipéptidos es similar a (a). El número de geles analizados fue A-0h: 3 geles; A-24 h: 4 geles; B-0h: 3 geles; B-24 h: 3 geles; C-0h: 2 geles; C-24 h: 2 geles; D-0h: 3 geles; D-24 h: 4 geles.



13a



b

mientras que la síntesis de 26 proteínas fue inhibida totalmente. Como estos cambios no fueron inducidos por los otros tratamientos descompactantes no es probable que se deban a la inhibición de la compactación no se consideraron en el siguiente análisis.

Este análisis se limitó, por lo tanto, a una comparación del efecto que tuvieron los tratamientos con CCD y con α -La. Los resultados en general no dan apoyo a un mecanismo de regulación de la síntesis de proteínas basado en el cambio de forma celular durante la compactación; sin embargo, para llegar a esa conclusión fue necesario establecer criterios que permitieran clasificar las 141 proteínas cuya presencia y ausencia (o disminución) podrán reconocerse con cierta constancia. Las clases mayores fueron: primero, proteínas cuya síntesis es afectada por igual con los dos tratamientos descompactantes (103 proteínas); segundo, proteínas cuya síntesis es afectada por los tratamientos cuando se les aplica antes de la compactación (8 proteínas); tercero, proteínas cuya síntesis cambia con la compactación (6 proteínas). Encontramos sólo una proteína que cambiaba con la compactación y cuyo cambio era inhibido con los tratamientos descompactantes (proteína 87, peso molecular 42 Kd, punto isoeléctrico 5 a 6). Este caso corresponde a las características esperadas para proteínas reguladas por la compactación, pero el estudio más acabado de esta proteína no es el propósito de esta Tesis. En todo caso, un número muy escaso de polipéptidos con las características buscadas, por comparación con las numerosas modificaciones en la síntesis de proteínas inducidas por CCD y α -La que no dependen de la compactación descritas más arriba, no permiten afirmar que el cambio de forma

celular regula la síntesis de las proteínas estudiadas.

3. Modificaciones de la actividad nuclear: inhibición de la replicación y de la transcripción.

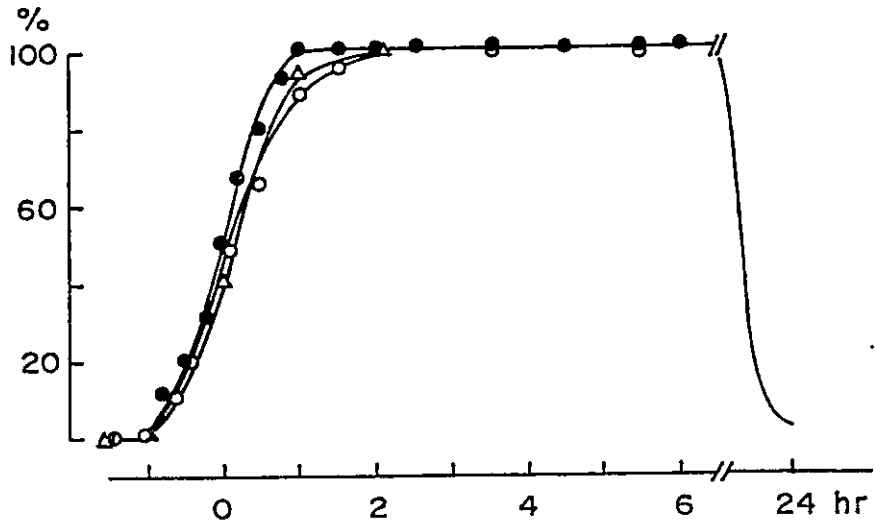
Los resultados descritos más arriba sugerían que la síntesis de proteínas probablemente no era regulada por los procesos morfogenéticos que inhibimos, por lo que el siguiente paso fue estudiar si los cambios en el patrón de proteínas sintetizadas durante el desarrollo son dependientes de las actividades nucleares de replicación y transcripción. Para resolver este problema usamos un diseño experimental semejante al de la sección anterior inhibiendo cada uno de esos procesos y observando la síntesis de proteínas. Esta vez, nuestra estrategia experimental ha consistido en comparar el efecto de diversas drogas que modifican la replicación o transcripción sin causar descompactación o modificar la forma celular, lo cual exige, primeramente, estudiar sus efectos morfológicos. La transcripción fue inhibida usando α -amanitina, la que a concentraciones de 1 $\mu\text{g/ml}$ es un inhibidor específico de la RNA polimerasa II, que participa en la síntesis de mRNA, y a concentraciones de 15 $\mu\text{g/ml}$ actúa además sobre la RNA polimerasa III (100).

La replicación del DNA fue inhibida con afidicolina, un inhibidor específico de la α -DNA polimerasa (49), enzima que participa en la replicación del DNA.

3.1 Efectos Morfológicos

Aunque α -amanitina y afidicolina inhiben específicamente la

Figura 14. EFECTO MORFOLOGICO DE LA INHIBICION DE ACTIVIDADES NUCLEARES. (a) % de embriones compactados en una población de embriones controles (●) o tratados con 2,5 µg/ml de afidicolina (▲) o 15 µg/ml de α-amanitiná (○). Ordenada: % de embriones compactados; abscisa: tiempo en hC. (b, c) Embrión tratado con α-amanitina o (d, e) con afidicolina por 3 (b, d) o 24 horas (c, e) desde la compactación. Ver texto para detalles de las descripciones morfológicas.



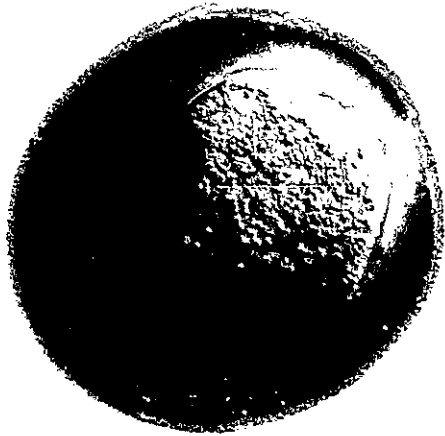
14a



b



c



d



e

actividad de algunas enzimas, también causan algunas modificaciones morfológicas descritas a continuación, que podrían ser consecuencia directa de la inhibición enzimática.

Ninguna de las dos drogas afectó la compactación, ni su cinética en una primera o segunda etapa. Sin embargo, 24 horas después, cuando los controles eran blastocistos, los embriones tratados con ambas drogas se habían descompactado (Fig. 14).

α -Amanitina permitió la proliferación celular, y en presencia de esta droga también hubo división nuclear lo que hace suponer que la replicación no fue alterada; además, inhibió la formación de la cavidad blastocélica e impidió la acumulación de líquido intracelular. La descripción de efectos de α -Amanitina se basa en la observación de alrededor de 30 embriones divididos en dos series experimentales (Fig. 14).

Afidicolina, en cambio, no impidió que cada célula acumulara vesículas de fluido en su interior pero, como era de esperarse, al inhibirse la replicación del DNA se bloqueó la carioquinesis y citoquinesis (Fig. 14). Los efectos de Afidicolina se observaron en alrededor de 20 embriones divididos en 2 series distintas.

3.2 Efectos sobre la síntesis de proteínas

Se analizó en geles unidimensionales el patrón de proteínas sintetizadas 4, 7 y 24 horas después de la compactación, por embriones en los que se inhibió la síntesis de RNA con 1 o 15 $\mu\text{g/ml}$ de α -amanitina, o la replicación de DNA con 2,5 $\mu\text{g/ml}$ afidicolina.

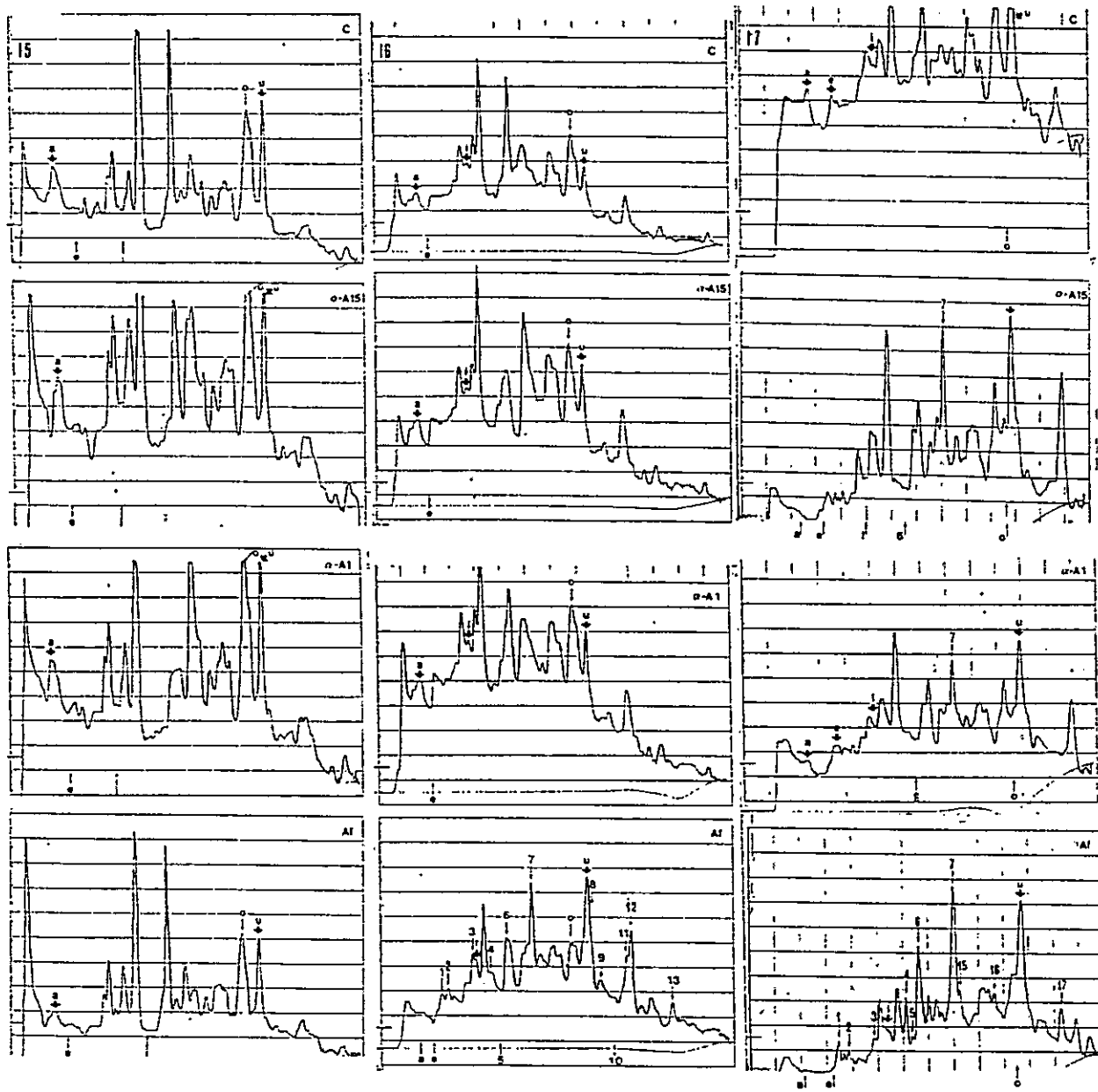
Cuando los embriones fueron tratados por 4 o 7 horas con 1 o 15 $\mu\text{g/ml}$ de α -amanitina no se observaron diferencias entre los

controles y los experimentales (Figs. 15-17, Apéndice IV). Sin embargo, en tiempos más largos, esta droga afecta la síntesis de proteínas, lo cual representa un control positivo. Cuando el tratamiento se prolongó por 24 horas se observó que la síntesis de proteínas en general disminuyó en presencia de la droga y esta disminución fue mayor para los tratamientos con 15 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de α -amanitina (Fig. 17, Apéndice IV). Por efecto del tratamiento de 24 horas también se observó modificaciones de polipéptidos específicos: con la concentración más baja apareció en la electroforesis la banda 7 y desapareció la banda 6, mientras que con 15 $\mu\text{g}/\text{ml}$ desaparecieron además las bandas de los polipéptidos a, e, i (Fig. 17, Apéndice IV).

Los tratamientos con afidicolina no produjeron diferencias cualitativas o cuantitativas apreciables en el patrón de síntesis de proteínas después de tratar durante 4 horas embriones no compactados (Fig. 15, Apéndice IV). Cuando el tratamiento con la droga fue prolongado hasta 7 horas, incluyendo por tanto el período en que los embriones replican su DNA, se observaron cambios importantes. Entre ellos, la disminución de las proteínas a, 5 y 10 y la aparición de una serie de proteínas que en los controles no se observaban; entre los que se destacan las proteínas 1, 2, 4, 6, 12, 13, 14 (Fig. 16, Apéndice IV).

Cuando el tratamiento se prolongó hasta el estado de blastocisto (24 horas después de la compactación) el patrón de proteínas sintetizadas por los embriones tratados con afidicolina fue muy distinto del de los controles. Las principales diferencias son la disminución de las bandas de los polipéptidos a, e, 18 y la aparición de 9 bandas, entre las que se destacan

Figuras 15-17. EFECTO DE LA INHIBICION DE ACTIVIDADES NUCLEARES SOBRE LA SINTESIS DE PROTEINAS. Densitogramas de autorradiografias de geles de embriones controles o sometidos a tratamientos por 4 (15), 7 (16), o 24 (17) horas desde las 0 hC. La incubación con ³⁵S-metionina se hizo durante las dos últimas horas de tratamiento. C: controles; tratamientos: 1 µg/ml de α-amanitina; 15 µg/ml de α-amanitina; 2,5 µg/ml de afidicolina. Para las proteínas a, e, i, o, u descritas en Resultados, se indica la ausencia (↑), presencia y aumento (↓), presencia y disminución (↓). También se indican los cambios en las proteínas a, e, 1-18 inducidas por el tratamiento.



las proteínas 4, 6, 16, 17 (Fig. 17, Apéndice IV).

Conviene señalar que por las mediciones en los densitogramas de los cambios en las proteínas sintetizadas es improbable que las proteínas de bajo peso molecular inducidas por los tratamientos correspondan a degradación proteolítica de proteínas de pesos moleculares más altos. Cuando medimos la incorporación de ^{35}S -metionina a los embriones de 8 células no encontramos diferencias significativas entre los controles y los tratados por 6 horas con afidicolina (promedio de cada triplicado: 46.319 cpm por embrión para los controles y 42.266 cpm por embrión para los tratados con afidicolina). Estos resultados indican que los cambios en el patrón electroforético no se explicarían por una diferencia en el transporte de la metionina causada por el tratamiento con afidicolina. Estas y otras explicaciones alternativas serán analizadas en la Discusión.

Así, es posible concluir que α -amanitina, pero principalmente afidicolina, cambian en forma notoria el patrón de síntesis de proteínas del embrión.

Como de acuerdo con estos resultados, la síntesis de proteínas podría depender de la replicación del DNA, quisimos comprobar si los tratamientos descompactantes ensayados alteraban la replicación. Para ésto incubamos los embriones en ^3H -timidina y observamos por autorradiografía su incorporación al DNA. Los resultados, resumidos en la Tabla 1, revelaron que en todos los casos, salvo el tratamiento con afidicolina (Fig. 18), hubo síntesis de DNA, aún cuando ésta pudo haber variado en cantidades que el método empleado no nos permitió detectar.

TABLA 1. Efecto de los tratamientos inhibitorios de la compactación y la actividad nuclear sobre la división celular, nuclear y del DNA en embriones preimplantacionales de ratón.

TRATAMIENTO	DIVISION CELULAR	DIVISION NUCLEAR	REPLICACION DEL DNA
Controles	+	+	+
EGTA	-	-	+
CCD	-	+	+
α -La	+	+	+
Con A	-	-	+
α -amanitina	+	+	+
Afidicolina	-	-	-

Las condiciones de los tratamientos son las descritas en Materiales y Métodos. La división celular y nuclear fue observada con óptica de Nomarski como se indicó en Materiales y Métodos, se estimó la división celular por recuento de células por embrión y la división nuclear por conteo de núcleos por célula. Para la replicación del DNA se midió la incorporación de ^3H -timidina por autorradiografía según se indica en Materiales y Métodos; la incorporación de marca radiactiva en el núcleo se señala con + y se ilustra en la Fig. 18a; la ausencia de incorporación de marca a los núcleos se señala con - y se ilustra en la Fig. 18b.

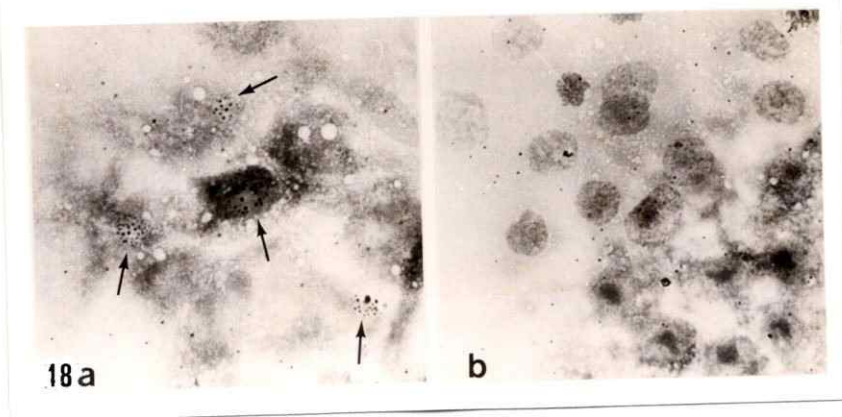


Figura 10. REPLICACION DEL DNA DE EMBRIONES PREIMPLANTACIONALES. Embriones incubados en ^3H -timidina fueron procesados para autorradiografía. La presencia de gránulos en los núcleos (flechas) indica incorporación de ^3H -timidina. (a) Presencia de gránulos en un embrión control; (b) ausencia de gránulos en un embrión tratado con afidicolina. Los resultados de las autorradiografías para los distintos tratamientos ensayados se resumen en la Tabla 1.

DISCUSION

El objetivo general de este trabajo fue analizar algunos de los procesos de los cuales podrían depender los cambios temporales que ocurren durante el desarrollo inicial de ratón.

Hemos planteado que durante el desarrollo preimplantacional de ratón los cambios temporales en la síntesis de proteínas podrían estar regulados, no sólo por cambios programados de la actividad génica, sino también por otros eventos del desarrollo que progresarían paralelamente en el tiempo, como son las modificaciones de forma y las replicaciones del DNA. Nuestros resultados revelan cambios complejos y constantes en el patrón electroforético de las proteínas sintetizadas y aquí analizamos dos mecanismos alternativos de regulación de dichos cambios:

- 1) Regulación de la síntesis de proteínas por cambios de los contactos o de la forma celular que ocurre durante la compactación.
- 2) Regulación de la síntesis de proteínas por actividades nucleares y en especial por ciclos de replicación del DNA.

1. ¿Es la morfogénesis un regulador de la síntesis protéica?

Esta pregunta ha sido respondida afirmativamente para otros sistemas. Como se describió en la Introducción, una variedad de tipos celulares responde, frente al establecimiento de los contactos o de los cambios de forma, modificando su transcripción o traducción (11, 23, 25, 67, 83, 97, 117).

Durante la compactación ocurren tanto cambios morfológicos como cambios en la síntesis de proteínas. Para estudiar si los

cambios de forma regulan la síntesis de proteínas hemos inhibido la compactación y observado el patrón de proteínas sintetizadas por los embriones.

El tratamiento con EGTA modifica en forma generalizada la síntesis de proteínas, retrasando la aparición de muchas y suprimiendo la aparición de otras. Este compuesto probablemente no entra a la célula por lo que su acción podría atribuirse a una quelación del Ca^{2+} extracelular y del intracelular que difunda hacia el exterior. La disminución del Ca^{2+} dentro de la célula podría tener numerosos efectos; entre otros, alterar los sistemas metabólicos y biosintéticos, modificando la velocidad de la síntesis protéica, como ha sido demostrado para la inhibición por EGTA de la traducción de algunos mRNAs específicos de la diferenciación de células de músculo esquelético de rata (29a), donde la falta de Ca^{2+} altera la fosforilación de proteínas ribosomales o reguladoras de la traducción dependiente de la proteína-quinasa C (72a, 89a, 110a, 113a).

Con A, en cambio, además de inhibir la compactación tiene un efecto que es más específico en cuanto modifica la velocidad de síntesis de sólo algunas proteínas. Es posible que algunos de estos cambios sean mediados por la activación de receptores de superficie a los que esta lectina se une, los cuales, durante el desarrollo normal podrían participar en la regulación de la síntesis protéica en una etapa más avanzada del desarrollo. Con A ha sido descrito como un inductor de diferenciación celular (95) y otra lectina, la aglutinina de germen de trigo (WGA), causa el adelantamiento de algunos procesos morfogénéticos, como compactación y blastulación, en embriones preimplantacionales de

ratón (57). Nuestros resultados sugieren que podría estar operando un adelanto semejante en la diferenciación molecular. Desconocemos, sin embargo, si las modificaciones en las proteínas sintetizadas inducidas por Con A corresponden a las observadas en una etapa más avanzada o si estos cambios corresponden a modificaciones postraduccionales.

CCD y α -La modifican en una forma muy semejante la síntesis de proteínas y sólo un 25% de las 141 proteínas observadas en geles bidimensionales se afecta en forma diferente. Estas podrían deberse a modificaciones postraduccionales distintas inducidas por cada tratamiento, o a alteraciones de la síntesis de proteínas que no estén relacionadas directamente con la compactación. Se ha descrito que CCD, produce una modificación de los mRNAs asociados al citoesqueleto y, por ello, una disminución en la traducción (3, 87). Además, las diferencias en la síntesis de proteínas inducidas por estos dos tratamientos, así como las inducidas por Con A o incluso por EGTa, también podrían atribuirse a que cada uno de estos agentes afecte distintas etapas de la compactación. Suponiendo que cada etapa regule proteínas específicas, se esperaría que la compactación inhibida por CCD o por α -La afectaran proteínas distintas. Dicha explicación, sin embargo, es poco probable. Hemos demostrado que α -La inhibe sólo la segunda etapa de la compactación, mientras que CCD altera todas las etapas, lo cual significa que los cambios en la síntesis de proteínas inducidos por α -La debieran estar incluidos en los cambios inducidos por CCD, pero nuestros resultados sugieren que ese no es el caso.

Finalmente, sólo una proteína corresponde a lo que

podía esperarse si nuestra proposición fuese correcta. Su peso molecular y punto isoeléctrico no coinciden con ninguna de las proteínas conocidas cuya síntesis es dependiente de la forma celular (11, 23, 25, 67, 83, 97, 117). Hay que tener presente, sin embargo, que más de un 25% de las proteínas son afectadas por los tratamientos en forma independiente de la compactación, y por lo tanto sería aventurado afirmar que la proteína encontrada es una proteína regulada por la compactación.

Es interesante destacar que tanto la constancia del patrón electroforético observado para los distintos tratamientos, como las pequeñas variaciones observadas durante el desarrollo sugieren que la mayor parte de las proteínas que estamos detectando puedan ser indispensables para la mantención de la estructura y las funciones celulares básicas ("housekeeping proteins"), y no estar comprometidas directamente en los procesos celulares de diferenciación y morfogénesis.

Teniendo en cuenta las limitaciones de la técnica de la autorradiografía de geles uni o bidimensionales, detalladas en la sección Resultados, sólo podemos concluir que no hemos detectado cambios en la síntesis de las aproximadamente 140 proteínas analizadas que pudieran relacionarse con la compactación. Es posible que algunas de las proteínas que hemos estudiado hayan variado su síntesis sin que lo hayamos detectado. Pero también han utilizado la misma técnica para reconocer los cambios temporales y espaciales en el patrón electroforético de síntesis protéica. Según los experimentos aquí descritos, dichos cambios no parecen estar regulados por el cambio de forma celular durante la compactación.

2. ¿Es la actividad nuclear un regulador de la síntesis de proteínas?

Hemos analizado dos actividades nucleares (transcripción y replicación) en relación con la síntesis de proteínas.

Podemos suponer justificadamente que hemos inhibido la síntesis de RNA en los experimentos con α -amanitina (73) y sobre esa base es posible hacer los siguientes comentarios.

Primero. El patrón de proteínas sintetizadas por los embriones entre las 0 y las 6 horas después de la compactación no es afectada, en nuestros experimentos, por ninguna de las dos concentraciones de α -amanitina, lo cual sugiere que dichas proteínas se sintetizan usando mRNAs transcritos antes de la compactación. Como se ha descrito que después del estado de 2 células prácticamente la totalidad del mRNA proviene del embrión (31), es muy probable que las proteínas que se sintetizan durante el proceso de compactación sean, en su mayoría, traducciones de mRNAs transcritos cuando los embriones tenían de 2 a 8 células. Además, se ha descrito que después de la compactación la cantidad de mRNA se duplica (94), lo cual significa de acuerdo con nuestros resultados, que esos transcritos tampoco se traducen inmediatamente, sino más tarde. Segundo. Un gran número de proteínas sintetizadas entre las 6 y 24 horas después de la compactación requieren de transcripción en esa etapa. Este resultado sugiere que el patrón de diferenciación temporal que hemos descrito para el estado de blastocisto puede ser regulado en parte a nivel transcripcional. Una regulación transcripcional semejante ha sido demostrada en etapas más iniciales del desarrollo preimplantacional (13, 92). El conjunto de estos

resultados permite sugerir la siguiente generalización: aún cuando el desarrollo preimplantacional está sujeto a regulación transcripcional, los mRNAs sintetizados son frecuentemente de larga vida y se utilizan más tarde, los mRNAs transcritos durante la segmentación son traducidos durante la compactación y los transcritos durante la compactación son traducidos durante la blastulación.

Basados en los experimentos con afidicolina podemos proponer que la replicación del DNA regula la síntesis de proteínas. Cuando los embriones son tratados por 24 horas con afidicolina desde el momento en que se compactan, muchas de las proteínas sintetizadas son distintas a las de los controles; esto sugiere que se requiere de los ciclos cuarto, quinto o sexto para que la actividad transcripcional, y por consiguiente la traducción, sea normal. Este mecanismo de diferenciación temporal basado en el ciclo celular, ha sido demostrado en diversos sistemas. Por ejemplo, el aumento del mRNA de acetilcolinesterasa (un marcador de la diferenciación del linaje celular del músculo de la cola de la larva de ascidia), requiere de un número preciso de ciclos de replicación del DNA para que ocurra en el tiempo apropiado (91); lo mismo puede decirse del cambio de la forma liviana (63) a la forma pesada (85) de la DNA ligasa en embriones de anfibios (71), o de la diferenciación sin clivaje en anélidos (2).

Sin embargo, la modificación del patrón de síntesis de proteínas inducido cuando se inhibe la replicación no puede ser explicado totalmente como un efecto mediado por la transcripción. Cuando los embriones son tratados con afidicolina por 6 horas desde el momento en que se compactan (inhibición del cuarto ciclo

de replicación), también se afecta la síntesis de proteínas, pero nuestros experimentos con α -amanitina, indican que dicha síntesis es independiente de la actividad transcripcional del embrión. Estos resultados sugieren que la replicación del DNA podría regular la traducción sin mediar la transcripción, como ha sido demostrado en células Hela y embriones de erizo de mar para la síntesis de proteínas histónicas, las cuales son reguladas por los ciclos de replicación del DNA (4, 56). Los tratamientos con α -amanitina utilizados, tanto por nosotros como por otros autores (73, 100) inhiben efectivamente la síntesis de RNA, sin embargo, no es posible afirmar absolutamente una inhibición completa y excluir que la síntesis de proteínas entre las 0 y las 6 horas después de la compactación pueda ser regulada por un efecto transcripcional, dependiente de la replicación de DNA.

Hay otras alternativas que es necesario considerar.

Primero. Es posible que algunos cambios en el patrón electroforético de las proteínas sintetizadas se deban a una degradación proteolítica inducida por estos tratamientos. Si así fuera, debería haber cierta correspondencia entre la disminución de proteínas de alto peso molecular y el aumento de proteínas de bajo peso molecular. Sin embargo, las mediciones en los densitogramas indican que la disminución de las proteínas de pesos moleculares altos (zona de las proteínas a, e) es mucho menor que el aumento en los polipéptidos pequeños, por lo cual, aún teniendo en cuenta la no linealidad de la Absorbancia con la cantidad de proteínas, resulta improbable que los cambios puedan ser explicados sólo por proteólisis.

Segundo. Es posible que los tratamientos usados induzcan

modificaciones en el transporte de aminoácidos (entre ellos metionina) aumentando la incorporación de marca radiactiva con la consecuente modificación del patrón electroforético; sin embargo, no hemos encontrado diferencias significativas en la cantidad de metionina incorporada al embrión entre los controles y los tratados con afidicolina, o sea, el transporte de metionina no se modificaría por el tratamiento. Tercero. Es posible que una prolongación del ciclo celular acelere el recambio de las proteínas en forma inespecífica, con lo que el patrón de proteínas sintetizadas se alteraría, pero éste fenómeno, así como diferencias en el transporte del precursor, debiera causar un efecto generalizado en las proteínas y no el aumento de algunas y la disminución de otras como en nuestros resultados.

Cuarto. Es posible que el cambio en el patrón de proteínas sintetizadas al tratar los embriones con afidicolina corresponda a una reacción de "emergencia" similar a los cambios inducidos en muchas células al variar bruscamente la temperatura, los nutrientes, etc.; estas situaciones de tensión inducen la síntesis de un complejo de proteínas llamadas hsp ("heat shock proteins"). En embriones preimplantacionales se ha descrito la síntesis de un complejo de 69/70 Kd como hsp (8) y podrían corresponder a proteínas que migran entre las zonas de las proteínas 3 y 41; pero aún si fuere así, las hsp serían insuficientes para dar cuenta de todos los cambios observados.

En conclusión, nuestros resultados demuestran que los cambios en el patrón electroforético inducido por afidicolina se deben a una participación de los ciclos del DNA en la síntesis de proteínas y que este efecto probablemente no es mediado por

transcripción.

Finalmente, es interesante destacar que los cambios en el patrón de síntesis de proteínas inducidos por los tratamientos con α -amanitina y afidicolina, por comparación con los controles, no son sólo de ausencia o disminución de proteínas sino también de presencia o aumento de bandas que no se observan en los controles. Es decir, la detención de la replicación en el cuarto ciclo no causaría una detención del "reloj de síntesis protéica", sino que al parecer un funcionamiento anormal de dicho "reloj". Esto podría explicarse por la participación en la síntesis de esas proteínas tanto de factores estimulantes como inhibidores cuya acción sería dependiente de los ciclos de replicación del DNA. En consecuencia, la ausencia de la actividad inhibitoria causaría a un aumento en la velocidad de síntesis de algunas proteínas, mientras que la ausencia de actividad estimulantes causaría a una disminución en la síntesis de otras proteínas, tal como lo hemos observado.

Nuestros resultados implican que en la medición del tiempo, responsable de los cambios moleculares descritos, participan las replications del DNA aunque éste no sea el único factor. Se ha demostrado en el embrión inicial de mamíferos que ni las divisiones celulares, ni las divisiones nucleares, ni una relación núcleo/citoplasma crítica, ni el tamaño del embrión, ni el número de células, participan en la medición del tiempo del desarrollo (véase Introducción), y como se infiere de este trabajo, sabemos ahora que la compactación tampoco es decisiva en esa medición.

El modelo que se ha propuesto para otros sistemas

embrionarios y que podría extrapolarse a éste, se basa en que con cada replicación del DNA ocurrirían modificaciones químicas de los nucleótidos que podrían ser detectadas por la maquinaria celular de transcripción o posiblemente de traducción (24), de tal manera que las células del embrión sintetizarían las proteínas que les corresponde al reconocer el número de ciclos transcurridos por las modificaciones del DNA.

Una de las modificaciones químicas que se han propuesto como reguladores de la actividad génica son las metilaciones del DNA. Se piensa que estas metilaciones podrían afectar la interacción proteína-DNA e inhibir la expresión génica (24); además, en nuestro caso algunas de estas proteínas cuya interacción con el DNA sería dependiente de las modificaciones químicas que éste contenga, podrían ser transportadas fuera del núcleo y afectar otros procesos bioquímicos, tales como la traducción. Sin embargo, carecemos de evidencia experimental nuestra o de otros autores que den apoyo directo a la posibilidad planteada.

En el desarrollo de mamíferos la regulación de la expresión génica por cambios en los niveles de metilación se ha propuesto para explicar el fenómeno de marca parental (imprinting). Está demostrado en muchos casos que los genes insertados en ratones transgénicos muestran actividad diferencial dependiendo si ellos son heredados del padre o de la madre, encontrándose una estrecha correlación entre la actividad génica, la herencia paterna o materna y el grado de metilación (109a). Esto ha llevado a proponer a la metilación del DNA como un importante mecanismo epigenético por el cual patrones de actividad génica - por

oposición a programa genético - son heredados durante el desarrollo. Nuestros resultados acerca de la participación de los ciclos de replicación del DNA en la regulación de la síntesis protéica concuerdan más con una explicación epigenética (o histórica, véase Introducción), que con la idea de un programa genético que ordena temporalmente en una secuencia lineal a los eventos del desarrollo (véase análisis de estas alternativas en Apéndice II). Sin embargo, nuestros resultados pueden considerarse preliminares en cuanto no demuestran que los ciclos de replicación del DNA sean explicación suficiente de un reloj del desarrollo.

4. Conclusiones

1) El patrón electroforético de las proteínas sintetizadas no es afectado al inhibir la compactación con diversos procedimientos, lo cual significa que el cambio de forma celular que ocurre durante ese proceso no regularía la síntesis de las proteínas estudiadas. Dicho en otra forma, una regulación en la síntesis de proteínas por cambios de los contactos o de la forma celular que ocurren durante la compactación no es confirmada por nuestros resultados.

2) El patrón electroforético de las proteínas sintetizadas es afectado notoriamente al inhibir la replicación y transcripción del DNA, pero hemos observado efectos de la replicación que no serían mediados por transcripción. Por lo tanto, en la diferenciación temporal de las proteínas sintetizadas podría participar un reloj basado en ciclos de replicación del DNA.

Dicho de otra manera, una regulación de la síntesis de proteínas por ciclos de replicación del DNA es compatible con nuestros resultados.

3) Los resultados anteriores no permiten discriminar entre el efecto de un programa de expresión génica ubicado en el DNA y el efecto de modificaciones del DNA inducidas por factores epigenéticos.

REFERENCIAS

1. ABREU, S.L., BRINSTER, R. L. (1978). Synthesis of tubulin and actin during the preimplantation development of the mouse. *Exp. Cell Res.* 114 :135-141.
2. ALEXANDRE, H., DE PETROCELLIS, B., BRACHET, J. (1982). Studies on differentiation without cleavage in "Chaetopterus". Requirement^m_A for a definite number of DNA replication cycles shown by aphidicolin pulses. *Differentiation* 22 :132-135.
3. BAG, J., PRAMANIK, S. (1987). Attachment of mRNA to the cytoskeletal framework and translational control of gene expression in rat L6 muscle cells. *Biochem. Cell Biol.* 65 :565-575.
4. BAUMBACH, L.L., MARASHI, F., PLUMB, M., STEIN, G., STEIN, J. (1984). Inhibition of DNA replication coordinately reduces cellular levels of core and H1 histone mRNAs: requirement for protein synthesis. 23 :1618-1625.
5. BAYNA, E.M., RUNYAN, R.B., SCULLY, N.F., RICHNER, J., LOPEZ, L.C., SHUR, B.D. (1986). Cell surface galactosyltransferase as a recognition molecule during development. *Mol. Cell Biochem.* 72 :141-151.
6. BACHVAROVA, R., DE LEON, V. (1980). Polyadenylated RNA of mouse ova and loss of maternal RNA in early development. *Dev. Biol.* 74 :1-8.
7. BENOS, D.J., BIGGERS, J.D. (1981). Blastocyst fluid formation. *En: Fertilization and embryogenic development "in vitro"* (ed. I. Mastroianni, Biggers, d.). Plenum Publ.

Corp., pp. 283-297.

8. BENSUADE, O., BABINET, C., MORANGE, M., JACOB, F. (1983).

Heat shock proteins, first major products of zygotic gene activity. *Nature* 305 :331-333.

9. BEN-ZE'EV, A. (1986). The relationship between cytoplasmic

organization, gene expression and morphogenesis. *Trends Biochem. Sci.* 11 :478-481

10. BEN-ZE'EV, A., FARMER, S., PENNMAN, S. (1980). Protein

synthesis requires cell-surface contact while nuclear events respond to cell shape in anchorage-dependent fibroblasts. *Cell* 21 :365-372.

11. BEN-ZE'EV, A., ROBINSON, G.S., BUCHER, N.L., FARMER, S.R.

(1988). Cell-cell and cell-matrix interactions differentially regulate the expression of hepatic and cytoskeletal genes in primary cultures of rat hepatocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 85 :2161-2165.

12. BIGGERS, J.A., WHITTEN, W.K., WHITTINGHAM, A.G. (1971). The

culture of mouse embryos 'in vitro'. In: *Methods in mammalian embryology* (ed. J.A. Daniel, W.h. Freeman) San Francisco, pp. 86-115.

13. BOLTON V.N., OADES, P.J., JOHNSON, M.H. (1984). The

relationship between cleavage, DNA replication, and gene expression in the mouse 2-cell embryo. *J. Embryol. Exp. Morph.* 79 :139-163.

14. BONNER, W.M., LASKEY, R.A. (1974). A film detection method

for tritium-labelled proteins and nucleic acids in polyacrylamide gels. *Eur. J. Biochem.* 46 :83-88.

- 14a. BORLAND, R.M., TASCA, R.J. (1974). Activation of Na⁺-dependent aminoacid transport system in preimplantation mouse embryos. *Dev. Biol.* 36 :169-182
15. BRAUDE, P.R., PELHALM, H.R.B., FLACH, G., LOBATTO, R. (1979). Post-transcriptional control in the early mouse embryo. *Nature* 282 :102-105.
16. BRAUDE, P., BOLTON, V. MOORE, S. (1988). Human gene expression first occurs between the four- and eight-cell stages of preimplantation development. *Nature* 332: 459-461.
17. BRAVO, R., CELIS, J.E., (1980). A search for a differential polypeptides synthesis throughout the cell cycle of HeLa cells. *J. Cell Biol.* 84 :795-802.
18. BURKHOLDER, G.D., COMINGS, D.E., OKADA, T.A. (1971). A storage form of ribosomes in mouse oocytes. *Exp. Cell Res.* 69 :361-371.
19. CLEGG, K.B., PIKO, L. (1975). Patterns of RNA synthesis in early mouse embryos. *J. Cell Biol.* 67 :72a.
20. CLEGG, K.B., PIKO, L. (1982). RNA synthesis and cytoplasmic polyadenylation in the one-cell mouse embryo. *Nature* 295 :342-245.
21. CLEGG, K.B., PIKO, L. (1983). Quantitative aspects of RNA synthesis and polyadenylation in 1-cell and 2-cell mouse embryos. *J. Embryol. Exp. Morph.* 74 :169-182.
22. DAVIDSON, E.H. (1987). Understanding embryonic development : A contemporary view. *Amer. Zool.* 27 :581-591.
23. DEAN, M., LEVINE, R.A., RAN, W., KINDY, M.S., SOENENSHEIN, G.E., CAMPIS, J. (1986). Regulation of c-myc transcription

- and mRNA abundance by serum growth factors and cell contacts. *J. Biol. Chem.* 261 :9161-9166.
24. CEDAR, H. (1988). DNA methylation and gene activity . *Cell* 53 :2-4.
25. DIKE, L., FARMER, S. (1988). Cell adhesion induces expression of growth-associated genes in suspension-arrested fibroblast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 85 :6792-6796.
26. DUCIBELLA, T. (1982). Depolymerization of microtubules prior to compaction . *Exp. Cell Res.* 138 :31-38.
27. DUCIBELLA, T. ANDERSON, E. (1975). Cell shape and changes in the eight-cell mouse embryo: prerequisites for morphogenesis of the blastocyst. *Dev. Biol.* 47:45-58.
28. DUCIBELLA, T. UKENA, T., KARNOVSKY, M., ANDERSON, E. (1977). Changes in cell surface and cortical cytoplasmic organization during early embryogenesis in the preimplantation mouse embryo. *J. Cell Biol.* 74 :153-167.
29. EDGAR, B.A., KIEHLE, C.P., SCHUBIGER, G. (1986). Cell cycle control by the nucleo-cytoplasmic ratio in early *Drosophila* Development. *Cell* 44 :365-372.
- 29a. ENDO, T., NADAL-GINARD, P.J. (1987). Three types of muscle-specific gene expression in fusion-blocked rat skeletal muscle cells: translation control in EGTA-treated cells. *Cell* 49 :515-526.
- 29b. EPSTEIN, C.J., SMITH, S.A. (1973). Amino acid uptake and protein synthesis in preimplantation mouse embryos. *Dev. Biol.* 33 :171-184.
30. FERNANDEZ, M.S., IZQUIERDO, L. (1983). Blastocel formation

- in half and double mouse embryos. *Anat. Embryol.* 160 : 77-82.
31. FLACH, G., JOHNSON, M.H., BRAUDE, P.R., TAYLOR, R.S., BOLTON, V.N. (1982). The transition from maternal to embryonic control in the 2-cell mouse embryo. *EMBO J.* 1 :681-686.
32. GAUNT, S.J. (1985). In vivo and in vitro cultured mouse preimplantation embryos differ in their display of a teratocarcinoma cell surface antigen: possible binding of an oviduct factor. *J Embryol. Exp. Morph.* 88 :55-70.
33. GEHRING, W.J. (1987). Homeo boxes in the study of development. *Science* 236 :1245-1252.
34. GERHART, J.C. (1987). Determinants on early amphibian development. *Amer. Zool.* 27 :593-605.
35. GIEBELHAUS, D.H., HEIKKILA, J.J., SCHULTZ, G.A. (1983). Changes in the quantity of histone and actin messenger RNA during the development of preimplantation mouse embryos. *Dev. Biol.* 98 :148-154.
- 35a. GINSBERG, L., HILLMAN, N. (1975). Shifts in ATP synthesis during preimplantation stages of mouse embryos. *J. Reprod. Fertil.* 43 :83-89.
36. GOODALL, H. , JOHNSON, M.H. (1984). The nature of intercellular coupling within the preimplantation mouse embryo. *J. Embryol. Exp. Morph.* 79 :53-76.
37. GOUSTIN, A.S., BETSHOLTZ, C., PFEIFER-OHLSSON, S., PERSSON, H., RYDNERT, J., BYWATER, M., HOLMGREN, G., HELDIN, C-H., WESTERMARK, B., OHLSSON, R. (1985). Coexpression of the sis and myc proto-oncogenes in developing human placenta

- suggests autocrine control of trophoblast growth. *Cell* 41 :301-312.
38. GRAHAM, C. F., DEUSSEN, Z.A. (1978). Features of cell lineage in preimplantation mouse embryos. *J. Embryol. exp. Morphol.* 48:53-72.
39. GRAVES, R.A., MARZLUFF, W.F., GIEBELHAUS, D.H., SCHULTZ, G.A. (1985). Quantitative and qualitative changes in histone gene expression during early mouse embryos development. *Proc Natl. Acad. Sci. USA.* 82 :5685-5689.
40. GREEN, P.B. (1987). Inheritance of pattern: analysis from phenotype to gene. *Amer. Zool.* 27: 657-674.
41. HANDYSIDE, A.H., JOHNSON, M.H., (1978). Temporal and spatial patterns of the synthesis of tissue-specific polypeptides in the preimplantation mouse embryo. *J. Embryol. Exp. Morph.* 44 :191-199.
42. HANDYSIDE, A.H., EDIDIN, M., WOLF, D. (1987). Polarized distribution of membrane components on two-cell mouse embryos. *Roux's Arch. Dev. Bio.* 196:273-278.
43. HESS, B., MARKUS, M. (1987). Order and chaos in biology. *Trends Biochem. Sci.* 12 :21.
44. HOULISTON, E., PICKERING, S.J., MARO, B. (1987). Redistribution of microtubules and pericentriolar material during the development of polarity in mouse blastomeres. *J. Cell Biol.* 104 :1299-1308.
45. HOWLETT, S.K. (1986). The effect of inhibiting DNA replication in the one-cell mouse embryo. *Roux's Arch. Dev. Biol.* 195 :499-505.

46. HOWLETT, S.K., BOLTON, V.N. (1985). Sequence and regulation of morphological and molecular events during the first cell cycle of mouse embryogenesis. *J. Embryol. Exp. Morph.* 87 :175-206.
47. HOWLETT, S.K., BARTON, S.C., NORRIS, M.L., SURANI, M.A.H. (1988). Nuclear and cytoplasmic localization of newly synthesized proteins in the early mouse embryo. *Development* 103 :129-134.
48. HYAFIL, F., MORELLO, D., BABINET, C., JACOD, F. (1980). A cell surface glycoprotein involved in the compaction of embryonal carcinoma cells and cleavage stage embryos. *Cell* 21 :927-934.
49. IKEGAMI, S., AMEMIYA, S., OGURO M., NAGANO H., MANO, Y. (1978). Inhibition by aphidicolin of cell cycle progression and DNA replication in sea urchin embryos. *J. Cell . Physiol.* 100 :439-444.
50. IZQUIERDO, L. (1986). Desde la especificación regional a la diferenciación celular en el desarrollo preimplantacional de mamíferos. *Arch. Biol. Med. Exp.* 19:279-300.
51. IZQUIERDO, L., EBENSPERGER, C. (1982). Cell membrane regionalization in early mouse embryos as demonstrated by 5'-nucleotidase activity. *J. Embryol. Exp. Morph.* 59:98-102.
52. IZQUIERDO, L., FERNANDEZ, M.S., LOPEZ, T. (1976). Cell membrane and cell junction in differentiation of preimplantation mouse embryos. *Arch. Biol. Med. Exp.* 10 :399-402.
53. IZQUIERDO, L., LOPEZ, T., MARTICORENA, P. (1980). *Cell*

- membrane regions in preimplantation mouse embryos. *J. Embryol. Exp. Morph.* 59:89-102.
54. 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.
55. JACKSON, B. W., GRUND, C., WINTER, W., FRANKE, W., ILLMENSEE, C. (1981). Formation of cytoskeletal elements during mouse embryogenesis. I. Intermediate filaments of the cytokeratin type and desmosomes in preimplantation embryos. *Differentiation* 17 :161-179.
56. JARVIS, J.W., MARZLUFF, W.F. (1989). The early and late sea urchin histone H4 mRNAs respond differently to inhibitors of DNA synthesis. *Dev. Biol.* 132 :325-330
57. JOHNSON, L.V. (1986). Wheat germ agglutinin induces compaction -and cavitation-like events in two-cell mouse embryos. *Dev. Biol.* 113 :1-9.
58. JOHNSON, M.H. (1979). Molecular differentiation of inside cells and inner masses isolated from the preimplantation mouse embryo. *J. Embryol. Exp. Morph.* 53 :335-344.
59. JOHNSON, M.H., MARO, B. (1984). The distribution of cytoplasmic actin in mouse 8-cell blastomeres. *J. Embryol. Exp. Morph.* 82 :97-17.
60. JOHNSON, M.H., PRATT, H.P.M. (1983). Cytoplasmic localizations and cell interactions in the formation of the mouse blastocyst. *En : Time, space and pattern in embryonic development.* Alan R. Liss., (1a Ed.), pp. 287-312.

61. JOHNSON, M.H., ROSSANT, J. (1981). Molecular studies on cells of the trophoectodermal lineage of the postimplantation mouse embryo. *J. Embryol. Exp. Morph.* 61 :103-116.
62. JOHNSON, M.H., PRATT, H.P.M., HANDYSIDE, A.H. (1981). The generation and recognition of positional information in the preimplantation mouse embryo. In: *Cellular and Molecular aspects of implantation* (ed. S.P. Glasser y D. W. Bullock). Plenum Publishing Corporation pp. 55-74.
63. JOHNSON, M.H., CHISHOLM, J.C., FLEMING, T.P., HOULISTON, E. (1986). A role for cytoplasmic determinants in the development of the mouse early embryo. *J. Embryol. Exp. Morph.* 97:Supplement 97-121.
64. KEMLER, R., BABINET, C., EISEN, H., JACOB, F. (1977). Surface antigen in early differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 74 :4449-4452
65. KEMP, R.B., HINCHLIFFE, J.R. (1984). *Matrices and cell differentiation.* Alan R. Liss, Inc., New York.
66. KIDDER, G.M., PEDERSEN, R.A. (1982). Turnover of embryonic messenger RNA in preimplantation mouse embryos. *J. Embryol. Exp. Morph.* 67 :37-49.
67. KOMADA, H., NAKABAYASHI, H. IDOTA, M., HARA, M., TAKAHASHI, T., TAKANARI, H., IZUTSU, K. (1987). Cytochalasin B enhances T cell mitogenesis by promoting expression of an interleukin 2 receptor. *Cell Struct. Funct.* 12 :281-285.
68. LAEMMLI, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*

227 :680-685.

69. LAMARCA, M.J., WASSARMAN, P.M. (1979). Program of early development in the mammal: changes in absolute rates of synthesis of ribosomal proteins during oogenesis and early embryogenesis in the mouse. *Dev. Biol.* 73 :103-119.
70. LEE, S., GILULA, N.B., WARNER, A.E. (1987). Gap junctional communication and compaction during preimplantation stages of mouse development. *Cell* 51 :851-860.
71. LEFRESNE, J., DAVID, J.C., SIGNORET, J. (1983). DNA ligase in axolotl egg: A model for study of gene activity control. *Dev. Biol.* 96 :324-330.
72. LENK, R., RANSOM, L., KAUFMAN, Y., PENMAN, S. (1977). A cytoskeletal structure with associated polyribosomes obtained from HeLa cells. *Cell* 10 :67-78.
- 72a. LE PEUCH, C.J., BALLESTER, R., ROSEN, O.M. (1983). Purified rat brain calcium- and phospholipid-dependent protein kinase phosphorylates ribosomal protein S6. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 80 :6858-6862.
73. LEVEY, I.L., BRINSTER, R.L. (1978). Effects of α -amanitin on RNA synthesis by mouse embryos in culture. *J. Exp. Zool.* 203 :351-360.
74. LEVEY, I.L., STULL, G.B., BRINSTER, R.L., (1978). Poly(A) and synthesis of polyadenylated RNA in the preimplantation mouse embryo. *Dev. Biol.* 64 :140-148.
75. LEVINSON, J., GOODFELLOW, P., VADEBONCOUER, M., MCDEVITT, H. (1978). Identification of stages specific polypeptides synthesized during murine preimplantation development. *Proc.*

- Natl. Acad. Sci. USA. 75 :3332-3336.
76. LO, C.W., GILULA, N.B. (1979). Gap junctional communication in the preimplantation mouse embryos. *Cell* 18 :399-409.
77. LOIS, P., IZQUIERDO, L. (1984). Cell membrane regionalization and cytoplasm polarization in the rat early embryo. *Roux's Arch. Dev. Biol.* 193:205-210.
78. MARO, B., PICKERING, S.S. (1984). Microtubules influence compaction in preimplantation mouse embryos. *Cell* 18 :399-409.
80. McLACHLIN, J.R., CAVENEY, S., KIDDER, G. (1983). Control of gap junction formation in early mouse embryos. *Dev. Biol.* 98 :155-164.
81. MITA-MIYAZAWA, I., IKEGAMI, S., SATOH, N. (1985). Histo-specific acetylcholinesterase development in the presumptive muscle cells isolated from 16-cell stage ascidian embryos with respect to the number of DNA replication. *J. Embryol. Exp. Morph.* 87 :83-94.
82. MOORE, J.A. (1987). Science as a way of knowing-developmental biology. *Amer. Zool.* 27 :415-573.
83. NEWMAN, P., WATT, F.M. (1988). Influence of cytochalasin D-induced changes in cell shape on proteoglycan synthesis by cultured articular chondrocytes. *Exp. Cell Res.* 178 :199-210.
84. NEWPORT, J., KIRSCHNER, M. (1982). A major developmental transition in early "Xenopus" embryos: I Characterization and timing of cellular changes at the midblastula stages. *Cell* 30 :675-686.

85. NIELSEN, P., GOELZ, S., TRASCHSEL, H. (1983). The role of the cytoskeleton in eukaryotic protein synthesis. *Cell Biol. Int. Rep.* 7 :245-254.
86. O'FARRELL, P.H. (1975). High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J. Biol. Chem.* 250 :4007-4020.
87. ORNELLES, D.A., FEY, E.G., PENNMAN, S. (1986). Cytochalasin releases mRNA from cytoskeletal framework inhibits protein synthesis. *Mol. Cell Biol.* 6 :1650-1662.
88. PAYNTON, B.V., REMPEL, R., BACHVAROVA, R. (1988). Changes in state of adenylation and time course degradation of maternal mRNA during oocyte maturation and early embryonic development in the mouse. *Dev. Biol.* 129 :304-314.
89. PELHALM, H.R.B., JACKSON, R.J. (1976). An efficient mRNA-dependent translation system from reticulocyte lysates. *Eur. J. Biochem.* 67 :247-256.
- 89a. PERISIC, O., TRAUGH, J.A. (1983). Protease-activated kinase II mediates multiple phosphorylation of ribosomal protein S6 in reticulocytes. *J. Biol. Chem.* 258 :13998-14002.
90. PETZOLDT, U., MUGGLETON-HARRIS, A. (1987). The effect of nucleocytoplasmic ratio on protein synthesis and expression of stage-specific antigen in early cleaving mouse embryos. *Development* 99 :481-491.
91. PETZOLDT, U., HOPPE, P.C., ILLMENSEE, K. (1980). Protein synthesis in enucleated fertilised and unfertilised mouse eggs. *Roux's Arch. Dev. Biol.* 189 :215-219.
92. PETZOLDT, U., BURKI, K., ILLMENSEE, G.R., ILLMENSEE, K. (1983). Protein synthesis in mouse embryos with

experimentally produced asynchrony between chromosome replication and cell division. Roux's Arch. Dev. Biol. 192 :138-144.

93. PETZOLDT, U. (1984). Regulation of stage-specific gene expression during early mouse development: effect of cytochalasin B and aphidicolin on stage-specific protein synthesis in mouse eggs. Cell Differentiation 15 :163-167.

94. PIKO, L., CLEGG, K.B. (1982). Quantitative changes in total RNA, total Poly A and ribosomes in early mouse embryos. Dev. Biol. 89 :362-378.

95. PLEDGER, W.J., STILES, C.D., ANTONIADES, H.N., SCHER, C.D. (1977). Induction of DNA synthesis in Balb c-3T3 cells by serum components: reevaluation of the commitment process. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 74 :4481-4485.

95a

96. PRATT, H.P.M., ZIOMEK, C.A., REEVE, W.J.D., JOHNSON, M.H. (1982). Compaction of the mouse embryos : an analysis of its components. J. Embryol. Exp. Morph. 70 :113-132.

97. REBILLARD, M., LEIBOVITCH, S., JULLIEN, M, TALHA, S., HAREL, L. (1987). Early stimulation by EGF plus insulin of rRNA, c-fos, and actin mRNA expression: inhibition by cytochalasin D. Exp. Cell Res. 172 :432-438.

98. REEVE, W.J.D. (1981). Cytoplasmic polarity develops at compaction in rat and mouse embryos. J. Embryol. Exp. Morph. 62 :351-367.

99. REEVE, W.J.D. (1981). Effect of concanavalin A on the formation of the mouse blastocyst. J. Reprod. Immunol. 4 :53-64.

100. ROEDER, R.G. (1975). Multiple forms of deoxyribonucleic acid-dependent ribonucleic acid polymerase in 'Xenopus laevis'. *J. Biol. Chem.* 249 :241-248.
101. SCHULTZ, G.A., CLOUGH, J.R., BRAUDE, P.R., PELHALM, H.R.B., JOHNSON, M.H. (1981). A reexamination of messenger RNA populations in the preimplantation mouse embryos. In: Cellular and Molecular aspects of implantation (ed. Glasser, S.R., Bullock, D.W.) pp. 137-154.
102. SCHWARZPAUL, W. PETZOLDT, U. (1988). Influence of embryo size on lactate dehydrogenase isozyme expression in giant mouse chimaeras. *Anat. Embryol.* 178 :281-285.
103. SEPULVEDA, M.S., DOGGENWEILER, C., IZQUIERDO, L. (1985). Scanning microscopy of desaggregated and aggregated preimplantation mouse embryos. *Roux's Arch. Dev. Biol.* 194 :445-452.
104. SLACK, J.M.W. (1983). From egg to embryo "Developmental and cell biology series". Cambridge, Univ. Press.
105. SMITH, R., MCLAREN, A. (1977). Factors affecting the time formation of the mouse blastocoel. *J. Embryol. Exp. Morph.* 1: 79-92.
106. SOBEL, J.S. (1983). Localization of myosin in the preimplantation mouse embryo. *Dev. Biol.* 95:227-231.
107. SOBEL, J.S., ALLIEGRO, M.A. (1985). Changes in the distribution of a spectrin-like protein during development of the preimplantation mouse embryos. *J. Embryol. exp. Morph.* 69:115-126.
108. SOLTER, D., KNOWLES, B.B. (1975). Immunosurgery of mouse

- blastocyst. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 72 :5099-5102.
- 109.SPINDLE, A., NAGANO, H., PEDERSEN, R. (1985). Inhibition of DNA replication in preimplantation mouse embryos by aphidicolin. J. Exp. Zool. 235 :289-295.
- 109a.SURANI, M.A., REIK,W., ALLEN, N.D. (1988). Transgens as molecular probes for genomic imprinting. Trends in Genetics. 4 :59-62.
- 110.SUTHERLAND, A.E., CALARCO-GILMAN, P.G. (1983). Analysis of compaction in the preimplantation mouse embryo. Dev. Biol. 100 :328-338.
- 110a.TAHARA, S.M., TRAUGH, J.A. (1982). Differential activation of two protease- activated protein kinases from reticulocytes by Ca⁺⁺ stimulated protease and identification of phosphorylated translational components. Eur. J. Biochem. 126 :395-399.
- 111.TARKOWSKI, A.K. (1966). An air-drying method for chromosome preparations from mouse eggs. Cytogenetics. 5 :394-400.
- 112.TARKOWSKI, A.K., WROBLESWSCA, J. (1967). Development of blastomeres of mouse eggs isolated at the 4- and 8-cells stages. J. Embryol. Exp. Morph. 18 :155-180.
- 113.TASCA, R.J., HILLAMN, N. (1970). Effects of actinomycin D and cycloheximide on RNA and protein synthesis in cleavage stage mouse embryos. Nature 225 :1022-1025.
- 113a.TREVILLYAN, J.M., PERISIC, O., TRAUGH, J.A., BYUS, C.V. (1985). Insulin- and phorbol ester- stimulated phosphorylation of ribosomal protein S6. J. Biol. Chem. 260 :3041-3044.

114. VANBLERKOM, J. (1981). Structural relationship and post-translational modification of stages specific proteins synthesised during early preimplantation development in the mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 78 :7629-7633.
115. VANBLERKOM, J., McGAUGHEY, R.W., (1978). Molecular differentiation of the rabbit. I. During oocyte maturation 'in vivo' and 'in vitro'. *Dev. Biol.* 63 :139-150.
116. VANBLERKOM, J., BARTON, S.C., JOHNSON, M.H. (1976). Molecular differentiation in the preimplantation mouse embryo. *Nature* 259 :319-321.
117. VARDIMON, L., FOX, L.L., DEGENSTEIN, L., MOSCONA, A.A. (1988). Cell contacts are required for induction by cortisol of glutamine synthetase gene transcription in the retina. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 85 :5981-5985.
118. WILKINS, S.A. (1986). *En: Genetic Analysis of animal development.* John Wiley & Sons, Inc. New York.
119. YOUNG, R.J., SWEENEY, K., BEDFORD, J.M. (1978). Uridine and guanosine incorporation by the mouse one-cell embryo. *J. Embryol. Exp. Morph.* 44 :133-148.

Development of cytoskeletal connections between cells of preimplantation mouse embryos

Roberto Mayor, Roxana Pey, and Luis Izquierdo

Departamento de Biología, Universidad de Chile, Casilla 653, Santiago, Chile

Summary. Observations by scanning electron microscopy of mouse cleaving embryos reveal the presence of long microvilli around cell contact regions that often bridge the gap between blastomeres. These microvilli correspond, in detergent-extracted morulae, to strings connecting the cortical cytoskeletons of adjoining cells. They appear about 4 h after compaction in synchronized cultures. Transmission electron microscopy, heavy meromyosin decoration and DNase I digestion show that cytoskeletal connections contain bundles of actin microfilaments. The establishment of cytoskeletal connections does not require immediate protein synthesis, as shown by incubation with cycloheximide. Diverse treatments that interfere with compaction were tested for the development of cytoskeletal connections: culture media with low Ca^{2+} and/or Mg^{2+} , or EGTA, or α -lactalbumin, do not prevent the establishment of connections, while colchicine delays their appearance and cytochalasin D suppresses it. The relation between cytoskeletal connections, compaction and blastulation is discussed.

Key words: Morula - Cytoskeleton - Intercellular - Connections

Introduction

During early cleavage, the mouse embryo consists of spherical blastomeres contained by the zona pellucida but this picture changes drastically during compaction of the morula at the 8-cell stage. Compaction is recognized under the light microscope by an increased cell-cell apposition, the effacement of cellular outlines and the flattening of blastomeres while the embryo becomes spherical; and physiologically, by cellular coupling via gap junctions (Ducibella 1977; Lo and Gilula 1979; McLachlin et al. 1983). These transformations suggest a process of supracellular integration (Izquierdo 1986) in which the cytoskeleton probably plays a leading role.

Actin microfilaments are presumably involved, since 8-cell morulae are readily decompacted by cytochalasins. As to colchicine and colcemid, their effect on compaction seems to depend on the cell cycle and Taxol, a drug that promotes tubulin polymerization, inhibits compaction and causes decompaction (Wiley and Eglitis 1980; Kimber and Surani 1981; Pratt et al. 1982; Ducibella 1982; Sutherland

and Calarco-Gillam 1983; Izquierdo et al. 1984; Maro and Pickering 1984).

A role of the cytoskeleton in compaction is also supported by the regionalization of its components in 8-cell embryos, as detected by immunofluorescence. Cortical myosin concentrates at the regions opposite the cell contacts (Sobel 1983). Spectrin or fodrin condense at the cell cortex (Sobel and Alliegro 1985; Schatten et al. 1986; Damjanov et al. 1986) and cortical actin becomes concentrated during the 8-cell stage, at the regions away from cell contacts (Lehtonen and Badley 1980; Johnson and Maro 1984). As to tubulin, its localization is perinuclear rather than cortical but during the 8-cell stage it also accumulates at cortical regions away from cell contacts (Lehtonen and Badley 1980; Houlston et al. 1987). Notwithstanding the interest of these observations, a note of caution is pertinent, because the specificity of immunofluorescence may be excellent but its quantification and localization with the light microscope are less reliable and, further, observation of whole ova or cleavage stages causes confusing effects of light scattering and refraction.

Transmission electron microscopy, instead, permits a high-resolution description but its usefulness in studying the cytoskeleton is limited because the three-dimensional network is seen in practically two dimensions and the continuity of microtubules or microfilaments is interrupted and many spatial relationships are lost. The use of removable embedding media, however, has allowed the examination of thicker sections and thereby the preservation of additional spatial cues (Capco and McGaughey 1986). Scanning electron microscopy, which is especially suited for the description of whole structures, has been extensively applied to the study of the cell surface of mammalian embryos but has not been applied to the study of detergent-extracted mammalian ova, as it has sea urchin and ascidian embryos (Moon et al. 1983; Jeffery and Meier 1983).

Our report here deals with, first, a description of the cortical and inner cytoskeleton of blastomeres, as observed by scanning microscopy of detergent-extracted embryos; second, the correspondence of some structures thus observed with structures observed by transmission microscopy; third, the development at compaction of bridges that connect the cytoskeletons of adjoining blastomeres; fourth, the composition of cytoskeletal connections; fifth, the correlation between the development of cytoskeletal connections and the process of compaction, as studied by means of decompacting treatments.

3- Offprint requests to: L. Izquierdo

Ms. No. 243 Author Mayor

Ms. A-30 Pages 1-9

Materials and methods

Collection, culture and synchronization of embryos

Mouse embryos were obtained from CF 1 males mated with females of the same strain that had been induced to superovulate by intraperitoneal injections with 5 IU pregnant mare serum (Sigma) and 44 h later with 4 IU human chorionic gonadotropin (hCG; Sigma). Two-cell embryos were flushed, at 48 h post-hCG, from the oviduct with Biggers' medium (Biggers et al. 1971) supplemented with 4 mg/ml bovine serum albumin (Sigma). They were cultured for different periods in the same medium under mineral oil in an atmosphere of 5% CO₂ in humid air at 37° C until the required stage of development was reached. These culture conditions were used in all controls. In order to aggregate embryos, the zona pellucida was removed in acid saline (Ducibella 1980) and pairs were cultured in contact for 5–8 h (Sepúlveda et al. 1985).

Batches of embryos, monitored by light microscopy, showed that about 3 h elapse between the compaction of the first and the last normal-looking morula. In order to improve synchronization of development we discarded all ova that were still uncompact when 2/3 of them had already compacted. As a result, no morula in a batch had been compacted for longer than 1 h when all reached compaction. Postcompaction time thus established is used for describing the development of cytoskeletal connections. Cell counts were performed on morulae disaggregated in EGTA-containing medium.

Preparation of cytoskeletons

The procedure began by removing the zona pellucida, then the embryos were rinsed during 30 s in a stabilization buffer, permeabilized for 1–90 min at 37° C in 0.1%–1% Triton X-100 in the same buffer and rinsed again for 30 s. Removal of the zona had no effect on permeabilization but zona-free cytoskeletons were less contaminated with cellular debris. Time of extraction and detergent concentration, within the limits tested, had only scant differential effects but we selected as the best method an extraction with 0.5% Triton X-100 for 1 min. As to stabilization buffers, after testing several formulations we chose Sobel's modification (Sobel 1983) of a buffer that contains EGTA, ethylene glycol, PIPES and polyvinylpyrrolidone. Altogether 140 embryos were used for establishing the best methods.

The description of the cytoskeleton, including connections, is based on the observation of 243 embryos by scanning microscopy and 60 embryos by transmission microscopy, covering the whole range of stages.

Scanning electron microscopy

The embryos or their cytoskeletons were fixed in 3% (w/v) glutaraldehyde in 0.1 M phosphate buffer pH 7.4 at room temperature for 30–60 min. They were rinsed in the same buffer and mounted, under 30% (v/v) acetone, on aluminium plaquettes covered with 1% (w/v) gelatine, gradually dehydrated in acetone and dried to the critical-point using liquid CO₂. The samples were coated with a 30-nm-thick layer of gold in a Polaron E 5000 apparatus and examined with the scanning attachment of a Philips 300 electron microscope.

Transmission electron microscopy

The embryos or their cytoskeletons were fixed in 3% glutaraldehyde in 0.1 M phosphate buffer pH 7.4 with 1% or 2% tannic acid at room temperature for 60 min, then rinsed in the same buffer and postfixed in 1% OsO₄ for 60 min in the dark. After rinsing in phosphate buffer the material was dehydrated in acetone, embedded in Spurr's resin (Polyscience) and polymerized. Thin sections were stained for higher contrast with uranyl acetate and lead citrate before being observed under a Philips 300 electron microscope.

Cytochemistry

Actin filaments were decorated with heavy meromyosin by a method based on reports from Goldman (1975), Begg et al. (1978) and Hirokawa et al. (1982). Cytoskeletons were fixed in 1% paraformaldehyde (EMS) in phosphate buffer for 30 min at 0° C and rinsed several times in buffer. Then, they were incubated with 2 mg/ml heavy meromyosin (Sigma, from rabbit muscle) in phosphate/buffer, and 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (Sigma), at room temperature for 30 min. After rinsing in buffer the cytoskeletons were fixed in 1% glutaraldehyde with 0.2% tannic acid for 30 min at room temperature, rinsed and left overnight in phosphate buffer at 4° C. Finally, cytoskeletons were postfixed in OsO₄ and processed for transmission electron microscopy as above. Preparations in which the heavy meromyosin solutions had been boiled for 5 min served as controls.

Depolymerization of F-actin was achieved by incubating the cytoskeletons with 1–8 mg/ml DNase I (Sigma) for 20 min at room temperature (Hitchcock et al. 1976). To this medium we added 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride so as to inhibit protease activity. After incubation the cytoskeletons were processed for scanning or transmission electron microscopy.

Decompacting treatments and inhibition of protein synthesis

The treatments were applied according to the following time schedule. (a) Morulae 0 h postcompaction were incubated until 6 h postcompaction in the medium tested and then processed for scanning microscopy. (b) Morulae 0 h postcompaction were incubated until 21 h postcompaction in the medium tested and then some were processed for scanning microscopy while the others were observed by light microscopy so as to assess compaction at 21 h postcompaction and blastulation at 24 h postcompaction. (c) Morulae 6 h postcompaction were incubated in the medium tested until 21 h postcompaction and then studied as in (b). Control cultures in Biggers' supplemented medium were run in parallel to all treatments and postcompaction times refer to controls.

For treatments in media devoid of Ca²⁺ and/or Mg²⁺, Biggers' supplemented medium was modified by replacing calcium lactate with sodium lactate or magnesium sulfate with sodium sulfate, or replacing both Ca²⁺ and Mg²⁺ salts. The media are not, however, free of Ca²⁺ and/or Mg²⁺ because even pro-analysis reagents include significant amounts of them as impurities. Roughly, 'Ca-free' media contain 9.3 μM Ca²⁺ and 'Mg-free' media contain 7.2 μM Mg²⁺.

EGTA treatment medium contained 1 mM EGTA in medium devoid of Ca^{2+} and Mg^{2+} . Colchicine and cytochalasin D treatment media contained 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ colchicine (Sigma) or 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ cytochalasin D (Sigma) in supplemented Biggers' medium. For preparation of these media see Izquierdo et al. (1984). Lactalbumin treatment medium contained 0.2% α -lactalbumin (Sigma) in supplemented Biggers' medium.

Inhibition of protein synthesis was tested by incubating 2-h-postcompaction morulae until 6 h postcompaction in supplemented Biggers' medium containing 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ cycloheximide (Sigma) and then observing cytoskeletal connections by scanning microscopy and compaction by light microscopy.

Results

Description of cytoskeleton

Blastomeres of all stages show under the transmission or scanning microscope distinct cortical and interior parts. This distinction, however, is no longer evident in trophoblastic cells of early blastocysts.

The cortical cytoskeleton looks like a dense net, whose width measures 20–40 nm, mostly made of microfilaments, single or arranged in bundles. Measurements of single microfilaments by transmission microscope show a unit diameter of 6–8 nm, which corresponds to actin filaments. These measurements agree well with observations with the scanning microscope when the thickness of the metallic coat (30 nm) is subtracted. By scanning microscopy, the spaces between microfilaments show variable amplitudes. We have not observed consistent differences between regions of the cortex that correspond to regions of cell contact or to regions of free cell surface. Only the latter show microvilli, from compaction onwards (Sepúlveda et al. 1985), but these are rather scarce and lie on the surface of the cortex in detergent-extracted blastomeres. Detergent extraction probably detaches most of the microvilli from the cell surface and divests those remaining of their rigidity (Figs. 1–5).

The inner cytoskeleton can be observed by scanning microscopy through ruptures of the cortical cytoskeleton. It appears as a loose three-dimensional network made largely of thick fibers approximately 120 nm in diameter, excluding the width of the metallic coat. Filaments of diverse diameter and organelle remnants are also observed. The thick fibers recognized by scanning microscopy correspond, under the transmission microscope, to discrete packets of fibrillar arrays with a repetitive structure, the period measuring approximately 25 nm (Figs. 1–4, Fig. 6). This fibrillar material has been described in early embryos of different species since the first reports by Weakley (1968), Calarco and Brown (1969) and Hillman and Tasca (1969).

Cytoskeletal connections

The description above is complemented here with data on cytoskeletal connections between blastomeres, which arise during the 8-cell stage and develop further in later stages.

Connections appear approximately 4 h after the beginning of compaction, as monitored by light microscopy, in synchronized cultures (see Materials and methods). At 6 h postcompaction the connections are established between all blastomeres in 100% of the morulae, when cell counts re-

veal that they have 8–12 blastomeres. Cytoskeletal connections in 8–12-cell morulae show under the scanning microscope a width that ranges from 10 nm to 150 nm, depending on their number of microfilaments, and a length that can reach 3 μm when morulae have fully decompacted in the stabilization buffer (see Materials and methods). Cytoskeletal connections in late morulae look shorter, probably because they do not decompact as much, and more numerous. On the surface of early blastocysts cytoskeletal connections are often wide and form a band that stands out at the border of trophoblastic cells (Figs. 7–18). We have not studied connections between cells of the trophoblast and those of the inner mass nor connections between the latter cells.

The position and width of cytoskeleton connections correspond to the long microvilli of non-extracted morulae, which were otherwise similarly processed (Figs. 13–16). These long microvilli normally develop in compacted morulae around the smooth regions of the cell membrane at the sites of blastomere contact (Johnson and Ziomek 1981; Sepúlveda et al. 1985) and also form between aggregated embryos (Figs. 17, 18).

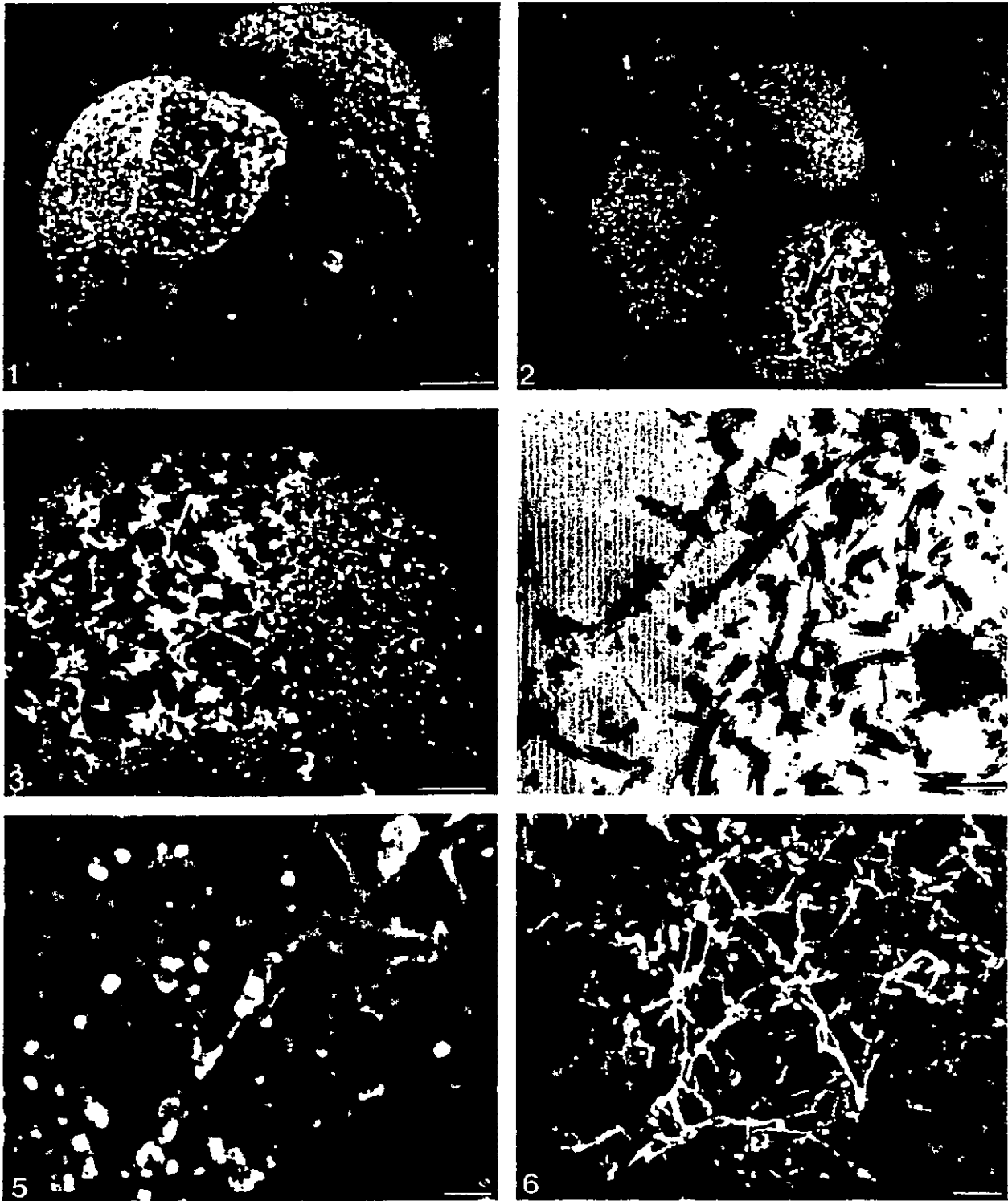
Structure of cytoskeletal connections

The connections contain abundant microfilaments, which resemble those of the cortical cytoskeleton and also reveal the dimensions of F-actin under the transmission microscope. Their identification as actin is further supported by two cytochemical demonstrations.

First, transmission microscopy shows that the microfilaments of cytoskeletal connections become decorated by heavy meromyosin. The interval between arrowheads on the microfilaments is approximately 25 nm and the orientation along the actin bundles is polarized. Heavy meromyosin decoration was observed on 12 embryos and control with boiled heavy meromyosin was performed on 5 embryos.

Second; scanning microscopy shows that connections disappear when morulae that developed for 6 h after compaction are incubated for 20 min with DNase I in a medium that includes the protease inhibitor phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) (Figs. 19, 20). Treatments with DNase I were performed on 338 embryos, including 35 controls in which the enzyme was replaced by bovine serum albumin. PMSF was added because in control experiments we observed that DNase I is not electrophoretically pure (Fig. 21 lane 1) and when incubated with a pure protein, such as bovine serum albumin (Fig. 21 lane 2), causes a proteolytic degradation of the latter (Fig. 21 lane 3); this proteolytic activity however, can be prevented by including PMSF in the incubation medium and thus the bovine serum albumin band is restored, the proteolytic fragments are effaced and the 30-KDa band, which is probably DNase I, is heightened (Fig. 21 lane 4).

We have not searched for other components, presumably included in microvilli, or cytoskeletal connections, which have been observed in association with microfilaments, such as myosin, villin, filamin, vinculin, etc. (Herman and Pollard 1981; Bretscher and Weber 1979; Hartwig and Stossel 1981; Bendori et al. 1987). Nor have we searched for components of tight or gap junctions or of intermediate filaments, which appear during compaction in regions of cell contact (Ducibella 1977; McLachlin et al. 1983; Emerson 1988).



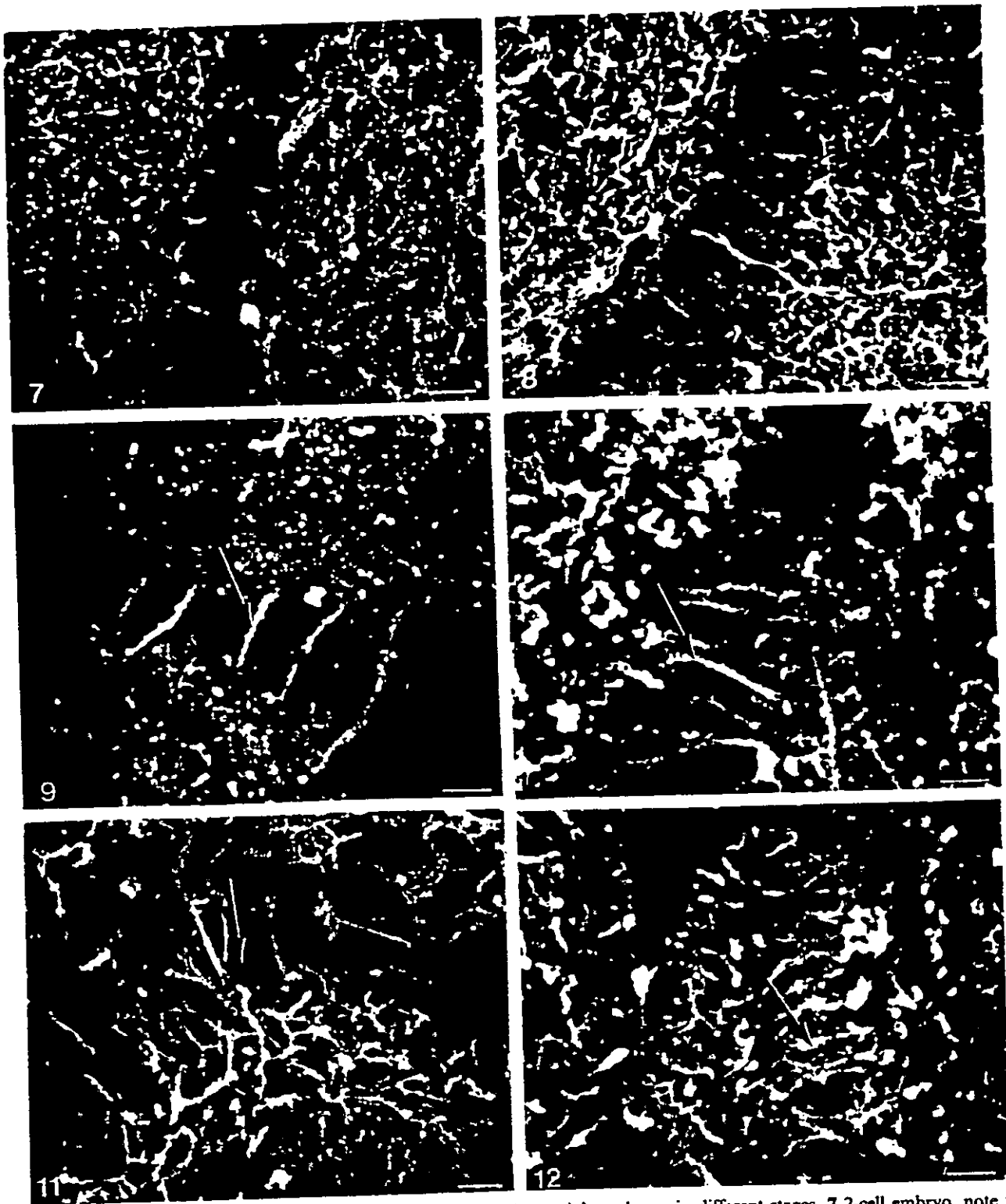
Figs. 1-6. Cytoskeletons of detergent-extracted embryos. 1 Scanning microscopy of a 2-cell embryo; cortical cytoskeleton (*) and inner cytoskeleton (arrow); bar = 10 μm . 2 Eight-cell embryo, see 1. 3 The same as above; bar = 2.5 μm . 4 Transmission microscopy of an 8-cell embryo; cortical cytoskeleton (*) and fibrillar arrays (arrow) in inner cytoskeleton; bar = 0.5 μm . 5 Scanning microscopy of an 8-cell embryo; cortical cytoskeleton showing remnants of microvilli (*); bar = 0.25 μm . 6 Same as above; inner cytoskeleton; bar = 1 μm .

Development of cytoskeletal connections under treatments that affect compaction

Since cytoskeletal connections develop after compaction their establishment and maintenance may be altered by treatments that interfere with compaction (Ducibella and Anderson 1979; Pratt et al. 1982; Bayna et al. 1988). There-

fore, we tested the effect of low Ca^{2+} , Mg^{2+} , Ca^{2+} and Mg^{2+} , of EGTA, cytochalasin D, colchicine and α -lactalbumin.

Table 1 shows that only cytochalasin D and colchicine treatments prevent the establishment of connections during the time in which they form in control cultures. Table 2 shows similar results except that connections establish in



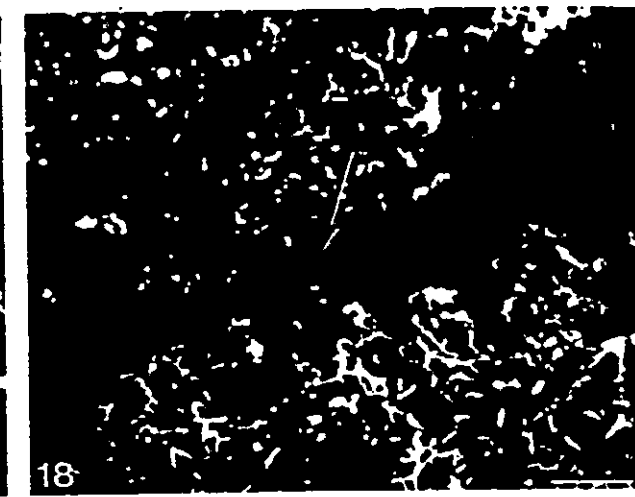
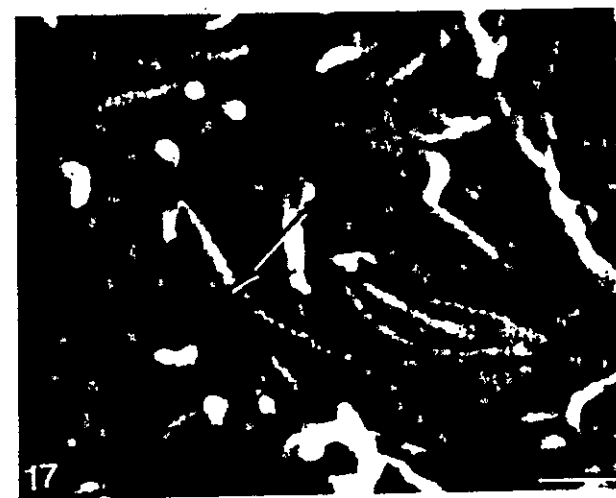
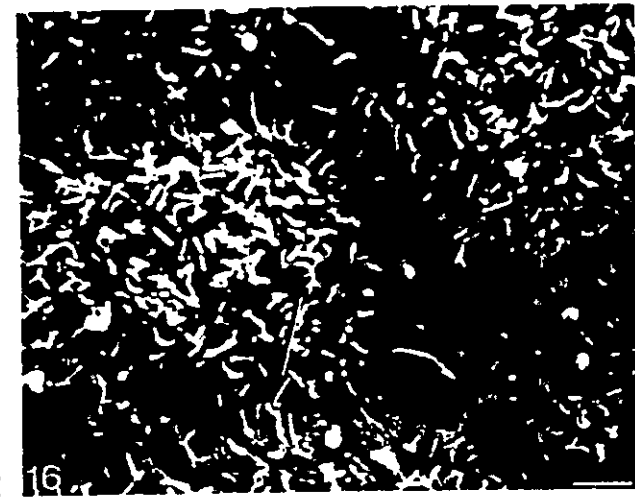
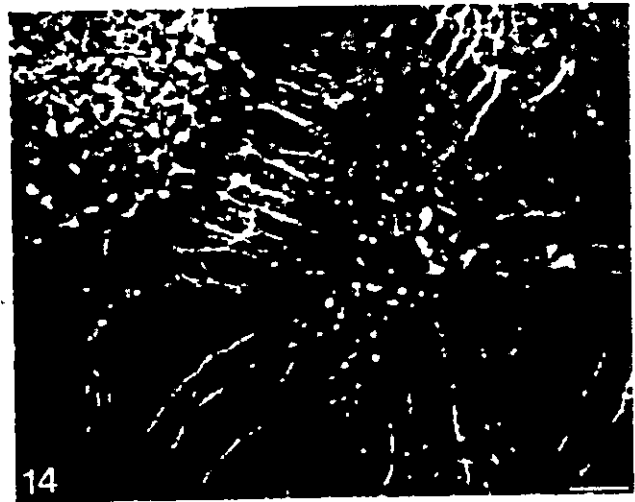
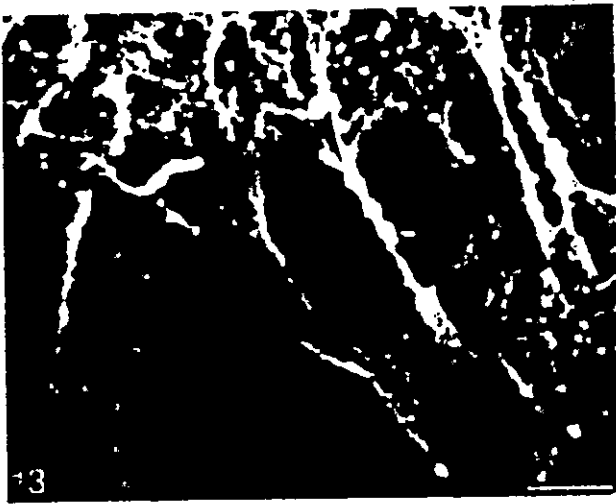
Figs. 7-12. Scanning microscopy of cytoskeletal connections (*arrows*) in embryos in different stages. 7 2-cell embryo, note the absence of cytoskeletal connections; *bar* = 1 μ m. 8 8-cell embryo 2 h postcompaction; *bar* = 1 μ m. 9 8-cell embryo 4 h postcompaction; *bar* = 1 μ m. 10 12-cell embryo, 6 h postcompaction; *bar* = 1 μ m. 11 Late morula; *bar* = 1 μ m. 12 Early blastocyst; *bar* = 1 μ m

the presence of colchicine, though their appearance is delayed and their number is much reduced as compared with controls. Table 3 shows that once the connections have been established in normal medium they are maintained in all the media tested, though less well in the presence of cytochalasin D. Tables 2 and 3 show that EGTA, cytochalasin D and colchicine prevent compaction and blastulation. The

number of embryos observed by scanning and light microscopy are indicated in tables.

In complementary experiments were tested ⁽¹⁷⁾ the requirement of protein synthesis during the establishment of cytoskeleton connections. When morulae were incubated with cycloheximide from 2 h to 6 h postcompaction, compaction was not affected and the five morulae that were detergent-

6



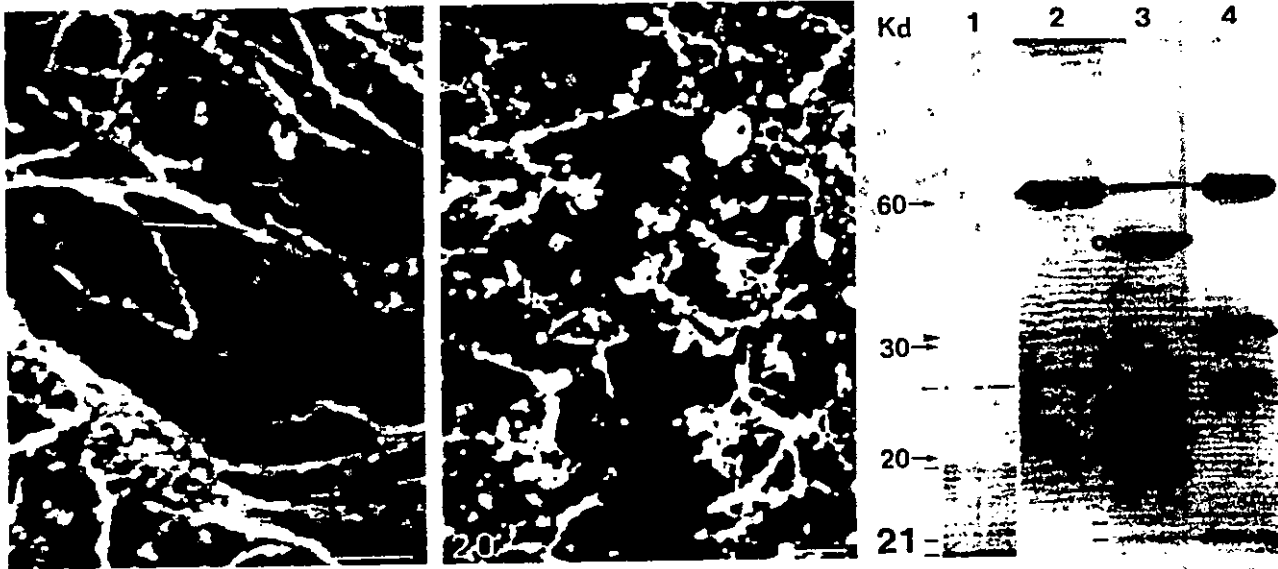
Figs. 13–18. Comparison between cytoskeletal connections (*arrowheads*) and long microvilli (*arrows*) by scanning microscopy. 13 Detergent-extracted embryo, 6 h postcompaction. *bar* = 0.5 μ m. 14 The same as 13; *bar* = 2 μ m. 15 Embryo 6 h postcompaction, non-detergent-extracted; note long microvilli extending between cells; *bar* = 0.5 μ m. 16 Same as 15; *bar* = 2 μ m. 17 Long microvilli extending between 12-cell embryos aggregated for 8 h; *bar* = 0.5 μ m. 18 The same as above; *bar* = 2 μ m

extracted and observed under the scanning microscope showed cytoskeletal connections similar to those of controls.

Discussion

l/r The first study with the scanning microscope of cell-surface changes during preimplantation development has already

reported 'thin cellular processes' extending from one cell to another (Calarco and Epstein 1973). Later studies on disaggregated blastomeres of 8-cell morulae showed the disappearance of short microvilli at regions of cell contact and then the development of a ring of long microvilli around the smooth fields (Reeve and Ziomek 1981; Sepúlveda et al. 1985). Our observations here reveal the similarity



Figs. 19, 20. Scanning microscopy and DNase I digestion of cytoskeletal connections. **19** Control showing connections after 20 min incubation with bovine serum albumin (2 mg/ml). **20** Absence of connections after 20 min treatment with DNase I (2 mg/ml) and phenylmethylsulfonyl fluoride; bar = 0.5 μ m

Fig. 21. Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (acrylamide 12%) stained by Coomassie blue, showing inhibition by phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) of the protease activity of DNase I on bovine serum albumin (BSA). **Lane 1:** 20 μ g DNase I. **Lane 2,** 20 μ g BSA. **Lane 3,** 20 μ g BSA incubated for 30 min at room temperature with 20 μ g DNase I. **Lane 4,** incubation as above plus 1 mM PMSF. *, BSA; o, proteolytic fragments of BSA; Δ , DNase I; ∇ , DNase I fragments or impurities

Table 1. Establishment of cytoskeletal connections: continuous treatments from 0 to 6 h postcompaction and observation of cytoskeletons by scanning microscopy at 6 h postcompaction

Treatments	Number of embryos	Connections established
Minus Ca^{2+} *	5	+
Minus Mg^{2+} *	13	+
Minus Ca^{2+} and Mg^{2+} *	10	+
EGTA	5	+
Colchicine	4	-
Cytochalasin D	8	-
α -Lactalbumin	7	+
Controls	28	+

* See Materials and methods

Table 2. Establishment of cytoskeletal connections, compaction and blastulation: continuous treatments from 0 to 21 or 24 h postcompaction; observation of cytoskeletons by scanning microscopy at 21 h postcompaction; observation by light microscopy of compaction at 21 h and of blastulation at 24 h postcompaction

Treatment	Scanning EM		Light microscope		
	Number of embryos	Connections established	Number of embryos	Compaction	Blastulation
Minus Ca^{2+} *	7	+	15	+	+
Minus Mg^{2+} *	8	+	17	+	+
Minus Ca^{2+} and Mg^{2+} *	9	+	12	+	+
EGTA	8	+	15	-	-
Colchicine	6	\pm	10	-	-
Cytochalasin D	8	-	11	-	-
α -Lactalbumin	6	+	51	+	+
Controls	32	+	72	+	+

* See Materials and methods

Table 3. Maintenance of cytoskeletal connections, compaction and blastulation: continuous treatments from 6 h to 21 h or 24 h postcompaction; scanning microscopy observations of cytoskeletons at 21 h postcompaction; light microscopy observations of compaction at 21 h postcompaction and of blastulation at 24 h postcompaction

Treatment	Scanning EM		Light microscope		
	Number of embryos	Connections established	Number of embryos	Compaction	Blastulation
Minus Ca^{2+} *	5	+	15	+	+
Minus Mg^{2+} *	4	+	12	+	+
Minus Ca^{2+} and Mg^{2+} *	7	+	12	+	+
EGTA	8	+	15	-	-
Colchicine	12	+	22	-	-
Cytochalasin D	11	\pm	20	-	-
α -Lactalbumin	6	+	45	+	+
Controls	34	+	70	+	+

* See Materials and methods

between long microvilli and cytoskeletal connections. The span and width of microvilli match those of cytoskeletal connections and both structures appear at the same time in the same place, surrounding regions of cell contact between blastomeres of the same embryo or between aggregated morulae. However, long microvilli do not always bridge the gap between adjoining blastomeres and may develop away from cell contacts, though next to smooth fields (Sutherland and Calarco-Gillam 1983; Izquierdo et al. 1984). We discard the possibility that cytoskeletal connections may be due to coalescence of microvilli during the process of detergent extraction because the connections are not observed prior to the 8-cell stage and, further, because morulae processed in contact often adhere but do not form connections.

If cytoskeletal connections correspond to microvilli it is not surprising that they are packed with microfilaments. Their arrangements and dimensions are typical of F-actin and this diagnosis is corroborated by tests with heavy meromyosin and DNase I. Decoration with heavy meromyosin is a highly specific test for F-actin (Goldman 1975; Begg et al. 1978; Sanger and Sanger 1980; Hirokawa et al. 1982) when the microfilaments in the cytoskeletal connections show the characteristic arrowhead polarity. We measured a period of about 25 nm, which differs considerably from the 34–36 nm reported for sea urchin cortex, epithelial brush border and muscle (Begg et al. 1978). This discrepancy may be ascribed to different methods used for permeabilizing cells because in fibrillar material of unextracted ova we have measured a period of 36 nm, which after Triton extraction is reduced to approximately 25 nm. It is possible that the 36-nm axial repeat of actin (Egelman et al. 1982; DeRosier and Tilney 1982) is shortened by detergent extraction. As to DNase I, which binds strongly to G-actin and induces depolymerization of F-actin (Hitchcock et al. 1976), our results show that cytoskeletal connections disappear by incubation with the enzyme in controlled conditions.

Connections form, probably, through fusion of long microvilli, either end-to-end, or from the end to any point on the plasma membrane of the apposed cell. The fusion of a long microvillus to an adjoining cell may start by adhesion of its sticky end, or of an end that becomes sticky on contact, followed either by contact-dependent localization of a microfilament-associated protein, such as vinculin, which can form transmembrane complexes (Ungar et al. 1986), or by terminal annealing of actin microfilaments (Nakaoka and Kasai 1969; Carlier et al. 1984).

Even though cytoskeletal connections are established on time in culture media prepared without adding Ca^{2+} and/or Mg^{2+} salts, the necessity of these ions cannot be excluded because such media contain significant amounts of them, and, in the case of Ca^{2+} , this is comparable with its intracellular concentration (see Materials and methods). As to compaction, these media retard but do not prevent it. EGTA treatment, instead, shows that chelation of Ca^{2+} and Mg^{2+} inhibits compaction (and blastulation) permanently without affecting the establishment of cytoskeletal connections.

Colchicine delays but does not prevent the development of cytoskeletal connections nor does it affect their maintenance when they are established previously in control medium. Earlier reports claimed that long microvilli appear and persist for 24 h in 8-cell morulae cultured with colcemid but do not form 2-cell embryos cleavage-arrested for 24 h with colcemid or colchicine (Sutherland and Calarco-Gillam 1983; Izquierdo et al. 1984). In spite of the establishment of connections during colchicine treatment, compaction and blastulation do not occur. Therefore, as in the case of EGTA treatments, we are led to conclude that the development of cytoskeletal connections is not enough to produce these morphogenetic events.

As described above, cytoskeletal connections do not develop in the presence of cytochalasin D and, if formed previously, they are partially disrupted when embryos are transferred to a medium containing this drug. It has been reported, however, that long microvilli develop at the time of compaction on embryos treated at different intervals with cytochalasin B or D (Sutherland and Calarco-Gillam 1983; Izquierdo et al. 1984). Since long microvilli that are stuffed with microfilaments are not altered by cytochala-

sins, it seems unlikely that the negative effect of this drug on the establishment of cytoskeletal connections might be explained by the depolymerization of their F-actin. Perhaps long microvilli fail to fuse with adjoining cells in media containing cytochalasin D and/or detach during detergent extraction.

It is pertinent to recall here that our cycloheximide treatments show that current protein synthesis is not required for the establishment of cytoskeletal connections, nor it is required, at the same stage, for gap junction formation (McLachlin et al. 1983). Several reports on tunicamycin treatments suggest that N-linked glycosylation is necessary for compaction, but we do not know at what stage because the drug has been applied continuously from the 2-cell stage onwards (Surani 1979; Pratt et al. 1982; Sutherland and Calarco-Gillam 1983); it is well known, however, that cell-surface glycoproteins actually mediate compaction (Hyafil et al. 1980; Damsky et al. 1983; Yoshida-Noro et al. 1984; Richa et al. 1985). Since it has been recently claimed that β -1,4-galactosyltransferase is involved specifically in late morula compaction (Bayna et al. 1988) we tested the effect of culture media containing α -lactalbumin, which is supposed to inhibit this enzyme (Shur 1983). Our experiments show that the treatment does not interfere with the development of cytoskeletal connections, nor with advanced morulae compaction and blastulation, which implies that α -lactalbumin, as used in our experiments, may not be an efficient inhibitor of galactosyltransferase.

To sum up: cytoskeletal connections are not required for compaction, as proven by the normal succession of morphogenetic events; the establishment of cytoskeletal connections does not require compaction as proven by EGTA treatment and, less clearly, by colchicine treatment; cytoskeletal connections are not a sufficient cause of compaction and blastulation, as proven by EGTA and colchicine treatments; lasting compaction and blastulation do not occur when cytoskeletal connections are not formed, at least not in the seven treatments tested.

Acknowledgements. This research has been supported by grants from the University of Chile and Fondecyt. The technical dexterity of F. Espinoza, V. Monasterio and L. Yanez is gratefully acknowledged.

References

- Bayna ME, Shaper JH, Shur BD (1988) Temporary specific involvement of cell surface β -1,4-galactosyltransferase during mouse embryo morula compaction. *Cell* 53:145–157
- Begg DA, Rodewald R, Rebhun LI (1978) The visualization of actin filament polarity in thin sections. *J Cell Biol* 79:846–852
- Bendori R, Salomon D, Geiger B (1987) Contact-dependent regulation of vinculin expression in cultured fibroblast: a study with vinculin-specific cDNA probes. *EMBO J* 6:2897–2905
- Biggers JD, Whitten WK, Whittingham DG (1971) The culture of mouse embryos in vitro. In: Daniel JD (ed) *Methods in mammalian embryology*. Freeman, San Francisco, pp 86–115
- Bretscher A, Weber K (1979) Villin: the major microfilament-associated protein of the intestinal microvillus. *Proc Natl Acad Sci USA* 76:2321–2325
- Calarco R, Brown E (1969) A structural and cytological study of the preimplantation development of the mouse. *J Exp Zool* 171:235–283
- Calarco PG, Epstein CJ (1973) Cell surface changes during preimplantation development in the mouse. *Dev Biol* 32:208–213
- Capco DG, McGaughy RW (1986) Cytoskeletal reorganization

- during early mammalian development: analysis using embedment-free sections. *Dev Biol* 115:446-458
- Carrier MF, Pantaloni D, Korn ED (1984) Steady state length distribution of F-actin under controlled fragmentation and mechanism of length distribution following fragmentation. *J Cell Biol* 259:9987-9991
- Damjanov I, Damjanov A, Lehto V, Virtanen I (1986) Spectrin in mouse gametogenesis and embryogenesis. *Dev Biol* 114:132-140
- Damsky CH, Richa J, Solter D, Knudsen K, Buck CA (1983) Identification and purification of a cell surface glycoprotein mediating intercellular adhesion in embryonic and adult tissue. *Cell* 34:455-466
- DeRosier DJ, Tilney LG (1982) How actin filaments pack into bundles. *Cold Spring Harbor Symp Quant Biol* 46:525-540
- Ducibella T (1977) Surface change of the developing trophoblast cell. In: Johnson MH (ed) *Development in mammals*, vol 1. North Holland, Amsterdam, pp 5-30
- 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 (1979) The effects of calcium deficiency on the formation of the zonula occludens and blastocoel in the mouse embryo. *Dev Biol* 73:46-58
- Egelman EH, Francis N, DeRosier DJ (1982) F-actin is a helix with a random variable twist. *Nature* 298:131-135
- Emerson JA (1988) Disruption of the cyokeratin filament network in the preimplantation mouse embryo. *Development* 104:219-234
- Goldman RD (1975) The use of heavy meromyosin bindings as an ultrastructural cytochemical method for localizing and determining the possible functions of actin-like microfilaments in nonmuscle cells. *J Histochem Cytochem* 23:529-542
- Hartwig JH, Stossel TP (1981) Structure of macrophage actin-binding protein molecules in solution and interacting with actin filaments. *J Mol Biol* 145:563-581
- Herman IM, Pollard TD (1981) Electron microscopy localization of cytoplasmic myosin with ferritin-labeled antibodies. *J Cell Biol* 88:346-351
- Hillman N, Tasca RJ (1969) Ultrastructural and autoradiographic studies of mouse cleavage stages. *Am J Anat* 126:151-173
- Hirokawa N, Tilney LG, Fujiwara K, Heuser JE (1982) Organization of actin, myosin, and intermediate filaments in the brush border of intestinal epithelial cells. *J Cell Biol* 94:425-443
- Hitchcock SE, Carlsson L, Lindberg U (1976) Depolymerization of F-actin by deoxyribonuclease I. *Cell* 7:531-542
- Houlston E, Pickering SJ, Maro B (1987) Redistribution of microtubules and pericentriolar material during the development of polarity in mouse blastomeres. *J Cell Biol* 104:1299-1308
- Hyafil F, Babinet C, Jacob F (1981) Cell-cell interaction in early embryogenesis: a molecular approach to the role of calcium. *Cell* 26:447-454
- Izquierdo L (1986) Desde la especificación regional a la diferenciación celular en el desarrollo preimplantacional de mamíferos. *Arch Biol Med Exp* 19:279-300
- 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
- Jeffery WR, Meier S (1983) A yellow crescent cytoskeletal domain in Ascidian eggs and its role in early development. *Dev Biol* 96:125-143
- Johnson MH, Maro B (1984) The distribution of cytoplasmic actin in mouse 8-cell blastomeres. *J Embryol Exp Morphol* 82:97
- Johnson MH, Ziomek CA (1981) Induction of polarity in mouse 8-cell blastomeres, specificity, geometry and stability. *J Cell Biol* 91:303-308
- Kimber SJ, Surani MAH (1981) Morphogenetic analysis of changing cell associations following release of 2-cell and 4-cell mouse embryos from cleavage arrest. *J Embryol Exp Morphol* 61:331-345
- Lehtonen E, Badley R (1980) Localization of cytoskeletal proteins in preimplantation mouse embryos. *J Embryol Exp Morphol* 55:211-225
- Lo CW, Gilula NB (1979) Gap junctional communication in the preimplantation mouse embryos. *Cell* 18:399-409
- Maro B, Pickering SS (1984) Microtubules influence compaction in preimplantation mouse embryos. *J Embryol Exp Morphol* 84:217-232
- McLachlin JR, Caveney S, Kidder GM (1983) Control of gap junction formation in early mouse embryos. *Dev Biol* 98:155-164
- Moon RT, Nicosia RF, Olsen C, Hille MB, Jeffery WR (1983) The cytoskeletal framework of sea urchin eggs and embryos: developmental changes in the association of messenger RNA. *Dev Biol* 95:447-458
- Nakaoka Y, Kasagi M (1969) Behavior of sonicated actin polymers: adenosine triphosphate splitting and polymerization. *J Mol Biol* 44:319-332
- Pratt HPM, Ziomek CA, Reeve WJD, Johnson MH (1982) Compaction of the mouse embryo: an analysis of its components. *J Embryol Exp Morphol* 70:113-132
- Reeve WJD, Ziomek CA (1981) Distribution of microvilli on dissociated blastomeres from mouse embryos: Evidence for surface polarization at compaction. *J Embryol Exp Morphol* 62:339-350
- Richa J, Damsky CH, Buck CA, Knowles BB, Solter D (1985) Cell surface glycoproteins mediate compaction, trophoblast attachment, and endoderm formation during early mouse development. *Dev Biol* 108:513-521
- Sanger JM, Sanger JW (1980) Banding and polarity of actin filaments in interphase and cleaving cells. *J Cell Biol* 86:568-575
- Schatten H, Cheney R, Balczon R, Willard M, Cline C, Simerly C, Schatten G (1986) Localization of Fodrin during fertilization and early development of sea urchin and mice. *Dev Biol* 118:457-466
- Sepúlveda MS, Doggenweiler C, Izquierdo L (1985) Scanning microscopy of disaggregated and aggregated preimplantation mouse embryos. *Roux's Arch Dev Biol* 194:445-452
- Shirayoshi Y, Okada TS, 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
- Shur B (1983) Embryonal carcinoma cell adhesion: the role of surface Galactosyltransferase and its 90K lactosaminoglycan substrate. *Dev Biol* 99:360-372
- Sobel JS (1983) Localization of myosin in the preimplantation mouse embryo. *Dev Biol* 95:227-231
- Sobel JS, Alliegro MA (1985) Changes in the distribution of a spectrinlike protein during development of the preimplantation mouse embryo. *J Cell Biol* 100:333-336
- Surani MAH (1979) Glycoprotein synthesis and inhibition of glycosylation by tunicamycin in preimplantation mouse embryo: compaction and trophoblast adhesion. *Cell* 18:217-227
- Sutherland AE, Calarco-Gillam PG (1983) Analysis of compaction in the preimplantation mouse embryo. *Dev Biol* 100:328-338
- Ungar F, Geiger B, Ben-Ze'ev A (1986) Cell contact- and shape-dependent regulation of vinculin synthesis in cultured fibroblasts. *Nature* 319:787-791
- Weakley BS (1968) Comparison of cytoplasmic lamellae and membranous clements in oocytes of five mammalian species. *Z Zellforsch Mikrosk Anat* 85:109-123
- Wiley LM, Eglitis MA (1980) Effects of colcemid on cavitation during mouse blastocoel formation. *Exp Cell Res* 127:89-101
- 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

Received March 7, 1989

Accepted in revised form June 21, 1989

APENDICE II

CONCEPTOS GENERALES

Aunque los resultados de esta investigación sugieran una explicación epigenética, no puede afirmarse en un plano conceptual que hayamos demostrado una representación histórica del desarrollo inicial de mamíferos o negado absolutamente una representación programática (véase resumen de estos conceptos en la Introducción). Sin embargo, conviene plantear algunas implicaciones que tiene una representación estrictamente programática y destacar sus inconsistencias.

La idea de la existencia de una **línea de eventos** en la que deba incluirse todo lo que ocurre durante el desarrollo, implica que todos los eventos son necesarios para el desarrollo. Se descarta así la idea de líneas paralelas o eventos simultáneos de tal forma que la alteración de un evento en una línea no modifique los eventos en otras líneas. Sin embargo, desechar la existencia de líneas paralelas es contrario a la evidencia experimental. Por ejemplo, es posible alterar la línea de proliferación celular inhibiendo las divisiones del embrión de una célula sin modificar la línea de la síntesis de proteínas (92). Estas y otras observaciones análogas sugieren revisar (40) la idea de una línea única de eventos como representación adecuada del desarrollo.

La idea de un **programa genético** (22, 33, 82, 118) que ordene temporalmente el desarrollo es una extrapolación de la idea de gen, como programa de la síntesis protéica, a la idea de genoma como programa del desarrollo, y supone que en el genoma estaría ordenada toda la información necesaria para el desarrollo. Si así fuera, tendría que contener instrucciones sobre dónde

comenzar el proceso de selección de la información, especificar las reglas para las sucesivas etapas de selección e incluso, definir las respuestas de normalización, a perturbaciones externas, que se observan en la regulación embrionica. Esta información no se ha reconocido en el genoma (118). Por el contrario, las observaciones sugieren que cada etapa del desarrollo determina por sí misma la siguiente (34) y en consecuencia, puede sostenerse que ellas están vinculadas por relaciones causales y no por su dependencia de un supuesto programa que contendría toda la causalidad. Por ejemplo, la compactación, al generar una región interna y otra externa, se relaciona causalmente con la diferenciación de la masa celular interna y del trofoblasto en la blastulación (60); es decir, la diferenciación del blastocisto tendría su causa en las etapas precedentes y no en la ejecución de un programa genético predeterminado. Esto no implica desconocer la importancia de los genes en el desarrollo, sino simplemente considerar a la actividad génica como una de las diversas actividades del desarrollo y no como su única directriz.

La idea del desarrollo como una **serie de eventos ordenados temporalmente** (22, 33) se refiere a que cada uno de los eventos ocurre en un momento único que correspondería al lapso que dicho evento ocupa en el desarrollo, ni antes ni después. Esta idea se basa en la suposición que un sistema de muchos eventos caóticos (no ordenados temporalmente) sería irreproducible (33). Sin embargo, esta idea no ha sido demostrada y más aún, se ha probado teórica y experimentalmente en muchos sistemas físicos y biológicos que se puede partir de un gran número de estados distintos y llegar siempre a un mismo estado final por efecto de un atractor no caótico (43). De hecho, en el desarrollo

preimplantacional de mamíferos se ha logrado inhibir experimentalmente durante horas la aparición de una molécula de superficie sin alterar el desarrollo, lo cual demuestra que el momento en que esta molécula aparece normalmente y el momento en que se necesita no son coincidentes (32). La diferencia entre ambos tiempos es lo suficientemente amplia como para sospechar que la aparición de dicha molécula no necesita estar temporalmente ordenada. Además, experimentos en los que bajo ciertos estímulos simples (por ejemplo, incubación con lectinas) se adelantan procesos morfogénéticos complejos como compactación y blastulación (57), indican que todos los otros factores distintos del estímulo que participan en estos cambios morfogénéticos estaban presentes antes que fueran necesarios.

APENDICE III

PATRON DE SINTESIS DE PROTEINAS; ABUNDANCIA RELATIVA EN DE GELES UNIDIMENSIONALES.

Se definieron y calcularon, para cada proteína (i) en un determinado tiempo de desarrollo (t), los siguientes parámetros:

$$F(i,t) = f(i, t) / f'(i, t')$$

donde $F(i,t)$ es la Abundancia Relativa en el Tiempo de la proteína i en el tiempo t; $f(i, t)$ es la Abundancia Relativa de la proteína i en el tiempo t y $f'(i, t')$ es la Abundancia Relativa Máxima de la proteína i en el tiempo en que dicha proteína alcanza un valor máximo de $f(i, t)$ para los controles; además,

$$f(i, t) = a(i,t)/A(t)$$

$$f'(i, t') = a(i, t')/A(t')$$

donde $a(i, t)$ es el área bajo la curva correspondiente a la proteína i del densitograma obtenido para el tiempo t; $A(t)$ es el área total bajo la curva del densitograma para el tiempo t; $a(i, t')$ es el área bajo la curva correspondiente a la proteína i del densitograma obtenido para el tiempo en que dicha proteína alcanza el valor máximo de $f(i, t)$ en los controles; $A(t')$ es el área total bajo la curva del densitograma para el tiempo en que se alcanza el valor máximo de $f(i, t)$ en las controles. De esto resulta:

$$F(i,t) = a(i,t) \times A(t') / a(i,t') \times A(t).$$

Los valores de $F(i,t)$ se calcularon sobre 2 o 3 densitogramas iguales y los promedios se agruparon en 4 rangos: 0 - 0.2; 0.2 - 0.5; 0.5 - 0.8; 0.8 - 1, los que se representan en el gráfico de la Fig. 19.

Estos valores son un índice indirecto de las variaciones en la velocidad de síntesis protéica, no existiendo una relación lineal entre dichos valores y la cantidad de cada una de las proteínas sintetizadas.

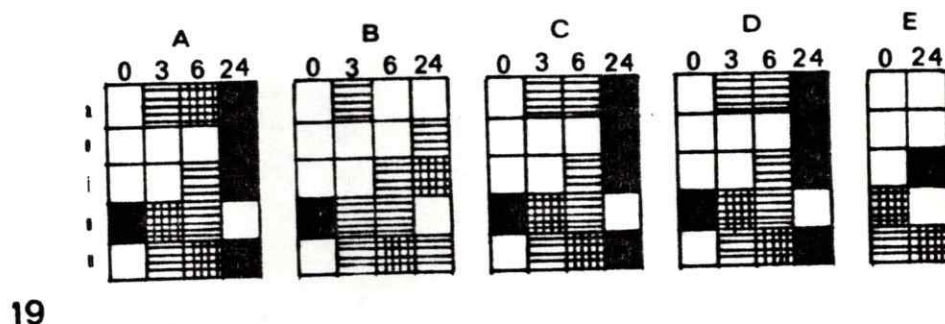


Figura 19. RESUMEN DE LOS EFECTOS DE LOS TRATAMIENTOS DESCOMPACTANTES SOBRE LA SINTESIS DE PROTEINAS. A: Control; B: tratamiento con EGTA; C: tratamiento con CCD; D: tratamiento con α -La; E: tratamiento con Con A. El número 0 indica el período entre las -2 y las 0 hC; el número 3 indica el período entre las 2 y 4 hC; el número 6 indica el período entre las 5 y las 7 hC; el número 24 indica el período entre las 22 y 24 hC. Las proteínas fueron marcadas las dos últimas 2 horas del tratamiento. Se indica la Abundancia Relativa en el Tiempo de las proteínas a, e, i, o, u (véase definición en Materiales y Métodos). \square : 0 - 0,2; ▨ : 0,2 - 0,5; ▩ : 0,5 - 0,8; \blacksquare : 0,8 - 1.

APENDICE IV

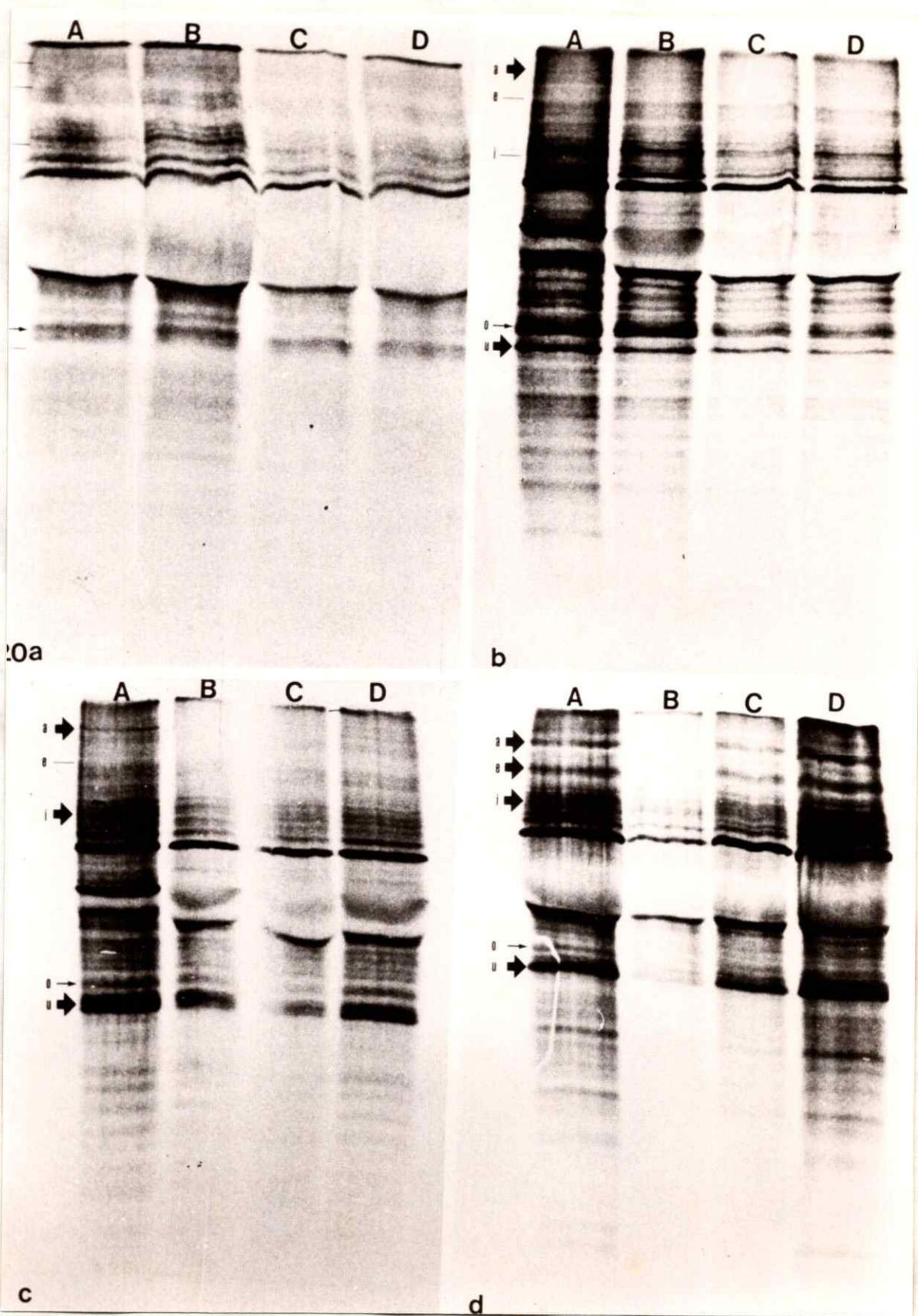
AUTORRADIOGRAFIA DE GELES UNIDIMENSIONALES.

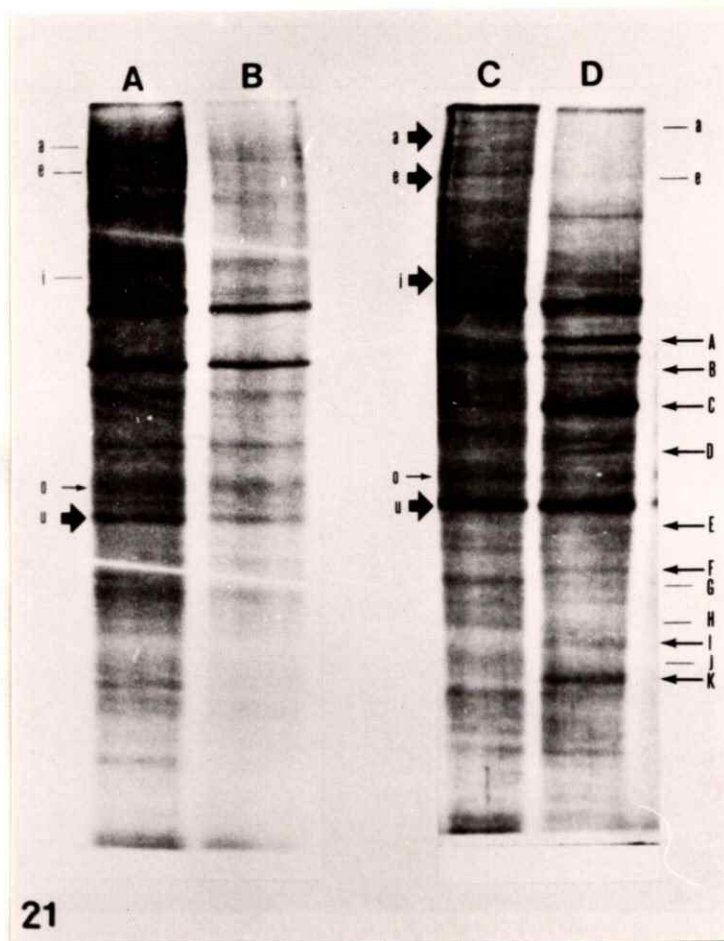
Figura 20. AUTORRADIOGRAFIAS CORRESPONDIENTES A LOS DENSITOGRAMAS DE LAS FIGURAS 7-10. Autorradiografía de geles de embriones controles o sometidos a tratamientos descompactantes por 2 horas antes de las 0 hC (a); por 4 horas desde las 0 hC (b); por 7 horas desde las 0 hC (c); por 24 horas desde las 0 hC (d). A: control; B: EGTA; C: CCD; D: α -La. Para las proteínas a, e, i, o, u, descritas en Resultados, se indica la ausencia (-), presencia y disminución (\leftrightarrow), presencia y aumento (\rightarrow).

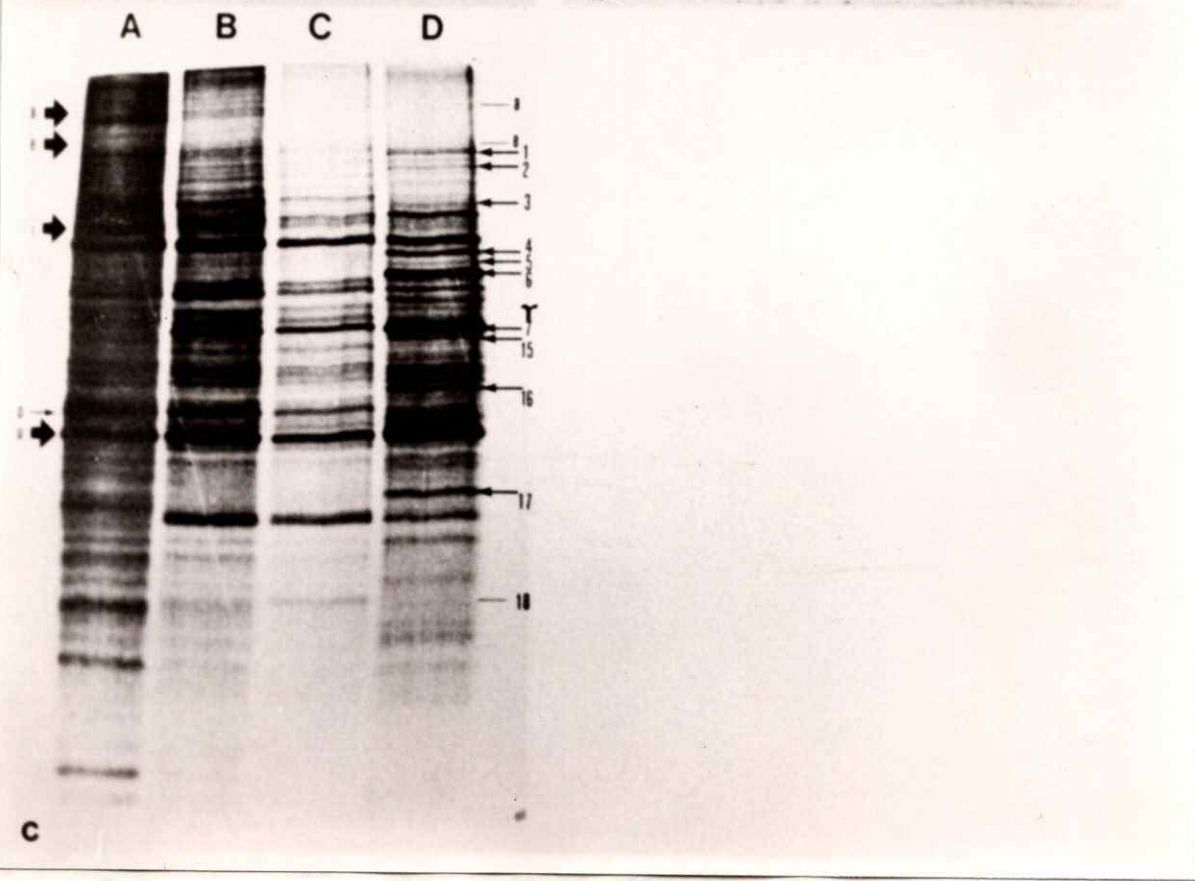
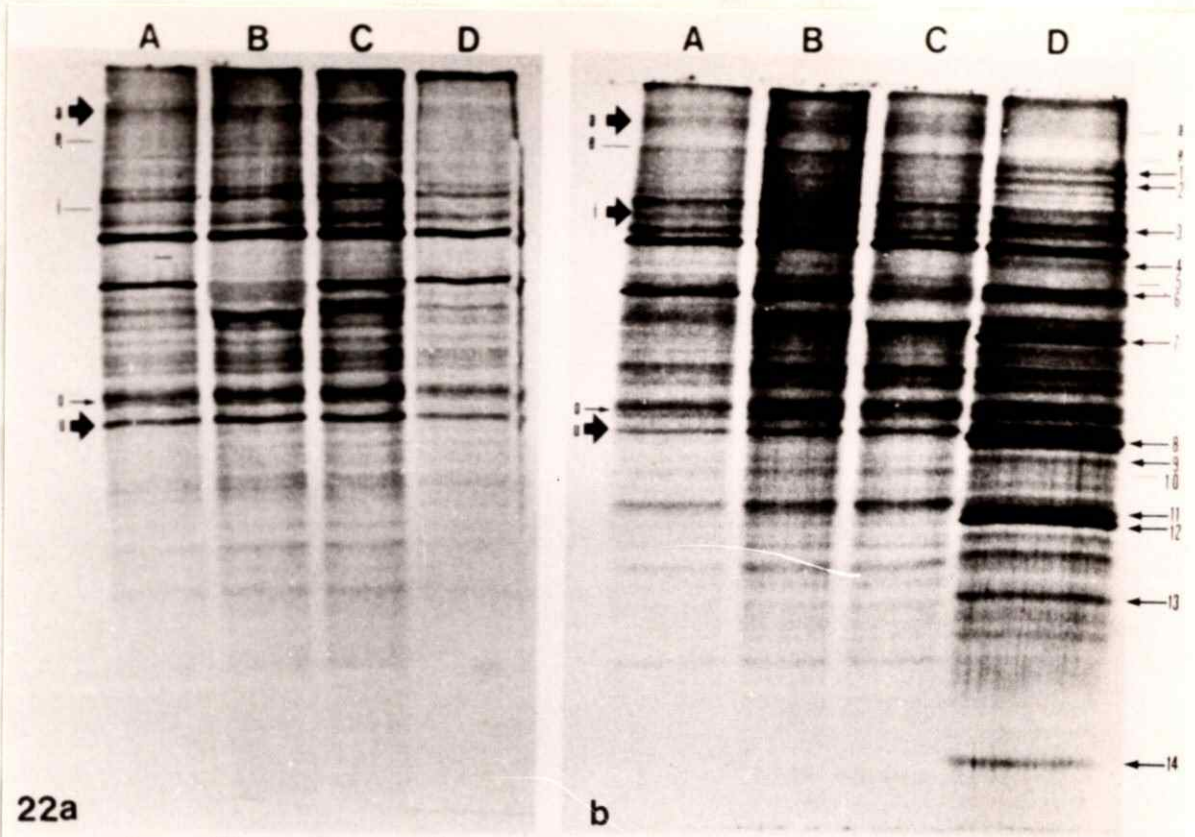
Figura 21. AUTORRADIOGRAFIAS CORRESPONDIENTES A LOS DENSITOGRAMAS DE LA FIGURA 11. Autorradiografía de geles de embriones controles (A, C) o tratados desde antes de la compactación (aproximadamente 0 hC) con 100 μ g/ml de Con A (B, D) por 2 horas (Ab, B) y por 24 horas (C, D). Para las proteínas a, e, i, o, u descritas en Resultados, se indica la ausencia (-), presencia y aumento (\rightarrow), la presencia y disminución (\leftrightarrow); y a la derecha de cada gel los cambios inducidos en las proteínas A-K.

Figura 22. AUTORRADIOGRAFIA CORRESPONDIENTES A LOS DENSITOGRAMAS DE LAS FIGURAS 15-17. Autorradiografía de geles de poliacrilamida al 10% de embriones controles o sometidos a tratamiento por 4 (a), 7 (b), o 24 horas (c) desde las 0 hC. A: controles; B: 1 μ g/ml de α -amanitina; C: 15 μ g/ml de α -amanitina; D: 2,5 μ g/ml de afidicolina. Para las proteínas a, e, i, o, u,

descritas en Resultados, se indica la presencia y aumento (◆), la presencia y disminución (↔), ausencia (-), así como los cambios en las proteínas a-u y 1-18 inducidos por el tratamiento.



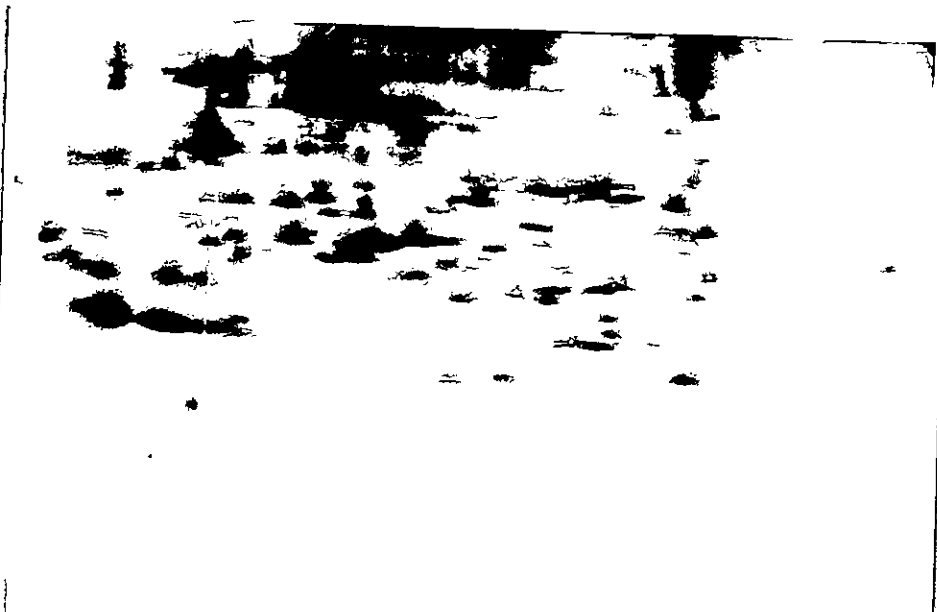




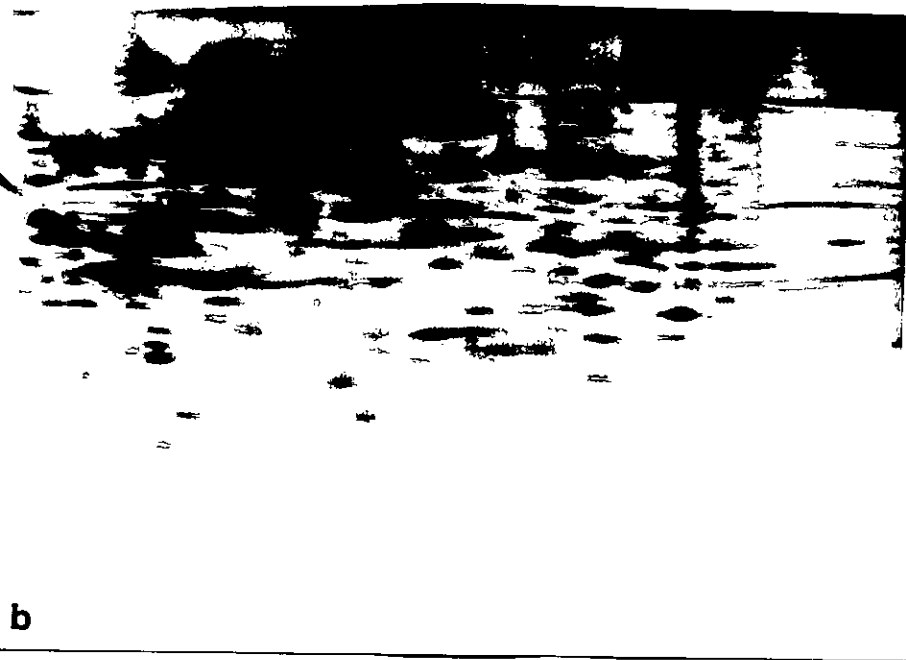
APENDICE V

EFFECTO DE LA INHIBICION DE LA COMPACTACION SOBRE LA SINTESIS DE PROTEINAS; AUTORADIOGRAFIA DE GELES BIDIMENSIONALES.

Figura 23: embriones controles con -4 hC (a) o 24 hC (b). Para todos los tratamientos los embriones fueron incubados con las drogas desde las -4 hC (a) o desde las 0 hC (b); Figura 24: tratamiento continuo por 4 horas (a) o 24 (b) horas con 0,5 µg/ml de CCD; Figura 25: tratamiento continuo por 4 horas (a) o 24 (b) horas con 0,2% α-La; Figura 26: tratamiento continuo por 4 horas (a) o 24 horas con 0,5 mM EGTA. La incubación con ³⁵S-metionina se hizo durante las últimas 4 horas del tratamiento. El número de embriones usados fue: Fig. 23: 37 embriones; Fig. 23: 36 embriones; Fig. 24a: 40 embriones; Fig. 24b: 41 embriones; Fig. 25: 42 embriones; Fig. 25b: 40 embriones; Fig. 26a: 39 embriones; Fig. 26b: 38 embriones.



23a



b



24a



b

