

**FUNCION DEL CONTACTO CELULAR EN LA REGIONALIZACION DURANTE
EL DESARROLLO INICIAL DE MAMIFEROS**

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

M. SOLEDAD SEPULVEDA JIMENEZ

Marzo de 1990

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



FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE CHILE

Informe de aprobación de Tesis de Doctorado

Se informa a la Comisión de Doctorado de la Facultad de Ciencias, que la Tesis de Doctorado presentada por la candidata

MARIA SOLEDAD SEPULVEDA JIMENEZ

ha sido aprobada por la Comisión Informante de Tesis, para el grado de Doctor en Ciencias con Mención en Biología, en el Examen de Defensa de Tesis rendido el día de Junio de 1990.

Director de Tesis

Dr. Luis Izquierdo

Luis Izquierdo

Comisión Informante de Tesis

Dr. Tulio Nuñez

Tulio Nuñez

Dr. Esteban Rodríguez

Dra. Myriam Santos

Dr. Claudio Barros

Myriam Santos

Claudio Barros



Esta Tesis fue realizada en el laboratorio de Biología del Desarrollo de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile, bajo la dirección del Dr. Luis Izquierdo.



El desarrollo del programa de doctorado de M. Soledad Sepúlveda J., se realizó gracias a una beca de postgrado de la Fundación Andes.



AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Luis Izquierdo, por la formación de todos estos años y por dedicarme incluso sus vacaciones al desarrollo de este trabajo de Tesis.

Al Dr. Carlos Doggenweiler, por su permanente apoyo y cariño durante toda mi permanencia en el laboratorio.

Al Dr. Tulio Nuñez, por su valiosa orientación y ayuda.

A la colaboración desinteresada de todos mis amigos del laboratorio: Roberto Mayor, Roxana Pey, Ana Valdez, Alejandra Mancilla, Florencio Espinoza, Juan Silva, Víctor Monasterio y Luis Balza.

A Rubén Peña, por su buen trabajo fotográfico.

A mis queridas amigas "vecinas", Verónica Téllez y Nancy Olea, por el gran cariño con que me han tratado siempre, por el permanente estímulo y por los cientos de pasteles que compartimos.

A mis entrañables amigas que ya no están en el laboratorio, Cecilia Matte, Teresa López, M. Inés Becker y M. Soledad Fernández, con quienes pasé los mejores momentos y de quienes aprendí cosas más importantes que las científicas.

A mi fiel amigo Carlos Medina, siempre dispuesto a discutir y a ayudarme a encontrar explicación a los resultados más oscuros.

A la generosa ayuda de la Fundación Andes, quienes confiaron en mí.

A Ariel, por su infinita paciencia y comprensión, por sus buenas discusiones, por su rigurosidad, con la cual me hacía dudar de cada experimento y por su desinteresada ayuda en las últimas series experimentales de esta Tesis.

Al apoyo incondicional de mis padres.

INDICE

RESUMEN.....	1
SUMMARY.....	4
ABREVIATURAS.....	6
INTRODUCCION.....	7
Descripción ad hoc del desarrollo preimplantacional del ratón.....	8
Regionalización durante el desarrollo inicial.....	12
5NUC y FAL: dos ectoenzimas marcadoras de la regionalización de la membrana plasmática.....	14
Función del contacto celular en la regionalización y en la diferenciación hacia blastocisto.....	18
OBJETIVOS.....	22
MATERIALES Y METODOS.....	24
1. Obtención de embriones.....	24
1.1 Composición del medio de Biggers.....	25
2. Eliminación de la zona pelúcida.....	25
2.1 Composición de la solución ácida.....	26
3. Cultivo.....	26
3.1 Control de la viabilidad de los embriones.....	27
4. Agregación de embriones.....	27
5. Técnicas citoquímicas.....	28
5.1 Detección de la actividad de 5'-nucleotidasa..	28
5.1.1 Composición del medio de incubación utilizado para la detección de la actividad de 5'-nucleotidasa.....	29
5.2 Detección de la actividad de fosfatasa alcalina.....	29

5.2.1 Composición del medio de incubación utilizado para la detección de la actividad de fosfatasa alcalina.....	30
6. Cultivo en presencia de lectinas.....	30
6.1 Cultivo con lectinas en solución.....	30
6.1.1 Lectinas utilizadas.....	31
6.1.2 Cultivo con WGA en presencia de cloruro de litio.....	31
6.2 Agregación de embriones con esferas de agarosa que tienen lectinas ligadas a la superficie.....	32
7. Cultivo en presencia de análogos de segundos mensajeros.....	32
7.1 Cultivo con dibutiril-cAMP.....	32
7.2 Cultivo con 12-miristato 13-acetato (PMA).....	33
7.3 Cultivo con 1-oleoil 2-acetilglicerol (OAG)...	34
7.3.1 Cultivo con OAG en presencia del ionóforo de calcio A 23187.....	34
7.3.2 Cultivo con OAG en presencia del ionóforo de calcio A 23187.....	35
7.4 Cultivo con 1-(5-isoquinolinasulfonil)-2-metilpiperazina (H7).....	35
7.5 Cultivo con N-(6-aminohexil)-5-cloro-1-naftalensulfonamida (W7).....	35
7.6 Cultivo con 4- α -forbol 12, 13 - didecanoato (4 α PDD).....	36
8. Inhibición de la síntesis de proteínas.....	36
8.1 Inhibición de la síntesis de proteínas en embriones cultivados con OAG.....	36
8.2 Inhibición de la síntesis de proteínas en embriones cultivados con OAG.....	37
8.3 Control de la inhibición por cicloheximida....	37

9. Cultivo con inhibidores de la polimerización de componentes del citoesqueleto: citochalasin D y colchicina.....	38
10. Microscopía electrónica de transmisión.....	38
RESULTADOS.....	40
1. Agregación de embriones regionalizados: actividad de 5NUC y FAL.....	40
2. Agregación entre embriones regionalizados y embriones no regionalizados: actividad de 5NUC y FAL.....	42
3. Agregación de embriones no regionalizados: actividad de 5NUC y FAL.....	45
4. Agregación de embriones no regionalizados en presencia de cicloheximida: actividad de 5NUC.....	50
5. Efecto de lectinas en solución sobre la actividad de 5NUC y FAL en embriones de 2 células.....	52
6. Agregación de embriones de 2 células con esferas de agarosa cubiertas con lectinas: actividad de 5NUC.....	59
7. Efectos morfogénicos inducidos en el estado de 2 células, por lectinas en solución.....	61
8. Efecto de análogos de segundos mensajeros sobre la actividad de 5NUC en la región de contacto intercelular en embriones de 2 células.....	66
9. Efectos morfogénicos de segundos mensajeros en embriones de 2 células.....	71
10. Morfogénesis inducida por OAG: efecto de inhibidores de síntesis de proteínas, de citoesqueleto, de PKC y efecto de un análogo de OAG.....	76
11. Cambios morfogénicos a nivel estructural inducidos por OAG.....	81
DISCUSION.....	89
1. Regionalización detectada por la demostración citológica de la actividad de 5NUC y de FAL.....	89

2. La aparición de 5NUC y FAL, ¿corresponde a la síntesis o activación de estas enzimas?.....	91
3. El contacto celular causa regionalización.....	95
4. Recepción del estímulo de contacto.....	97
5. Transmisión de la señal de contacto.....	99
6. Recepción de la señal de contacto en el efector...103	
7. ¿Por qué se anticipa la regionalización normal del estado de 4 células en quimeras 2+2?.....	105
8. Otros efectos morfogénéticos inducidos experimentalmente.....	110
9. Proyección de nuestras observaciones.....	115
CONCLUSIONES.....	116
REFERENCIAS.....	119

R E S U M E N

En el embrión de ratón, desde el estado avanzado de 4 células se puede demostrar citoquímicamente la actividad de 5'-nucleotidasa (5NUC) y de fosfatasa alcalina (FAL) en las regiones de contacto celular y su ausencia en las regiones libres de contacto. El objetivo general de esta Tesis es estudiar la función que tiene el contacto celular sobre la regionalización de la membrana plasmática que se reconoce por la actividad de 5NUC y de FAL. Específicamente, se plantean los siguientes objetivos: 1) demostrar que los contactos celulares establecidos experimentalmente inducen regionalización en las superficies que eran libres y que la regionalización puede anticiparse del estado de 4 células al de 2 células; 2) investigar los mecanismos comprometidos en la inducción de regionalización e identificar componentes de superficie celular que pudieran estar involucrados; 3) estudiar la vía de transmisión de la señal desde el contacto artificial hasta la superficie que se regionaliza; 4) describir otros efectos morfogénéticos posibles que sean inducidos por el contacto celular y por la simulación de contactos o por componentes de la vía de transmisión de la señal.

Agregando embriones con 8 o más células se induce actividad de 5NUC o de FAL en la región de contacto artificial y cuando se agregan embriones de 2 células se reconoce actividad de estos en el contacto artificial y en

los contactos naturales. Estos resultados confirman que el contacto celular genera regionalización y que experimentalmente puede anticiparse el proceso en aproximadamente 12 h respecto de su ocurrencia normal.

En los agregados de embriones de 2 células se observa que los contactos naturales se regionalizan antes que el artificial, lo cual interpretamos suponiendo que el contacto artificial genera una señal que se transmite a los contactos naturales y que estos se regionalizan en poco tiempo porque en ese lugar las células han estado largo tiempo en contacto. Esta última suposición se confirma puesto que el porcentaje de contactos naturales regionalizados en la unidad de tiempo es mayor cuando se agregan estados de 2 células más avanzados.

La regionalización inducida por contacto no es inhibida por cicloheximida de donde se infiere que el contacto y la transmisión de la señal no requieren de síntesis de proteínas y que la demostración citoquímica revela una activación de la enzima.

La regionalización puede ser inducida en embriones de 2 células libres utilizando algunas lectinas (Con A, WGA, SBA pero no UEA I) en solución o unidas a esferas de agarosa, lo cual sugiere que habría carbohidratos comprometidos en la recepción de la señal generada por el contacto en las quimeras.

También puede inducirse el efecto de regionalización con agonistas de segundos mensajeros del sistema fosfatidilinositol lo cual sugiere que dichos mensajeros podrían estar comprometidos en la transmisión de la señal inducida por contacto, desde el contacto artificial al natural.

La estimulación con WGA y agonistas de diacilglicerol no sólo induce regionalización en embriones de 2 células sino también procesos morfogénicos más avanzados que simulan la compactación y blastulación.

S U M M A R Y

Since the 4-cell late stage 5'-nucleotidase (5NUC) and alkaline phosphatase (FAL) activities can be cytochemically demonstrated on cell contact regions of the mouse embryo. Here we submit that cell contact causes the regionalization of these enzyme activities.

Embryos having 8 cells or more when aggregated reveal 5NUC and FAL activity on the region of artificial contact and aggregated 2-cell embryos show these enzyme activities on those contacts but more frequently on the natural contacts. We ascribe this result to the longer cell apposition on the natural contact as it is shown when advanced 2-cell embryos are placed in contact.

Results suggest that a signal generated at the artificial contact is transmitted to the natural contact where the enzyme activity is demonstrated. The artificial contact can be replaced by several lectines (Con A, WGA, SBA but not UEA I) either in solution or attached to agarose spheres. The transmission of the contact signal can be simulated by second messengers of the phosphoinositides pathway. The reception of the signal by the effector at the natural contact activates the enzymes but does not require their synthesis.

Stimulation of 2-cell embryos by WGA and by diacylglycerol agonists anticipate not only their regionalization but also a compaction and blastulation that mimic these normal morphogenetic events.

A B R E V I A T U R A S

4 α PDD	4- α -forbol 12, 13-didecanoato
BSA	Albúmina de suero de bovino
CCD	Citochalasina D
CHX	Cicloheximida
Con A	Concanavalina A
db-cAMP	Dibutiril-cAMP
DMSO	Dimetilsulfóxido
FAL	Fosfatasa alcalina
H7	1-(5-isoquinolinasulfonil)-2metil-piperazina
hCG	Gonadotrofina coriónica humana
5NUC	5'-nucleotidasa
OAG	1-oleoil 2-acetil glicerol
PKC	Proteina quinasa C
PMA	Forbol 12-miristato 13-acetato
PMSG	Gonadotrofina de suero de yegua preñada
PVP	Polivinilpirrolidona
SBA	Agglutinina del poroto de soya
Tris	Hidroximetilaminoetano
UEA I	Agglutinina de aulaga
W7	N-(6-aminohehil)-5-cloro-1-naftalensulfonamida
UI	Unidades internacionales
WGA	Agglutinina de germen de trigo

I N T R O D U C C I O N

El desarrollo inicial de los mamíferos se extiende desde la fecundación hasta la implantación del embrión en el endometrio. Esta etapa culmina con la formación del blastocisto, en el cual se distinguen por primera vez dos tipos celulares, la masa celular interna y el trofoblasto.

Durante este periodo del desarrollo se plantea el problema de cómo explicar la diferenciación celular observada en el blastocisto a partir de un huevo, en el que no se distinguen regiones citoplasmáticas bien definidas y cuya segmentación genera células constituidas por citoplasmas semejantes que rodean núcleos supuestamente iguales. Además, durante estas etapas, hay normalización del desarrollo (regulación embrionica) luego de la desagregación de células o de la agregación de embriones (Tarkowski & Wroblewska, 1967) y de otras operaciones más controladas como la destrucción de ciertos blastómeros (Matte *et al.*, 1987) y la estratificación del citoplasma por centrifugación (Téllez *et al.*, 1988). Por lo tanto, la diferenciación celular que se manifiesta en el blastocisto no podría atribuirse a un desarrollo estrictamente determinado sino a una organización intrínseca lábil y/o a factores extrínsecos, como son las diferencias generadas durante la segmentación en cuanto a contactos celulares y quizás también, en cuanto a microambiente celular

(Izquierdo, 1986).

DESCRIPCION AD HOC DEL DESARROLLO PREIMPLANTACIONAL DEL RATON

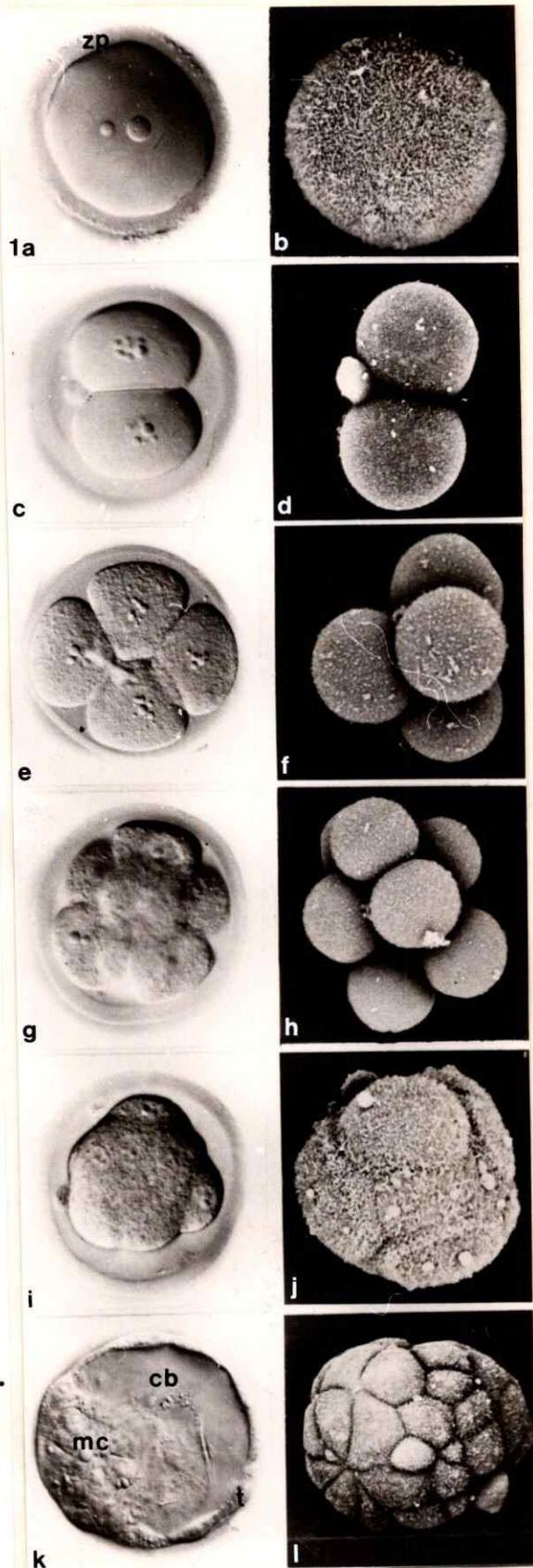
El desarrollo preimplantacional del ratón comprende divisiones celulares (segmentación), regionalización celular, compactación y la diferenciación celular del blastocisto. Durante este período se mantiene el tamaño del embrión, que mide aproximadamente 70 μm de diámetro. La fecundación ocurre en la ampulla y desde allí el embrión es impulsado hacia el extremo uterino del oviducto. Este tránsito dura 3,5 días y durante él se realiza la segmentación. La primera división se produce 24-27 horas después de la fecundación y las siguientes divisiones ocurren aproximadamente cada 10 a 12 horas (Luthard & Donahue, 1975). Sin embargo, no son sincrónicas y por lo tanto, se encuentran diversos números de blastómeros aunque sean más frecuentes las potencias de dos (Graham & Deussen, 1978) (fig. 1).

Desde la primera división de segmentación se observa una regionalización de los componentes celulares y simultáneamente hay una intensa actividad génica, que se manifiesta tempranamente después de la fecundación y se caracteriza por una rápida sustitución del mRNA materno del oocito, por el propio del embrión (West & Green, 1983).

Figura 1

Desarrollo preimplantacional del ratón.

En la columna izquierda observaciones por microscopía de luz con óptica de Nomarski. En todos los estados el embrión está rodeado por la zona pelúcida (zp). En la columna derecha observaciones por microscopía electrónica de barrido, en que la zona pelúcida ha sido eliminada para observar la superficie. a, b: embrión de 1 cél. c, d: embrión de 2 cél. e, f: embrión de 4 cél. g, h: embrión de 8 cél. no compactado. i, j: embrión de 8 cél. compactado. k, l: blastocisto, mc= masa celular interna, cb= cavidad blastocélica, t= trofoblasto. Aumento: 290 x



Cuando el embrión se ha segmentado en 8 células se inicia el proceso de compactación (Ducibella & Anderson, 1975). Hasta ese estado de desarrollo los blastómeros son esféricos, presentan sólo contactos puntuales entre ellos y el acoplamiento iónico se debe a la presencia de puentes citoplasmáticos entre blastómeros hermanos (Lo & Gilula, 1979). En la compactación los blastómeros adyacentes se aplanan unos contra otros, extendiéndose así las áreas de contacto intercelular (fig. 1).

Durante la compactación se producen cambios en la adhesividad de los blastómeros que corresponden a la expresión de una glicoproteína denominada uvomorulina que es análoga a caderina E, antígeno arc-1 y antígeno rr-1. Además se han descrito en otros sistemas glicoproteínas que corresponden a uvomorulina tales como L-CAM de pollo y CAM-120/180 de humanos (revisión en Fleming & Johnson, 1988). La función de uvomorulina depende de la presencia de Ca^{++} en el medio (Hyafil *et al.*, 1981; Shirayoshi *et al.*, 1983; Ringwald *et al.*, 1987). En esta etapa no se reconoce una matriz extracelular estructurada, pero ya se observa la presencia de laminina, heparán-sulfato y nidógeno (Wu *et al.*, 1983; Dziadek & Timpl, 1985; Dziadek *et al.*, 1985).

Los cambios descritos en la compactación son dependientes del citoesqueleto, puesto que los agentes que alteran la estabilidad de microtúbulos y microfilamentos interfieren con la compactación (Ducibella, 1980; Pratt *et*

al., 1982).

El proceso de compactación está acompañado, además, por el establecimiento de las primeras uniones intercelulares específicas. En las regiones de contacto entre los blastómeros aparecen puntos de fusión de membranas que impiden el paso de la emulsión de lantano y corresponden a "tight junctions"; además, hay contactos que dejan un espacio de 40 Å delineado por el paso de la emulsión de lantano, que corresponden a "gap junctions" (Ducibella & Anderson, 1975). Estas últimas son las uniones responsables del acoplamiento iónico entre los blastómeros del embrión de 8 ó más células (Lo & Gilula, 1979; McLachlin et al., 1983; Goodall & Johnson, 1984; Lee et al., 1987).

Al finalizar el paso por el oviducto, el embrión de ratón es una mórula compuesta de aproximadamente 24 células (Fernández & Izquierdo, 1980). En los blastómeros periféricos se establecen "tight junctions zonulares" sellando así los espacios entre las células externas, que constituirán el trofoblasto. Desde estados más tempranos, ya en algunos blastómeros de la mórula se observa la acumulación de material en el citoplasma que luego se vacía a los espacios interblastoméricos (Izquierdo et al., 1976). El sellamiento impide la difusión del material intercelular hacia el espacio extraembrionario, formándose así la cavidad blastocélica.

De esta manera, la mórula compuesta de un sólo tipo de células se transforma en un blastocisto, en el cual puede reconocerse la diferenciación de los blastómeros en dos tipos celulares. Los blastómeros periféricos constituyen un epitelio aplanado de células estrechamente unidas entre sí, denominado trofoblasto o trofoectoderma y los blastómeros centrales, alrededor de un tercio del total, constituyen la masa celular interna que queda desplazada hacia un polo. La masa celular interna o brote embrionario, dará origen al embrión propiamente tal y el trofoectoderma dará origen a la mayor parte de los anexos embrionarios. Resumiendo, la primera diferenciación celular reconocida en el desarrollo preimplantacional de mamíferos se manifiesta en la transición del estado de mórula al estado de blastocisto y el trofoblasto es el primer tejido determinado. La determinación se demuestra por experiencias de microcirugía: la masa celular aislada regenera una capa periférica de trofoblasto, mientras que el trofoblasto aislado no regenera masa celular interna (véase Fernández & Izquierdo, 1983)

REGIONALIZACION DURANTE EL DESARROLLO INICIAL

El proceso de regionalización o de especificación regional se reconoce cuando los componentes celulares, que tenían en cada célula una distribución espacial relativamente homogénea y dispuesta en un campo centro-periferia, se redistribuyen constituyendo regiones

distintas. La regionalización es una etapa decisiva del desarrollo inicial por cuanto implica la ruptura del equilibrio, en este caso de la simetría esférica, y el comienzo de un proceso morfogénico irreversible.

Desde las primeras etapas del desarrollo, se han detectado signos de regionalización de algunos componentes citoesqueléticos, utilizando técnicas de inmunofluorescencia. En el embrión de 2 células, la miosina cortical se concentra en las regiones alejadas del contacto celular (Sobel, 1983), mientras que espectrina y fodrina aparecen en las regiones de contacto celular (Sobel & Alliegro, 1985; Reima & Lehtonen, 1985; Schatten et al., 1986). Los microfilamentos corticales, que son detectados en todos los estados del desarrollo preimplantacional (Lehtonen & Badley, 1980), se concentran en las regiones alejadas de los contactos celulares durante el estado de 8 células (Johnson & Maro, 1984) y los microtúbulos corticales se localizan de acuerdo a un patrón similar (Lehtonen & Badley, 1980; Houliston et al., 1987).

La regionalización (o polarización) de los componentes de la membrana celular se detecta desde el estado de 2 células con anticuerpos, lectinas y análogos de lípidos, y la proporción de células polarizadas aumenta durante la segmentación (Handyside et al, 1987). Asimismo, se ha reconocido una regionalización de la superficie celular, desde el estado de 4 células hacia adelante, por la

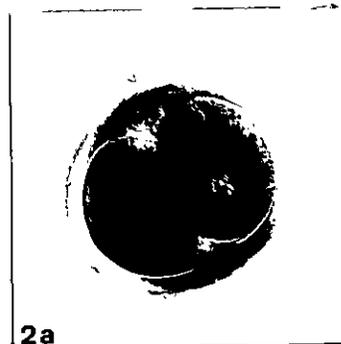
demostración citoquímica de las actividades de fosfatasa alcalina (FAL) y 5'-nucleotidasa (5NUC), cuyos productos de reacción marcan exclusivamente las zonas de contacto celular, (Izquierdo, 1977; Izquierdo *et al.*, 1980; Izquierdo & Ebensperger, 1982, Lois & Izquierdo, 1984). (fig. 2).

El proceso de regionalización del cortex y la superficie celular es particularmente notable durante la compactación de la mórula de 8 células, cuando desaparecen las microvellosidades en las regiones de contacto celular (Reeve & Ziomek, 1981; Sepúlveda *et al.*, 1985).

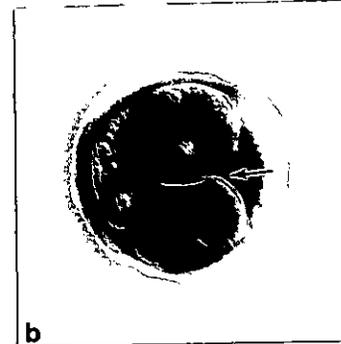
5NUC Y FAL: DOS ECTOENZIMAS MARCADORAS DE LA REGIONALIZACION DE LA MEMBRANA PLASMÁTICA

En esta Tesis nos interesan especialmente dos ectoenzimas de membrana plasmática, 5NUC y FAL, porque de acuerdo con observaciones realizadas en este laboratorio pueden ser usadas como marcadores de regionalización (Izquierdo *et al.*, 1980; Izquierdo & Ebensperger, 1982). Se cree que ambas enzimas están unidas covalentemente a fosfatidilinositol glicosilado, por el lado externo de la membrana (Low & Zilverdsmith, 1980; Cross, 1987; Low, 1987; Cross, 1987).

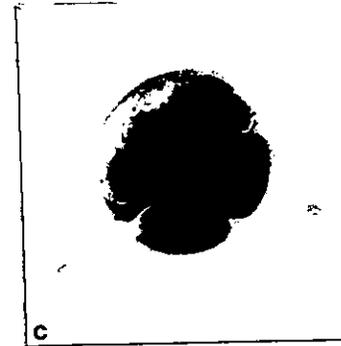
Ectoenzimas son proteínas integrales de membrana plasmática que tienen su sitio activo situado sobre la superficie externa de la célula. Se han planteado diversas hipótesis para explicar la función de las



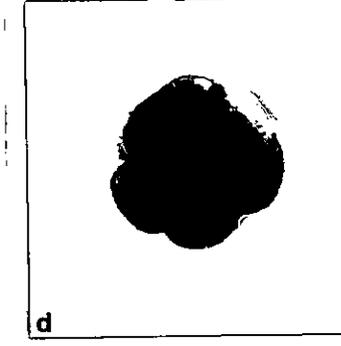
2a



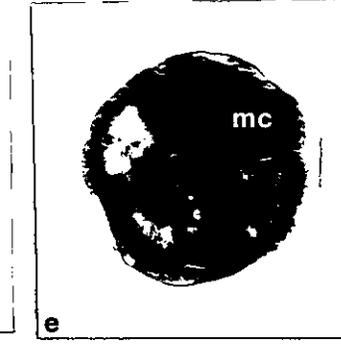
b



c



d



e

Figura 2

Regionalización

Demostración citoquímica de la actividad de 5NUC durante el desarrollo preimplantacional del ratón. Aumento: 260 x

a: embrión de 2 células que no presenta actividad.

b: embrión avanzado de 4 células, donde aparece actividad en las zonas de contacto celular (flecha).

c, d: embriones de 8 y 16 células, respectivamente, con todos sus contactos celulares marcados.

e: blastocisto con notable actividad en la masa celular interna (mc).

ectoenzimas. La más simple propone que ellas metabolizan sustratos, disponibles extracelularmente, como parte de una vía metabólica extracelular. Una segunda hipótesis, es que las ectoenzimas funcionan como partes integrales de procesos de transporte celular, siendo el efecto neto el de asegurar un transporte vectorial de sus productos a través de la membrana plasmática (Stanley *et al.*, 1982).

Las ectoenzimas también podrían funcionar como receptores, aunque no se sabe como las señales de superficie celular podrían ser transducidas en respuestas celulares. Sin embargo, se han propuesto interacciones de ectoenzimas con el citoesqueleto, como por ejemplo entre 5NUC y actina (Carraway *et al.*, 1979).

Otra característica notable de muchas ectoenzimas es la gran fluctuación de su concentración en lugares de crecimiento y diferenciación celular (Berman *et al.*, 1980). Por lo tanto, se ha considerado la posibilidad de que esten involucradas en los mecanismos que gatillan la diferenciación (Stanley *et al.*, 1982).

5'-nucleotidasa (EC 3.1.3.5) es una glicoproteína intrínseca de membrana que se encuentra en diversos tipos celulares (Stanley *et al.*, 1980). Aunque no se le ha asignado ningún rol fisiológico, se han sugerido algunos, por ejemplo, la degradación de nucleótidos y la producción de adenosina (como una "hormona local" según Baron *et al.*,

1986).

5NUC es ampliamente usada como un marcador general de membrana plasmática, aunque la enzima parece estar concentrada (regionalizada) en ciertos dominios de células epiteliales polarizadas, tales como hepatocitos (Wisher & Evans, 1975) y células del epitelio intestinal (Baron et al., 1986).

La enzima existe principalmente como un homodímero de subunidades α de un peso molecular aproximado de 70.000 (Baillyes et al., 1982, 1984). Alrededor del 20 % de la enzima se encuentra como un heterodímero de subunidades α y β . La subunidad β tiene un peso molecular aproximado de 38.000.

Se denomina Fosfatasa alcalina (EC 3.1.3.1) a una familia de isoenzimas con propiedades catalíticas similares, que hidrolizan una variedad de fosfomonoésteres en un rango de pH alcalino. La mayoría son proteínas dimericas en que el peso molecular de cada subunidad varía entre 64.000 y 72.000. Son altamente glicosiladas conteniendo ácido siálico como carbohidrato terminal (Fishman, 1974). Son metalo-enzimas que en su forma nativa contienen cuatro átomos de zinc; dos están asociados a la actividad catalítica y dos contribuyen a la integridad estructural de la molécula.

La función fisiológica de FAL se desconoce, aunque su actividad ha sido asociada a la formación de proteínas fibrilares y también al pasaje de metabolitos a través de la membrana celular (Burstone, 1962; Fishman, 1974; Hertz, 1985).

FUNCION DEL CONTACTO CELULAR EN LA REGIONALIZACION Y EN LA DIFERENCIACION HACIA BLASTOCISTO

Tarkowski y Wróblewska (1967) estudiando el desarrollo *in vitro* de blastómeros de ratón aislados en diferentes estados de segmentación, observaron que blastómeros aislados de un embrión de 2 células producían más blastocistos que vesículas trofoblásticas, mientras que los aislados de embriones de 8 células producían menos blastocistos que vesículas trofoblásticas ("blastocistos" sin masa celular interna). Estos resultados fueron interpretados suponiendo que al tiempo de la blastulación las células se diferencian de acuerdo a su posición: las externas hacia trofoblasto y las internas hacia masa celular. Puesto que el blastocelo aparece en función de la edad del embrión y no del número de células (Fernández & Izquierdo, 1980), mientras más avanzado es el embrión del cual se aísla un blastómero menos probable es que éste alcance a segmentarse un suficiente número de veces como para tener células internas cuando sobreviene la blastulación. Esta interpretación epigenética del desarrollo se ha denominado modelo adentro-afuera,

invocándose la diferencia de posición como la causa de la diferenciación celular.

Pero estas diferencias posicionales generan también un microambiente distinto para las células internas y externas de la mórula, el cual podría ser causante de la diferenciación celular. Sin embargo, es improbable que se trate solamente de un microambiente químico, porque produciendo un blastocisto quimérico gigante e introduciendo una mórula en su cavidad blastocélica se observa que ésta se desarrolla como un blastocisto normal (Pedersen & Spindle, 1980). En conjunto, las explicaciones invocadas para la diferenciación celular del blastocisto son, a nuestro parecer, incompletas porque no explican los mecanismos por los cuales las células reconocerían su posición dentro del embrión.

Pensamos que la diferenciación celular se inicia con la regionalización, y ésta con los contactos celulares, los cuales aportarían información posicional mediante receptores específicos que transducirían la señal de posición

Los contactos celulares estarían involucrados en la regionalización y eventualmente en la diferenciación celular, como lo sugieren experimentos de agregación y desagregación de embriones. Por ejemplo, poniendo en contacto embriones iniciales de ratón se ha observado una redistribución de componentes citoesqueléticos corticales

(miosina, espectrina), formación de uniones hendidas ("gap junctions") y desaparición de microvellosidades en las zonas de contacto; además, estos procesos de redistribución espacial, se revierten al separar los blastómeros, lo cual significa que se requiere contacto celular para mantener la regionalización (Sobel, 1983a, b; McLachlin *et al.*, 1983; Sobel & Alliegro, 1985; Sepúlveda *et al.*, 1985).

De acuerdo con los antecedentes antes citados proponemos que el contacto celular sería la causa eficiente que provocaría la regionalización de la membrana plasmática, generando la primera asimetría que ocurre durante el desarrollo inicial de los mamíferos y que sería un requisito para la morfogénesis y la diferenciación celular. Es decir, la regionalización durante el desarrollo de mamíferos comenzaría tan temprano como el primer contacto, producido por la primera división.

Ya hemos estudiado el efecto del contacto celular en la distribución de las microvellosidades (Sepúlveda *et al.*, 1985) y en esta Tesis se pone a prueba tal hipótesis estudiando la regionalización de dos enzimas de superficie celular - 5'-nucleotidasa y fosfatasa alcalina - que se observa durante la segmentación del embrión de ratón y de otros mamíferos (Ishiyama & Izquierdo, 1977) y que en condiciones normales precede la desaparición de microvellosidades que ocurre durante la compactación. Además, se estudia la inducción de dos eventos

morfogenéticos que normalmente suceden a la regionalización
- compactación y blastulación - que pueden reconocerse por
la observación in vivo.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

El objetivo general de esta Tesis es estudiar el efecto que tiene el contacto celular sobre la regionalización de la membrana plasmática, reconocida por la demostración citoquímica de 5NUC y FAL, y sobre otros eventos morfogénéticos.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

Los objetivos específicos principales de esta Tesis son:

- 1) Demostrar que los contactos celulares experimentales causan regionalización de las enzimas marcadoras y que este proceso puede anticiparse, en relación al desarrollo normal.
- 2) Investigar los mecanismos que participan en la inducción de la regionalización causada por el contacto celular e identificar los componentes de superficie que pudieran estar involucrados.
- 3) Estudiar la vía de transmisión de la señal inducida por el contacto, desde el contacto artificial hacia la superficie celular que se regionaliza.
- 4) Describir otros posibles efectos morfogénéticos provocados por la estimulación artificial de la superficie celular o por componentes de la vía de transmisión de la señal inducida por el contacto.

Los resultados de este trabajo de Tesis han sido parcialmente publicados en:

COMUNICACIONES A CONGRESOS

- López, T. & Sepúlveda, M.S. (1985). Compactación experimental: actividad de 5'-nucleotidasa y fosfatasa alcalina sobre las superficie de contacto. Arch. Biol. Med. Exp. 18: R-146.
- Izquierdo, L.; Becker, M.I.; Fernández, S.; Sepúlveda, M.S., Ahumada, A. & Pey, R. (1986). Rol de componentes de membrana celular en el desarrollo inicial de mamíferos. Arch. Biol. Med. Exp. 19: R-215.
- Sepúlveda, M.S. (1988). Regionalización al comienzo del desarrollo inducida por contacto celular. Arch. Biol. Med. Exp. 21: R-536.
- Sepúlveda, M.S. & Izquierdo, L. (1988). Regionalización inducida en el huevo de 2 células. Arch. Biol. Med. Exp. 21: R-360.
- Sepúlveda, M.S. & Nuñez, M.T. (1988). Morfogénesis del huevo preimplantacional: efecto de WGA y participación de segundos mensajeros. Arch. Biol. Med. Exp. 21: R-332.
- Sepúlveda, M.S. & Izquierdo, L. (1989). Recepción y transmisión de señales de contacto durante el desarrollo inicial de los mamíferos. Arch. Biol. Med. Exp. 22: R-303.

COMUNICACIONES "IN EXTENSO"

- Sepúlveda, M.S. & Izquierdo, L. (1990). Effect of cell contact on regionalization of mouse embryos. Developmental Biology 139: 363-369

M A T E R I A L E S Y M E T O D O S

1. O B T E N C I O N D E E M B R I O N E S

Se utilizaron embriones preimplantacionales obtenidos del cruce de hembras de ratón superovuladas de la cepa CF 1, con machos de la misma cepa.

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

La cópula se reconoció por la presencia del tapón vaginal. Las hembras fecundadas se sacrificaron por dislocación cervical, se extrajeron los oviductos y los embriones se obtuvieron por perfusión con el medio descrito por Biggers (Biggers, Whitten & Whittingham, 1971) ajustando la concentración de albúmina de suero de bovino (BSA) (Sigma) a 4 mg/ml. La edad de los embriones se expresa en horas post inyección de hCG.

En los resultados designaremos a los embriones de 2 células como tempranos, cuando al comienzo de los experimentos tienen 42 h post hCG y como tardíos, cuando al comienzo de los experimentos tienen 48 h post hCG.

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

NaCl	94.59 mM
KCl	4.78 mM
KH ₂ PO ₄	1.19 mM
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	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	0.05 mg/ml
Rojo fenol	5 mg/l

2. ELIMINACION DE LA ZONA PELUCIDA

La zona pelúcida de los embriones fue digerida por incubación en medio salino ácido (pH 2.8) descrito por Ducibella (1980) durante 15 a 20 segundos. Luego, los embriones se lavaron varias veces en medio Biggers con albúmina y fueron cultivados por al menos 1 h para recuperarlos del tratamiento ácido. Se ensayaron recuperaciones de hasta 6 horas, pero no variaban los resultados.

En ciertas series experimentales, la zona pelúcida fue digerida por incubación en solución de pronasa

(Calbiochem) al 0.5 % (p/v) en medio Biggers sin albúmina, por 5 a 7 minutos. Luego, se realizaron 5 lavados en Biggers y se cultivó durante 1-2 h antes de la agregación.

2.1 Composición de la solución ácida (Ducibella, 1980).

NaCl	140.0 mM
NaH ₂ PO ₄	0.73 mM
Na ₂ HPO ₄	0.86 mM
KCl	4.8 mM
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	1.2 mM
CaCl ₂	1.7 mM
Polivinilpirrolidona (PM: 40.000)	0.4 %

3. CULTIVO

Los embriones fueron cultivados en gotas de 5 a 10 μ l de medio Biggers bajo aceite mineral en una atmósfera de 5 % (v/v) de CO₂ en aire húmedo y a 37 °C.

En otras series experimentales, que se indican, en las cuales las sustancias utilizadas eran solubles en vaselina, los cultivos fueron hechos en cápsulas especiales, Falcon 3031, en un volumen de 400 a 600 μ l. Para evitar la evaporación se agregó agua en la cámara externa de la cápsula.

3.1 Control de la viabilidad de los embriones.

La viabilidad de los embriones al finalizar los cultivos en las diferentes series experimentales fue controlada colocando los embriones en eosina amarillenta (Merck) al 0.5 % en Biggers y los embriones que se tiñeron fueron descartados.

4. AGREGACION DE EMBRIONES

Pares de embriones sin zona pelúcida fueron colocados en gotas de medio Biggers, puestos en contacto con una pipeta pulida a la llama y cultivados, como se describe arriba, por diferentes lapsos, que variaron entre 1 y 6 h. Embriones que no se agregaban durante el período de cultivo o que se disociaban durante la manipulación eran descartados.

Se formaron pares en diversas combinaciones de distintos estados de desarrollo, que en este trabajo denominaremos, de acuerdo con el número de células de los embriones, como 2+2, 2+4, 2+8, 2+blastocisto (bl), 4+8, 8+8, 8+bl, etc.

En los resultados designaremos dos tipos de contactos: contactos naturales, es decir, aquellos entre células de un mismo embrión y contactos artificiales, es decir, aquellos entre células de embriones diferentes que resultan de la agregación.

5. TECNICAS CITOQUIMICAS

Al describir los resultados, nos referiremos a embriones no regionalizados y a embriones regionalizados. En los primeros, las actividades de 5NUC ó FAL no son detectadas con nuestros métodos citoquímicos y en los embriones regionalizados estas actividades enzimáticas son detectadas en los contactos celulares. Como se explicó en la Introducción, hasta el estado de 4 células, los embriones no están regionalizados y todos los embriones con más de 4 células están regionalizados.

5.1 Detección de la actividad de 5'-nucleotidasa (5NUC).

Para la demostración de la actividad de 5NUC, los embriones se procesaron según el procedimiento de Izquierdo & Ebensperger (1982) adaptado de Uusitalo y Karnovsky (1977). Se fijaron en una solución de glutaraldehído al 1 % en amortiguador tris-maleato 0.1 M a pH 6.0 durante 1 h a temperatura ambiente. Luego se lavaron en amortiguador tris-maleato 0.1 M a pH 7.2 tres veces y se incubaron a pH 7.2 durante 50 min a 37 °C, en el medio indicado en 5.1.1.

Luego de la incubación, los embriones se lavaron en amortiguador tris-maleato y en agua. El producto de la reacción se reveló exponiendo los embriones a una solución de sulfuro de amonio al 0.1 % por un par de minutos. Finalmente, fueron lavados en agua y montados enteros en

glicerol al 50 %, para ser observados al microscopio de luz.

Como control de rutina se incubó en un medio sin el sustrato.

5.1.1 Composición del medio de incubación utilizado para la detección de la actividad de 5'-nucleotidasa.

5' AMP	1.5 mM
Tris-maleato	0.1 M
Nitrato de plomo	1.5 mM
Sulfato de Magnesio	10.0 mM
Glucosa	5 %

5.2 Detección de la actividad de fosfatasa alcalina (FAL)

Para la demostración citoquímica de la actividad de FAL, los embriones se procesaron según el método utilizado por Izquierdo *et al* (1980). Se fijaron en una solución de glutaraldehído al 3 % en amortiguador cacodilato 0.1 M a pH 7.4 durante 1 h a temperatura ambiente. Luego se lavaron en el mismo amortiguador tres veces y se incubaron a pH 9.5 durante 90 min a temperatura ambiente, en el medio indicado en 5.2.1.

Luego de la incubación los embriones se lavaron en amortiguador cacodilato 0.1 M pH 7.4 y en agua. El producto de la reacción se reveló exponiendo los embriones a una solución de sulfuro de amonio al 0.1 % por un par de

minutos. Finalmente, fueron lavados en agua y montados enteros en glicerol al 50 %, para ser observados al microscopio de luz.

Como control de rutina se incubó embriones en un medio sin sustrato.

5.2.1 Composición del medio de incubación utilizado para la detección de la actividad de fosfatasa alcalina.

β -glicerofosfato	32 mM
Tris	160 mM
Citrato de plomo	3 mM
Sulfato de magnesio	6 mM
Glucosa	5 %

6. CULTIVO EN PRESENCIA DE LECTINAS

6.1 Cultivo con lectinas en solución

Embriones de 2 células fueron cultivados como se indica en 3, en una solución de Biggers que contenía una de las lectinas señaladas en 6.1.1, por tiempos variables entre 1 y 6 horas.

Las lectinas utilizadas tienen afinidad por diferentes residuos sacaridos específicos, como se señala en 6.1.1 y las concentraciones utilizadas variaron entre 50 y 700 $\mu\text{g/ml}$ (Wartiovaara *et al.*, 1978; Kimber & Bird, 1985;

Zuzack & Tasca, 1985; Dealtry *et al.*, 1987).

Luego de las incubaciones los embriones fueron procesados para la detección citoquímica de 5NUC ó FAL, como se indica en 5, o montadas para microscopía de luz ó fijadas para microscopía electrónica, como se indica en 10.

6.1.1 Lectinas utilizadas

Lectina:	sacarido reconocido:	concentración utilizada:
Con A (<i>Canavalia ensiformes</i>)	glucosa manosa	700 $\mu\text{g/ml}$
WGA (<i>Triticum vulgare</i>)	N-acetilglucosamina, ác. siálico	50 $\mu\text{g/ml}$ 100 $\mu\text{g/ml}$
SBA (<i>Glycine max</i>)	galactosamina	100 $\mu\text{g/ml}$
UEA I (<i>Ulex europaeus</i>)	fucosa	100 $\mu\text{g/ml}$

6.1.2 Cultivo con WGA en presencia de Cloruro de Litio

En algunas series experimentales se cultivó con WGA (50 $\mu\text{g/ml}$) como se indica en 6.1, pero además se agregó LiCl 15 mM (Hallcher & Sherman, 1980; Berridge *et al.*, 1982) en el Biggers en que era preparada la solución. Para esto se reemplazó parte proporcional de NaCl por LiCl (Izquierdo & Becker, 1982).

Luego los embriones fueron observados al microscopio de luz.

6.2 Agregación de embriones con esferas de agarosa que tienen lectinas ligadas a la superficie

Embriones de 2 células sin zona pelúcida fueron agregados con esferas de agarosa de aproximadamente 100 μm de diámetro, que tenían ligadas a su superficie moléculas de Con A o WGA (Sigma) (Kimber & Surani, 1983), por tiempos que variaron entre 2 y 6 h, del mismo modo descrito en 4.1. Previo a la agregación, las esferas fueron lavadas 10 veces en Biggers por al menos 5 h.

Luego del período de agregación, las muestras fueron procesadas para la demostración citoquímica de 5NUC o FAL, como se indica en 5.

Como controles se cultivó embriones libres sin zona pelúcida, en las mismas gotas en que se realizó la agregación.

7. CULTIVO EN PRESENCIA DE ANALOGOS DE SEGUNDOS MENSAJEROS

7.1 Cultivo con dibutiril-cAMP

Embriones de 2 células fueron cultivados, como se indica en 3, en una solución de dibutiril-cAMP (db-cAMP, Sigma) 10^{-4} M (Bilozour & Powers, 1982), durante diversos

periodos de tiempo, después de los cuales fueron montados y observados al microscopio de luz o fijados y procesados para la demostración citoquímica de 5NUC, como se indica en 5.1.

La solución de db-cAMP se preparó en Biggers a partir de una solución stock 10^{-2} M preparada en agua.

7.2 Cultivo con 12-miristato 13-acetato (PMA)

Embriones de 2 células fueron cultivados como se indica en 3, en cápsulas Falcon 3031, en una solución de forbol 12-miristato 13-acetato (PMA) 0,6 μ g/ml preparada a partir de una solución stock de 1 mg/ml (mantenida a -20 °C) (Sawicki & Mystkowska, 1981; Niemierko & Komar, 1985), durante diversos periodos de tiempo. Luego, los embriones fueron observados al microscopio de luz o fijados y procesados para la demostración citoquímica de 5NUC, como se indica en 5.1.

Las soluciones de este reactivo así como las de otros que se mencionarán más adelante se prepararon a partir de soluciones stock preparadas en dimetilsulfóxido (DMSO). Por esto se controló el efecto de DMSO, realizando cultivos paralelos en que se utilizó las mismas cantidades de DMSO empleadas para disolver. No se observaron efectos sobre el desarrollo al comparar con medio de cultivo normal.

7.3 Cultivo con 1-oleoil 2-acetilglicerol (OAG)

Embriones de 2 células fueron cultivados como se indica en 3, en cápsulas Falcon 3031, en una solución de oleoilacetilglicerol (OAG, Sigma), durante diversos periodos de tiempo (Rink *et al.*, 1983). Las concentraciones utilizadas variaron entre 5 $\mu\text{g/ml}$ y 120 $\mu\text{g/ml}$, aunque la mayoría de los experimentos se realizaron con 60 $\mu\text{g/ml}$. Estas diluciones se prepararon a partir de una solución stock de 10 mg/ml en DMSO, mantenida a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, en una atmósfera de nitrógeno.

Después del cultivo en OAG los embriones fueron montados y observados al microscopio de luz con óptica de Nomarski o fijados y procesados para la demostración citoquímica de 5NUC, como se indica en 5.1.

7.3.1 Cultivo con OAG en presencia de Cloruro de Litio

En algunas series experimentales se cultivó con OAG (60 $\mu\text{g/ml}$) como se indica en 7.2, pero además se agregó LiCl 15 mM (Hallcher & Sherman, 1980; Berridge *et al.*, 1982) en el Biggers en que era preparada la solución. Para esto se reemplazó parte proporcional de NaCl por LiCl (Izquierdo & Becker, 1982).

Luego, los embriones fueron observados al microscopio de luz o fijados para microscopía electrónica de transmisión, como se indica en 10.

7.3.2 Cultivo con OAG en presencia del ionóforo de Calcio A 23187

En algunas series experimentales se cultivo con OAG (60 $\mu\text{g/ml}$) como se indica en 7.2, pero además se agregó ionóforo de Calcio A 23187, 1 μM , diluido a partir de una solución 1 mM en DMSO (Carroll & Eckberg, 1986). Luego, los embriones fueron montados y observados al microscopio de luz.

7.4 Cultivo con 1-(5-isoquinolinasulfonil)-2-metil-piperazina (H7)

Embriones de 2 células fueron cultivados como se indica en 3, en cápsulas Falcon 3031, en una solución de H7 (Sigma) 40 $\mu\text{g/ml}$ en Biggers (Eckberg *et al.*, 1987), durante 1 h y luego los embriones fueron transferidos a una solución con la sustancia ensayada además de H7. La solución se preparó a partir de una solución stock de 4 mg/ml en DMSO.

7.5 Cultivo con N-(6-aminohexil)-5-cloro-1-naftalensulfonamida (W7)

Embriones de 2 células fueron cultivados como se indica en 3, en cápsulas Falcon 3031, en una solución de W7 (Sigma) 50 μM en Biggers (Eckberg *et al.*, 1987; Yakamura & Spindle, 1988), durante 1 h y luego los embriones fueron transferidos a una solución con la sustancia ensayada además de W7. La solución se preparó a partir de una solución

stock 10 mM en agua.

7.6 Cultivo con 4- α -forbol 12, 13-didecanoato (4 α PDD)

Embriones de 2 células fueron cultivados como se indica en 3, en cápsulas Falcon 3031, en una solución de 4- α -forbol 12, 13-didecanoato (4 α PDD, Sigma), durante diversos periodos de tiempo. Se utilizó una concentración de 60 μ g/ml en Biggers (Eckberg *et al.*, 1987), preparada a partir de una solución stock de 10 mg/ml en DMSO, mantenida a - 20 °C .

Después del cultivo en 4 α PDD, los embriones fueron montados y observados al microscopio de luz con óptica de Nomarski.

8. INHIBICION DE LA SINTESIS DE PROTEINAS.

8.1 Inhibición de la síntesis de proteínas en quimeras 2+2.

Embriones aislados y sin zona pelúcida fueron cultivados por 30 min en medio Biggers y por 1-2 h en medio Biggers conteniendo 50 μ g/ml de cicloheximida (CHX) (Sigma) de acuerdo a McLachlin *et al* (1983). Luego, los embriones fueron agregados como se indica en 4, en el mismo medio que contenía CHX.

8.2 Inhibición de la síntesis de proteínas en embriones cultivados con OAG.

Embriones de 2 células fueron cultivados en una solución de Biggers conteniendo CHX (50 $\mu\text{g/ml}$) durante 1 h y luego fueron cultivados con OAG (60 $\mu\text{g/ml}$) y CHX durante 3 h. Luego, los embriones fueron montados y observados al microscopio de luz con óptica de Nomarski.

8.3 Control de la inhibición por CHX

Para controlar que CHX estaba efectivamente inhibiendo la síntesis de proteínas se realizó el siguiente experimento de incorporación de aminoácidos. Embriones de 2 células fueron incubados con CHX (50 $\mu\text{g/ml}$) por 1 h y luego incubados por 2 h en el mismo medio pero conteniendo metionina- ^{35}S (Amersham), en una concentración final de 1 mCi/ml. La incorporación fue detenida transfiriendo los embriones a un medio que contenía metionina fría (concentración final: 50 mM); luego, las proteínas fueron precipitadas con ácido tricloroacético (TCA) y BSA (concentraciones finales: 5 % y 0.25 mg/ml, respectivamente) y su radioactividad fue medida en un contador de centelleo (Flach *et al.*, 1982). Los resultados de un experimento con tres réplicas (10 embriones en cada una) muestran un 94 % de inhibición.

9. CULTIVO CON INHIBIDORES DE LA POLIMERIZACION DE COMPONENTES DEL CITOESQUELETO: CITOCALASINA D Y COLCHICINA

En las series experimentales que se indican en los Resultados, se utilizó drogas que inhiben la polimerización de actina y tubulina. En el primer caso se utilizó citochalasin D (CCD, Sigma) 5 $\mu\text{g/ml}$, preparada en Biggers a partir de una solución stock de 1 mg/ml en DMSO (Izquierdo *et al.*, 1984). En el segundo caso, se utilizó colchicina 2 $\mu\text{g/ml}$, preparada en Biggers a partir de una solución stock de 1 mg/ml en DMSO (Téllez *et al.*, 1984).

Los cultivos se realizaron como se indica en 3. Se cultivó durante 1 h en el inhibidor escogido y luego durante diversos periodos de tiempo, según se indica, con la sustancia que se ensayaba además del inhibidor.

10. MICROSCOPIA ELECTRONICA DE TRANSMISION

Para observar los embriones al microscopio electrónico de transmisión, éstos fueron fijados en glutaraldehído al 3 % (p/v) en amortiguador fosfato de sodio 0.1 M, pH 7.4, durante 1 h. Luego, se lavaron en amortiguador, durante 30 min, realizando 3 cambios y se postfijaron en tetróxido de Osmio al 1 % (p/v), en el mismo amortiguador, durante 1 h a temperatura ambiente y en oscuridad. Después de lavados en amortiguador durante toda la noche, los embriones se deshidrataron en concentraciones

crecientes de acetona, se incluyeron en una resina de baja viscosidad (Polyscience, Spurr, 1969) y se polimerizaron durante 18 h a 70 °C.

Se realizaron cortes finos (entre 600 y 800 Å de espesor) con un ultramicrotomo Sorvall MT-5000. El contraste adecuado se obtuvo tiñendo los especímenes con acetato de uranilo y citrato de plomo (Matte et al., 1987). Los cortes fueron observados en un microscopio electrónico Philips 300.

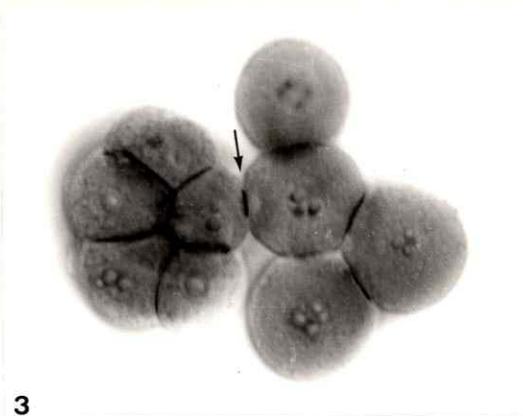
R E S U L T A D O S

1. Agregación de embriones regionalizados: actividad de 5NUC y FAL.

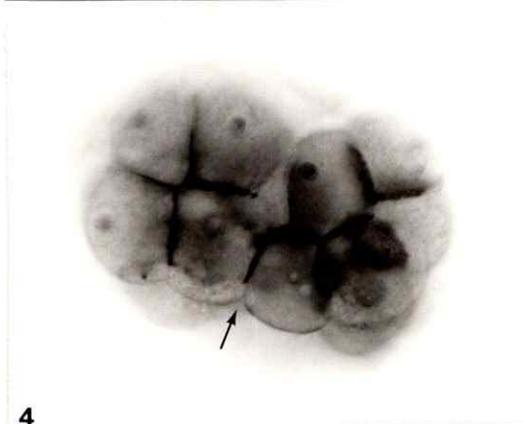
Después de cultivar en contacto por 2 a 3 h, 17 pares 4+8, 77 pares 8+8, 10 pares 8+bl y 15 pares bl+bl y procesar las quimeras para el reconocimiento citoquímico de 5NUC ó FAL, se puede observar el patrón de regionalización reconocido por la actividad enzimática que ya se ha descrito previamente (véase fig. 2 en Introducción). Además, todas las quimeras revelan actividad enzimática sobre los contactos artificiales, es decir, sobre los nuevos contactos celulares generados por la agregación (figs. 3-5). Los resultados con 67 quimeras tratadas para 5NUC y con 35 quimeras tratadas para FAL son similares.

En resumen, estos resultados sugieren que la agregación de dos embriones provoca regionalización en una zona de contacto que antes era libre y no estaba regionalizada.

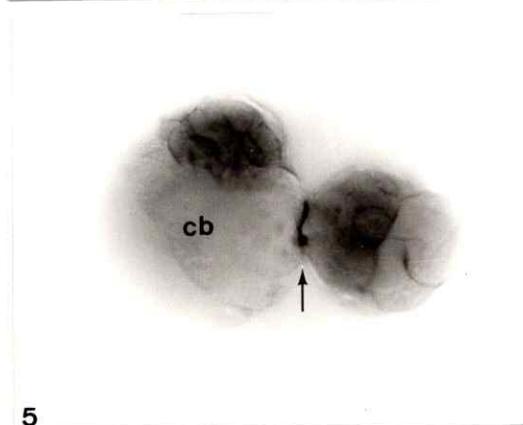
Una variante de los experimentos con quimeras 8+8, revela el efecto que tiene la extracción de la zona pelúcida sobre la superficie celular. Si se extrae con pronasa (0.5 μ g/ml) durante 5 min, en vez de usar Biggers ácido, se observa sólo un 33.3 % de contactos artificiales marcados con actividad de 5NUC sobre un total de 24 quimeras. Sin embargo, la actividad en el mismo contacto llega a 100 % (igual que extrayendo la zona pelúcida con Biggers ácido) si



3



4



5

Figuras 3 - 5

Quimeras montadas completas que fueron cultivadas durante 2 horas antes de la fijación. Obsérvese actividad de 5NUC sobre los contactos naturales de cada embrión y sobre los contactos artificiales (flechas), generados por la agregación. Aumento: 330x
Fig. 3, 4+8; Fig. 4, 8+8; Fig. 5, bl+bl.
cb= cavidad blastocélica.

después del tratamiento con pronasa se cultivan los embriones por 6 h antes de agregarlos.

2. Agregación entre embriones regionalizados y embriones no regionalizados: actividad de 5NUC y FAL.

Los experimentos de esta serie se realizaron con quimeras 2+8 y 2+bl. La actividad de 5NUC fue estudiada en 84 quimeras y la actividad de FAL en 25 quimeras.

Al agregar por 2 a 3 h embriones de 2 células con mórulas o blastocistos y procesar la quimera para la demostración citoquímica de 5NUC ó FAL, se observa que todos los embriones de 8 células y blastocistos están marcados con los productos de reacción, como se podía esperar y la mayoría de los contactos artificiales presentan actividad (aproximadamente el 80 %) (véase detalle en tabla 1, figs 6-8).

No esperábamos encontrar actividad en los contactos naturales de los embriones de 2 células agregados ya que la actividad de estas enzimas no ha sido demostrada citoquímicamente en embriones de 2 células libres (Izquierdo *et al.*, 1980; Izquierdo & Ebensperger, 1982). Sin embargo, como se muestra en la tabla 1, aproximadamente el 30 % de los embriones agregados de 2 células exhibían sus contactos naturales marcados. Por lo tanto, la agregación habría causado en el embrión de 2 células una regionalización que

Tabla 1

Agregación de embriones regionalizados con embriones no regionalizados

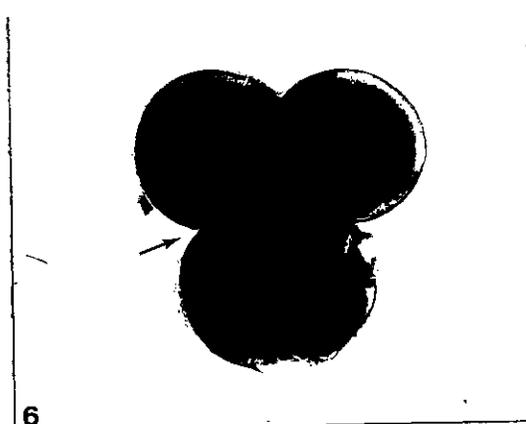
Tipo de quimera	n° quimeras observadas ^b	5NUC ^a		FAL ^a	
		porcentaje CN positivos ^c	porcentaje CA positivos ^d	porcentaje de CN positivos ^c	porcentaje de CA positivos ^d
2		30.5		31.5	
+	90		81.6		78.9
8		100		100	
2		30.7		33.3	
+	19		76.9		83.3
bl		100		100	

a: embriones de 2 células (43 h post hCG) agregados por 2-3 h con embriones de 8 células (67 h post hCG) o con blastocistos (91 h post hCG), fijados y procesados para la demostración citoquímica de 5NUC o FAL. 71 embriones de 2 células aislados fueron usados como controles paralelos y eran negativos en el 100 % de los casos.

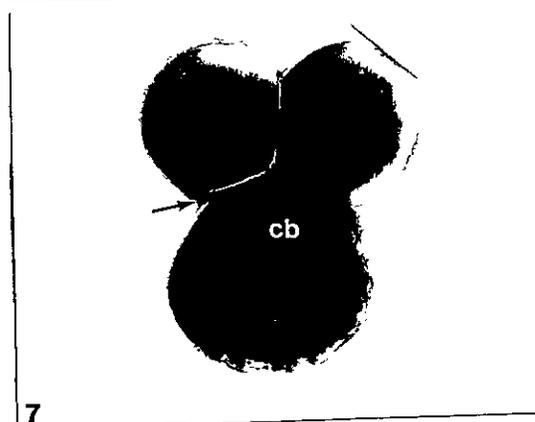
b: número total de quimeras procesadas para la demostración citoquímica.

c: porcentaje de contactos naturales (CN) que muestran reacción positiva

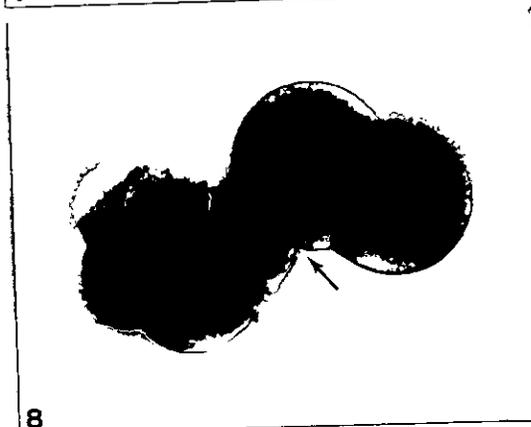
d: porcentaje de contactos artificiales (CA) que muestran reacción positiva.



6



7



8

Figuras 6-8

Quimeras, procesadas como en las figuras 3-5, en que uno de los embriones del par es un embrión de 2 células (43 h post HCG, al comienzo de la agregación). Las flechas señalan los contactos artificiales. Aumento: 330 x. Fig. 6, 2+8. Obsérvese actividad de 5NUC sobre los contactos naturales de la mórula y sobre el contacto artificial entre ambos embriones. Obsérvese ausencia de actividad en el contacto natural del embrión de 2 células. Fig. 7, 2+bl. Actividad de 5NUC sobre los contactos naturales del blastocisto y sobre los contactos artificiales. Fig. 8, 2+8. Obsérvese actividad de 5NUC sobre los contactos naturales de ambos embriones y sobre el contacto artificial.

en embriones libres se inicia durante el estado de 4 células, aproximadamente 12 h más tarde.

Como controles, se cultivaron aislados 71 embriones de 2 células, con o sin zona pelúcida y fueron procesados paralelamente. No se observó actividad en ninguno de ellos (tabla 1).

3. Agregación de embriones no regionalizados: actividad de 5NUC y FAL.

Los experimentos de esta serie se realizaron con quimeras 2+2 porque la agregación de embriones de 1 célula no se consigue con los métodos aplicados a los otros estados y los embriones de 4 células están en proceso de regionalizarse o están recién regionalizados.

La actividad de 5NUC fue estudiada en 263 quimeras 2+2 y la actividad de FAL en 22. Como control paralelos, se usó 260 embriones de 2 células, todos los cuales dieron reacción negativa (fig. 9).

Agregando durante 2 a 3 h, dos embriones de 2 células (42 h post HCG), de modo tal que sólo haya un contacto artificial, además de los dos contactos naturales y procesandolos para la demostración citoquímica de 5NUC se encuentra actividad enzimática, por lo menos en un contacto, en el 55.8 % de las quimeras (véase tabla 2). Si se analiza los resultados por contactos, se encuentra que el 36 % de

Tabla 2

Agregación de embriones de 2 células: actividad de SNUC

edad ^a (h post hCG)	horas de agregación	% quimeras positivas ^b	% controles positivos ^c
42	2 - 3	55.8 (24/43)	0 (0/56)
	5 - 6	90.2 (37/41)	0 (0/42)
48	2 - 3	90.6 (29/32)	0 (0/61)

a: edad de los embriones al comienzo de la agregación.

b: porcentaje de quimeras mostrando reacción positiva en al menos un contacto, artificial o natural (número de quimeras positivas / número total de quimeras).

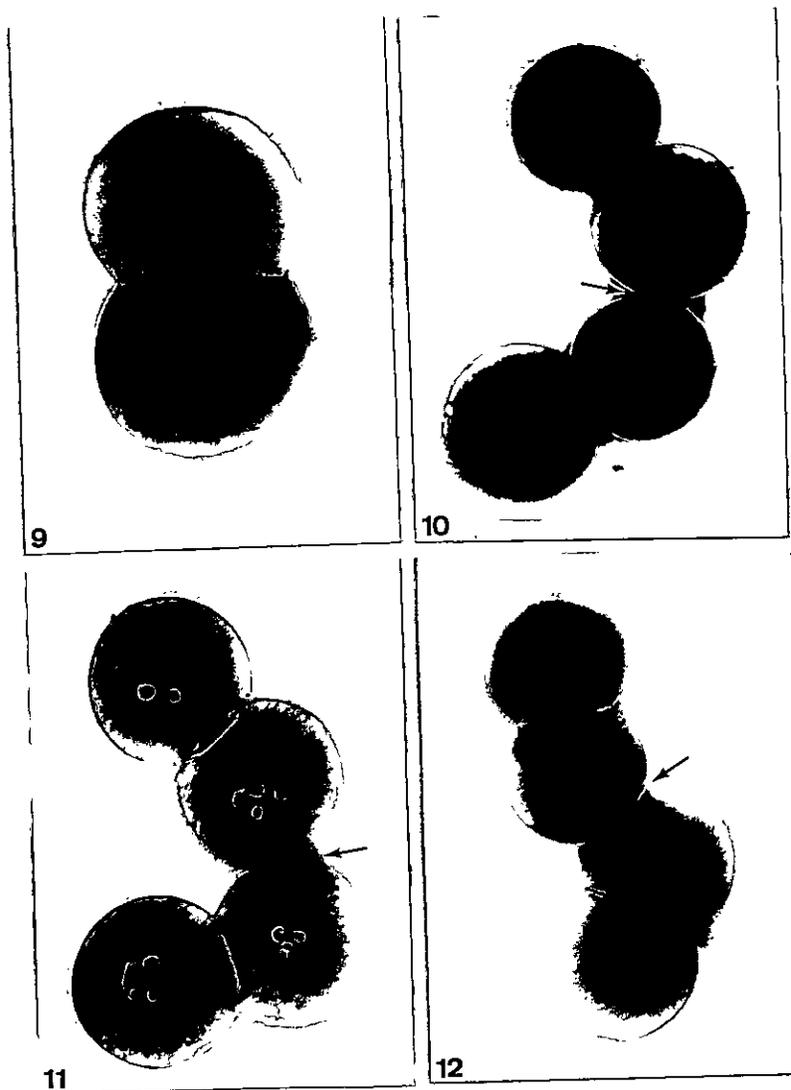
c: Controles: embriones de 2 células, sin zona pelúcida, cultivados en paralelo; porcentaje de embriones con reacción positiva (número de embriones positivos / número total de embriones).

los contactos naturales y el 7 % de los contactos artificiales muestran actividad (fig. 13). Nunca se encontró quimeras en que se marcara sólo el contacto artificial (figs. 10-12).

Estos resultados demuestran que el contacto artificial causa un efecto que se transmite al contacto natural y además sugieren que la actividad enzimática gatillada por la agregación podría aparecer sobre los contactos naturales antes que sobre los artificiales porque los naturales han estado presente durante más tiempo, desde que ocurrió la división, es decir, son aproximadamente 8 horas más antiguos que el contacto artificial.

Cuando el tiempo de agregación de embriones de 2 células (42 h post HCG) fue prolongado desde 2 - 3 h a 5 - 6 h, el 90.2 % de las quimeras reveló actividad de 5NUC (tabla 2), sobre el 72 % de los contactos naturales y sobre el 71 % de los contactos artificiales; es decir, la actividad de 5NUC resultó tan frecuente en el contacto artificial como en el contacto natural (fig. 13). Cuando en estas condiciones se observó embriones cuyas células se habían dividido, estos fueron descartados.

El efecto del tiempo de contacto sobre la regionalización también es apoyado por experimentos realizados con embriones de 2 células tardíos (48 h post HCG), es decir, embriones en que han transcurrido 13 horas



Figuras 9 - 12

Embriones de 2 células aislados o agregados. Las flechas señalan los contactos artificiales. Aumento: en fig. 9, 490 x y en figs. 10-14, 330 x. Fig. 9, embrión aislado (42 h post HCG), que fue cultivado sin zona pelúcida durante 2 h. No se reconoce actividad de 5NUC en su contacto natural. Fig. 10, 2+2 (42 h post HCG) agregados por 2 h. Obsérvese actividad sobre el contacto natural de un embrión y no sobre el contacto artificial. Fig. 11, 2+2 (48 h post HCG) agregados durante 2 h. Obsérvese actividad de 5NUC sobre ambos contactos naturales y no sobre el contacto artificial. Fig. 12, 2+2 (42 h post HCG) agregados durante 6 h. Obsérvese actividad de 5NUC en todos los contactos.

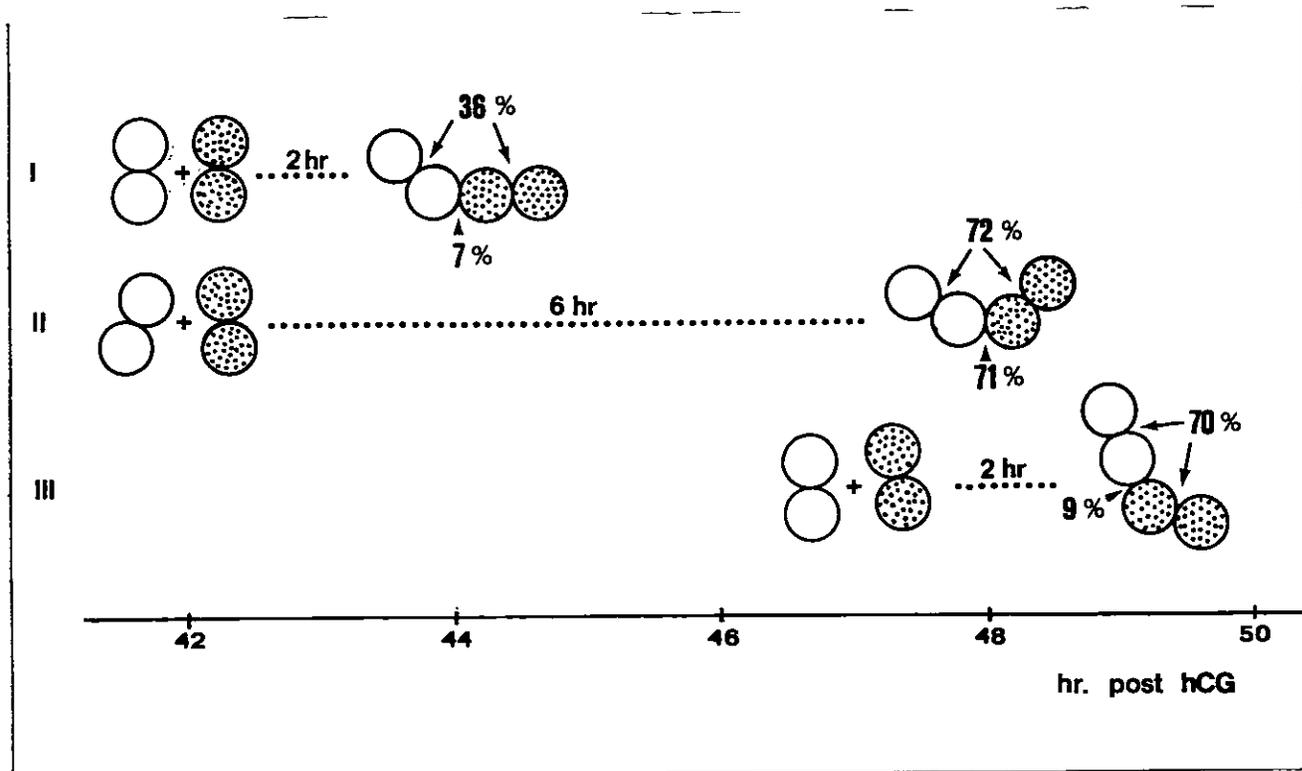


Figura 13

Efecto del tiempo sobre la regionalización.

Esquema resumen de los resultados de las series experimentales en que embriones de 2 células fueron agregados en línea, cultivados por diferentes periodos de tiempo y luego procesados para la demostración citoquímica de la actividad de 5NUC. En la abcisa se indica el tiempo de desarrollo, expresado en horas post inyección de HCG. Las líneas punteadas indican el tiempo de agregación. Las flechas indican el porcentaje de contactos naturales (CN) positivos sobre el número total de contactos naturales. Las cabezas de flechas indican el porcentaje de contactos artificiales (CA) marcados sobre el número total de contactos artificiales.

	n° quimeras observadas	CN positivos/ CN totales	CA positivos/ CA totales
serie I	43	31/86 (36 %)	3/43 (7 %)
serie II	41	59/82 (71.9 %)	29/41 (70.7 %)
serie III	32	45/64 (70.3 %)	3/32 (9.4 %)

desde que se generó el contacto natural por la división celular. Cuando estos embriones se agregan por 2 a 3 h, se detecta la actividad enzimática en el 90.6 % de las quimeras, sobre el 70 % de los contactos naturales y sobre el 9 % de los contactos artificiales (tabla 2, fig.13).

En otra serie experimental estudiamos que ocurría al variar el número de contactos artificiales, modificando la posición de los embriones al realizar la agregación como se muestra en la fig. 14. Al cultivar quimeras 2+2 (43 h post hCG) durante 5 h, se encuentra que el número de contactos naturales marcados se mantiene o aumenta levemente de 65 a 75 %; en cambio, el porcentaje de contactos artificiales marcados disminuye de 60 % a 33 %, cuando el número de contactos artificiales aumenta de 1 a 3 (fig. 14).

En quimeras 2+2 (43 h post hCG), igual que en 8+8 (véase párrafo 1) se revela el efecto de extraer la zona pelúcida con pronasa, cuando no se recupera en cultivo por más de 2 h. En este caso se marcó con actividad de 5NUC sólo el 11.5 % de los contactos naturales y ninguno de los contactos artificiales, sobre un total de 13 quimeras.

4. Agregación de embriones no regionalizados en presencia de Cicloheximida: actividad de 5NUC.

Al agregar embriones de 2 células tempranos, que fueron previamente tratados por 1 a 2 h con CHX (véase control de efecto de CHX en Materiales y Métodos) y cultivarlos en el

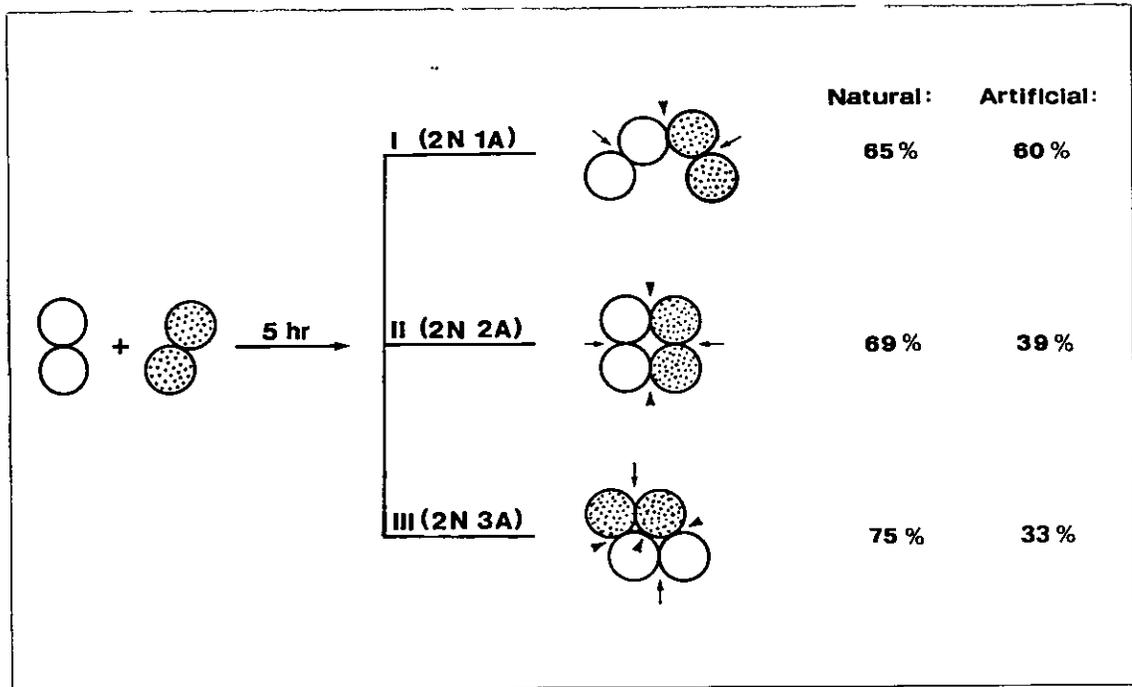


figura 14

Efecto del número de contactos sobre la regionalización.

Esquema resumen de los resultados de las series experimentales en que embriones de 2 células (43 h post hCG) fueron agregados durante 5 h, de diversas formas para producir diferente número de contactos artificiales, fijados y procesados para el reconocimiento citoquímico de la actividad de 5NUC. N= contactos naturales (flechas). A= contactos artificiales (cabezas de flechas). Los porcentajes fueron calculados considerando el número de contactos positivos, naturales o artificiales, sobre el número total de contactos de cada tipo.

	n° quimeras observadas	N positivos/ N totales	A positivos/ A totales
serie I	10	13/20 (65 %)	6/10 (60 %)
serie II	13	18/26 (69.2 %)	10/26 (38.5 %)
serie III	12	18/24 (75 %)	12/36 (33.3 %)

mismo medio por 2 a 3 h, se encuentra que el 32 % de los contactos naturales se regionaliza y ninguno de los contactos artificiales lo hace, lo cual no difiere mayormente de lo que ocurre con quimeras 2+2 agregadas en medio control (véase figura 15).

Esto sugiere que la regionalización anticipada es más bien un fenómeno de activación que de síntesis. Sin embargo, cuando el tiempo de cultivo en agregación se prolonga a 5 ó 6 h, no se encuentran contactos con actividad, mientras que en los controles el 70 % de los contactos se regionaliza. Por lo tanto, se sugiere que se requeriría síntesis de proteínas para mantener la regionalización, porque habría recambio de la enzima marcadora o de otra proteína implicada en el proceso.

5. Efecto de lectinas en solución sobre la actividad de 5NUC y FAL en embriones de 2 células.

Los resultados expuestos más arriba nos orientaron hacia el análisis de los mecanismos involucrados en la inducción de la regionalización, en especial hacia la identificación de los componentes de la superficie celular que pudieran estar involucrados en la recepción de la señal de contacto. Los tratamientos con pronasa (véase párrafos 1 y 3) ya sugerían la participación de glicoproteínas y como los componentes eficaces podrían ser los carbohidratos de superficie, utilizamos lectinas que tienen afinidades específicas por estos residuos. Se ensayó 4 lectinas

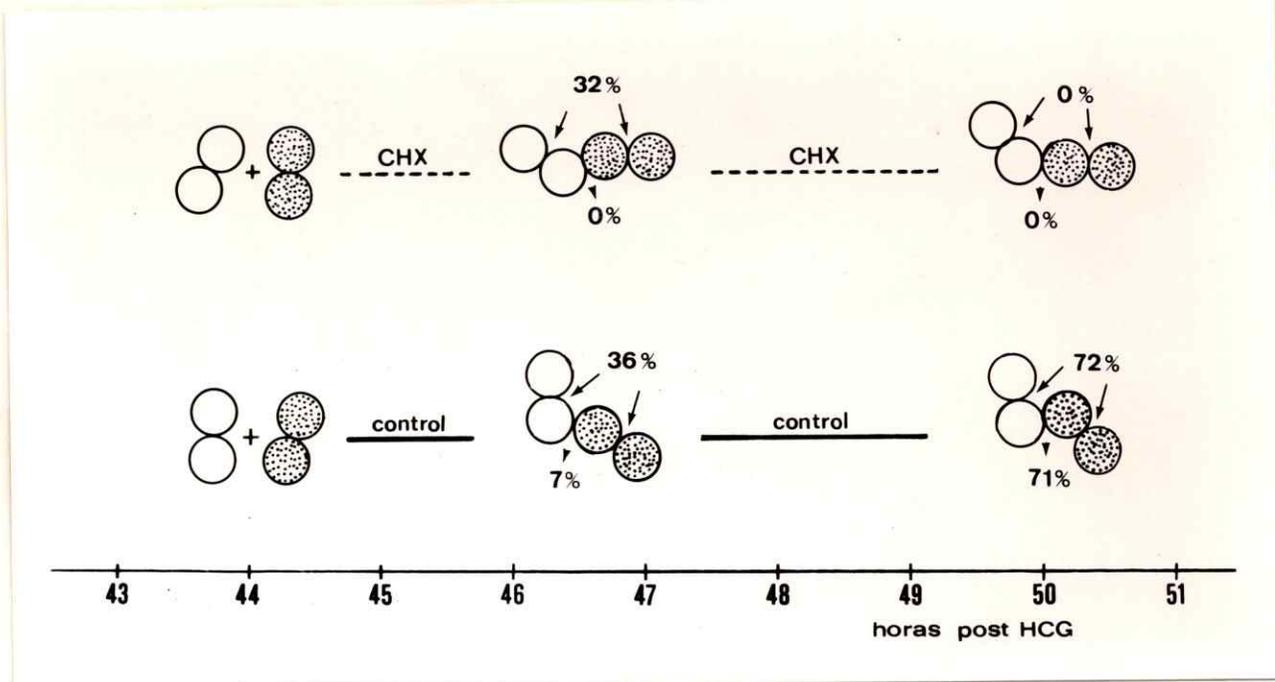


Figura 15

Efecto de CHX sobre la regionalización.

Arriba, resumen de los resultados de las series experimentales en que embriones de 2 células cultivados en presencia de CHX fueron agregados en línea, cultivados por diferentes periodos de tiempo con CHX y luego procesados para la demostración citoquímica de la actividad de 5NUC; abajo se muestran los controles sin CHX. En la abscisa se indica el tiempo de desarrollo, expresado en horas post inyección de HCG. Las líneas punteadas indican el tiempo de agregación. Las flechas indican el porcentaje de contactos naturales (CN) positivos sobre el número total de contactos naturales. Las cabezas de flechas indican el porcentaje de contactos artificiales (CA) marcados sobre el número total de contactos artificiales.

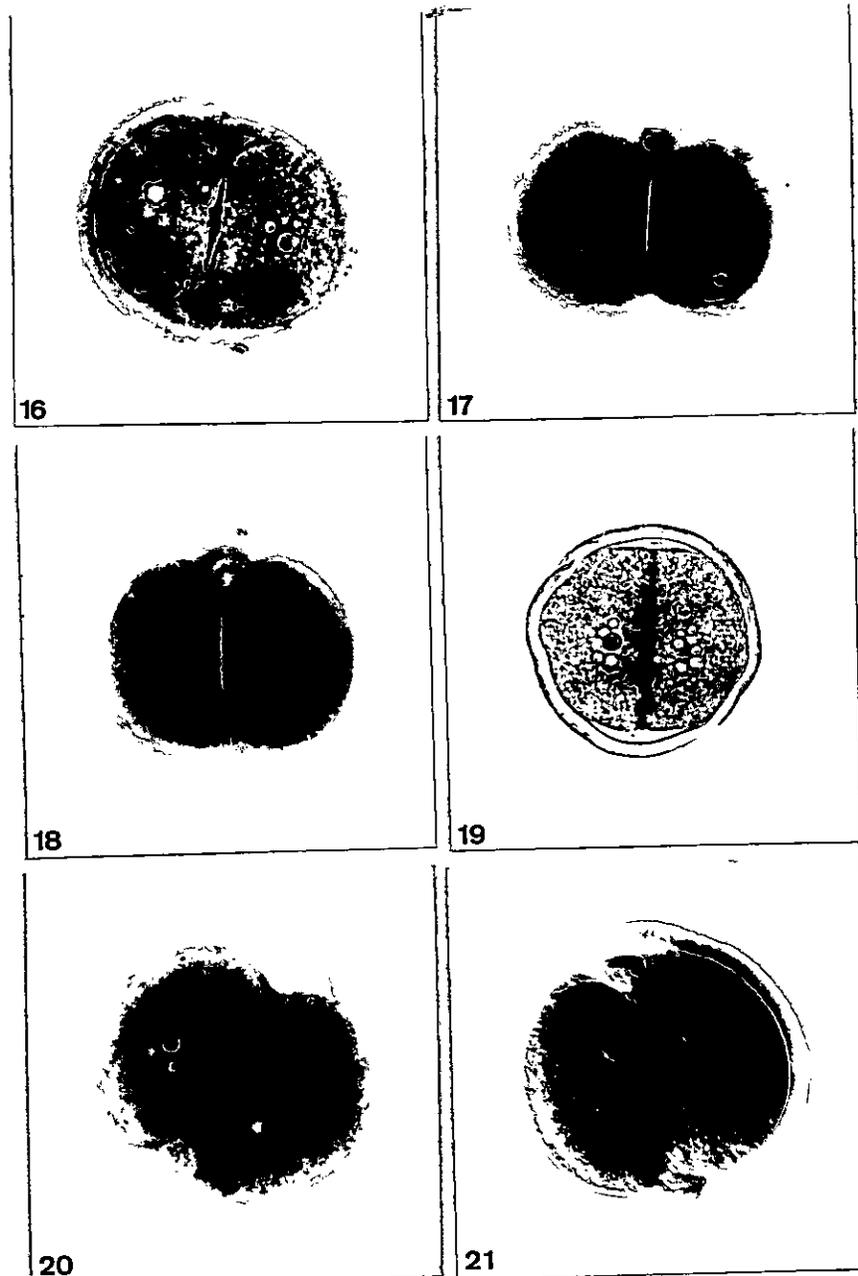
	2 - 3 h		5 - 6 h	
	CN positivos/ CN totales	CA positivos/ CA totales	CN positivos/ CN totales	CA positivos/ CA totales
CHX	11/34	0/17	0/46	0/23
Control	31/86	3/43	59/82	29/41

diferentes, Concanavalina A (Con A), aglutinina del germen de trigo (WGA), aglutinina del poroto de soya (SBA) y aglutinina de aulaga (UEA I), las que se unen a distintos residuos carbohidratos (Materiales y Métodos, sección 6.1.1). Se probaron distintas concentraciones de cada una de ellas, pero se escogió la que se indica en Materiales y Métodos, de acuerdo a trabajos de otros autores (Wartiovaara *et al.*, 1978; Kimber & Bird, 1985; Zuzack & Tasca, 1985; Dealtry *et al.*, 1987).

Al cultivar embriones de 2 células, es decir, embriones que aún no presentan regionalización de su membrana celular, en presencia de una solución de Con A (700 $\mu\text{g/ml}$), durante 2 h, se encuentra que el 83.3 % (10/12) de los embriones revela actividad de 5NUC en su zona de contacto natural y al cabo de 3 h de incubación el 100 % (14/14) de los embriones se regionaliza (fig. 16).

Si se usa SBA (100 $\mu\text{g/ml}$) se obtiene un 33.3 % (12/36) de embriones regionalizados en 2 horas de incubación (fig. 20). Resultados similares se obtienen utilizando WGA (50 $\mu\text{g/ml}$) (véase más abajo) (fig. 19). En todas las series experimentales se procesó como controles paralelos, al menos 20 embriones de 2 células que fueron cultivados sin lectinas, no encontrándose actividad en ninguno de ellos.

En una serie experimental se utilizó junto con Con A, inhibidores de la polimerización de elementos del citoesqueleto, citochalasina (0.5 $\mu\text{g/ml}$) y Colcemid (2



Figuras 16 - 21

Embriones de 2 células que fueron cultivados durante 2 h en una solución de una de las lectinas que se indica y luego procesados para la demostración citoquímica de 5NUC (figs. 16-17, 19-21) o FAL (fig. 18). Obsérvese actividad enzimática en la zona de contacto celular, a excepción de fig. 21. Aumento: 320 x. Fig. 16, Con A (700 ug/ml). Fig. 17, Con A (700 ug/ml) en presencia de citochalasina D (0.5 ug/ml) y colcemid (2 ug/ml). Fig. 18, Con A (700 ug/ml). Fig. 19, WGA (50 ug/ml). Fig. 20, SBA (100 ug/ml). Fig. 21, UEA I (100 ug/ml).

Tabla 3**Regionalización inducida por lectinas**

Lectina:	concentración utilizada ($\mu\text{g/ml}$):	% embriones regionalizados en 2-3 h ^a :
Con A	700	83.3
WGA	50	39.0
	100	94.0
SBA	100	33.3
UEA I	100	0.0

a: embriones de 2 células fueron incubados con una de las lectinas que se menciona, durante 2 - 3 horas, fijados y procesados para la demostración citoquímica de 5'-nucleotidasa.

$\mu\text{g/ml}$). En estas condiciones, se obtuvo la misma proporción de embriones regionalizados que cuando se cultiva solamente con Con A (fig. 17).

Los efectos de lectinas en solución son dependientes de los tiempos de incubación y de la concentración utilizada. Como se muestra en la figura 22, para cultivos en presencia de WGA ($50 \mu\text{g/ml}$), si se cultiva durante 1 h, el 28 % de la muestra presenta actividad de 5NUC, pero si el tiempo de cultivo se aumenta a 2 h, el 38 % presenta actividad y es posible llegar a tener el 100 % de embriones marcados, cultivando durante 4 h (fig. 22). Sin embargo, tiempos cortos de incubación, del orden de 15 min, no provocan regionalización. Si se aumenta la concentración de WGA a $100 \mu\text{g/ml}$, el porcentaje de embriones regionalizados aumenta a 94 % (17/18) en 3 h de incubación. Igualmente, si se cultiva con WGA ($50 \mu\text{g/ml}$) embriones sin zona pelúcida, la cual une una gran cantidad de lectina (Johnson, 1986), se obtiene un 67 % (8/12) de embriones regionalizados en 2 h de incubación.

La lectina UEA I ($100 \mu\text{g/ml}$) que se une a fucosa, no provoca regionalización en embriones de 2 células (0/21) (fig. 21).

En resumen, las lectinas son capaces de provocar regionalización anticipada, sin que se requiera de un contacto celular artificial.

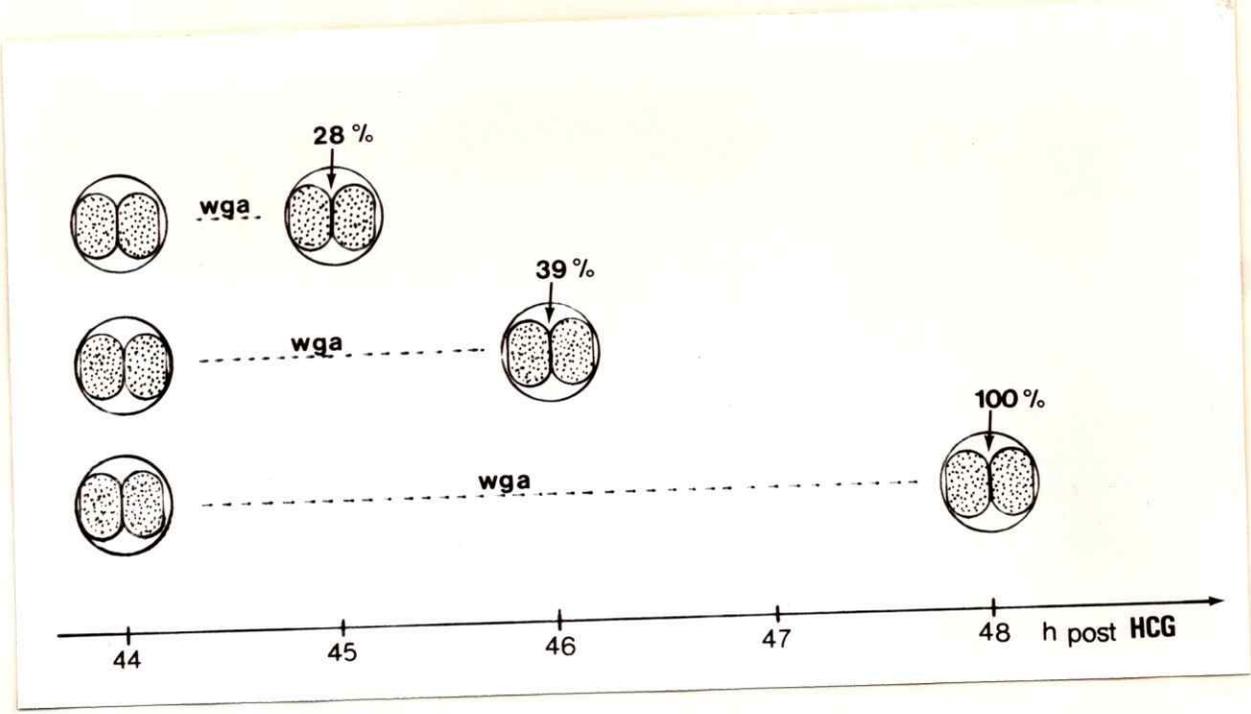


Figura 22

Esquema resumen de los resultados obtenidos al incubar embriones de 2 células durante diversos períodos de tiempo, en una solución de WGA (50 ug/ml) (línea punteada) y luego procesarlos para la demostración citoquímica de 5NUC. Las flechas indican el porcentaje aproximado de embriones regionalizados. En la abcisa se indica el tiempo de desarrollo expresado en horas post inyección de hCG.

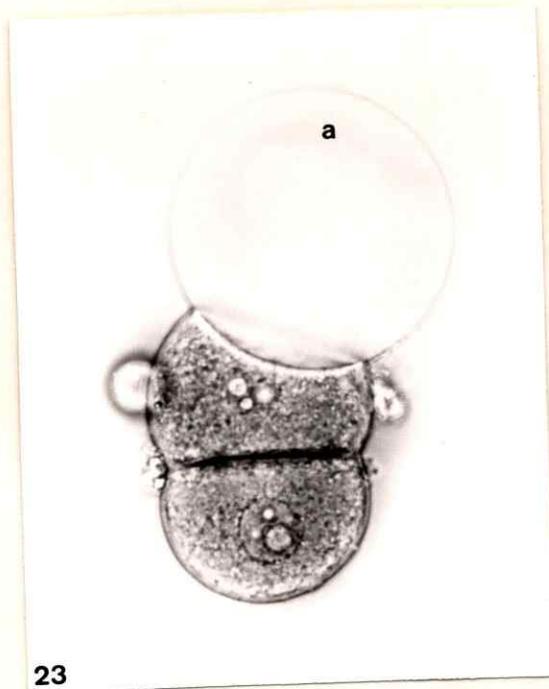
h en WGA	% embriones regionalizados	n°embriones positivos/ n°embriones totales
1	28.5	6/21
2	38.6	17/44
4	100.0	22/22

6. Agregación de embriones de 2 células con esferas de agarosa cubiertas con lectinas: actividad de 5NUC.

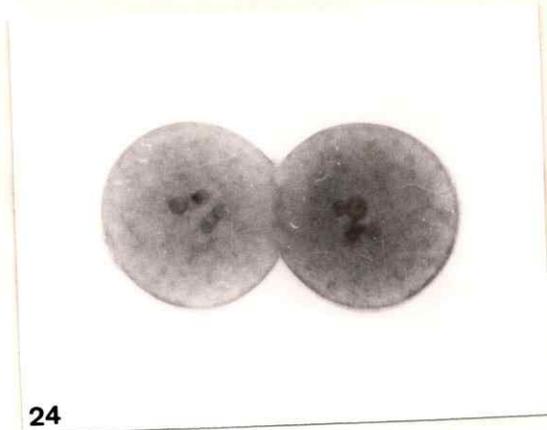
En esta serie experimental, a diferencia de la anterior, el contacto con la lectina fue localizado, tal como ocurre cuando se usa un embrión inductor, por emplear una esfera de agarosa que tenía moléculas de lectinas unidas a la superficie.

Al cultivar en contacto un embrión de 2 células con una esfera de agarosa cubierta con Con A, durante 2 horas, se obtiene un 28.6 % (4/14) de embriones con actividad de 5NUC en su zona de contacto natural y si el cultivo se prolonga a 4 h se llega a un 50 % (6/12) de embriones regionalizados. Nunca se observó actividad enzimática en el contacto artificial con la esfera aunque se cultivara hasta el día siguiente (fig. 23). Resultados semejantes se obtienen si se reconoce actividad de FAL. Los resultados son semejantes a los obtenidos cuando se agrega dos embriones de 2 células, excepto que no se observa actividad en la membrana plasmática que queda en contacto con la esfera de agarosa.

Como control se cultivó 23 embriones de 2 células sin zona pelúcida en las mismas gotas en que se cultivó los embriones agregados con esferas de agarosa y no se encontró actividad enzimática en ninguno de ellos, lo cual demuestra que la lectina unida a la esfera no difundía suficientemente al medio (fig. 24). Los embriones no se adhieren a esferas de agarosa desprovistas de lectina.



23



24

Figura 23
 Embrión de 2 células agregado con una esfera de agarosa (a) cubierta con la lectina Con A, durante 3 h. Obsérvese actividad de 5NUC sólo en la zona de contacto natural del embrión. Aumento: 450 x

Figura 24
 Embrión de 2 células cultivado, sin agregar, como control paralelo, en la misma gota donde se realizó la agregación de la fig. 23. Obsérvese ausencia de actividad enzimática. Aumento: 350 x.

7. Efectos morfogénéticos inducidos en el estado de 2 células, por lectinas en solución.

De las lectinas ensayadas, la única que causó cambios morfológicos en esta etapa del desarrollo fue WGA.

Al cultivar 325 embriones de 2 células en una solución de WGA (50 $\mu\text{g/ml}$), encontramos que no sólo se inducía regionalización de la membrana plasmática, sino que además en todos los embriones se inducían cambios morfogénéticos, que simulaban la compactación y blastulación, eventos que ocurren más tardíamente en el desarrollo normal (véase fig. 1)

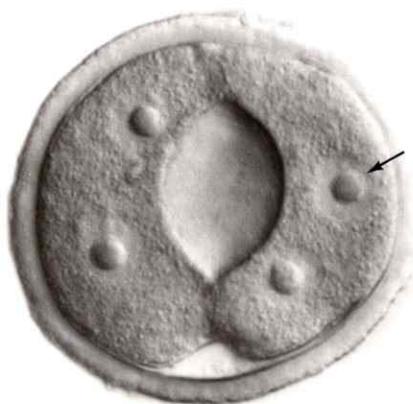
Luego de cultivar durante 1 h con WGA se observa un aumento de la aposición celular, que por semejanza con la compactación, denominaremos "pseudocompactación" (fig. 25). Si el cultivo se prolonga a 6 h, se observa la formación de una cavidad entre las dos células, fenómeno que por semejanza con la blastulación denominaremos "pseudoblastulación" (fig. 26). Cultivos prolongados por más de 6 h muestran que la cavidad formada aumenta de tamaño y que se inhibe la división celular, pero ocurren divisiones nucleares (fig. 27). Los resultados con lectinas sugieren que estos cambios morfogénéticos son inducidos por su interacción con ciertos carbohidratos de superficie, en este caso específico N-acetilglucosamina, ácido siálico y ácido neuramínico.



25



26



27



28

Figuras 25 - 28

Embriones de 2 células cultivados en una solución de WGA (50 ug/ml) en Biggers por distintos periodos de tiempo. Aumento: 550 x. **Fig. 25**, 1 h de cultivo; no se distinguen fácilmente los límites celulares (pseudocompactación) y el espacio entre los blastómeros y la zona pelúcida (zp) está estrechado. **Fig. 26**, 6 h de cultivo. Obsérvese aparición de cavidad intercelular (c). **Fig. 27**, 16 h de cultivo. Obsérvese expansión de la cavidad y los núcleos (flechas) que se han dividido. **Fig. 28**, 3 h de cultivo en que se agregó además LiCl (15 mM). Obsérvese pseudoblastula.

El efecto morfogenético de WGA se acelera agregando LiCl 15 mM al medio de incubación, obteniéndose pseudoblastulación al cabo de 2 h de cultivo (fig. 28), es decir, 4 h antes de lo observado con WGA sólo.

Estos resultados nos sugirieron la participación del segundo mensajero, inositol-trifosfato (IP_3), en este proceso, ya que se sabe que LiCl inhibe la inositol-1-fosfatasa, provocando acumulación de IP_3 y por lo tanto, exacerbando los fenómenos que causa (Berridge, 1984).

Al analizar con mayor detalle estos embriones al microscopio electrónico, se puede reconocer la membrana celular y comprobar que la cavidad observada al microscopio de luz es intercelular y no intracelular y que se formaría por la coalescencia de pequeñas vesículas, como ocurre durante una blastulación normal (figs. 29, 31).

La zona de contacto se extiende y los blastómeros se aplanan uno contra otro, observándose la presencia de microvellosidades (fig. 30), que más tarde desaparecen, como ocurre durante la compactación. Los núcleos de forma redondeada son semejantes a los núcleos de un embrión normal (figs. 31, 32).

En el citoplasma se distinguen cambios respecto a un estado de 2 células control. Los organelos y en especial las mitocondrias constituyen agrupaciones. Lo mismo ocurre con los cuerpos multimembranosos, que además aumentan en

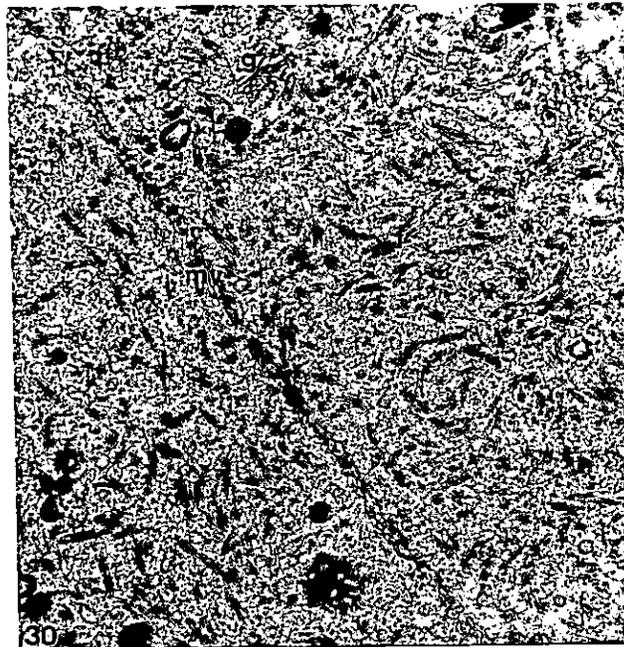


Figura 29

Embrión cultivado durante 2 h en una solución de WGA (50 $\mu\text{g/ml}$) en Biggers. Fotomicrografía panorámica en que se observa numerosas vesículas (flechas). Aumento: 1500 x

Figura 30

Embrión tratado como en fig. 29. Zona de contacto en que se observa microvellosidades (mv) en aposición. g= aparato de Golgi, f= material fibrilar. Aumento: 8000 x

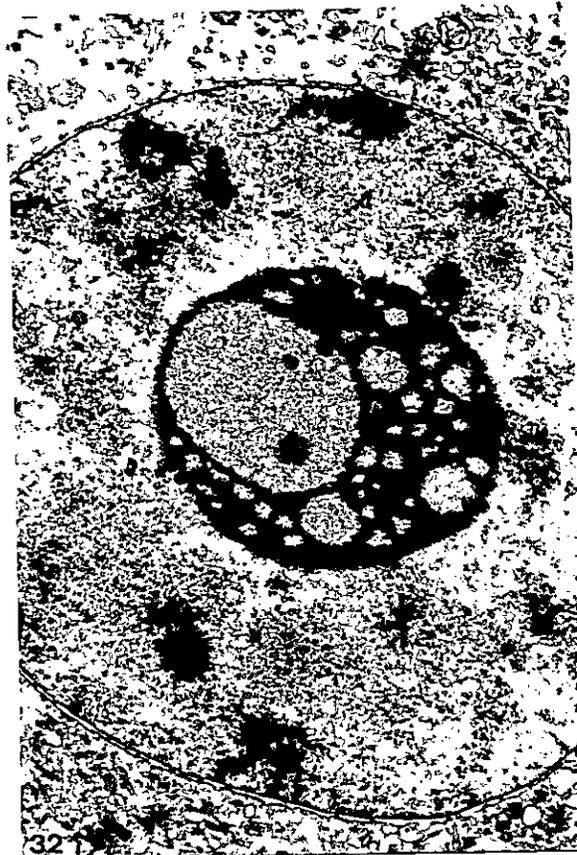


Figura 31
 Embrión de 2 células cultivado durante 20 h en una solución de WGA (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) y luego procesado para microscopía electrónica de transmisión. Obsérvese la cavidad (c) intercelular y la presencia de dos núcleos en un blastómero (flechas). cr= cuerpos cristaloides. Aumento: 1000 x

Figura 32
 Magnificación de fig. 31 en que se observa con mayor detalle uno de los núcleos. Aumento: 5400 x

número (fig. 33). Otra característica notable es la aparición de grandes cuerpos cristaloides, que no existen en el estado de 2 células y que son abundantes en la etapa de mórula (figs. 31, 35). Estos se encuentran muchas veces asociados a vesículas de retículo endoplásmico rugoso.

No hemos estudiado la formación de uniones con emulsión de lantano (Shaklai & Tavassoli, 1977) pero en cultivos de 20 horas con WGA, hemos observado uniones especializadas, probablemente "gap junctions", en la región más apical del contacto celular (fig. 34).

8. Efecto de análogos de segundos mensajeros sobre la actividad de 5NUC en la región de contacto intercelular en embriones de 2 células.

Basados en los resultados obtenidos con LiCl antes descritos y tratando de analizar experimentalmente cómo se transmite la señal de contacto desde el contacto artificial hacia el contacto natural, estudiamos la posibilidad de que participaran segundos mensajeros en tal proceso. Esto, sin embargo, no permite descartar otras posibilidades, que serán analizadas en la Discusión.

En estas series experimentales utilizamos análogos de segundos mensajeros o interferimos algunos de los pasos de las vías de acción conocidas, utilizando diversas drogas. En general, se trató de aumentar artificialmente los niveles de mensajeros intracelulares y soslayar la etapa de inducción en la superficie, observándose el efecto de

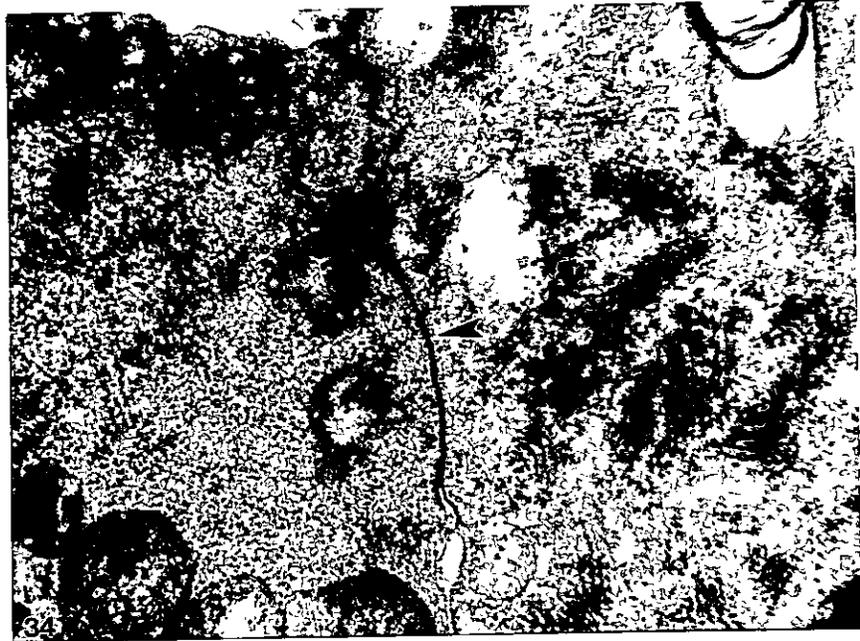
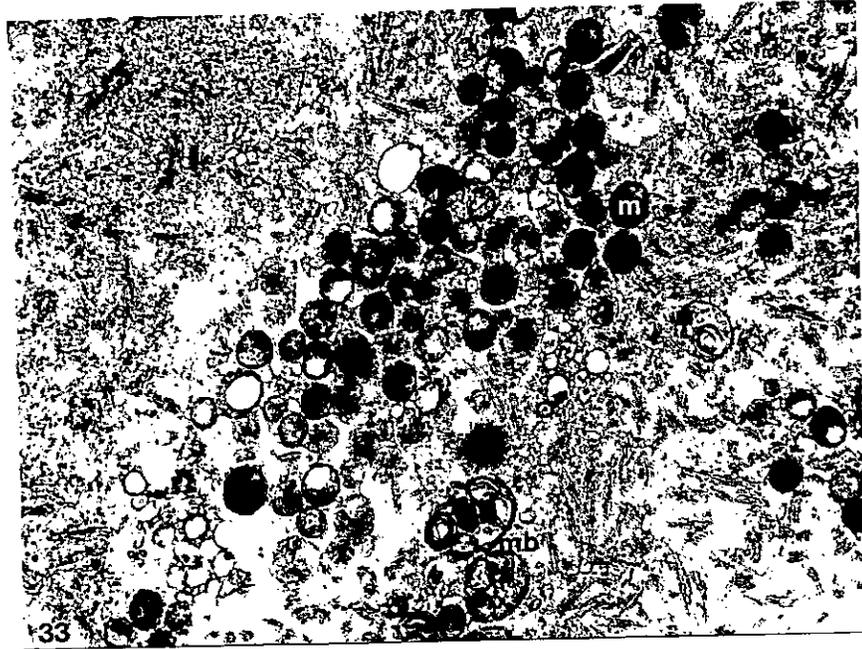


Figura 33
 Embrión de 2 células cultivado en WGA (50 ug/ml)
 durante 7 h. Obsérvese acumulación de mitocondrias
 (m) y cuerpos multimembranosos (mb). Aumento: 10750 x

Figura 34
 Embrión cultivado durante 20 h en WGA (50 ug/ml).
 Obsérvese unión tipo "gap junction" (cabeza de flecha)
 en la zona apical del contacto celular. Aumento:
 31000 x



Figura 35

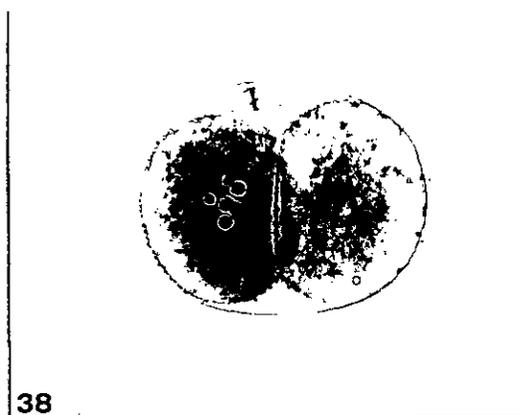
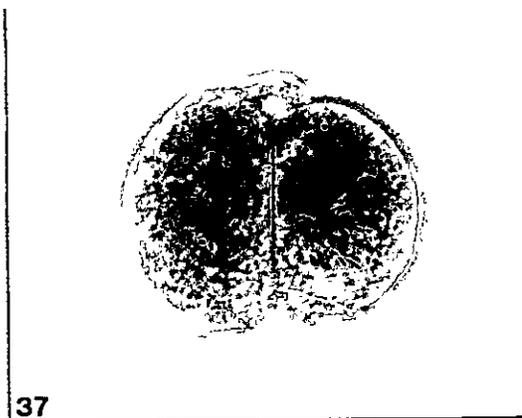
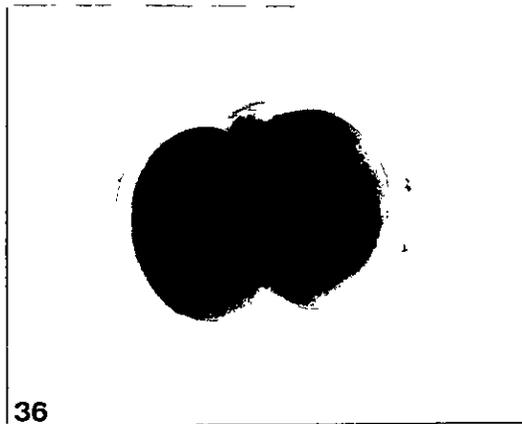
Embrión de 2 células cultivado durante 20 h con WGA. Cuerpo cristalóide en asociación con una vesícula de retículo endoplasmático (flecha). Aumento: 30000x

regionalización anticipada.

Al cultivar 25 embriones de 2 células durante 2 h, en presencia de una solución del análogo de cAMP, dibutiril-cAMP 10^{-4} M (Bilozour & Powers, 1982) y procesarlos para la demostración citoquímica de 5NUC, no se encuentra actividad de la enzima marcadora, en la zona de contacto (fig. 36).

En cambio, al cultivar durante 1 h embriones de 2 células en presencia de una solución de PMA 10^{-6} M, un ester de forbol que activa proteína quinasa C (PKC) (Takai *et al.*, 1985), se encuentra un 31 % (9/29) de los embriones regionalizados (fig. 37). También es posible inducir la regionalización, en embriones de 2 células, utilizando en el medio de incubación, el análogo de diacilglicerol, oleoil-acetil-glicerol (OAG) (60 μ g/ml) (Rink *et al.*, 1983). En esta forma, se obtiene luego de sólo 15 min de incubación, un 30.8 % (4/13) de embriones regionalizados y luego de 1 h de incubación un 53.8 % (14/26) (fig. 38).

Estos resultados sugieren que la señal de contacto que causa la activación de 5NUC en el contacto intercelular, es transmitida a este por segundos mensajeros de la vía del fosfatidil-inositol.



Figuras 36 - 38

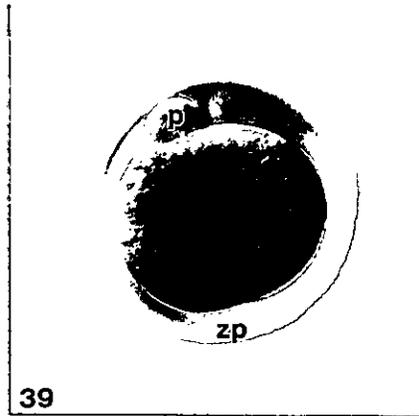
Embriones de 2 células cultivados con el análogo de segundo mensajero que se indica, durante 2 h (fig. 36) o 1 h (figs. 37-38) y luego procesados para la demostración citoquímica de 5NUC. Obsérvese actividad enzimática en la zona de contacto natural en las figs. 37 y 38. Aumento: 330x. Fig. 36, dibutiril-cAMP (10^{-4} M). Fig. 37, PMA (10^{-6} M). Fig. 38, OAG (60 ug/ml).

9. Efectos morfogénéticos de segundos mensajeros en embriones de 2 células.

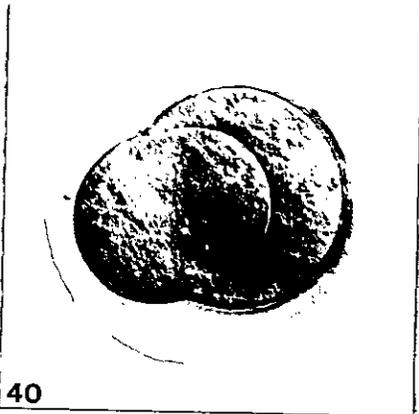
De los análogos utilizados en la serie experimental anterior, db-cAMP, no provocaba cambios morfogénéticos durante el desarrollo de embriones de 2 células, en cambio, los activadores de PKC ensayados, provocaban fenómenos semejantes a los descritos para WGA, es decir, pseudocompactación y pseudoblastulación.

OAG (60 μ g/ml) en el medio de incubación, causa pseudocompactación en el 100 % de los embriones de 2 células después de aproximadamente 20 min de cultivo, perdiéndose por completo la distinción de los límites celulares (fig. 39). Si el cultivo se prolonga por aproximadamente 4 h, el 50 % de los embriones inicia un proceso, que aquí llamaremos engolfamiento, durante el cual una célula del embrión de 2 células se extiende sobre la otra hasta rodearla por completo (fig. 40).

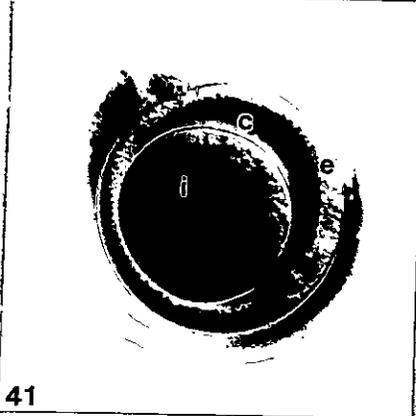
Durante el engolfamiento o una vez que se ha completado, aparece una cavidad entre ambas células, dando al conjunto la apariencia de un pseudoblastocisto, que tiene una célula externa rodeando una interna (fig. 41). Esta forma se reconoce aproximadamente 20 h después que se ha iniciado el cultivo, cuando los controles han alcanzado el estado de 4 a 8 células. Por lo tanto, la división citoplasmática es inhibida aunque no lo sean las divisiones nucleares, puesto que se encuentran con frecuencia células



39



40



41

Figuras 39 - 41
 Embriones de 2 células cultivados en OAG (60 ug/ml) por diferentes periodos de tiempo y luego observados al microscopio de luz con óptica de Nomarski. Aumento= 330 x. Fig. 39, 20 min. Obsérvese pseudocompactación. p= polocito, zp= zona pelúcida. Fig. 40, 6 h. Obsérvese extensión de una célula sobre otra, durante el proceso de engolfamiento. Fig. 41, 22 h. Pseudoblastocisto con célula interna (i), célula externa (e) y una cavidad entre ambas (c).

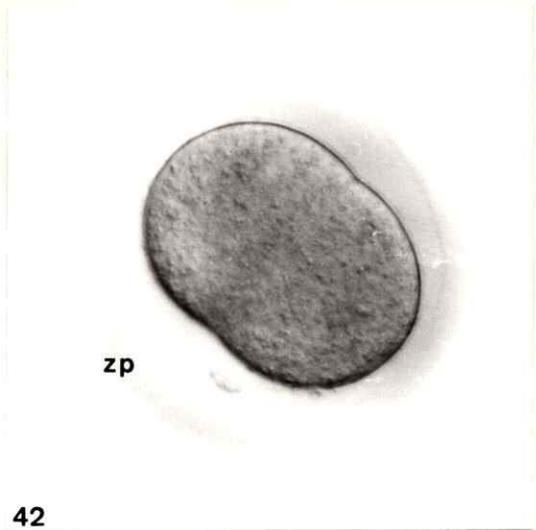
binucleadas.

Al duplicar la concentración de OAG en el medio de cultivo, se observa los mismos efectos que con 60 $\mu\text{g/ml}$. Sin embargo, si se baja la concentración de OAG a 20 $\mu\text{g/ml}$, luego de 20 min de incubación, sólo el 50 % de la población muestra pseudocompactación y si se reduce a 5 $\mu\text{g/ml}$, no hay efecto visible desarrollándose normalmente los embriones.

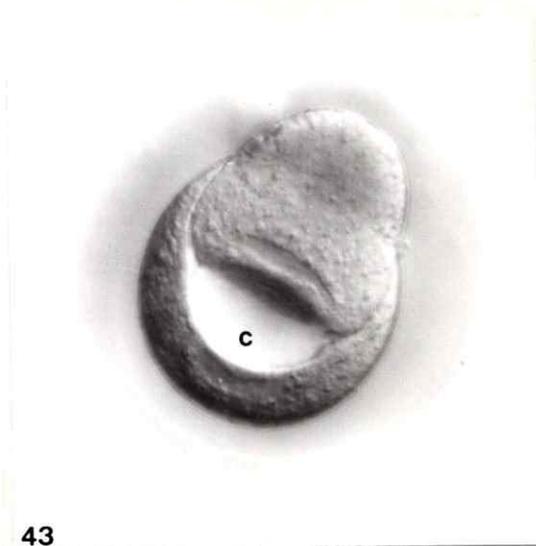
Estos procesos morfogénéticos pueden ser acelerados si además de OAG, se agrega el ionóforo de Calcio, A 23187 (1 μM). En estas condiciones se observa pseudocompactación luego de 5 a 10 min de cultivo (fig. 42) y engolfamiento y formación de cavidad luego de 30 min (fig. 43), encontrándose al cabo de sólo 1 h de cultivo, embriones como el de la fig. 44, con una célula interna, otra externa y una cavidad.

Una menor aceleración del proceso se observa agregando LiCl (15 mM) al medio con OAG (60 $\mu\text{g/ml}$). La pseudocompactación ocurre en 10 min (fig. 45) y el engolfamiento comienza a las 2 h de cultivo (fig. 46), obteniéndose un pseudoblastocisto aproximadamente 10 h después que se ha iniciado el cultivo (fig. 47). Sólo en el 5 % de los casos, se observa que la célula interna se ha dividido (fig. 48).

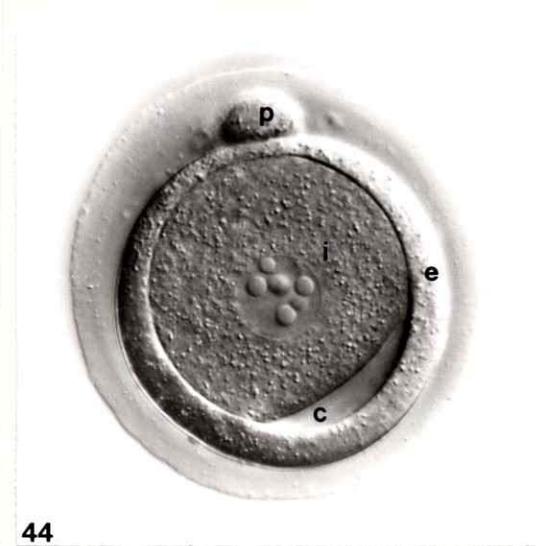
Los efectos de OAG sobre el desarrollo de embriones de 2 células son reversibles, como lo muestran experimentos en



42



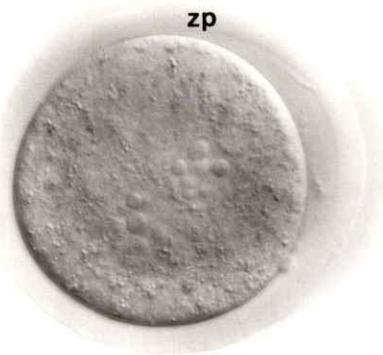
43



44

Figuras 42 - 44

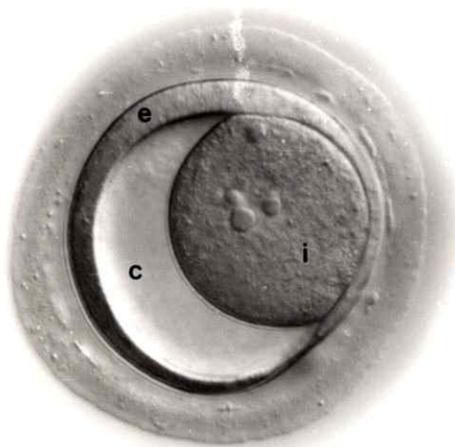
Embriones de 2 células cultivados en OAG (60 ug/ml) y ionóforo de calcio (A 23187), por distintos periodos de tiempo y luego observados al microscopio de luz con óptica de Nomarski. Aumento: figs 42-43, 400x; fig. 44, 480x. **Fig. 42**, 10 min. Obsérvese pseudocompactación. **Fig. 43**, 30 min. Obsérvese engolfamiento y formación de cavidad (c). **Fig. 44**, 1 h. Obsérvese pseudoblastocisto con célula interna (i), célula externa (e) y cavidad (c). p= polocito.



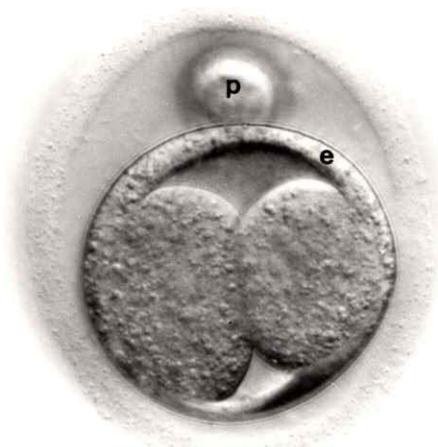
45



46



47



48

Figuras 45 - 48

Embriones de 2 células cultivados con OAG (60 ug/ml) y LiCl (15 mM) en Biggers, por distintos periodos de tiempo y luego observados al microscopio de luz con óptica de Nomarski. Aumento= 450 x. **Fig. 45**, 20 min. Embrión totalmente compactado con apariencia de embrión de 1 célula. Obsérvese presencia de los dos núcleos. zp= zona pelúcida. **Fig. 46**, 4 h. Embrión en etapa de engolfamiento. **Fig. 47**, 20 h. Pseudoblastocisto con célula interna (i) desplazada hacia un polo, célula externa (e) y cavidad (c). **Fig. 48**, 20 h. Pseudoblastocisto en que la célula interna se ha dividido en dos células. e= célula externa, p= polocito.

que luego de distintos períodos de incubación con OAG (60 $\mu\text{g/ml}$), se lavó varias veces en medio Biggers control y se cultivó durante 2 días, observándose el desarrollo. Así, se encontró que incubaciones en OAG y LiCl (15 mM) por períodos que podían extenderse hasta 20 h, no impedían que los embriones se dividieran y llegaran a blastular en los tiempos correspondientes al desarrollo normal (fig. 49).

Los resultados descritos en este capítulo sugieren, la participación de los segundos mensajeros diacilglicerol e IP_3 en los eventos morfogénéticos de compactación y blastulación, que ocurren normalmente durante el desarrollo.

10. Morfogénesis inducida por OAG: efecto de inhibidores de síntesis de proteínas, de citoesqueleto, de PKC y efecto de un análogo de OAG.

Incluyendo CHX (50 $\mu\text{g/ml}$) en el cultivo de 30 embriones de 2 células con OAG, hemos encontrado que los cambios morfogénéticos descritos en el punto 9 ocurren al mismo tiempo que en los controles sin CHX y por lo tanto, son independientes de la síntesis de proteínas (fig. 50).

Por otra parte, utilizando además de OAG, drogas como citochalasina D (CCD) y colcemid, que inhiben la polimerización de actina y tubulina, respectivamente, no se observa engolfamiento, pero se forma una cavidad entre las dos células (fig. 51), similar a la que se observa cuando se cultiva con WGA (fig. 26).

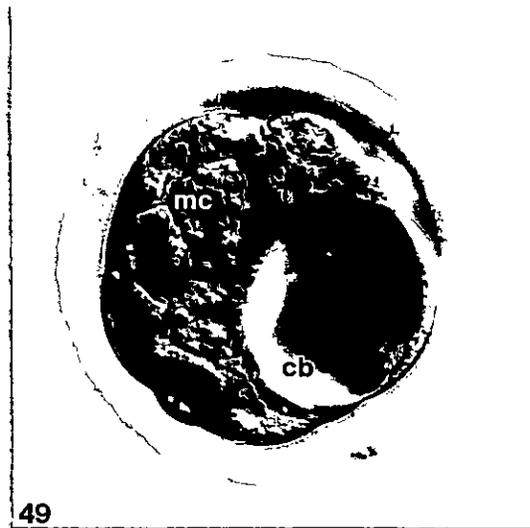
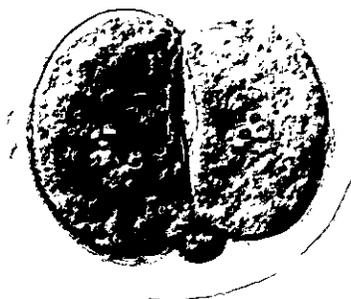


Figura 49

Blastocisto obtenido después de lavar y cultivar en Biggers durante 48 h un embrión de 2 células que fue cultivado previamente en OAG ($60 \mu\text{g/ml}$) y LiCl (15 mM) durante 22 h. mc= masa celular interna, cb= cavidad blastocélica. Aumento: 450 x



50



51

Figura 50

Embrión de 2 células que fue cultivado con CHX (50 $\mu\text{g/ml}$) durante 1 h y luego con CHX y OAG (60 $\mu\text{g/ml}$) durante 3 h. Obsérvese engolfamiento e inicio de cavidad, como en los embriones control con OAG. Aumento: 350 x

Figura 51

Embrión de 2 células que fue cultivado con CCD (0.5 $\mu\text{g/ml}$) durante 1 h y luego con CCD y OAG (60 $\mu\text{g/ml}$) durante 3 h. No se observa engolfamiento, pero sí formación de una cavidad intercelular. Aumento: 350 x

Para verificar que los efectos morfogenéticos son causados por diacilglicerol se realizaron dos tipos de controles: unos con inhibidores específicos de PKC y otros con un análogo inactivo de OAG, es decir, una molécula semejante a OAG que no activa PKC.

Al cultivar 50 embriones de 2 células con H7 (Eckberg *et al.*, 1987), un inhibidor específico de PKC, durante 1 h y luego pasar los embriones a un medio con H7 más OAG durante 2 h, no se observan cambios morfogenéticos y los embriones mantienen la apariencia de estados 2 normales (fig. 52). Si se usa W7, un inhibidor de calmodulina y de PKC (Yakamura & Spindle, 1988), además de OAG, tampoco ocurre compactación ni engolfamiento luego de 3 h de cultivo, en los 30 embriones de 2 células ensayados (fig. 53).

Finalmente, para descartar la posibilidad de que el efecto de OAG sea atribuible al cambio que provoca en la composición lipídica de la membrana se utilizó 4- α -forbol, un análogo de OAG que probablemente provoca un cambio similar en la estructura de la membrana pero que no activa PKC (Eckberg *et al.*, 1987). En esas condiciones no ocurren fenómenos morfogenéticos en los 32 embriones de 2 células ensayados, aunque el cultivo con el análogo se mantenga por 7 h (fig. 54).

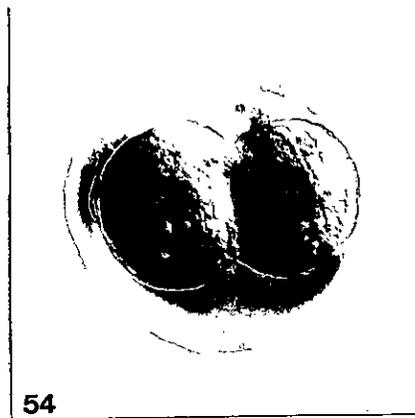
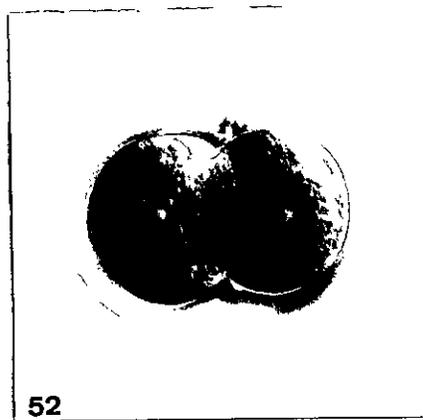


Figura 52

Embrión de 2 células que fue cultivado durante 1 h con H7 (40 $\mu\text{g/ml}$) y luego con H7 más OAG (60 $\mu\text{g/ml}$) durante 2 h. Obsérvese apariencia de embrión de 2 células normal. Aumento: 330 x

Figura 53

Embrión de 2 células que fue cultivado durante 1 h con W7 (50 μM) y luego con W7 más OAG (60 $\mu\text{g/ml}$) durante 2 h. Obsérvese apariencia de embrión normal. Aumento: 330 x

Figura 54

Embrión de 2 células que fue cultivado durante 5 h con 4-*l*-forbol (60 $\mu\text{g/ml}$). Obsérvese apariencia de embrión normal. Aumento: 330 x

11. Cambios morfogénéticos a nivel ultraestructural inducidos por OAG

Al observar al microscopio electrónico se puede ver claramente la extensión de una célula sobre la otra. Las microvellosidades desaparecen de la zona de contacto celular y se forman engrosamientos de membrana y gran cantidad de invaginaciones cubiertas ("coated pits") (figs. 55, 56).

En el citoplasma, es posible reconocer frecuentemente la presencia de vesículas "jigsaw" (fig. 58) y la formación de cuerpos cristaloides, pero con una estructura menos compacta que los observados con WGA. En este caso son frecuentes los acúmulos de pequeños cristaloides (figs. 56, 57, 59, 60). Como se mencionó antes, dichas estructuras no existen en un embrión de 2 células normal. También es frecuente encontrar en el citoplasma gran cantidad de microtúbulos, tanto en las regiones de contacto celular como en la región apical (fig. 57). En embriones normales de 2 células, es difícil reconocer microtúbulos si no se usan técnicas de inmunofluorescencia.

Un signo de diferenciación notable lo presentan los núcleos. Estos durante el desarrollo normal y hasta la etapa de blastocisto son redondos y no varían mayormente de un estado a otro (fig. 61). Sin embargo, cuando los embriones de 2 células son cultivados con OAG y LiCl, los núcleos cambian de forma, siendo lobulados, semejantes a los núcleos de un blastocisto avanzado (fig. 62). En la célula

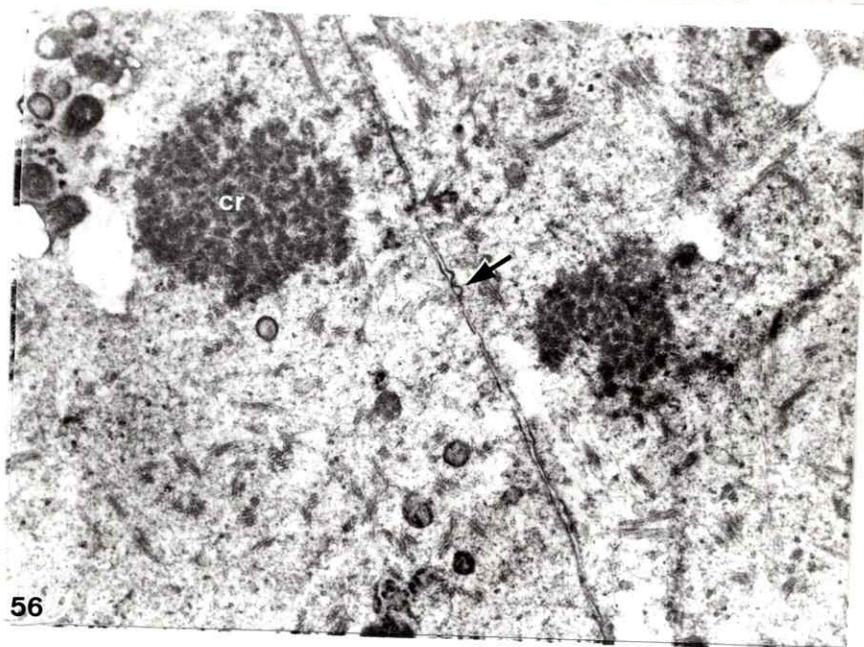
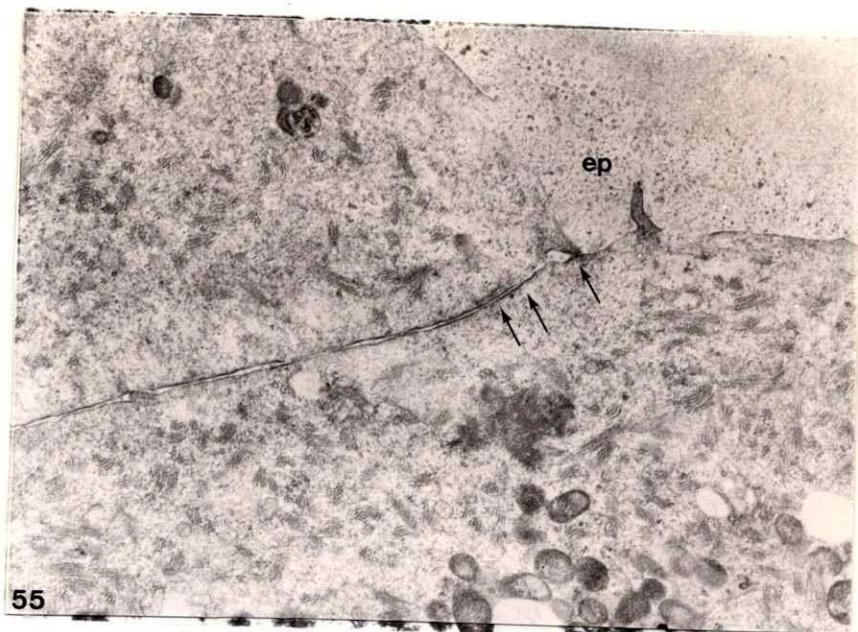
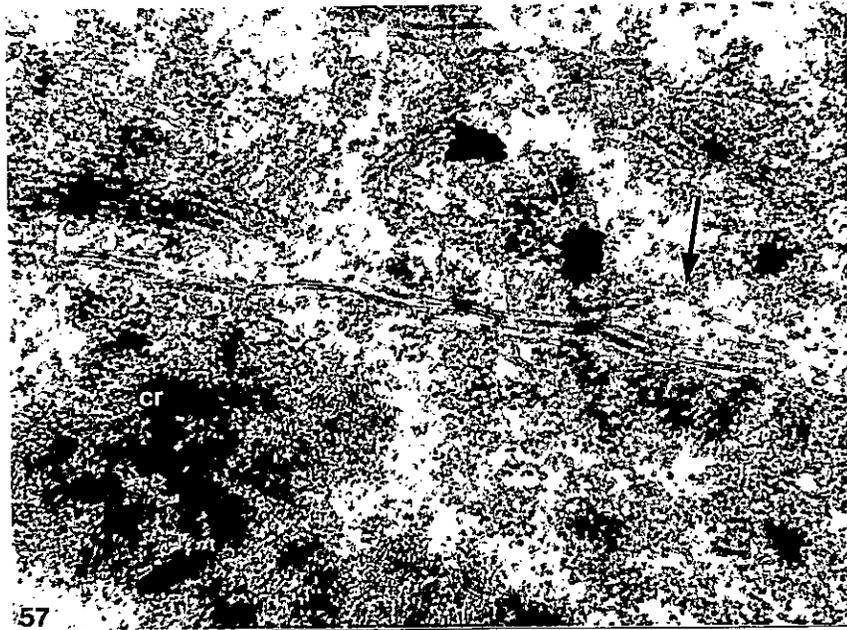
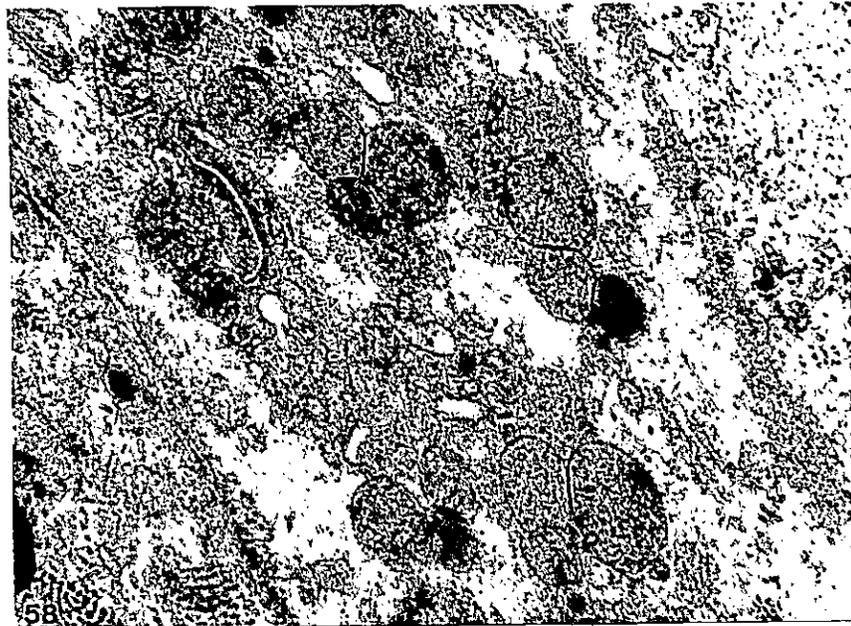


Figura 55
 Embrión de 2 células cultivado durante 2 h con OAG (60 $\mu\text{g/ml}$) y LiCl (15 mM) y procesado para microscopía electrónica de transmisión. Zona de contacto intercelular en que se reconocen especializaciones de membrana (flechas). ep= espacio perivitelino. Aumento: 12600 x

Figura 56
 Igual a fig. 55. Obsérvese vesículas de endocitosis (flecha) y cuerpos cristaloides (cr). Aumento: 7900 x



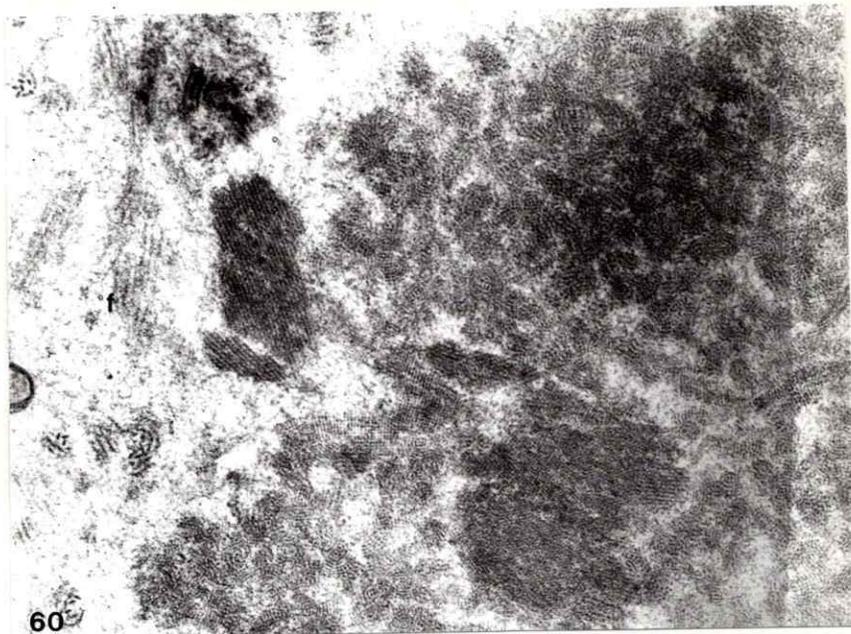
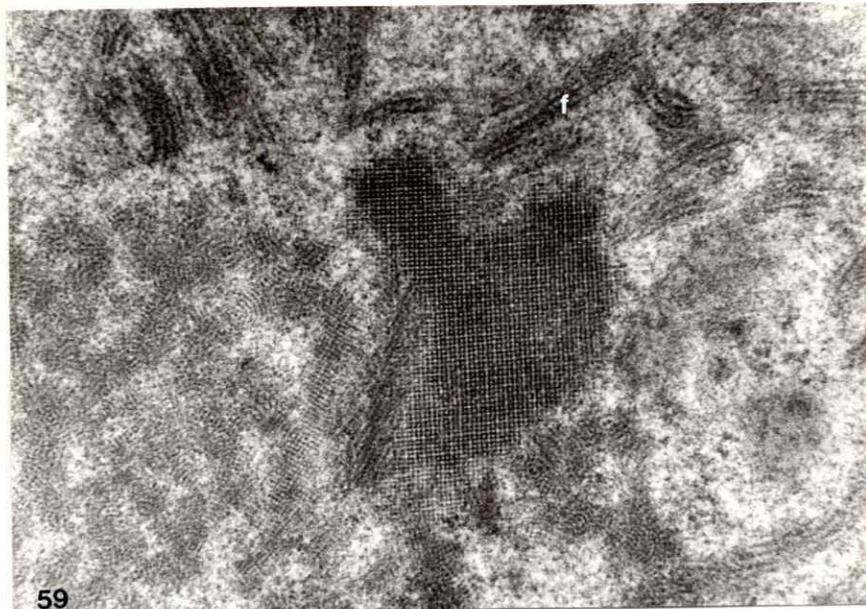
57



58

Figura 57
Embrión de 2 células tratado igual que en fig. 55. Obsérvese grupo de microtúbulos (flecha) y cuerpos cristaloides (cr). Aumento: 29200 x

Figura 58
Embrión de 2 células tratado igual que en fig. 55. Obsérvese vesículas "jigsaw" (flechas). Aumento: 28800 x



Figuras 59 y 60

Embrión de 2 células tratado igual que en fig. 55. Obsérvese distintos estados de cuerpos cristaloides. f= material fibrilar. Aumento: fig. 59, 44000x; fig. 60, 20000 x

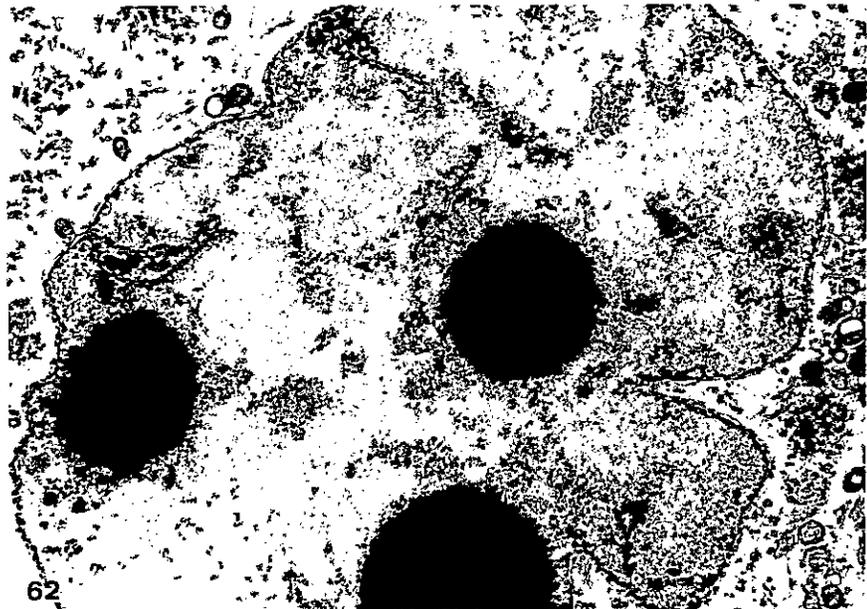
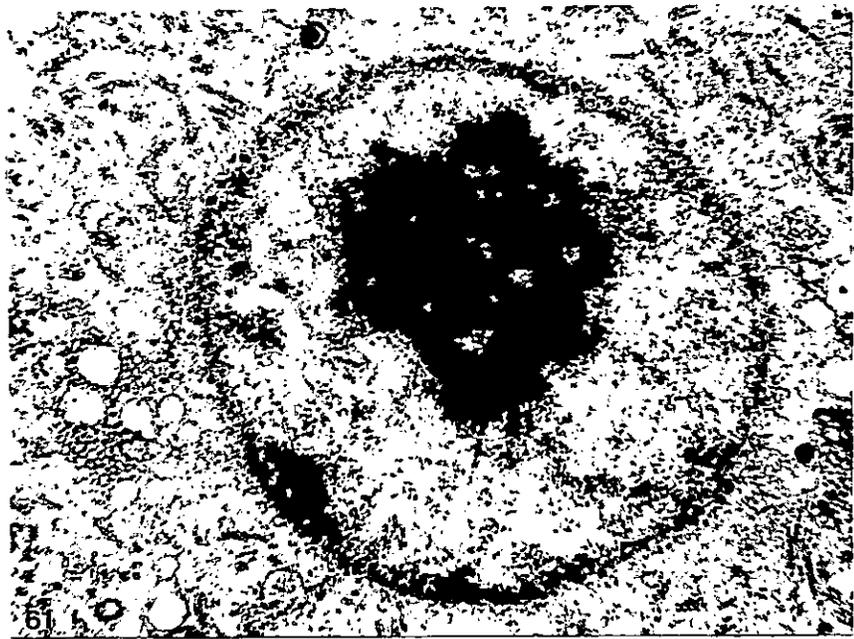


Figura 61

Núcleo de un embrión normal de 8 células procesado para microscopía electrónica de transmisión. Obsérvese forma redondeada. Aumento: 3000 x

Figura 62

Núcleo de un embrión de 2 células cultivado en OAG (60 $\mu\text{g/ml}$) y LiCl (15 mM) durante 1.5 h y luego procesado para microscopía electrónica de transmisión. Obsérvese forma lobulada. Aumento: 2160 x

externa, además son alargados.

Al analizar los embriones que han sido tratados por tiempos más largos con OAG (20 - 24 horas), es frecuente observar que la célula interna presenta microvellosidades hacia el interior de la cavidad (fig. 63) y su citoplasma es más electrodensso que el de la célula externa (figs. 64, 65). Características semejantes son encontradas en un blastocisto normal.

No es posible reconocer el lugar en que se cierra la célula externa y hasta el momento pensamos que ocurre fusión celular.

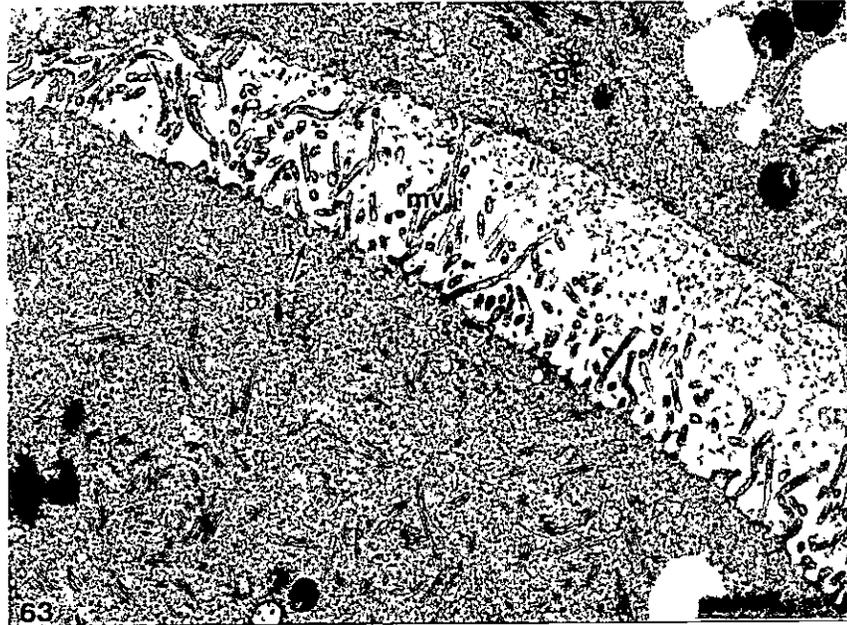
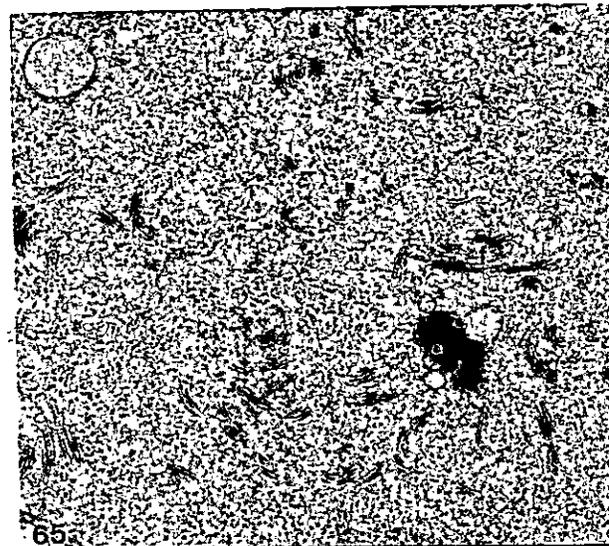
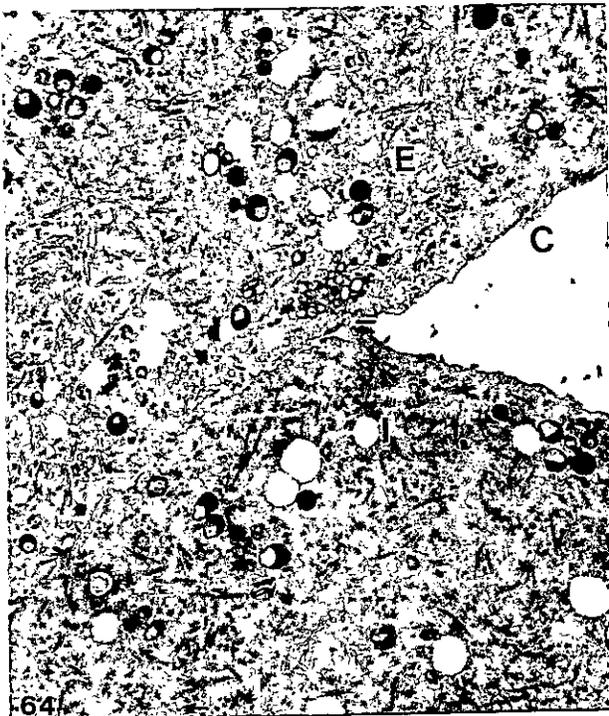


Figura 63

Embrión de 2 células que fue cultivado en una solución de OAG (60 $\mu\text{g/ml}$) y LiCl (15 mM) en Biggers durante 21 h y luego procesado para microscopía electrónica de transmisión. Obsérvese microvellosidades (mv) hacia la cavidad y vesículas endocitóticas (flecha) en célula interna. Aumento: 13900 x



Figuras 64 y 65

Igual a fig. 63. En Fig. 64, obsérvese distinta densidad electrónica entre la célula externa (E) y la célula interna (I). C= cavidad. Aumento: 5900 x. En Fig. 65, obsérvese escasa cantidad de material fibrilar (f) en célula externa. Aumento: 18500 x

D I S C U S I O N

1. Regionalización detectada por la demostración citoquímica de la actividad de 5NUC y de FAL.

Para comprobar que 5NUC y FAL aparecen en regiones de contacto celular, es decisivo fijar las enzimas en su lugar y visualizar los productos insolubles de su efecto catalítico; por lo tanto, es pertinente comentar el procedimiento utilizado.

En general, se han utilizado dos procedimientos básicamente distintos, para la demostración citoquímica de la actividad de FAL: el método de Burstone con acoplamiento de colorantes azo y el método de Gomori-Takamatsu adaptado por diferentes autores (Pearse, 1968). El primero es muy sensible en cuanto a detección de actividad pero no es preciso en cuanto a localización. Ha sido utilizado anteriormente en este laboratorio para reconocer el comienzo de la actividad de FAL en embriones de distintas especies de mamíferos con los siguientes resultados: todos los embriones con menos de 4 células dan una reacción negativa, ésta se hace positiva durante el estado de 4 células y todos los embriones con más de 4 células dan una reacción positiva (Izquierdo & Marticorena, 1975; Ishiyama & Izquierdo, 1977). Resultados independientes de otros autores con un método similar fueron diferentes en cuanto detectaron la actividad de FAL desde el estado de 8 células (Johnson *et al.*, 1977).

Puesto que los estudios de regionalización requerían una localización precisa de la actividad de FAL, el método de Gomori-Takamatsu fue modificado de acuerdo con Mayahara *et al.* (1967), Sundström & Mörnstad (1975), para observar embriones iniciales de mamíferos al microscopio de luz o electrónico (Izquierdo, 1977). Los resultados confirmaron la detección de actividad de FAL desde el estado avanzado de 4 células y demostraron claramente su localización en regiones de contacto celular. Resultados similares fueron obtenidos independientemente por Mulnard & Huygens (1978). Con posterioridad se completó, con un método más eficaz, las observaciones en embriones iniciales de ratón (Izquierdo *et al.*, 1980) y de rata (Lois & Izquierdo, 1984). Resultados diferentes de Vorbrodt *et al.* (1977) fueron atribuidos por Mulnard & Huygens (1978) nuestro grupo (Izquierdo *et al.*, 1980) a incubaciones prolongadas en un medio relativamente ácido.

La mayor parte de los resultados que se informan en esta Tesis se refieren a actividad de 5NUC y no de FAL, porque el método establecido para detectar la primera es más fácil y reproducible. Vorbrodt *et al.* (1977), Nizeyimana-Rugina & Mulnard (1979) estudiaron la actividad de 5NUC en embriones preimplantacionales de ratón con resultados discrepantes; pero entonces y después se revisó considerablemente la demostración citoquímica de esa enzima por Uusitalo & Karnovsky (1977) en linfocitos, por Yamashina

& Kawai (1979) en glándula salival y por Klaushofer & von Mayersbach (1979) en tejido hepático. Se ensayaron esos procedimientos en nuestro laboratorio y se formuló un método adecuado para la observación con el microscopio de luz ó electrónico de embriones iniciales de ratón. Los resultados fueron semejantes a los obtenidos para actividad de FAL: la actividad de 5NUC aparece durante el estado avanzado de 4 células y está confinada a la superficie celular en regiones de contacto celular (Izquierdo & Ebersperger, 1982). Las principales diferencias entre nuestros resultados y los de Vorbrodt *et al* (1977) o los de Nizeyimana-Rugina & Mulnard (1979) son atribuibles a la composición del fijador y al contenido de plomo en el medio de incubación. Se evitó el depósito no específico de plomo disminuyendo el $Pb(NO_3)_2$ a 1.5 mM mientras que Vorbrodt *et al.* usaban 3.6 mM y Nizeyimana-Rugina & Mulnard (1979) usaban 60 mM. La reducción del contenido de plomo fue posible porque la enzima se preserva mejor por fijación en glutaraldehído algo acidificado en tampón tris-maleato que por los procedimientos usados antes de la revisión ya mencionada.

2. La aparición de 5NUC y FAL, ¿corresponde a la síntesis o activación de estas enzimas?

La respuesta a esta pregunta requiere revelar la actividad de las enzimas aunque no estén localizadas y reconocer su presencia aunque no estén activas.

Está bien demostrado que la fijación causa una cierta inactivación de las enzimas pero si esta no es total los productos de la catálisis se acumularán en función del tiempo y temperatura pudiendo ser detectados *in situ*, si son insolubles. La inactivación por fijación de 5NUC es relativamente escasa, como lo demuestran los ensayos bioquímicos paralelos realizados por Uusitalo & Karnovsky (1977), Yamashina & Kawai (1979) y Klaushofer & von Mayersbach (1979). En consecuencia no hay razones para suponer que la actividad de 5NUC aparece antes del estado de 4 células y que no se detecta por escasa sensibilidad del método citoquímico; sin embargo, no se ha estudiado la actividad de 5NUC con métodos bioquímicos, en embriones preimplantacionales.

En cambio, se ha estudiado con esos métodos la actividad de FAL en embriones iniciales de ratón. La primera observación se realizó por espectrofotometría del fosfato inorgánico liberado cuando los embriones tratados por congelación-descongelación se incubaron por 18 h con β -glicerofosfato (Izquierdo & Marticorena, 1975) y con posterioridad se utilizó el método bastante más sensible de Bessey *et al.* (1973) en que el sustrato es p-nitrofenilfosfato (Cachicas *et al.*, 1988; Cachicas, 1989). El primer trabajo no reveló actividad en embriones con 2 células y el segundo, que también incluyó oocitos y embriones de 1 célula, reveló actividad significativa en

estos que se reduce hasta casi desaparecer en el estado de 2 células y luego aumenta rápidamente. Una publicación reciente de Kim et al. (1989) también revela un valor mínimo en embriones de 2 células y un aumento exponencial en estados más avanzados. Sin embargo, debe tenerse en cuenta que en este último trabajo se extrajeron los embriones con Triton X-100, lo cual puede haber activado la enzima, tal como se ha demostrado para UDP glucosa-pirofosfatasa (Persat et al., 1983). En resumen, estos trabajos demuestran que la actividad de FAL es apenas perceptible en el estado de 2 células y luego aumenta notablemente. Si la actividad mínima descrita por Kim et al. (1989) no es causada por la extracción con el detergente sería necesario concluir que, en nuestros experimentos, el contacto podría aumentar muy significativamente una actividad basal. En todo caso, usando el test citoquímico se observa una diferencia categórica entre la actividad de FAL en embriones libres de 2 células y la actividad en agregados 2+2.

La presencia de FAL, independientemente de su actividad, se ha demostrado con métodos inmunocitoquímicos. Una comunicación breve de Ziomek et al. (1986) informa que en el oocito y primeros estados de segmentación del ratón se puede reconocer FAL por anticuerpos contra esa enzima. Un extenso estudio de Becker (Tesis, 1988) sobre anticuerpos monoclonales dirigidos contra moléculas de superficie de

teratocarcinoma demostró por inmunofluorescencia indirecta que 48 de estos reconocían moléculas en la superficie de oocitos y embriones preimplantacionales de ratón; de estos anticuerpos 10 se unen a FAL, como se comprobó con un test ELISA (Cachicas, Tesis 1989) y entre los 10 hay 3 que reconocen moléculas de FAL en el oocito y otros anticuerpos que sólo reconocen moléculas en embriones. Es decir, podría haber más de una forma de FAL en estados iniciales del desarrollo del ratón y por lo menos una en sus oocitos. Kim *et al.* (1989) han encontrado recientemente dos formas electroforéticas de FAL en embriones de 2 células de ratón, una que sería sintetizada durante la ovogénesis y otra que sería embrionaria, lo cual confirma las observaciones de Becker y Cachicas. Del conjunto de estos resultados se infiere que en el oocito y primeros estados de segmentación del ratón hay dos o más isozimas de FAL y que la aparición de la actividad en el embrión de 4 células cultivado libre o en agregados de 2+2, corresponde muy probablemente a la activación de una ó más isoenzimas.

En cuanto a 5NUC, la aparición de su actividad en los agregados 2+2 incubados por distintos tiempos con CHX demuestra que en estas condiciones lo que se anticipa no es la síntesis sino que la activación de la enzima. La ausencia de actividad de 5NUC cuando la incubación se prolonga de 2 h hasta 5-6 h sugiere fuertemente que la síntesis, sin embargo, es necesaria para mantener o extender la regionalización. No sería correcto inferir que la

incubación breve con CHX fue insuficiente porque nuestro control bioquímico demuestra que en sólo 1 h de incubación se reduce en 94 % la incorporación de metionina-³⁵S.

Se han publicado observaciones comparables respecto de las "gap junctions" que se forman entre los blastómeros en el estado de 8 células y también entre embriones de 8 células agregados: CHX no inhibe la aparición de "gap junctions" en el embrión pero impide su formación entre los embriones (McLachlin *et al.*, 1983; véase en este contexto Barron *et al.*, 1989). Dichos resultados, así como los nuestros, sugieren que los embriones contienen componentes prefabricados, aunque no en exceso, bastante antes de su utilización.

3. El contacto celular causa regionalización.

La existencia de regionalización, reconocida por actividad de 5NUC o FAL, en el contacto artificial entre embriones con más de 4 células podría atribuirse al atrapamiento y concentración en el contacto artificial de moléculas activas de dichas enzimas que difundirían en la superficie libre de la membrana plasmática e igualmente podría interpretarse la regionalización de ese contacto entre dos embriones cuando uno de ellos tiene más de 4 células. Pero ya es menos probable que las enzimas atrapadas en el contacto artificial puedan liberarse y difundir para ser atrapadas esta vez en el contacto natural

del embrión de 2 células. Aun si ocurriera así, podría sostenerse que el contacto causa regionalización de la membrana plasmática. Sin embargo, una regionalización por difusión y atrapamiento de enzimas activas no explica que pueda detectarse regionalización en agregados 2+2, primero en el contacto natural y luego en el artificial, en circunstancia que como se ha comentado más arriba el estado libre de 2 células no presenta las enzimas activas ó estas lo son tan poco ó se encuentran tan dispersas que nunca se detecta su actividad por el método citoquímico.

Otros casos de regionalización mencionados en la Introducción se refieren a componentes del citoesqueleto que en vez de distribuirse en toda la periferia de la célula adoptan una posición relativa al contacto celular. Pero sólo tratándose de la miosina se ha demostrado por experimentos de desagregación y agregación de células que el contacto es causante de regionalización (Sobel, 1983). En el caso bien estudiado por nosotros (Sepúlveda et al., 1985) de las microvellosidades de la superficie celular, estas desaparecen durante el estado de 8 células en las áreas de contacto celular y reaparecen cuando se desagregan las células; por otra parte, las microvellosidades desaparecen en el contacto artificial cuando se agregan dos embriones de 8 células.

A pesar de la semejanza entre esos resultados y los de este trabajo es pertinente señalar dos diferencias: primero,

la agregación en este caso no regionaliza solamente el contacto artificial sino también el natural y segundo, la activación de 5NUC o de FAL anticipa lo que ocurrirá normalmente 12 horas más tarde. Esta modificación del tiempo de desarrollo se discutirá más adelante pero desde luego conviene señalar que el aplanamiento de microvellosidades de superficie inducido por el contacto artificial es una propiedad del estado de 8 células y que el fenómeno se observa muy atenuado en embriones de 4 o de 16 células agregados con embriones de 8 células (Sepúlveda *et al.*, 1985).

4. Recepción del estímulo de contacto

Los datos analizados hasta aquí permiten distinguir claramente entre la recepción del estímulo en el contacto artificial y la reacción de regionalización en el contacto natural, lo cual implica un mecanismo de transmisión de la señal del contacto al efector. Ni la recepción ni la transmisión ni la reacción en el efector requieren de síntesis proteica, como lo demuestran los experimentos con CHX. Tampoco es necesaria la activación enzimática en el contacto artificial para que se active en el natural, porque en el natural se observa antes y además, porque ni siquiera se observa en el artificial cuando el estímulo de contacto celular se sustituye por el estímulo con lectinas localizadas.

De cuatro lectinas ensayadas en solución (Con A, WGA, SBA, UEA I) sólo UEA I no indujo regionalización. Este resultado negativo era predecible porque UEA I se une a fucosa y este azúcar no se ha identificado en embriones preimplantacionales antes del estado de mórula avanzada (Kimber & Bagley, 1987; Dealtry et al., 1987; Muramatsu, 1988); por lo tanto, el efecto negativo de UEA I sirve como control de que las otras lectinas actuaron específicamente. Pero esa especificidad no demuestra la existencia de una molécula receptora específica de contacto celular porque hay numerosísimas moléculas diferentes en la superficie celular asociadas a los mismos carbohidratos (véase en tabla 3 los azúcares implicados).

Aun así, nuestros resultados sugieren que la reacción en el efector (es decir, en el contacto natural) es proporcional a la concentración de lectinas y por lo tanto, que la magnitud del estímulo es dependiente del número de receptores activados. Sin embargo, no ha sido posible calcular con precisión la concentración de lectinas que saturaría los receptores ni establecer una estricta relación dosis-respuesta, quizás porque la respuesta no la medimos directamente por la actividad de la enzima sino indirectamente por el porcentaje de embriones regionalizados en la unidad de tiempo. Pero el tiempo de desarrollo aumenta la reactividad del efector, incluso en ausencia del estímulo, lo cual se discute más adelante.

Tampoco es posible estimar según nuestros resultados la importancia que tiene la aglutinación de los receptores inducida por la lectina, lo cual podría modificar la curva dosis-respuesta. Las esferas utilizadas tenían un diámetro aproximado de 100 μm y los embriones de 70 μm , pero con estos datos no basta para estimar con exactitud la superficie de contacto porque esta depende de la adhesividad, de la deformabilidad de la célula y de la altura y densidad de las microvellosidades. Una comparación visual sugiere que el área de contacto artificial de un embrión de 2 células con una esfera de agarosa no es muy diferente del área de contacto artificial en la quimera 2+2, pero la semejanza de la reacción en ambos casos (porcentaje de contactos naturales regionalizados en la unidad de tiempo) podría ser una mera coincidencia. Para investigar en qué medida el contacto artificial del 2+2 es mediado por azúcares, sería necesario ensayar el efecto de inhibición sobre la regionalización que tienen los azúcares específicos disueltos en el medio.

5. Transmisión de la señal de contacto

Ya sea que el contacto artificial sea localizado, como en el caso de 2+2 y en el caso de 2 más una esfera de agarosa revestida de lectina, o no localizado, como en el caso de lectinas en solución, la señal podría transmitirse desde su recepción hasta el efector en el contacto natural

por diversas vías, entre las cuales cabe destacar las que siguen. Actividad del citoesqueleto inducida por el contacto artificial que desplazaría moléculas de la superficie celular en el plano de la membrana plasmática, como se ha demostrado en el "capping" de linfocitos (***) . Disminución de restricciones a la movilidad de moléculas de superficie, inducida por el contacto artificial, y atrapamiento de ellas en el contacto natural por uniones homofílicas o heterofílicas (Edelman, 1985). Endocitosis en el contacto artificial y exocitosis en el contacto natural, como se observa en células epiteliales polarizadas (Fleming et al., 1986). Producción por el estímulo en el contacto artificial de segundos mensajeros que difunden hacia el resto de la célula (Berridge, 1984, 1987). Véase fig. 66. Algunos ensayos preliminares y la consulta de publicaciones pertinentes nos sugirieron que las vías primera y última eran las más probables.

Los experimentos con inhibidores de la polimerización de los microtúbulos o de los microfilamentos, sin embargo, no suprimieron el efecto de regionalización del contacto natural cuando se cultivaron embriones de 2 células libres con la lectina Con A en solución. Pero en este caso toda la superficie celular fue probablemente estimulada por la lectina, incluso el área de contacto celular o sus inmediaciones, y por lo tanto, es posible que no haya participado el citoesqueleto para transmitir activamente la

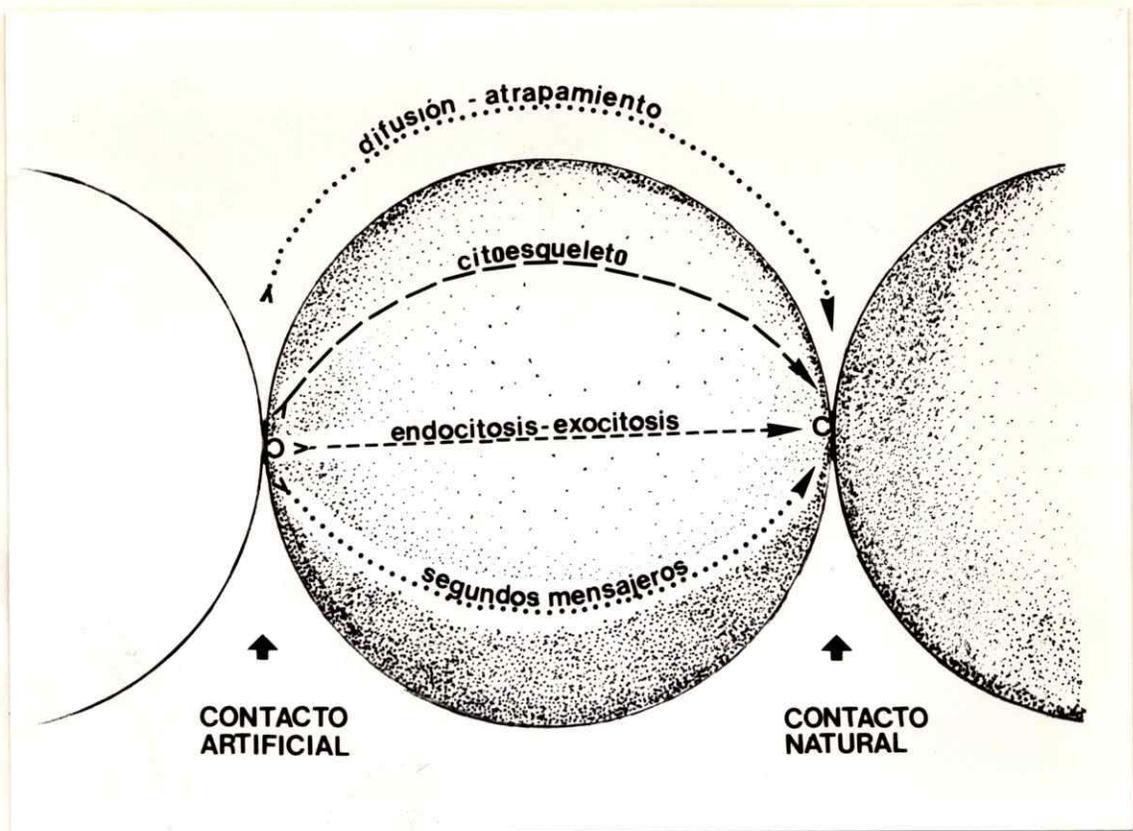


Figura 66

Esquema de algunas de las posibles vías por las cuales podría transmitirse la señal generada en el contacto artificial hacia el contacto natural.

señal inducida por el contacto. La estimulación localizada por una esfera de agarosa revestida de lectina podría haber dado resultados diferentes y convendría realizar esos experimentos, pero no se ha superado la dificultad de mantener a los embriones agregados en un medio con inhibidores del citoesqueleto. Tanto 5NUC como FAL están ancladas a la membrana celular por una molécula de fosfatidilinositol unida al aminoácido C-terminal de la proteína a través de un glican (revisión en Low, 1987) y si dicho tallo sirviera de conexión al citoesqueleto es razonable esperar que el efecto de sus inhibidores fuera semejante para ambas enzimas y se explicara así la notable similitud entre ellas, respecto de la regionalización, en condiciones normales o experimentales.

No obstante su eventual interés, los experimentos en esa vía se discontinuaron porque parecía más promisorio estudiar la vía de los segundos mensajeros. El análogo de cAMP, dibutiril-cAMP, no indujo la regionalización, reconocida por actividad de 5NUC, en el contacto natural de embriones libres de 2 células; sin embargo, en las mismas condiciones se puede observar la regionalización del embrión por PMA y OAG, dos análogos solubles de diacilglicerol que activan la proteína quinasa C. Estos resultados sugieren que diacilglicerol y por lo tanto, la vía del fosfatidilinositol (Berridge, 1984, 1987) está involucrada en el proceso de regionalización .

Otros autores habían estudiado el efecto de pulsos de PMA sobre embriones de ratón en estado de 2 células y observado que se inhibe la citoquinesis pero no la carioquinesis, resultando blastómeros binucleados (Mystkowska & Sawicki, 1987). En el estado de 8 células, PMA (en concentraciones entre 5 y 20 veces mayor que la usada en nuestro trabajo) afecta la polimerización de actina e impide o revierte el aplanamiento celular característico de la compactación (Bloom, 1989), lo cual también lo hemos observado.

6. Recepción de la señal de contacto en el efector.

Este es el punto menos resuelto del problema de regionalización inducida por contacto. Los datos principales son: primero, el método citoquímico demuestra actividad de 5NUC y FAL en embriones de 2 células agregados en circunstancias que dicha actividad no se demuestra en embriones no agregados del mismo estado y segundo, la actividad enzimática se demuestra antes en el contacto natural que en el artificial. En cuanto a la modificación que la señal de contacto induce en el efector, lo más probable es que se trate de una activación de las enzimas, ya sea que el nivel anterior de actividad sea cero o algo mayor que cero (tal como se analizó más arriba en puntos 1 y 2) pero no puede descartarse que la señal de contacto induzca también una aproximación de las moléculas de enzima

en el área de contacto natural lo cual concentraría el producto insoluble de la catálisis haciéndolo más visible. No parece probable que la redistribución de la enzima explique por si sola el fenómeno porque el área regionalizada es, observada con microscopio de luz, alrededor de un 8 % del área celular total y una dilución de 12 veces no impediría reconocer la actividad de la enzima en lugares de la membrana libres de contacto si se usan incubaciones prolongadas con el sustrato. Sin embargo, no podrá estimarse la importancia del factor redistribución mientras no se mida con métodos bioquímicos la actividad enzimática de embriones de 2 células estimulados por contacto celular o por lectinas.

En cuanto a la activación de las enzimas en el área de contacto, suponemos que será el resultado de cambios conformacionales pero no conocemos el mecanismo. Por analogía con resultados que se comentarán más adelante pensamos que con la recepción del contacto e hidrólisis de fosfatidilinositol se activan tanto la vía del diacilglicerol como la del IP_3 , es decir, se estimula la PKC y se moviliza Ca^{++} de depósitos intracelulares, pero no tenemos información suficiente como para proponer precursores de la reacción en el efector (véase Takai *et al.*, 1985 y Berridge, 1987). Aquí es pertinente señalar que en embriones de 2 células durante la fase G2 del ciclo, la fosforilación de proteínas aumenta 3 a 6 veces (Domon *et*

7. ¿Por qué se anticipa la regionalización normal del estado de 4 células en quimeras 2+2?

En quimeras 2+2 ocurre regionalización aproximadamente 12 h antes que en el desarrollo normal, durante el estado avanzado de 4 células. Por lo tanto, estamos observando la anticipación de un proceso, lo cual exige referirse a cómo se mide el tiempo de desarrollo. Las variaciones en el estado de desarrollo que se comprueba en una población de embriones preimplantacionales no expresan la inexatitud o la inexistencia de un reloj del desarrollo sino que la asincronía en el inicio o el retraso por letalidad. Esta última causa queda pronto en evidencia y en cuanto a la primera, los embriones normales pueden sincronizarse seleccionando los que han alcanzado el mismo estado dentro de un breve lapso (Mayor, Tesis 1989).

Antes de discutir cómo funciona el reloj del desarrollo conviene discutir su existencia porque en vez de un mecanismo que indique la hora de cada evento es posible imaginar que cada evento sea simplemente efecto del evento anterior, asegurándose así esa secuencia lineal que con escasas variaciones se observa en el desarrollo normal. Si así fuera, la perturbación de un estado modificaría el momento del estado siguiente, pero no es así. Se ha observado que en el desarrollo de medios o dobles embriones, obtenidos experimentalmente, no se altera el momento en que

ocurre la blastulación, demostrándose que el tiempo no se mide por número de ciclos celulares ni por el número de células (Fernández & Izquierdo, 1980). Tampoco se altera el momento de la blastulación por el retardo en la segmentación que induce LiCl (Izquierdo & Becker, 1982) o la aceleración que induce la progesterona (Roblero & Izquierdo, 1976). En cuanto a etapas más iniciales del desarrollo preimplantacional, recientemente se ha demostrado que inhibir con diversos tratamientos la compactación durante el estado de 8 células no impide ni retarda el establecimiento de conexiones citoesqueléticas (Mayor et al., 1989) y que los mismos u otros tratamientos no alteran las notables modificaciones del patrón de síntesis proteica que normalmente ocurren en esa etapa (Mayor, Tesis 1989). Sin embargo, la inhibición de la replicación del DNA con afidicolina, que no afecta la compactación, altera el patrón de síntesis proteica (Mayor, Tesis 1989).

El conjunto de estos resultados y otros no detallados sugieren la existencia de un reloj del desarrollo, posiblemente accionado por ciclos de replicación del DNA, que indicaría cuando debe ocurrir cada evento del desarrollo, desde eventos pluricelulares como la blastulación hasta moleculares como la síntesis de proteínas. No obstante lo anterior, la regionalización puede anticiparse del estado de 4 células al de 2 células. Pensamos que esto es posible porque no estaría implicada la

síntesis sino la activación de las enzimas marcadoras, porque los demás componentes del sistema están presentes y porque la mayor estimulación que causa la agregación de un segundo embrión o las lectinas anticipa lo que ocurre normalmente 12 h más tarde y posiblemente se trata del mismo mecanismo.

El mecanismo comprendería incremento del área de contacto celular y tiempo de contacto celular o tiempo de desarrollo (edad) del embrión.

Un incremento del área de contacto celular ocurre normalmente cuando el embrión de 2 células se segmenta a 4 células. Experimentalmente, agregar dos embriones de 2 células también representa un incremento del área de contacto y el área se incrementa todavía más cuando en vez de ordenar los embriones linealmente se les congrega porque los contactos artificiales aumentan de uno a dos o tres. Sin embargo, en estos experimentos no aumenta proporcionalmente el número de embriones regionalizados, no varía el porcentaje de contactos naturales marcados y disminuye el porcentaje de contactos artificiales marcados. En consecuencia, los experimentos no demuestran que un aumento del área de contacto cause un aumento de la regionalización. Pero tampoco lo niegan, primero, porque los resultados podrían atribuirse a la escasez de enzima activable (Discusión, punto 2) y segundo, porque no parece posible precisar cuanto se incrementa el área de contacto

celular en los distintos ordenamientos. En cambio los experimentos con lectinas solubles, especialmente los realizados con WGA, revelan una correlación positiva entre su concentración y el porcentaje de embriones regionalizados en la unidad de tiempo, lo cual puede atribuirse a la magnitud de la superficie estimulada sin que haya limitación de la enzima disponible ya que sólo se regionaliza el contacto natural.

El tiempo de contacto celular es un factor que queda en evidencia al comprobar en 2+2 que el porcentaje de contactos naturales regionalizados es mayor que el de contactos artificiales y que el porcentaje de los contactos naturales regionalizados aumenta, ya sea prolongando el tiempo de agregación, ya sea agregando embriones de mayor edad. Para extrapolar a los embriones normales de 4 células las conclusiones de experimentos con 2+2, es necesario discriminar entre tiempo de contacto celular y edad del embrión. En agregados de 2-3 h el porcentaje de contactos naturales regionalizados aumenta cuando los embriones tienen más edad y por lo tanto sus células han estado más tiempo en contacto, pero el porcentaje de contactos artificiales regionalizados no aumenta significativamente, lo cual demostraría que la edad de los embriones no tiene influencia y que el factor decisivo es el tiempo de contacto.

Los experimentos analizados sugieren que la regionalización normal en el embrión de 4 células es

consecuencia de la mayor área de contacto celular y del mayor tiempo de contacto y que el mayor tiempo de desarrollo, o edad, es un factor de escasa relevancia.

Aunque sea una sugerencia, conviene calificarla porque podría parecer en contradicción con resultados anteriores de nuestro laboratorio. Con el fin de precisar si la regionalización era consecuencia de la división celular e intercalación de una supuesta nueva membrana entre los blastómeros, se inhibió la división con drogas que afectan el citoesqueleto sin que se impidiera más tarde la regionalización, reconocida por la activación de 5NUC y FAL (Izquierdo et al., 1984). Si bien es cierto que en esas condiciones no aumentaba el número de contactos celulares, la regionalización se estudió a las 44 h de cultivo con inhibidores y por entonces también se reconoció signos de un desarrollo más avanzado como compactación, aplanamiento de microvellosidades, comienzo de blastulación y engolfamiento, que implican no sólo mayor edad sino también mayor superficie de contacto (véase discusión de esos procesos en Sepúlveda et al., 1985 y Mayor et al., 1989).

8. Otros efectos morfogénéticos inducidos experimentalmente

La facilidad con que se pueden observar in vivo algunos fenómenos morfogénéticos que ocurren normalmente después de la regionalización, como la compactación o la blastulación

fue aprovechada en el curso de este trabajo para analizar el estímulo de la superficie celular y su propagación en condiciones experimentales que exigen una observación continua y no admiten interrupciones para demostraciones citoquímicas. Aunque estas observaciones contribuyan al análisis de la regionalización no son decisivas en tanto no se demuestra que la compactación y blastulación involucran necesariamente la regionalización previa. Es probable que así sea, como se discute a continuación, pero aún quedaría por demostrar que los efectos morfogenéticos inducidos son propiamente compactación o blastulación y no la simulación de estos procesos. Si lo fueran, no carecerían de interés para el análisis de mecanismos de estimulación y propagación pero los resultados no podrían extrapolarse sin más al proceso de regionalización.

La secuencia ordenada de estados en el proceso de desarrollo es evidente pero el fenómeno de regulación embrionaria, ya planteado más arriba, demuestra que no se trata de la ejecución de instrucciones ordenadas temporalmente para todos los eventos del desarrollo. Por ejemplo, es posible suprimir la segmentación sin modificar la secuencia de cambios en la síntesis de proteínas (Petzoldt et al., 1983) o inhibir la compactación sin alterar la expresión génica que corresponde a estados más avanzados (Mayor, Tesis 1989). Observaciones como estas dan fundamento a una concepción del desarrollo que lo

describe como una malla de relaciones causales con carácter histórico y no como una secuencia lineal ordenada por un programa genético (véase revisión y discusión en Mayor, Tesis 1989).

De las tres lectinas en solución que inducen regionalización en embriones de 2 células, WGA en tratamientos más prolongados induce además otros procesos morfogénéticos que asemejan los que ocurren en estados más avanzados del desarrollo. En 1 h llega a desaparecer el espacio entre las células, como se observa en la compactación y en 6 h se forma una cavidad entre las células, como en la blastulación, la que luego aumenta de tamaño. Johnson (1986) había publicado resultados semejantes a los nuestros obtenidos también con WGA e investigado el mecanismo de formación del líquido blastocélico para determinar si era el mismo descrito en blastocistos normales. Los resultados no fueron concluyentes: aunque pudo inhibir con ouabaina la expansión del blastocele inducida por WGA, la demostración citoquímica de la Mg^{++} ATPasa fue negativa. Más recientemente se ha demostrado con un anticuerpo policlonal dirigido contra Na^+/K^+ ATPasa que esta enzima no se expresa en la pseudoblastulación inducida por WGA, contrariamente a lo que ocurre en la blastulación normal (Watson & Kidder, 1988).

Nuestro trabajo, se ha dirigido a investigar la recepción del contacto y la vía de transmisión de la señal.

El análogo dibutiril-cAMP, que no causaba regionalización tampoco causó compactación y blastulación en embriones de 2 células, aunque se ha descrito una importante participación del sistema adenilato ciclasa en el desarrollo normal de la cavidad blastocélica (Manejwala *et al.*, 1986; Manejwala & Schultz, 1989). Comprobamos que OAG causa compactación en embriones de 2 células en 20 min y que en 4 h una célula comienza a engolfar a otra, apareciendo una cavidad entre ellas. Controles realizados con inhibidores de PKC y con análogos inactivos de OAG demuestran que el efecto es atribuible a diacilglicerol y por otra parte, la aceleración de estos procesos morfogénéticos cuando el tratamiento con OAG se complementa con ionóforo de Ca^{++} o LiCl, demuestran que la vía del IP_3 ha sido activada. No conocemos publicaciones de otros autores que se refieran al efecto de OAG sobre embriones preimplantacionales.

El problema aquí es dilucidar si los efectos morfogénéticos inducidos por segundos mensajeros del sistema fosfatidilinositol corresponden efectivamente a la compactación y blastulación que se observa durante el desarrollo normal. La evidencia no es decisiva: en términos moleculares es más bien adversa y en términos celulares más bien favorable.

Principalmente llama la atención en los resultados de Johnson (1986) y de Watson & Kidder (1988) que no se

reconozcan las enzimas que en el blastocisto normal acciona la inyección de líquido. Pensamos que una forma de aclarar el problema consistiría en reconocer en los blastocistos inducidos por OAG el patrón de síntesis de proteínas características del blastocisto normal (véase Mayor, Tesis 1989) pero el tratamiento con OAG inhibe después de 2 h casi totalmente la síntesis, aunque no la incorporación, de metionina-³⁵S, y en ese lapso no se observa el patrón característico de blastocisto.

Las observaciones con el microscopio electrónico, por su parte, revelan que la estructura del núcleo, la aparición de cuerpos cristaloides, la agregación de organelos citoplasmáticos son mucho más características de una mórula avanzada que de un estado de 2 células y además se reconocen diferencias de densidad electrónica entre las dos células lo cual ha sido observado en la blastulación normal (Izquierdo *et al.*, 1976). Pero no es convincente el sellamiento periférico que precede normalmente la blastulación incluso en medios y dobles embriones (Fernández & Izquierdo, 1980) y en embriones cultivados en LiCl (Becker & Izquierdo, 1982) aunque no se pueda descartar mientras no se delineen los espacios intercelulares con emulsión de lantano. Además, las vesículas agregadas ("jigsaw vesicles" de Calarco & Brown, 1969) que abundan especialmente en los embriones tratados con OAG también son más abundantes en embriones cultivados con LiCl que en los controles (Becker &

Izquierdo, 1982).

Finalmente, es pertinente destacar una observación que tiene importancia en la biología del desarrollo: en la blastulación normal se determina el trofoblasto y se pierde la capacidad de regulación embrionaria (véase Izquierdo, 1986) mientras que en los embriones de 2 células inducidos a blastular con un tratamiento breve de OAG y luego transferidos a medio de cultivo sin la droga, desaparece la cavidad, las células se segmentan, compactan, forman una mórula y luego, de acuerdo con la escala temporal del desarrollo normal, se forma un blastocisto de apariencia típica. Si la blastulación inducida por OAG en el embrión de 2 células fuera equivalente a la blastulación en el embrión normal de 20 a 30 células significaría que el desarrollo anticipado del embrión es reversible lo cual implica la alteración de la secuencia temporal y la diferenciación de un trofoblasto no determinado.

El conjunto de estas consideraciones deja el problema de compactación y blastulación o pseudocompactación y pseudoblastulación sin resolver. Por cierto que la segunda alternativa, aunque parezca más probable, no descarta la posibilidad de una función de los mensajeros de la vía fosfatidilinositol en los procesos normales de compactación y blastulación.

9. Proyección de nuestras observaciones

Los resultados comprendidos en esta Tesis sugieren tres líneas principales de investigación. 1) Estudio de componentes de la membrana plasmática implicados en el reconocimiento, adhesión e inducción entre células. 2) Estudio de los sistemas involucrados en la transmisión de señales inducidas por el contacto celular. 3) Estudio de las modificaciones causadas por dichas señales intracelulares en sus efectores.

Aunque en la primera línea hemos reconocido la importancia de los carbohidratos, en la segunda la participación de la vía del fosfatidilinositol y en la tercera, la probable activación de las ectoenzimas, la información reunida sólo aporta algunas piezas al enigma del desarrollo inicial que se suponía más simple en vista de la igualdad celular. El análisis separado de estas líneas puede esclarecer mecanismos pero sólo su integración plantea operacionalmente el problema de especificación regional que precede la diferenciación celular.

CONCLUSIONES

Los resultados experimentales indican que:

1. La agregación de embriones con más de 4 células (regionalizados) induce regionalización (actividad de 5NUC y de FAL) del contacto artificial.
2. La agregación de embriones que tienen 2 células (no regionalizados) induce regionalización del contacto natural y luego del artificial.
3. El contacto artificial puede sustituirse en un embrión de 2 células por una esfera revestida de lectinas o por lectinas en solución, regionalizándose el contacto natural.
4. Análogos de los segundos mensajeros del sistema fosfatidilinositol causan regionalización del contacto natural del embrión de 2 células y el efecto puede ser exacerbado o inhibido específicamente.
5. Las lectinas y los análogos de segundos mensajeros inducen en el embrión de 2 células, además de regionalización, procesos morfogénéticos que tienen cierta semejanza con la compactación y la blastulación.

6. La regionalización inducida por agregación de embriones y los cambios morfogénéticos inducidos por segundos mensajeros del sistema fosfatidilinositol, no requieren de la síntesis de proteínas.

En consecuencia:

7. La regionalización de una quimera de dos embriones de 2 células anticiparía lo que ocurre normalmente en el estado de 4 células avanzado porque se ha incrementado la superficie de contacto celular.
8. La regionalización causada en el estado de 2 células por lectinas, localizadas o en solución, revelaría que hay carbohidratos comprometidos en la recepción del estímulo de contacto.
9. La regionalización inducida en el estado de 2 células por los segundos mensajeros sugiere que el sistema fosfatidilinositol participa en la transmisión de la señal de contacto hacia el contacto natural.
10. La demostración citoquímica de 5NUC y de FAL en el contacto natural sería efecto de la activación de estas enzimas por un metabolito aún no identificado.
11. El mecanismo de regionalización normal en el estado de 4 células sería probablemente el mismo de la regionalización experimental inducida en el estado de 2 células.

12. La compactación y blastulación inducidas experimentalmente no corresponderían en términos de síntesis de proteínas, a los eventos morfogénicos normales; sin embargo, las observaciones morfológicas sugieren que los segundos mensajeros de la vía del fosfatidilinositol están implicados en dichos procesos.

REFERENCIAS

- BARON, M.D.; POPE, B. & LUZIO, P. (1986). The membrane topography of ecto-5'-nucleotidase in rat hepatocytes. *Biochem. J.* **236**: 495-502.
- BARRON, D.J.; VALDIMARSSON, G.; PAUL, D.L. & KIDDER, G.M. (1989). Connexin32, a gap junction protein, is a persistent oogenetic product through preimplantation development of the mouse. *Dev. Genet.* **10**: 318-323.
- BAYLES, E. M.; SOOS, M.; JACKSON, P.; NEWBY, A.C.; SIDDLE, K. & LUZIO, J.P. (1984). The existence and properties of two dimers of rat liver ecto-5'-nucleotidase. *Biochem. J.* **221**: 369-377.
- BECKER, M.I. (1988). Estudio de la superficie celular del embrión inicial de mamíferos mediante anticuerpos monoclonales. Tesis de Doctorado. Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.
- BECKER, M. I. & IZQUIERDO, L. (1982). Electron microscope observation on preimplantation mouse embryos cultured with LiCl. *Anat. Embryol.* **164**: 343-347.
- BERMAN, J.J.; TONG, C. & WILLIAMS, G.M. (1980). 5'-nucleotidase activities in cultured rat liver epithelial and fibroblast cells. *J. Histochem. Cytochem.* **28**: 174-177.

- BERRIDGE, M. J. (1984). Inositol triphosphate and diacylglycerol as second messengers. *Biochem. J.* **220**: 345-360.
- BERRIDGE, M.J. (1987). Inositol triphosphate and diacylglycerol: two interacting second messengers. *Ann. Rev. Biochem.* **56**: 159-193.
- BERRIDGE, M.J.; DOWNES, C.P. & HANLEY, M.R. (1982). Lithium amplifies agonist-dependent phosphatidylinositol responses in brain and salivary glands. *Biochem. J.* **206**: 587-595.
- BESSEY, A.; LOWRY, H.; BRUCK, M.L.; GRANDCHAMP, S. & EPHRUSSI, B. (1973). A method for the rapid determination of alkaline phosphatase with five cubic millimeters of serum. *J. Biol. Chem.* **164**: 321.
- BIGGERS, J.D.; WHITTEN, W.K. & WHITTINGHAM, D.G. (1971). The culture of mouse embryos in vitro. En: "Methods in mammalian embryology" (Daniel, J.C., ed.). Freeman, San Francisco, pp. 86-116.
- BILOZUR, M. & POWERS, R.D. (1982). Two sites for calcium action in compaction of the mouse embryo. *Exp. Cell Res.* **142**: 39-45.
- BLOOM, T.L. (1989). The effects of phorbol ester on mouse blastomeres: a role for protein kinase C in compaction?. *Development* **106**: 159-171.

- BRAUN, J. & UNANUE, E.R. (1983). Surface immunoglobulin and the lymphocyte cytoskeleton. *Feder. Proc.* **42**: 2446-2451.
- BURSTONE, M.S. (1962). Phosphatases. En: "Enzyme histochemistry" (Burstone, M.S., ed.). Academic Press Inc., pp. 160-280.
- CACHICAS, V. (1989). Estudio de fosfatasa alcalina en el desarrollo inicial del ratón mediante anticuerpos monoclonales de rata dirigidos contra células de teratocarcinoma de la línea F9 de ratón. Tesis para optar al título de bioquímico. Universidad de Concepción.
- CACHICAS, V.; IMARAI, M.; DE IOANNES, A.; IZQUIERDO, L. & BECKER, M.I. (1988). Expresión de fosfatasa alcalina en el desarrollo inicial de mamíferos. *Arch. Biol. Med. Exp.* **21**: R-439.
- CALARCO, P. & BROWN, E.H. (1969). An ultrastructural and cytological study of preimplantation development of the mouse. *J. Exp. Zool.* **171**: 253-284.
- CARRAWAY, K.L.; DOSS, R.C.; HUGGINS, J.W.; CHESNUT, R.W. & CARRAWAY, C.A. (1979). Effects of cytoskeletal perturbant drugs on ecto 5'-nucleotidase, a concanavalin A receptor. *J. Cell Biol.* **83**: 529-5543.

- CARROL, A.G. & ECKBERG, W.R. (1986). Inhibition of germinal vesicle breakdown and activation of cytoplasmic contractility in *Spisula* oocytes by calmodulin antagonists. *Biol. Bull.* **170**: 43-50.
- CROSS, G.A.M. (1987). Eukaryotic protein modification and membrane attachment via phosphatidylinositol. *Cell* **48**: 179-181.
- DEALTRY, G.B.; CURRY, M.R. & SELLENS, M.H. (1987). Fucosylated glycoconjugates appear on mouse embryos during blastocyst formation. *J. Exp. Zool.* **243**: 163-169.
- DOMON, M.; TAKAHASHI, I. & ONODERA, K. (1986). Modulation in protein phosphorylation during G2 phase of the cell cycle in two-cell mouse embryos. *Exp. Cell Res.* **162**: 169-174.
- DUCIBELLA, T. (1980). Divalent antibodies to mouse embryonal carcinoma cells inhibit compaction in the mouse embryo. *Dev. Biol.* **79**: 356-366.
- DZIADEK, M. & TIMPL, R. (1985). Expression of nidogen and laminin in basement membranes during mouse embryogenesis and in teratocarcinoma cells. *Dev. Biol.* **111**: 372-382.
- DZIADEK, M.; FUJIWARA, S.; PAULSSON, M. & TIMPL, R. (1985). Immunological characterization of basement membrane types of heparan sulfate proteoglycan. *EMBO J.* **4**: 905-912.

- DUCIBELLA, A. & ANDERSON, E. (1975). Cell shape and membrane changes in the eight cell mouse embryo: prerequisite for morphogenesis of the blastocyst. *Dev. Biol.* **47**: 45-58.
- ECKBERG, W.R.; SZUTS, E.Z. & CARROLL, A.G. (1987). Protein kinase C activity, protein phosphorylation and germinal vesicle breakdown in *Spisula* oocytes. *Dev. Biol.* **124**: 57-64.
- EDELMAN, G.M. (1985). Cell adhesion and the molecular processes of morphogenesis. *Ann. Rev. Biochem.* **54**: 145-169.
- FERNANDEZ, S. & IZQUIERDO, L. (1980). Blastocoel formation in half and double embryos. *Anat. Embryol.* **160**: 77-81.
- FERNANDEZ, S. & IZQUIERDO, L. (1983). Effect of LiCl on differentiation of mouse embryos beyond the blastocyst stage. *Arch. Biol. Med. Exp.* **16**: 51-54.
- FISHMAN, W.H. (1974). Perspectives on alkaline phosphatase isoenzymes. *Am. J. Med.* **56**: 617-646.
- FLACH, G.; JOHNSON, M. H.; BRAUDE, P.R.; TAYLOR, R.A.S. & BOLTON, V.N. (1982). The transition from maternal to embryonic control in the 2-cell mouse embryo. *EMBO J.* **1**: 681-686.

- FLEMING, T.P. & JOHNSON, M.H. (1988). From egg to epithelium. *Ann Rev. Cell Biol.* **4**: 458-485.
- FLEMING, T.P.; CANNON, P.M. & PICKERING, S.J. (1986). The cytoskeleton, endocytosis and cell polarity in the mouse preimplantation embryo. *Dev. Biol.* **113**: 406-419.
- GOODALL, H. & JOHNSON, M.H. (1984). The nature of intercellular coupling within the preimplantation mouse embryo. *J. Embryol. exp. Morphol.* **79**: 53-76.
- GRAHAM, C.F. & DEUSSEN, Z.A. (1978). Features of cell lineage in preimplantation mouse embryos. *J. Embryol. exp. Morphol.* **48**: 53-72.
- HALLCHER, L.M. & SHERMAN, W.R. (1980). The effects of lithium ion and other agents on the activity of myo-inositol-1-phosphatase from bovine brain. *J. Biol. Chem.* **255**: 10896-10901.
- HANDYSIDE, A.H.; EDIDIN, M. & WOLF, D.E. (1987). Polarized distribution of membrane components on two-cell mouse embryos. *Roux's Arch. Dev. Biol.* **196**: 273-278.
- HERTZ, F. (1985). Alkaline phosphatase isoenzyme in cultured human cancer cells. *Experientia* **41**: 1357-1490.
- HOUSLITON, 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.
- HYAFIL, F.; BABINET, C. & JACOB, F. (1981). Cell-cell interactions in early embryogenesis: a molecular approach to the role of calcium. *Cell* **26**: 447-454.
- ISHIYAMA, V. & IZQUIERDO, L. (1977). The onset of phosphatase activity in early mammalian embryos. *J. Embryol. exp. Morphol.* **42**: 305-308.
- IZQUIERDO, L. (1977). Cleavage and differentiation. En: "Development in mammals" (Johnson, M.H., ed.). North Holland Publ., Amsterdam. **2**: 99-118.
- 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. & BECKER, M.I. (1980). Effect of Li^+ on preimplantation mouse embryos. *J. Embryol. exp. Morphol.* **67**: 51-58.
- IZQUIERDO, L. & EBENSPERGER, C. (1982). Cell membrane regionalization in early mouse embryos as demonstrated by 5'-nucleotidase activity. *J. Embryol. exp. Morphol.* **69**: 115-126.

- IZQUIERDO, L. & MARTICORENA, P. (1975). Alkaline phosphatase in preimplantation mouse embryos. *Exp. Cell Res.* **92**: 399-402.
- IZQUIERDO, L.; FERNANDEZ, S. & LOPEZ, T. (1976). Cell membrane and cell junctions in differentiation of preimplanted mouse embryos. *Arch. Biol. Med. Exp.* **10**: 130-134.
- IZQUIERDO, L.; LOPEZ, T. & MARTICORENA, P. (1980). Cell membrane regions in preimplantation mouse embryos. *J. Embryol. exp. Morphol.* **59**: 89-102.
- IZQUIERDO, L.; LOPEZ, T. & PANUNCIO, A. (1984). Plasma membrane regionalization and compaction of mouse cleaving embryos: effect of microtubule and microfilament inhibitors. *Arch. Biol. Med. Exp.* **17**: 29-39.
- JOHNSON, L.V. (1986). Wheat germ agglutinin induces compaction- and cavitation-like events in two-cell mouse embryos. *Dev. Biol.* **113**: 1-9.
- JOHNSON, M.H. & MARO, B. (1984). The distribution of cytoplasmic actin in mouse 8-cell blastomeres. *J. Embryol. exp. Morphol.* **82**: 97-117.
- JOHNSON, S.M.; ASHERNON, G.L.; WATTS, R.W.E.; NORTH, M.E.; ALLSOP, J. & WEBSTER, A.D.B. (1977). Lymphocyte purine 5' nucleotidase deficiency in primary hypogammaglobulinemia. *Lancet* **1**: 168-170.

- KIM, J.; KIM, H.K.; KIM, K.; KIM, S.R. & CHO, W.K. (1989).
Multiple forms of alkaline phosphatase in mouse
preimplantation embryos. *J. Reprod. Fert.* **86**: 65-72.
- KIMBER, S.J. & BAGLEY, P.R. (1987). Cell-surface
enrichment of fucosylated glycoconjugates in the 8- to
16-cell mouse embryo. *Roux's Arch. Dev. Biol.* **196**: 492-
498.
- KIMBER, S.J. & BIRD, J.M. (1985). Cell surface changes in
preimplantation mouse embryos during compaction
investigated using FITC conjugated lectins after
proteolytic enzyme treatment. *Roux's Arch. Dev. Biol.*
194: 470-479.
- KIMBER, S.J. & SURANI, M.A.H. (1983). Coated beads
stimulate single cells from mouse embryos to spread. En:
"Lectins" (Boog-Hansen, T.C. & Spengler, G.A., eds.) pp.
63-72.
- KLAUSHOFER, K. & VON MAYERBASCH, H. (1979). Freeze
substituted tissue in 5'-nucleotidase histochemistry.
Comparative histochemical and biochemical investigations.
J. Histochem. Cytochem. **27**: 1582-1587.
- LEE, S.; GILULA, N.B. & WARNER, A.E. (1987). Gap
junctional communication and compaction during
preimplantation stages of mouse development. *Cell* **51**:
851-860.

- LEHTONEN, E. & BADLEY, R. (1980). Localization of cytoskeletal proteins in preimplantation mouse embryos. *J. Embryol. Exp. Morphol.* **55**: 211-225.
- LO, C.W. & GILULA, N.B. (1979). Gap junctional communication in the preimplantation mouse embryo. *Cell* **18**: 411-422.
- LOIS, P. & IZQUIERDO, L. (1984). Cell membrane regionalization and cytoplasm polarization in the rat early embryo. *Roux's Arch. Dev. Biol.* **193**: 205-210.
- LOW, M.G. (1987). Biochemistry of the glycosylphosphatidylinositol membrane protein anchors. *Biochem. J.* **244**: 1-13.
- LOW, M.G. & ZILVERSMIT, D.B. (1980). Role of phosphatidylinositol in attachment of alkaline phosphatase to membranes. *Biochemistry* **19**: 3913-3918.
- LUTHARDT, F.W. & DONAHUE, R.P. (1975). DNA synthesis in developing two-cell embryos. *Dev. Biol.* **44**: 210-216.
- MANEJWALA, F.; KAJI, E. & SCHULTZ, R.M. (1986). Development of activable adenylate cyclase in the preimplantation mouse embryo and a role for cyclic AMP in blastocoel formation. *Cell* **46**: 95-103.

- MANEJWALA, F.M. & SCHULTZ, R.M. (1989). Blastocoel expansion in the preimplantation mouse embryo: stimulation of sodium uptake by cAMP and possible involvement of cAMP-dependent protein kinase. *Dev. Biol.* **136**: 560- 563.
- MATTE, C.; DOGGENWEILER, C. & IZQUIERDO, L. (1987). Development of mouse embryos following the destruction of blastomeres. *Arch. Biol. Med. Exp.* **20**: 295-303.
- MAYAHARA, H.; HIRANO, H.; SAITO, T. & OGAWA, K. (1967). The new lead citrate method for the ultracytochemical demonstration of activity of non-specific alkaline phosphatase (orthophosphoric monoester phosphohydrolase). *Histochimie* **11**: 88-96.
- MAYOR, R. (1990). Desarrollo inicial de mamíferos: efecto de la inhibición del cambio de forma celular y de la replicación del DNA, sobre el patrón de síntesis proteica. Tesis de Doctorado, Fac. de Ciencias, U. de Chile.
- MAYOR, R.; PEY, R. & IZQUIERDO, L. (1989). Development of cytoskeletal connections between cells of preimplantation mouse embryos. *Roux's Arch. Dev. Biol.* **198**: 233-241.
- MCLACHLIN, J.R.; CAVENEY, S. & KIDDER, G.M. (1983). Control of gap junction formation in early mouse embryos. *Dev. Biol.* **98**: 155-164.

- MURAMATSU, T. (1988). Developmentally regulated expression of cell surface carbohydrates during mouse embryogenesis. *J. Cell Biochem.* **36**: 1-14.
- MYSTKOWSKA, E.T. & SAWICKI, W. (1987). Modification of cell division by phorbol ester in preimplantation mouse embryos. *Development* **101**: 403-408.
- MULNARD, J. & HUYGENS, R. (1978). Ultrastructural localizations of non specific alkaline phosphatase during cleavage and blastocyst formation in the mouse. *J. Embryol. exp. Morphol.* **41**: 121-131.
- NIMIERKO, A. & KOMAR, A. (1985). Action of phorbol myristate acetate (PMA) at fertilization of mouse oocytes *in vitro*. *J. Embryol. exp. Morphol.* **90**: 171-177.
- NIZEYIMANA-RUGINA, E. & MULNARD, J. (1979). Ultrastructural localization of 5'-nucleotidase in preimplantation mouse embryos. *Arch. Biol.* **90**: 131-140.
- PEARSE, A.G.E. (1968). *Histochemistry*. Vol. 1. J. & A. Churchill Ltd.
- PEDERSEN, R.A. & SPINDLE, A. I. (1980). Role of the blastocoele microenvironment in early mouse embryo differentiation. *Nature* **284**: 550-552.

- PERSAT, F.; AZZAR, G.; MARTEL, M.-B. & GOT, R. (1983).
Properties of uridine diphosphate glucose
pyrophosphorylase from golgi apparatus of liver.
Biochem. Biophys. Acta 749: 329-350.
- PETZOLD, 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.
- PRATT, H.P.M.; ZIOMEK, C.A.; REEVE, W.J.D. & JOHNSON, M.H.
(1982). Compaction of the mouse embryo: an analysis of
its components. J. Embryol. exp. Morphol. 70: 113-132.
- REEVE, W.J.D. & ZIOMEK, C.A. (1981). Distribution of
microvilli on dissociated blastomeres from mouse embryos:
evidence for surface polarization at compaction. J.
Embryol. exp. Morphol. 62: 339-350.
- REIMA, I. & LEHTONEN, E. (1985). Localization of
nonerythroid spectrin and actin in mouse oocytes and
preimplantation embryos. Differentiation 30: 68-75.
- RINGWALD, M.; SCHUH, R.; VESTWEBER, D.; EISTETTER, H.;
LOTTSPREICH, F.; ENGEL, J.; DOLZ, R.; JAHNIG, F.; EPPLEN,
J.; MAYER, S.; MULLER, C. & KEMLER, R. (1987). The
structure of cell adhesion molecule uvomorulin. Insights
into the molecular mechanism of Ca²⁺-dependent cell

- adhesion. *EMBO J.* **6**: 3647-3653.
- RINK, T.J.; SANCHEZ, A. & HALLAM, T.J. (1983).
Diacylglycerol and phorbol ester stimulate secretion
without raising cytoplasmic free calcium in human
platelets. *Nature* **305**: 317-319.
- ROBLERO, L. & IZQUIERDO, L. (1976). Effect of progesterone
on the cleavage rate of mouse embryos *in vitro*. *J.*
Reprod. Fert. **46**: 475-476.
- SAWICKI, W. & MYSTKOWSKA, E.T. (1981). Phorbol ester-
mediated modulation of cell proliferation and primary
differentiation of mouse preimplantation embryos. *Exp.*
Cell Res. **136**: 455-458.
- 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.
- SEPULVEDA, M.S.; DOGGENWEILER, C. & IZQUIERDO, L. (1985).
Scanning microscopy of disaggregated and aggregated
preimplantation mouse embryos. *Roux's Arch. Dev. Biol.*
194: 445-452.
- SHAKLAI, M. & TAVASSOLI, M. (1977). A modified technique
to obtain uniform precipitation of lanthanun tracer in
extracellular space. *J. Histochem. Cytochem.* **25**: 1013-

- SHIRAYOSHI, Y.; OKADA, T.S. & TAKEICHI, M. (1983). The calcium dependent cell-cell adhesion system regulates inner cell mass formation and cell surface polarization in early mouse development. *Cell* **35**: 631-638.
- SOBEL, S. (1983 a). Cell-cell contact modulation of myosin organization in the early mouse embryo. *Dev. Biol.* **100**: 207-213.
- SOBEL, S. (1983 b). Localization of myosin in the preimplantation mouse embryo. *Dev. Biol.* **95**: 227-231.
- SOBEL, S. & ALLIEGRO, M.A. (1985). Changes in the distribution of a spectrin-like protein during developmental of the preimplantation mouse embryo. *J. Cell Biol.* **100**: 333-336.
- SPURR, A. (1969). A low-viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy. *J. Ultrastr. Res.* **26**: 31-43.
- STANLEY, K.K.; EDWARDS, M.R. & LUZIO, J.P. (1980). Subcellular distribution and movement of 5'-nucleotidase in rat cells. *Biochem. J.* **186**: 59-59.
- STANLEY, K.K.; NEWBY, A.C. & LUZIO, J.P. (1982). What do ectoenzymes do? *TIBS Abril*: 145-147.

- SUNDSTROM, B. & MORNSTAD, H. (1975). Lead citrate-containing media for use at alkaline pH: their stabilization with glucose and increased buffer strength. *Stain Technol.* **50**: 287-288.
- TAKAI, Y.; KAIBUCHI, K.; TSUDA, T. & HOSHIJIMA, M. (1985). Role of protein kinase C in transmembrane signaling. *J. Cell. Biochem.* **29**: 143-155.
- TARKOWSKI, A.K. & WROBLEWSKA, J. (1967). Development of blastomeres of mouse eggs isolated at the 4 and 8 cell stage. *J. Embryol. exp. Morphol.* **18**: 155-180.
- TELLEZ, V.; AHUMADA, A.; MURO, J.; SEPULVEDA, S. & IZQUIERDO, L. (1988). Centrifugation of 2-cell mouse ova: cytoplasm stratification and recovery. *Roux's Arch. Dev. Biol.* **197**: 360-365.
- UUSITALO, R.J. & KARNOVSKY, M.J. (1977). Surface localization of 5'-nucleotidase on the mouse lymphocyte. *J. Histochem. Cytochem.* **25**: 87-96.
- VORBRODT, A.; KONWINSKI, M.; SOLTER, D. & KOPROWSKI, H. (1977). Ultrastructural cytochemistry of membrane-bound phosphatases in preimplantation mouse embryos. *Dev. Biol.* **55**: 117-134.
- WARTIOVAARA, J.; LEHTONEN, E. & VIRTANEN, I. (1978). Lectin binding in early mouse embryos. *Med. Biol.* **56**: 393-397.

- WATSON, A.J. & KIDDER, G.M. (1988). Immunofluorescence assessment of the timing of appearance and cellular distribution of Na/K-ATPase during mouse embryogenesis. *Dev. Biol.* **126**: 80-90.
- WEST, J.D. & GREEN, J.F. (1983). The transition from oocyte-coded to embryo-coded glucose phosphate isomerase in the early mouse embryo. *J. Embryol. exp. Morphol.* **78**: 127-140.
- WILEY, L.M. (1984). Cavitation in the mouse preimplantation embryo: Na/K-ATPase and the origin of nascent blastocoele fluid. *Dev. Biol.* **105**: 330-342.
- WISHER, M.H. & EVANS, W.H. (1975). Functional polarity of the rat hepatocyte surface membrane. *Biochem. J.* **146**: 375-388.
- WU, T.C.; WAN, Y.-J.; CHUNG, A.E. & DAMJANOV, I. (1983). Immunohistochemical localization of entactin and laminin in mouse embryos and fetuses. *Dev. Biol.* **100**: 496-505.
- YAKAMURA, H. & SPINDLE, A. (1988). Stage-specific response of preimplantation mouse embryos to W-7, a calmodulin antagonist. *J. Exp. Zool.* **248**: 45-54.
- YAMASHINA, S. & KAWAI, K. (1979). Cytochemical studies on the localization of 5'-nucleotidase in the acinar cells of the rat salivary glands. *Histochem.* **60**: 255-263.

- ZIOMEK, C.A.; LEPIRE, H.; MOYNIHAN, M. & WOLF, D. (1986).
Preimplantation mouse embryos express a human placental-
like alkaline phosphatase. J. Cell Biol. 103: 488 a.
- ZUZACK, J.S. & TASCA, R.J. (1985). Lectin-induced
blockage of developmental processes in preimplantation
mouse embryos *in vitro*. Gamete Res. 12: 275-290.