

UCH-FC
MAG-B
M435

Departamento de Biología
Facultad de Ciencias
Básicas y Farmacéuticas
Universidad de Chile

**DESARROLLO DEL EMBRION
DE RATON DESPUES DE LA
DESTRUCCION DE BLASTOMEROS**

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

M. CECILIA MATTE DONOSO

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

ENERO, 1985



Facultad de Ciencias Básicas y Farmacéuticas
Universidad de Chile

INFORME DE APROBACION
TESIS DE MAGISTER

Se informa a la Comisión de Postgrado de la Facultad de Ciencias Básicas y Farmacéuticas que la Tesis de Magister presentada por la candidata

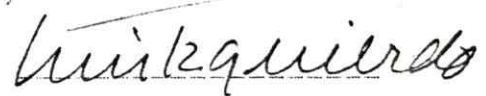
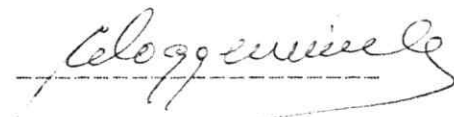
M. CECILIA MATTE DONOSO

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

Directores de Tesis:

Carlos Doggenweiler

Luis Izquierdo

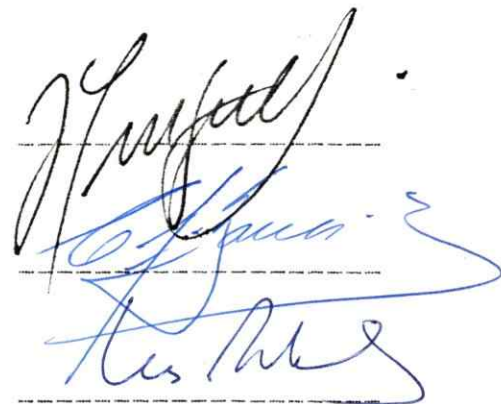


Comisión informante de Tesis:

José Minguel

Claudio Barros

Luis Roblero



A mis padres y hermanos

A Jenaro

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi profundo agradecimiento a todas las personas que me ayudaron y brindaron su apoyo durante el desarrollo de esta tesis:

Al Dr. Carlos Doggenweiler, por haberme acogido en su laboratorio, orientado y apoyado durante el desarrollo de este trabajo.

Al Dr. Luis Izquierdo, por su valiosa y generosa dirección la que me permitió la realización de este trabajo de tesis.

Al Dr. Juan Fernández, por su ayuda, comprensión y apoyo.

A mis amigos del laboratorio: Sole F., Tere, M. Inés, Vero, Ani, Margarita, Víctor, Luis y Juan Muro quienes con su colaboración y afecto hicieron gratos mis días de trabajo.

A mi amiga Sole Sepúlveda, le agradezco todo, su amistad, apoyo, ayuda desinteresada y haber compartido conmigo todos los años de estudio en la Facultad.

INDICE

	pág.
Agradecimientos	ii
Indice	iii
Resumen	1
Summary	3
Introducción	5
Material y métodos	12
Resultados	16
- Desarrollo de embriones después de la destrucción de blastómeros	16
- Destrucción de un blastómero de un embrión de 2 células	18
- Destrucción de 2 blastómeros de un embrión de 4 células	18
- Destrucción de un blastómero de los estados de 8 y 16 células	18
- Destino de los blastómeros destruidos	20
- Figuras	22
Discusión	38
- Capacidad de regulación	38
- Ubicación de los blastómeros destruidos en el embrión desarrollado	39
- Reparación del embrión dañado	40
- Información posicional	42
Conclusiones	44
Referencias	45

RESUMEN

El modelo adentro-afuera propone que la diferenciación de los blastómeros hacia masa celular interna o trofoblasto depende de su ubicación, central o periférica, en la mórula cuando ésta se transforma en blastocisto. El modelo interpreta el proceso de regulación embrionica que se observa al cultivar blastómeros aislados de los primeros estados de desarrollo, como cambios en las relaciones celulares, sin tener en cuenta que la pérdida de contactos celulares puede aportar información posicional. Si así fuera, podría tener un efecto diferente aislar un blastómero de un embrión que destruir un blastómero sin separarlo de los blastómeros vecinos. En estados más avanzados del desarrollo - desde la compactación del embrión de 8 células hasta la transición de mórula a blastocisto - los blastómeros aislados han perdido la capacidad de regular, pero dicha capacidad se conserva por el embrión completo, como lo demuestra su desarrollo hasta el estado adulto cuando se agrega con otro.

En este trabajo se investiga el efecto que tiene sobre el desarrollo del embrión, la destrucción de blastómeros en distintos estados de desarrollo. Con este objeto se estudia la proporción de embriones operados que se desarrollan normalmente y el proceso de reparación de la parte destruida.

Las condiciones experimentales fueron: destrucción de un

blastómero de un estado de 2 células (1/2); destrucción de dos blastómeros de un estado de 4 células (2/4); destrucción de un blastómero de una mórula de 8 células (1/8); destrucción de un blastómero periférico de una mórula de 16 células (1/16). Luego del tratamiento algunos embriones se fijaron de inmediato mientras otros fueron cultivados por tiempos variables antes de la fijación, para ser estudiados con el microscopio electrónico. De estos, algunos fueron procesados para la determinación citoquímica de fosfatasa alcalina.

Se observó que la capacidad de regulación de los embriones operados no disminuye en estados más avanzados y que la reparación en la mórula procede por el avance de las células periféricas vecinas a la destruida restableciéndose las relaciones entre las membranas plasmáticas que estaban adosadas, tal como se reconocen por su actividad de fosfatasa alcalina. De estos resultados se puede concluir: 1) que los restos celulares no aportan información posicional, 2) que a partir de la compactación los contactos celulares contienen información posicional, 3) que la regionalización de las membranas plasmáticas, reconocida por actividad enzimática, se conserva y 4) que en la mórula de 16 células se ha perdido la equivalencia morfogénica entre blastómeros internos y externos.

SUMMARY

The inside-outside model submits that the central or peripheral localization of a blastomere in the morula determines its differentiation into inner cell mass or trophoblast. This model interprets the process of embryonic regulation, of blastomeres isolated during the first stages of development, as a change in the cell microenvironment but disregards cellular contacts that may contain positional information. If this is so, a different result could be obtained by isolating a blastomere or destroying a blastomere without dissociating it from adjoining ones. In later stages - from the 8-cell embryo to the transition from morula to blastocyst- isolated blastomeres lose their regulatory capacity, but the whole embryo preserves it as shown by aggregated embryos, which form viable chimaeras.

In this work we studied the effect produced by the destruction of a blastomere at different developmental stages on the regulatory ability of the embryo.

The following experimental conditions were used: destruction of one blastomere of a 2-cell embryo (1/2); destruction of two blastomeres of a 4-cell embryo (2/4); destruction of one blastomere of a 8-cell embryo (1/8); destruction of a peripheral blastomere of a 16-cell embryo (1/16). After the treatment, some embryos were fixed while others were cultured for variable times before fixation. The material was processed for electron microscopy and some embryos were processed for the

cytochemical demonstration of alkaline phosphatase.

It was observed that the regulatory capacity of the operated embryos was not diminished in advanced stages and that morula reparation proceeded by means of the peripheric cells adjoining the destroyed one; thus reestablishing the relations between membranes that were apposed, which are recognized by their alkaline phosphatase activity.

From these results we conclude that:

1. the cellular residues do not contain positional information;
2. from compaction onwards, the cellular contacts contain positional information;
3. the regionalization of the plasma membranes, recognized by enzymatic activity, remains and
4. the morphogenetic equivalence between internal and external blastomeres is lost at the 16-cell morula.

INTRODUCCION

Hasta el estado de 8 células, los blastómeros del embrión de ratón son esféricos y de apariencia semejante; más tarde durante el mismo estado se aplanan unos contra otros y aumentan así su área de contacto. Este fenómeno se ha denominado compactación (Ducibella & Anderson, 1975). La transformación de la mórula en blastocisto requiere el sellamiento por uniones estrechas de los blastómeros periféricos del embrión, creándose la condición necesaria, indispensable para la determinación celular (Ducibella & Anderson, 1979; Fernández & Izquierdo, 1980). Simultáneamente, los blastómeros empiezan a desarrollar vacuolas intracelulares y el contenido de estas vacuolas se expulsa hacia el espacio intercelular, donde se forman lagunas que luego confluyen constituyendo la cavidad blastocélica (Wiley & Eglitis, 1981). Este contenido no corresponde al microambiente de las células internas, como lo demuestra el desarrollo de un blastocisto dentro de la cavidad blastocélica de un blastocisto gigante (Pedersen & Spindle, 1980). La formación de cavidad blastocélica ocurre cuando el embrión de ratón está compuesto aproximadamente de 24 células (Fernández & Izquierdo, 1980).

En mamíferos, los resultados experimentales de aislamiento de blastómeros y fusión de embriones han revelado tan extrema capacidad de regulación que se pone en duda la existencia de un plan preformado de desarrollo, a menos que sea muy lábil. Entendemos aquí por regulación

embriónica el proceso que restaura el desarrollo normal de un embrión perturbado experimentalmente (Izquierdo, 1977).

Se ha observado que al cultivar un blastómero aislado de un embrión de ratón en el estado de 2 células - esto es, la mitad de un embrión - se desarrollan escasos blastocistos de forma normal y de tamaño reducido, numerosas vesículas trofoblásticas y raramente masas celulares compactas (Tarkowski, 1959; Mulnard, 1965). Esta información fue interpretada primeramente en el sentido de que habría un plan de polaridad o simetría en el huevo antes de iniciarse la segmentación puesto que si el plano de segmentación no coincidiera con el de simetría, los constituyentes celulares podrían repartirse desigualmente entre los dos primeros blastómeros y uno de ellos recibir, por ejemplo, todos o la mayoría de los factores responsables de la formación de trofoblasto. De esta interpretación debiera inferirse que si se aíslan y cultivan ambos blastómeros de un embrión se desarrollarían estructuras complementarias, como masas celulares y vesículas trofoblásticas en el caso extremo, o más frecuentemente, blastocistos con diversas proporciones de trofoblasto respecto a masa celular interna. Sin embargo, en la gran mayoría de los casos, ambos blastómeros dan origen a formas vesiculares con masa celular escasa o ausente (Mulnard, 1965). También debiera inferirse de la interpretación propuesta que de un blastómero aislado de embriones de 4 a 8 células, o sea la cuarta y la octava parte de un embrión, deberían desarrollarse estructuras más

extremas y específicas que las desarrolladas de la mitad de un embrión. Sin embargo, en todos los casos se desarrolla una elevada proporción de formas vesiculares (Tarkowski & Wróblewska, 1967; Cerisola & Izquierdo, 1969). Por lo tanto, las experiencias señaladas de regulación después del aislamiento de blastómeros, no apoyan la idea de un plan de polaridad o simetría anterior a la segmentación, al menos en ratón.

El análisis de estos resultados y en especial, la comparación de porcentaje de vesículas trofoblásticas derivadas de un blastómero aislado de un embrión de 2 células (1/2 embrión), de 4 células (1/4 de embrión) y de 8 células (1/8 de embrión) sugirió a Tarkowski y Wróblewska (1967) el modelo denominado adentro-afuera. Este modelo propone que las células centrales, por ser centrales, se diferenciaron en masa celular interna y las periféricas, por ser periféricas, se diferenciaron en trofoblasto. El modelo ha sido analizado con experimentos sistemáticos de agregación de embriones (Hillman, Sherman & Graham, 1972) y del conjunto de estos resultados (véase Denker, 1983) la mayoría de los autores ha concluido que antes de la diferenciación evidente de masa celular interna y trofoblasto, los blastómeros no están determinados. Las discrepancias se plantean sobre cuanto antes ocurre la diferenciación de los blastómeros y en este sentido debe destacarse que en numerosos trabajos de Johnson y colaboradores (Johnson, 1981) se sugiere que la diferenciación se inicia durante la transición de 8 a 16

células, basándose en la polarización que se manifiesta cuando estas células se cultivan aisladas o agregadas en distintas combinaciones.

El modelo adentro-afuera ha pretendido explicar tanto el proceso normal de diferenciación como la regulación embrionaria, atribuyéndolos a diferencias en el microambiente celular. Además excluye la existencia de un plan preformado de desarrollo y no tiene en cuenta que los contactos celulares podrían contener información posicional. Esta posibilidad, sin embargo, no debiera ignorarse, ya que desde el estado de 4 a 8 células, cuando todas ellas son aun periféricas, se establecen relaciones intercelulares expresadas en la regionalización de la membrana celular (Izquierdo, López & Marticorena, 1980; Izquierdo & Ebensperger, 1982), compactación (Ducibella & Anderson, 1975) y la formación de uniones celulares (Lo & Gilula, 1979; McLachlin, Caveney & Kidder, 1983). Si en el curso de la segmentación se generara información posicional a través de los contactos celulares, podría tener distinto efecto aislar un blastómero de un embrión de ratón que destruir uno de ellos sin separarlo, lo cual no ha sido hasta ahora analizado en forma sistemática.

En estados más avanzados de desarrollo - desde la compactación del embrión de 8 células hasta la transición de mórula a blastocisto - el problema de determinación o regulación se plantea en terminos diferentes porque los blastómeros aislados han perdido la capacidad de regular y

sin embargo, dicha capacidad se conserva por el embrión completo, como lo demuestra el desarrollo hasta el estado adulto de blastómeros, externos o internos, agregados de mórulas de 16 células (Ziomek, Johnson & Handyside, 1982) o de mórulas completas agregadas (McLaren, 1976). Hasta este estado el destino de los blastómeros es aun lábil y cualquier blastómero podría dar origen a masa celular interna si en el momento adecuado se encuentra rodeado por otras células (Kelly, 1977; Ziomek, Johnson & Handyside, 1982). Pero el desarrollo exitoso de quimeras podría atribuirse a un reordenamiento de los blastómeros, los que se asociarían por afinidad morfogenética sin que hubiera modificación del destino original. Esta posibilidad, en embriones con más de 8 blastómeros, no ha podido descartarse totalmente con experimentos de marcación celular (Denker, 1983). Por lo tanto, podría suponerse que la destrucción de ciertos blastómeros en estados avanzados, por alterar las relaciones intercelulares, interferiría efectivamente con la información posicional de las células y en consecuencia, con la morfogénesis del blastocisto.

En este trabajo se investiga el efecto que tiene sobre el desarrollo del embrión la destrucción controlada de sus blastómeros en los estados de 2, 4, 8 y 16 células. Se observa en especial la aparición de uniones celulares o cavidad blastocélica, ya que dichos fenómenos los interpretaremos aquí como signos del desarrollo de una mórula o de un blastocisto normal aunque no se ha demostrado que el sellamiento periférico y la blastulación

sean condición suficiente de un desarrollo normal, se ha establecido que no hay formación de blastocisto cuando no ha ocurrido previamente el sellamiento periférico y que no hay diferenciación de trofoblasto cuando no hay blastulación. Particularmente en mórulas compactadas de 16 células, se estudia el efecto que tiene sobre el desarrollo del embrión la destrucción de uno de sus blastómeros periféricos.

Si se observara que la destrucción de ciertos blastómeros produce defectos reproducibles, concluiríamos que en esta etapa las células están determinadas y que la regulación por agregación de embriones puede explicarse como un reordenamiento espacial producido por afinidad de sus blastómeros. En cambio, si se observara que la capacidad de regulación, aunque sea disminuida, se conserva después de la destrucción de blastómeros, examinaremos en mórulas compactadas la contribución a la reparación del daño que hacen las células vecinas a la destruida, procurando distinguir entre las células centrales y periféricas para determinar su equivalencia. Esta distinción puede facilitarse utilizando una demostración citoquímica de fosfatasa alcalina, que puede servir de molécula marcadora, aunque la función de esta enzima durante el clivaje no se ha dilucidado (Izquierdo, López & Marticorena, 1980). Con esta técnica, pueden distinguirse las células internas, cuya membrana plasmática está enteramente marcada por la actividad enzimática, de las células periféricas que solo presentan marcación en las membranas que se encuentran en

contacto con otras y no en las membranas expuestas al exterior del embrión. Si la reparación ocurriera indiferentemente con contribución de células internas o periféricas, podríamos suponer que la regionalización de la membrana, la compactación y el establecimiento de uniones intercelulares funcionales no procuran información posicional - o esta no es indispensable - y por lo tanto, concluiríamos que los blastómeros internos y periféricos en la mórula son equivalentes.

MATERIAL Y METODOS

Se utilizaron 194 embriones obtenidos por ovulación espontánea de hembras de ratón de la cepa Suizo-Rockefeller. La cópula se reconoció por la presencia de tapón vaginal y la edad de los embriones se determinó tomando como tiempo cero de desarrollo la hora cero del día en que se reconoció el tapón. Se utilizaron 58 hembras fecundadas, las que se sacrificaron mediante dislocación cervical e inmediatamente se privaron de los oviductos. Estos se lavaron brevemente en medio de cultivo descrito por Biggers (Biggers, Whitten & Whittingham, 1971) y los embriones se obtuvieron perfundiendo con el mismo medio (Tabla I).

Una vez obtenidos los embriones se procedió a la destrucción de uno o dos de sus blastómeros utilizando un micromanipulador (Lin, 1967; Lin, 1971; Babinet, 1980). Este consiste en dos palancas operadas con movimientos reducidos mecánicamente. Una de ellas esta unida a una micropipeta que se usa para mantener fija la posición del embrión mediante succión. Estas micropipetas pueden ser hechas a mano con capilares de vidrio de 0.5 mm de diámetro externo y 30 μ m de diámetro interno. La otra palanca esta unida a un capilar de vidrio de un diámetro aproximado de 1 μ m, que se utiliza para destruir el blastómero. Este capilar se obtiene estirando una micropipeta en una microfragua (Industrial Science Associates, Inc.).

Después de realizada la destrucción de los blastómeros, que se reconoció por la citolización observada con el

microscopio estereoscópico, los embriones fueron puestos en gotas de medio Biggers bajo aceite mineral a 37 C, pH 7.2 en una mezcla 5 % CO₂ en aire. El cultivo se mantuvo entre 0 y 50 horas.

Al completarse el cultivo, los embriones fueron fijados en glutaraldehído al 3 % (p/v) en amortiguador cacodilato de Sodio 0.1 M, pH 7.4, durante 60 minutos. Luego se lavaron en amortiguador 0.05 M realizando 3 cambios y se postfijaron en tetróxido de Osmio al 1 % (p/v), en el mismo amortiguador, durante 60 minutos a temperatura ambiente y en obscuridad. Después de lavados en el amortiguador, los embriones se deshidrataron en concentraciones crecientes de acetona [30, 50, 70 y 90 % (v/v)] durante 15 minutos en cada una y finalmente en acetona de 100 % por 30 minutos. Se incluyeron en acetona mezclada con resina de baja viscosidad (Polyscience; Spurr, 1969), en proporción de 1:1 y 2:1 (v/v) durante 15 minutos y en resina pura por 30 minutos para finalmente ser polimerizados en cápsulas de inclusión durante 24 horas a 70 C.

En otra serie experimental se procesó embriones para la demostración citoquímica de fosfatasa alcalina de acuerdo con el método de Mayahara, Hirano, Saito y Ogawa (1967) adaptado por Izquierdo, López y Marticorena (1980).

Para observar los embriones al microscopio electrónico se hicieron cortes finos (entre 600-800 Å de espesor) con un ultramicrotomo Porter-Blum MT 2-B y se recibieron en grillas de cobre de 200 mesh. El contraste adecuado se obtuvo

tificando los especímenes durante 3 minutos en acetato de uranilo al 4 % en metanol absoluto a temperatura ambiente. Se los lavó en agua bidestilada y se los tiñó durante 3 minutos en citrato de plomo al 0.25 %. Luego fueron lavados en agua bidestilada, KOH 0.02 M y metanol al 100%. Los cortes fueron observados en un microscopio electrónico Philips 300.

Como controles se cultivaron simultáneamente, en idénticas condiciones, embriones intactos de la misma edad.

El efecto de la destrucción de uno o dos blastómeros del embrión preimplantacional de ratón se estudió en las siguientes condiciones experimentales: destrucción de un blastómero de un estado avanzado de 2 células (1/2); destrucción de dos blastómeros de un estado avanzado de 4 células (2/4); destrucción de un blastómero de una mórula compactada de 8 células (1/8); destrucción de un blastómero periférico de una mórula de 16 células (1/16). En el caso de los medios embriones se utilizaron estados avanzados de 2 y 4 células, con el propósito de evitar una perturbación del o de los blastómeros hermanos debida a la presencia del puente citoplasmático al comienzo de cada división. El criterio que se utilizó para diferenciar los estados de 8 y 16 células fue el menor tamaño de los blastómeros y el mayor grado de compactación del embrión de 16 células.

TABLA I

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

NaCl	5,540	g/l
KCl	0,356	g/l
KH ₂ PO ₄	0,162	g/l
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0,294	g/l
NaHCO ₃	2,106	g/l
Na piruvato	0,028	g/l
Ca Lactato	0,527	g/l
Na Lactato	3,680	ml/l
Glucosa	1,000	g/l
Streptomycina	0,050	g/l
Rojo fenol	0,005	g/l
Albúmina	4,000	g/l
Penicilina	100.000	UI/l

RESULTADOS

Desarrollo de embriones después de la destrucción de blastómeros

Después de destruir medio embrión del estado de 2 células (1/2), de un total de 24 embriones 4 fueron fijados inmediatamente, antes de 1 minuto (tiempo 0) y los 20 restantes fueron cultivados por 42 horas obteniéndose desarrollo semejante a los controles en un 95%.

Después de destruir medio embrión del estado de 4 células (2/4), de un total de 36 embriones 7 fueron fijados a tiempo 0 y los 29 restantes fueron cultivados por 29, 48 y 50 horas obteniéndose desarrollo semejante a los controles en 100%, 85.7%, y 83.3%, respectivamente, con un valor promedio de 89%.

Después de destruir un blastómero de un embrión de 8 células (1/8), de un total de 49 embriones 4 fueron fijados a tiempo 0 y los 45 restantes fueron cultivados por 1, 15 y 18 horas, obteniéndose desarrollo semejante a los controles en 100%, 84.6% y 75.9%, respectivamente, con un valor promedio de 80%.

Después de destruir un blastómero de un embrión de 16 células (1/16), de un total de 83 embriones 5 fueron fijados a tiempo 0 y los 78 restantes fueron cultivados por 1, 5, 13, 14, 16, 17, 20 y 22 horas obteniéndose desarrollo semejante a los controles en 75%, 93.3%, 73%, 76.9%, 100%, 50%, 100% y 100%, respectivamente, con un valor promedio de 80%.

En la tabla II se resumen los resultados en términos de porcentaje de embriones de cada serie experimental que alcanzaron desarrollo semejante a los controles. Debe tenerse presente que no hemos contado separadamente blastocistos y vesículas trofoblásticas por que con el microscopio no hemos observado ningún caso en que sea evidente la ausencia de masa celular interna aunque ésta suela encontrarse aparentemente disminuida.

TABLA II. Desarrollo de embriones después de la destrucción de blastómeros.

Estado (h de de sarrollo)	N° de blas tómeros da ñados	Total de embriones tratados	Horas de cultivo	N° total de horas (esta do final)	Desarrollados	
					normalmente/ cultivados totales	(%)
2 (42)	1	4	0	42	-	-
2 (42)	1	20	42	84 (mórulas y blastocistos)	19/20	19/20
		24				(95%)
4 (57)	2	7	0	57	-	-
4 (58)	2	9	29	87 (mórulas)	9/9	9/9
4 (57)	2	14	48	105 (blastocistos)	12/14	12/14
4 (57)	2	6	50	107 (blastocistos)	5/6	5/6
		36				26/29 (89%)
8 (65)	1	4	0	65	-	-
8 (65)	1	3	1	66 (mórulas)	3/3	3/3
8 (66)	1	13	15	81 (blastocistos)	11/13	11/13
8 (64)	1	29	18	82 (blastocistos)	22/29	22/29
		49				36/45 (80%)
16 (65)	1	5	0	65	-	-
16 (65)	1	4	1	66 (mórulas)	3/4	3/4
16 (66)	1	15	5	71 (mórulas)	14/15	14/15
16 (65)	1	26	13	78 (mórulas y blast.)	19/26	19/26
16 (66)	1	13	14	80 (mórulas y blast.)	10/13	10/13
16 (65)	1	4	16	81 (blastocistos)	4/4	4/4
16 (65)	1	6	17	82 (blastocistos)	3/6	3/6
16 (65)	1	4	20	85 (blastocistos)	4/4	4/4
16 (65)	1	6	22	87 (blastocistos)	6/6	6/6
		83				63/78 (80%)

Destrucción de un blastómero de
un embrión de 2 células (1/2)

En los embriones a tiempo 0 se observa que el blastómero destruido se desintegra y que el resto de su membrana plasmática se vesicula manteniendo cierta continuidad, pero perdiendo su adherencia al blastómero hermano (Figs. 1 y 2). El blastómero intacto, que conserva las estructuras características del estado de dos células, se desarrolla en cultivo produciendo una mórula compactada (Figs. 3 a 6).

Destrucción de 2 blastómeros de
un embrión de 4 células (2/4)

Cuando se destruyen dos blastómeros de un embrión de 4 células ocurre lo mismo que en el caso anterior. A tiempo 0 se observa que los blastómeros destruidos se desintegran y los restos de sus membranas no permanecen adheridas a los blastómeros hermanos (Figs. 7 y 8). De estos blastómeros intactos, los cuales conservan las estructuras características del estado de 4 células, se puede desarrollar un blastocisto completo (Figs. 9 a 12).

Destrucción de un blastómero de los
estados de 8 y 16 células (1/8 y 1/16)

En los estados normales de 8 y 16 células se observa regionalización, compactación y uniones estrechas puntuales. Al romper uno de los blastómeros externos y cultivar el embrión, se observa que la membrana del blastómero destruido no permanece adherida a las células intactas (Figs. 13 a

16). Para distinguir entre los blastómeros internos y externos del embrión de 16 células hemos recurrido a la demostración citoquímica de fosfatasa alcalina. A tiempo 0 se puede observar que la membrana de la célula interna, adyacente a la célula destruida, conserva actividad de fosfatasa alcalina a pesar de encontrarse ahora expuesta al exterior (Figs. 17 y 18). El espacio que ocupaba el blastómero destruido es llenado por el desplazamiento de las células periféricas vecinas (Figs. 19 y 20). Luego, estas células emiten prolongaciones que entrelazándose las aproximan (Figs. 21 a 23). Seis horas después se observa el contacto establecido entre los blastómeros periféricos. Las membranas adosadas dan reacción positiva pero aun es posible distinguir, por la intensidad de la reacción, una región más interna con mayor actividad de fosfatasa alcalina de una región más periférica sin actividad de fosfatasa alcalina. Estas observaciones sugieren que la región que antes de la destrucción estuvo adosada es distinta de la región que se adosó en el curso del proceso de reparación (Figs. 24 y 25). Las prolongaciones se entrelazan sellando las membranas de los blastómeros adyacentes (Figs. 26 y 27), lo cual sugiere que juegan un rol en la aproximación de las membranas de los blastómeros periféricos próximos al destruido. Una vez ocurrida la reparación, prosigue el desarrollo dando origen a blastocistos completos (Figs. 28 a 30). Los entrelazamientos son más notables en la reparación cuando se destruye 1/16 que cuando se destruye 1/8; posiblemente

porque en este último caso recién ha ocurrido la compactación (Figs. 31 y 32).

Destino de los blastómeros destruidos

Con respecto a la ubicación de los restos de los blastómeros destruidos, se observó que independientemente del estado en el cual hayan sido destruidos, siempre permanecieron adheridos a la parte externa del embrión; su ubicación no fue constante respecto de la masa celular interna (Figs. 9, 11, 28 y 31).

Desde el momento de la destrucción celular ocurre la modificación de gran parte de los organelos y no es posible reconocer lisosomas, complejo de Golgi, componentes del citoesqueleto ni retículo endoplásmico (Figs. 14, 33 y 34).

La membrana plasmática se desintegra y forma vesículas membranosas, las que permanecen hasta por lo menos 48 horas después de la destrucción celular (Figs. 12 y 33). Lo mismo ocurre con la envoltura nuclear, permaneciendo el nucleólo como una estructura densa (Fig. 30).

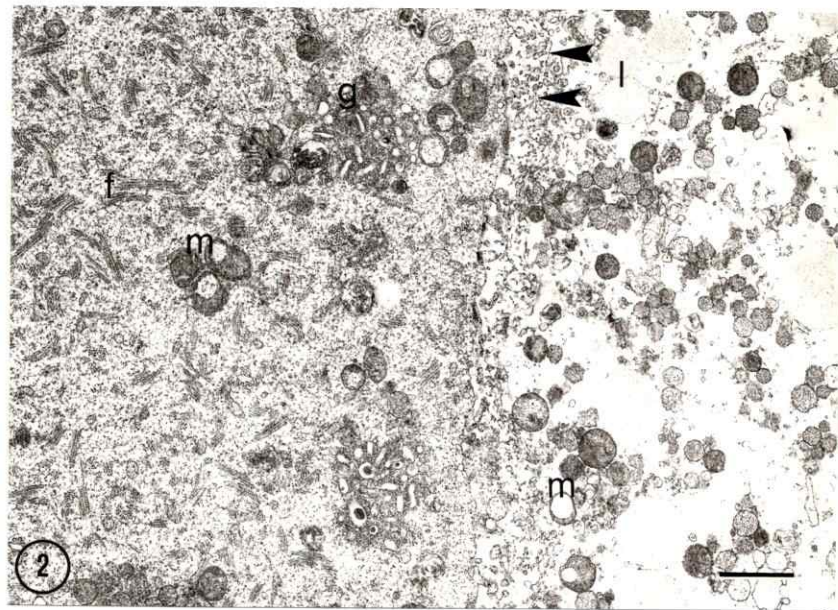
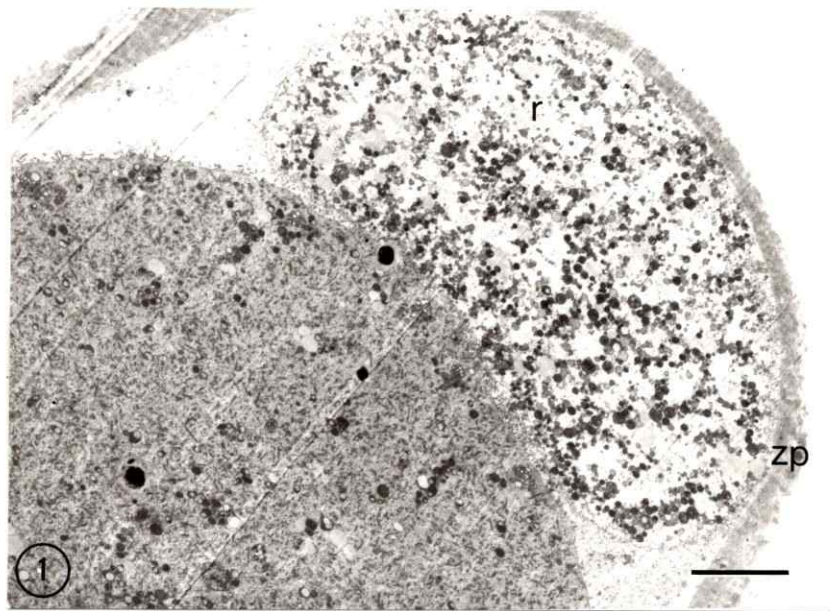
Es posible reconocer mitocondrias desintegradas desde tiempo 0 hasta por lo menos 48 horas después de la destrucción celular (Figs. 12, 33 y 36). Ocasionalmente también es posible reconocer cuerpos multimembranosos durante el mismo lapso (Fig. 12). Los cuerpos cristaloides están estructurados a tiempo 0 pero pierden su arreglo estructural antes de 3 horas desde la destrucción celular (Figs. 34 y 35). Las vesículas lipídicas se mantienen

aparentemente intactas hasta por lo menos 48 horas después de ocurrida la destrucción celular (Fig. 10).

Figuras 1 y 2. Destrucción de uno de los 2 primeros blastómeros y fijación inmediata. En el blastómero intacto, se observa citoplasma con material fibrilar (f), mitocondrias (m), complejo de golgi (g) y en la membrana plasmática se reconocen microvellosidades. En el blastómero destruido (r) se observa gotas de lípidos (l), mitocondrias (m) y otros componentes que han perdido su morfología normal. La membrana plasmática del blastómero destruido (puntas de flecha) se ha vesiculado pero aun conserva cierta continuidad. Ambos blastómeros están contenidos en la zona pelúcida (zp).

Barra Fig. 1 representa 5 μ m

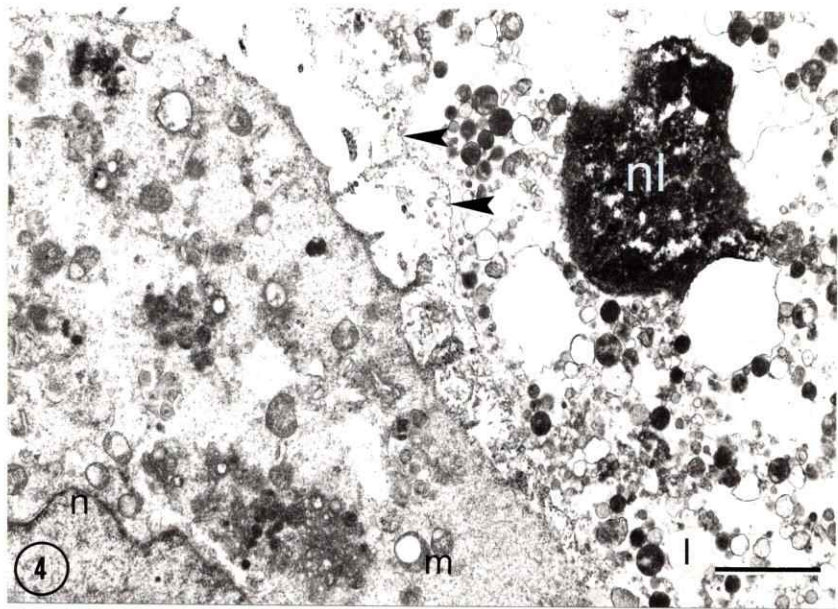
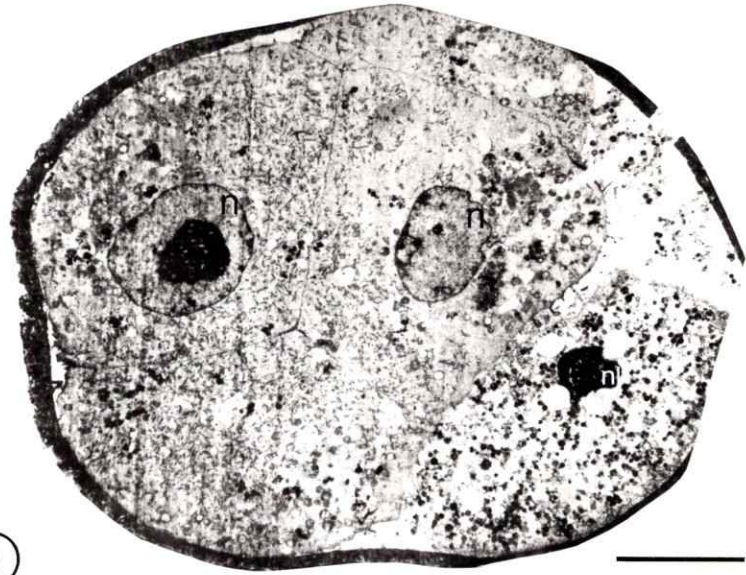
Barra Fig. 2 representa 1 μ m



Figuras 3 y 4. Destrucción de uno de los 2 primeros blastómeros, cultivo por 42 horas y fijación. En los blastómeros intactos se observan los componentes normales de un estado de mórula compactada: núcleo (n), mitocondrias (m), membrana plasmática con microvellosidades. En el blastómero destruido se reconoce restos de membrana plasmática (puntas de flecha), nucléolo (nl), gotas de lípidos (l) y cuerpos densos que pueden corresponder a restos de mitocondrias.

Barra Fig. 3 representa 10 μ m

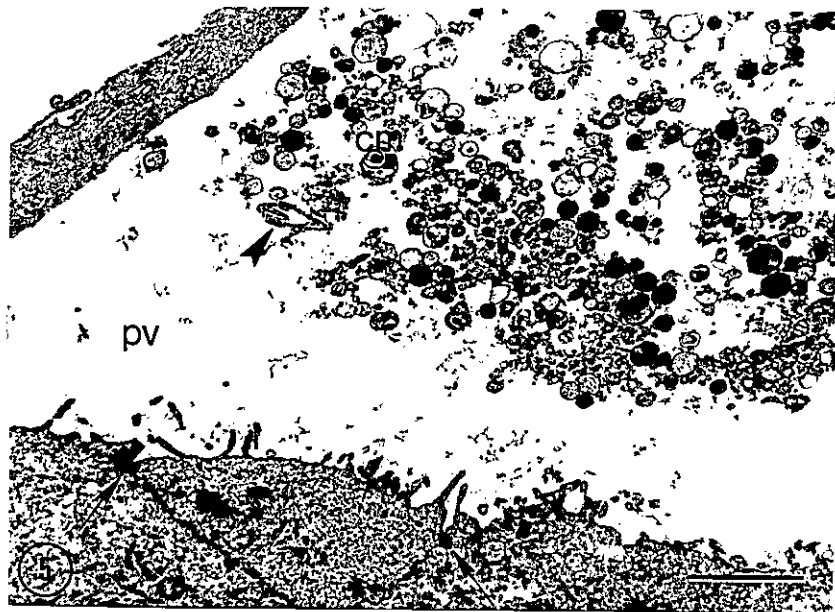
Barra Fig.4 representa 2 μ m.



Figuras 5 y 6. Destrucción de uno de los 2 primeros blastómeros, cultivo por 42 horas y fijación. Se observa el sellamiento entre blastómeros periféricos (flechas), espacio perivitelino (pv). En el blastómero destruido se observa cuerpos multimembranosos (cm) y una sección de la cola del espermio (punta de flecha).

Barra Fig. 5 representa 2 μ m

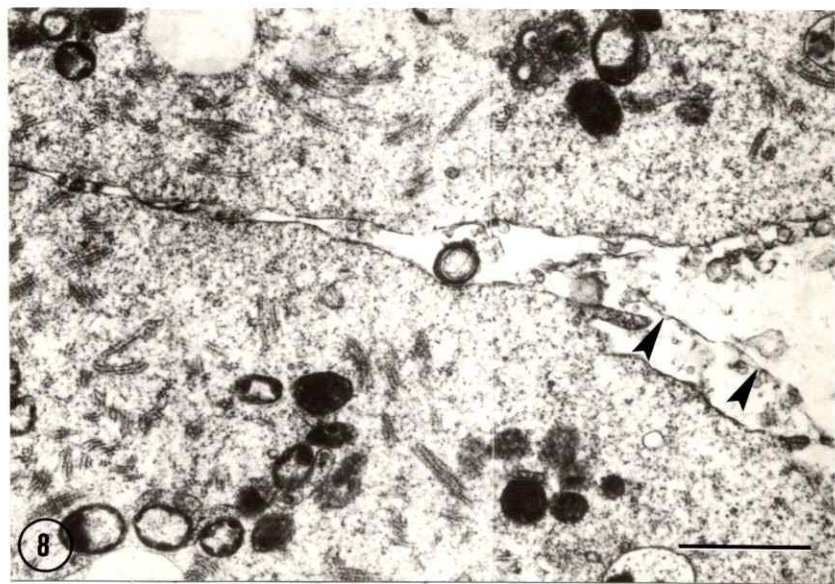
Barra Fig. 6 representa 0.5 μ m



Figuras 7 y 8. Destrucción de dos de los 4 primeros blastómeros y fijación. Los blastómeros intactos presentan las estructuras características del estado de cuatro células. Obsérvese el contacto entre los blastómeros y disminución del espacio entre ellos (flechas). Entre los restos de los blastómeros destruidos se reconoce la membrana plasmática vesiculosa (puntas de flecha).

Barra Fig. 7 representa 10 μ m

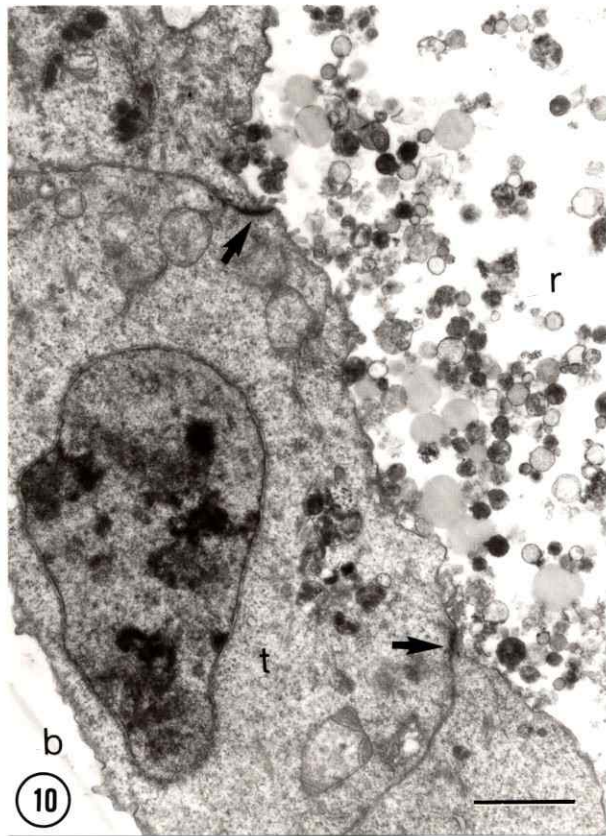
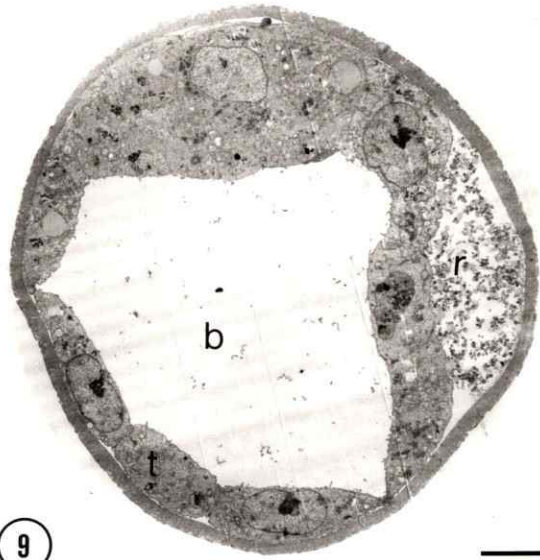
Barra Fig. 8 representa 1 μ m.



Figuras 9 y 10. Destrucción de dos de los 4 primeros blastómeros, cultivo por 48 horas y fijación. Obsérvese blastocisto con restos de blastómeros destruidos (r) en el espacio perivitelino. Cavidad blastocélica (b), células trofoblásticas (t) selladas entre si (flecha).

Barra Fig. 9 representa 10 μ m

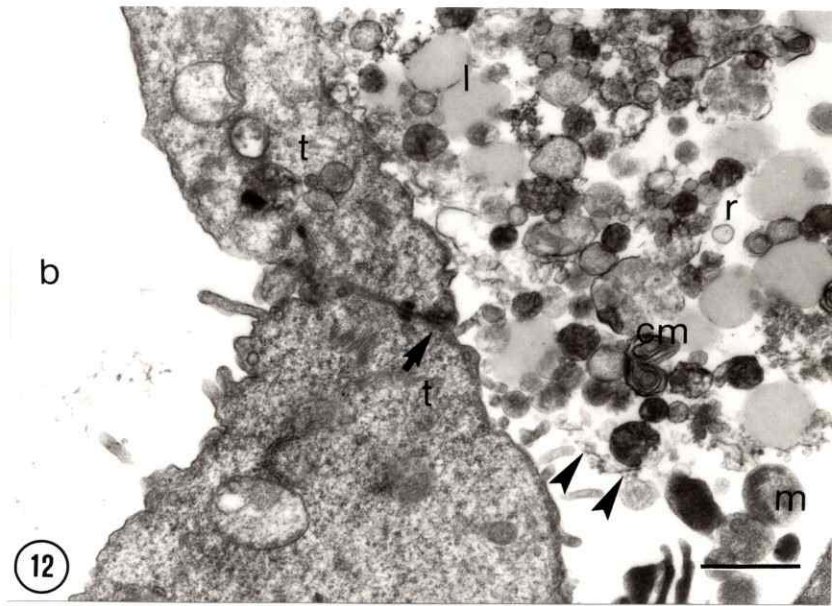
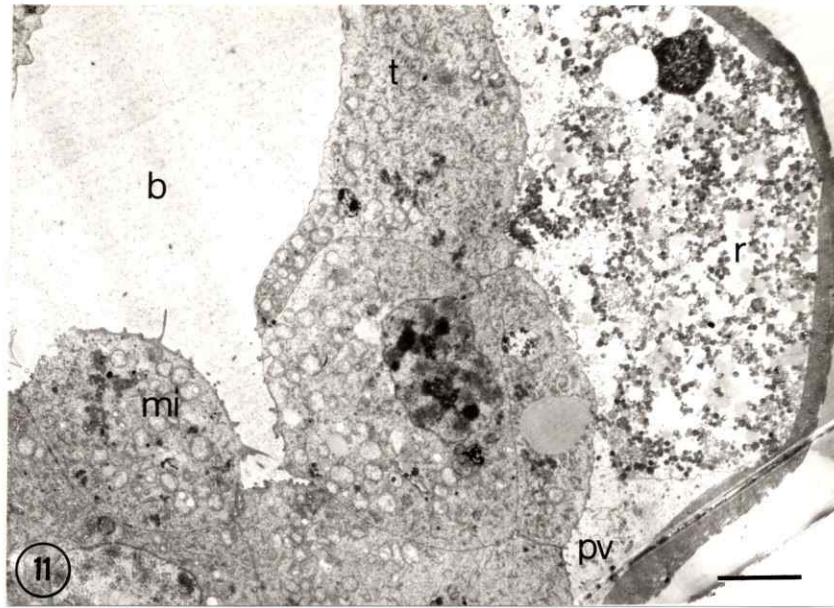
Barra Fig. 10 representa 2 μ m



Figuras 11 y 12. Destrucción de dos de los 4 primeros blastómeros, cultivo por 48 horas y fijación. Obsérvese blastocisto con restos de blastómeros destruidos (r) en el espacio perivitelino (pv). Cavidad blastocélica (b), células trofoblásticas (t) selladas entre si (flechas), células de masa celular interna (mi). En el blastómero destruido obsérvese cuerpos multimembranosos (cm), gotas de lípidos (l) y cuerpos densos que pueden corresponder a restos de mitocondrias (m). La membrana plasmática (puntas de flecha) se ha vesiculado pero aun conserva cierta continuidad.

Barra Fig. 11 representa 5 um

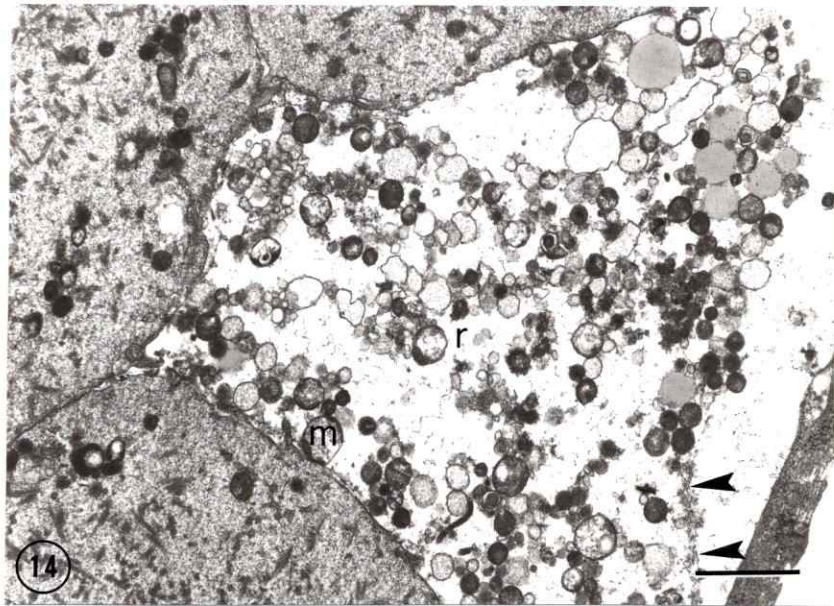
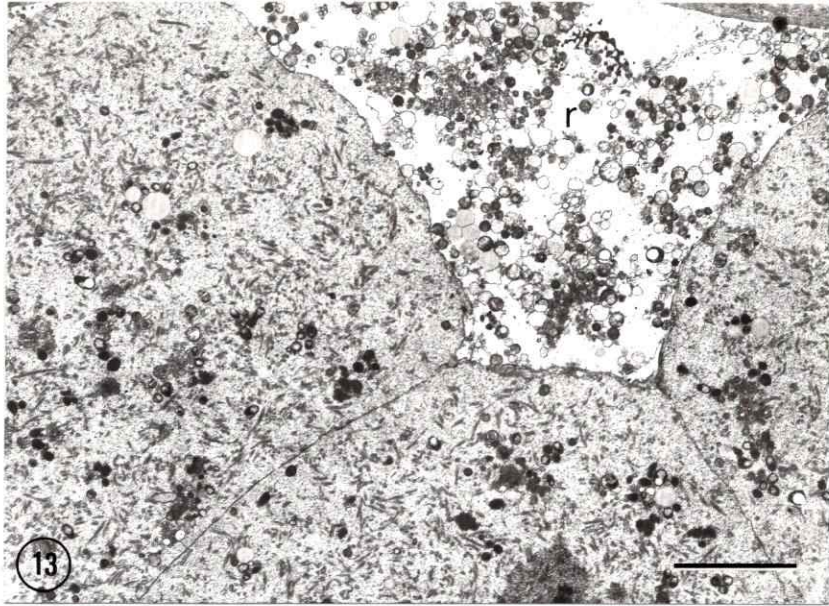
Barra Fig. 12 representa 1 um



Figuras 13 y 14. Destrucción de uno de los 16 primeros blastómeros y fijación inmediata. Los blastómeros intactos se observan compactados y pueden apreciarse entre ellos los restos (r) del blastómero destruido. Entre los restos puede reconocerse mitocondrias (m) y membrana plasmática (puntas de flecha).

Barra Fig. 13 representa 10 μ m

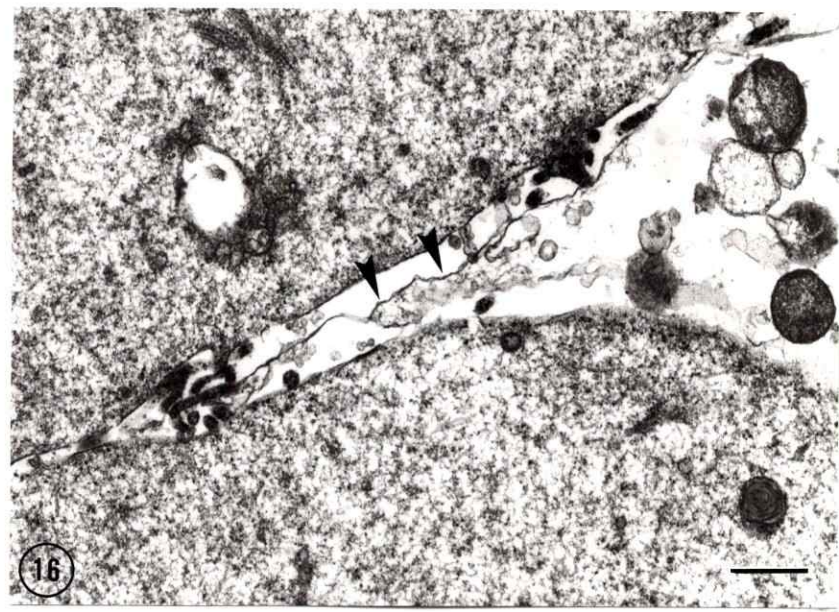
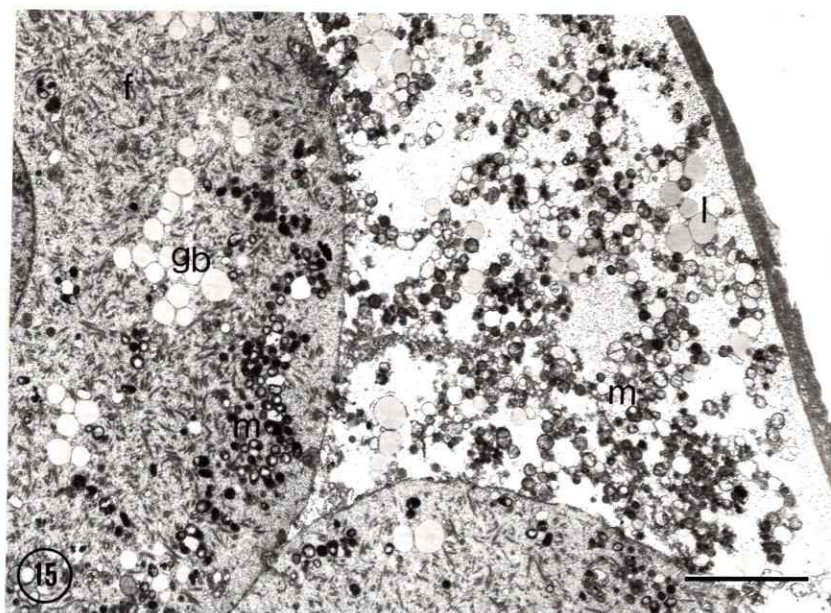
Barra Fig.14 representa 2 μ m



Figuras 15 y 16 . Destrucción de uno de los 16 primeros blastómeros y fijación inmediata. Se observa el sellamiento entre blastómeros intactos y en ellos se encuentran gotas precursoras de contenido blastocélico (gb), mitocondrias (m), material fibrilar (f). Entre los restos del blastómero destruido se reconocen mitocondrias (m), lípidos (l) y membrana plasmática (puntas de flecha).

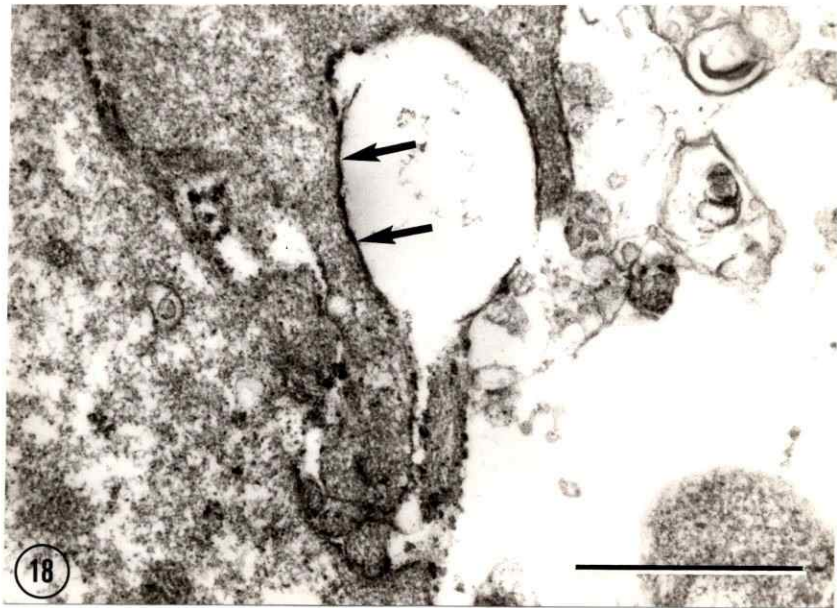
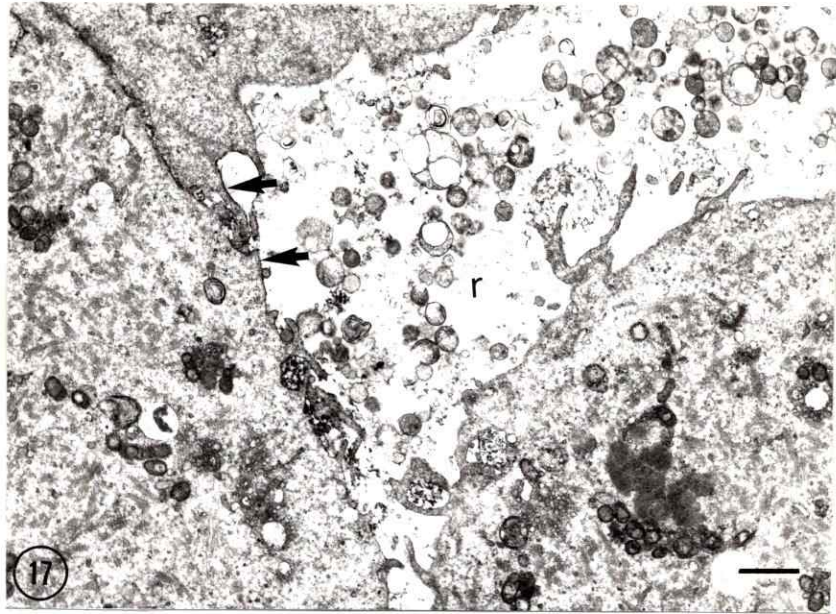
Barra Fig. 15 representa 5 um

Barra Fig. 16 representa 0.5 um



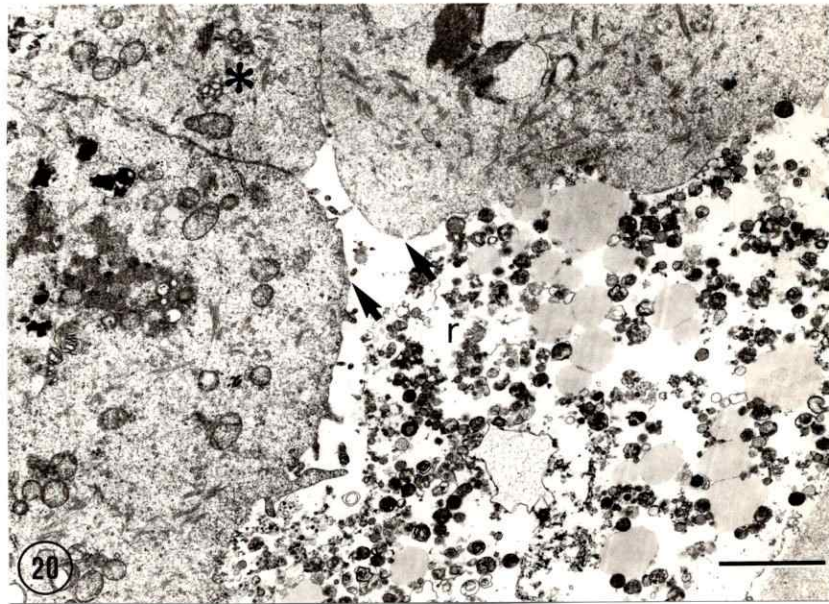
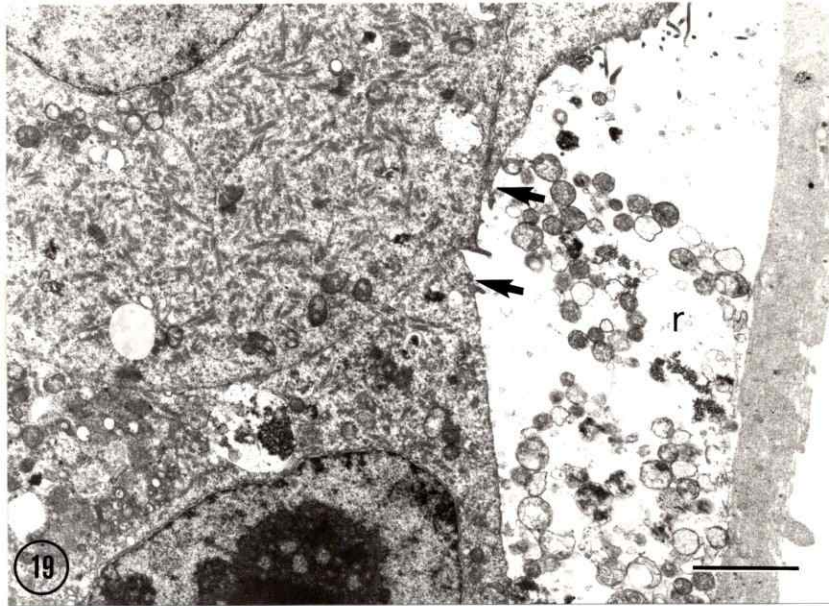
Figuras 17 y 18. Destrucción de uno de los 16 primeros blastómeros y fijación. Se observa actividad de fosfatasa alcalina (flechas) en la región de membrana celular en contacto con la célula vecina y en la membrana de la célula adyacente al resto (r) de la célula destruida.

Barras Figs. 17 y 18 representan 1 μ m



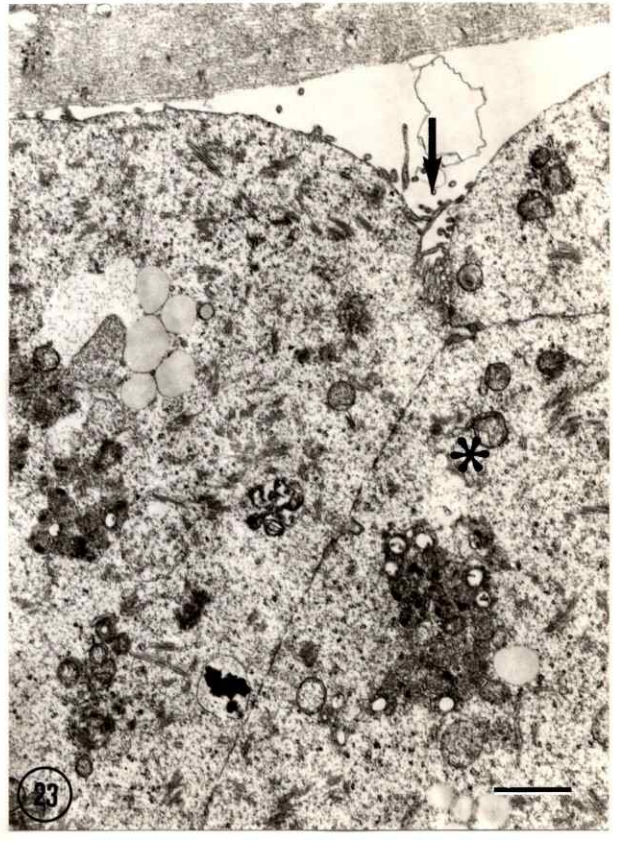
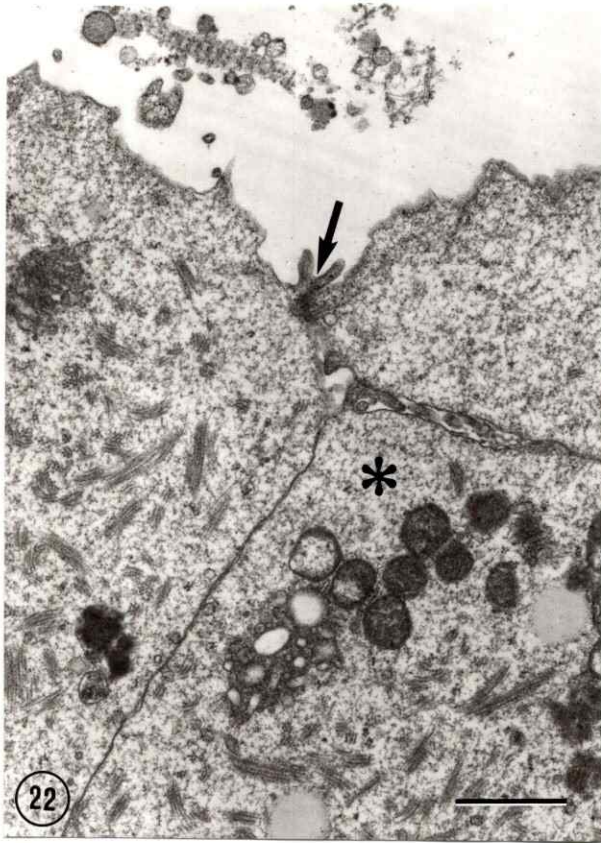
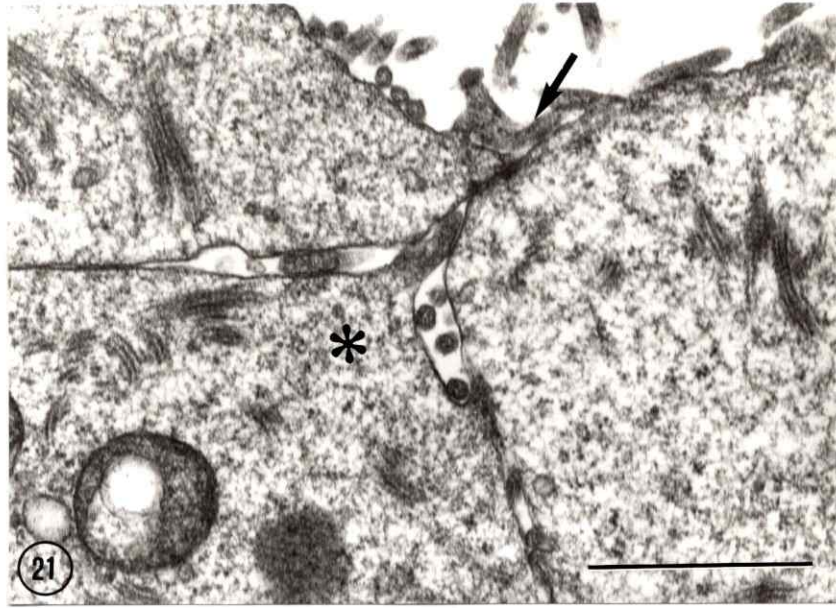
Figuras 19 y 20. Destrucción de uno de los 16 primeros blastómeros, cultivo por 1 hora y fijación. Se observan dos formas del proceso de reparación. En Fig. 19, se observa la extensión de las dos células periféricas vecinas de la mórula (flechas) para ocupar el espacio dejado por el blastómero destruido (r). En Fig. 20, se observa como en la ocupación de este espacio no participa la célula profunda (asterisco) en tanto que se aproximan las células periféricas vecinas (flechas) del blastómero destruido (r).

Barras Figs. 19 y 20 representan 2 μ m



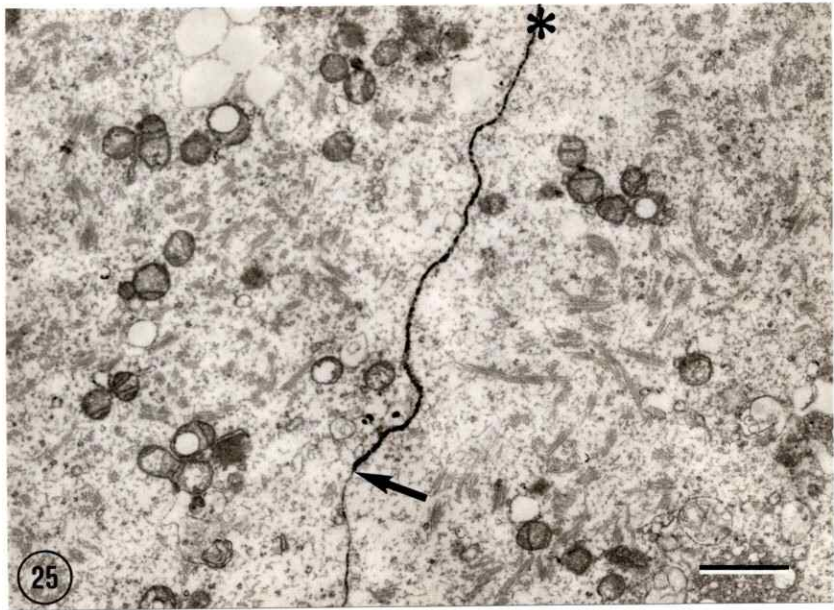
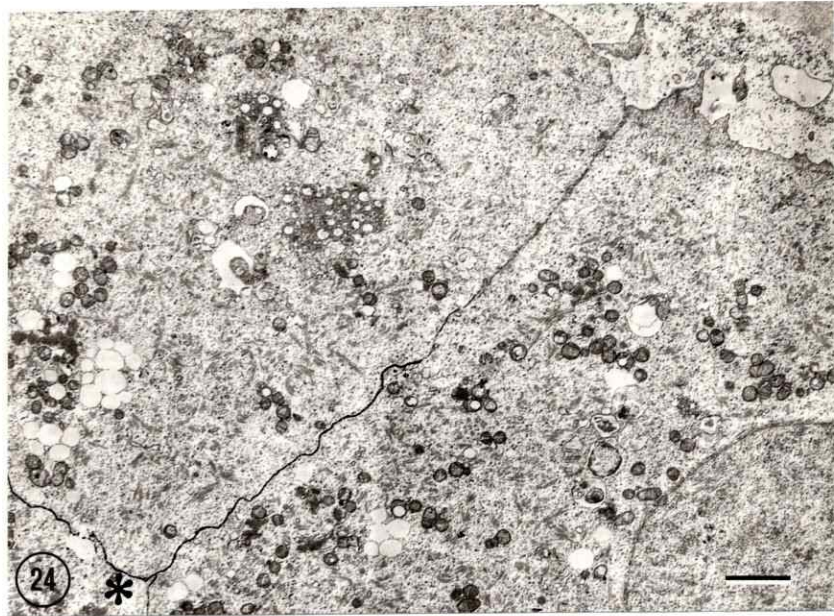
Figuras 21, 22 y 23. Destrucción de uno de los 16 primeros blastómeros, cultivo por 5 horas y fijación. Las células periféricas vecinas a la destruida toman contacto entre si (flechas), mientras que la célula vecina profunda permanece en su lugar (asterisco).

Barras Figs. 21, 22 y 23 representan 1 μ m



Figuras 24 y 25. Destrucción de uno de los 16 primeros blastómeros, cultivo por 6 horas y fijación. Las células periféricas vecinas a la destruida toman contacto entre si. Se observa actividad de fosfatasa alcalina en las membranas adosadas de los blastómeros que reparan la destrucción celular. La intensidad de la reacción en estas membranas es mayor hacia el centro del embrión (asterisco).

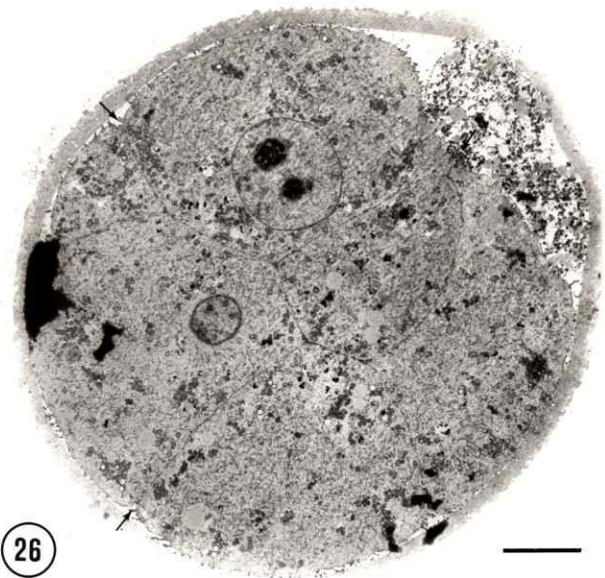
Barras Figs. 24 y 25 representan 2 um



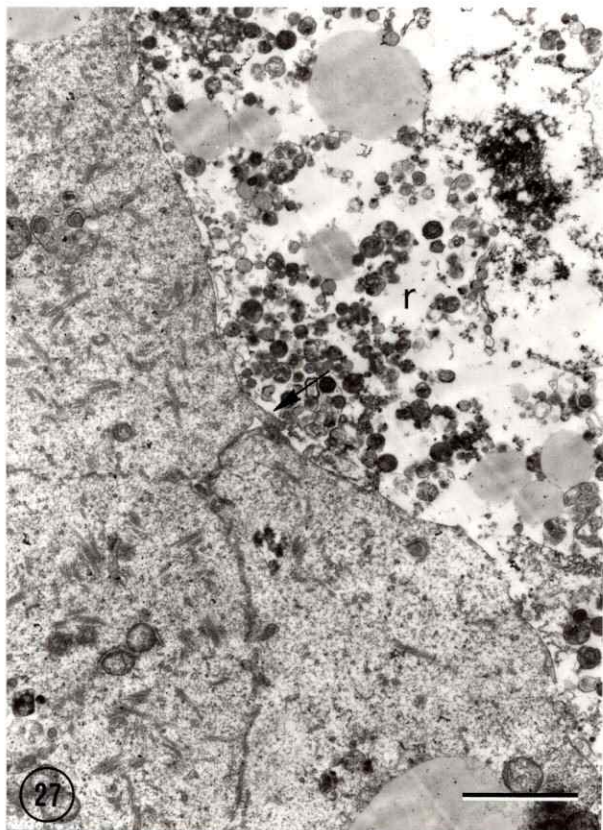
Figuras 26 y 27. Destrucción de uno de los 16 primeros blastómeros, cultivo por 13 horas y fijación. Se observa una mórula compactada, cuyas células periféricas se encuentran selladas entre sí (flechas). En Fig. 27 se observa con mayor aumento el sellamiento periférico (flecha) bajo los restos del blastómero destruido (r).

Barra Fig. 26 representa 10 μ m

Barra Fig. 27 representa 2 μ m



26

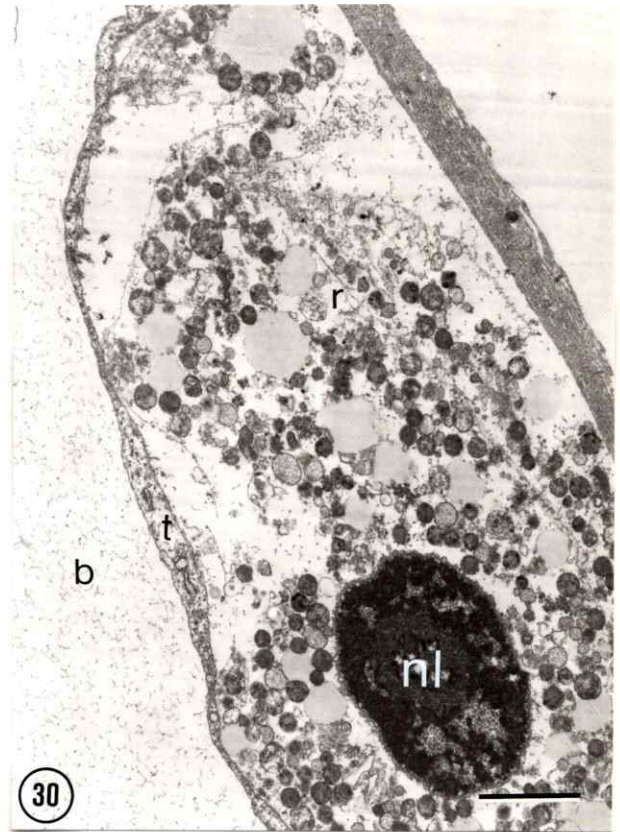
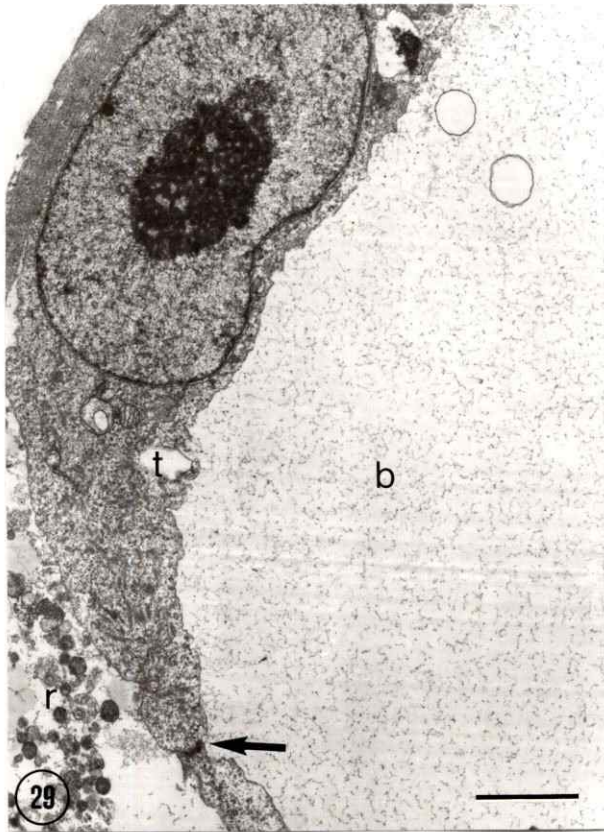
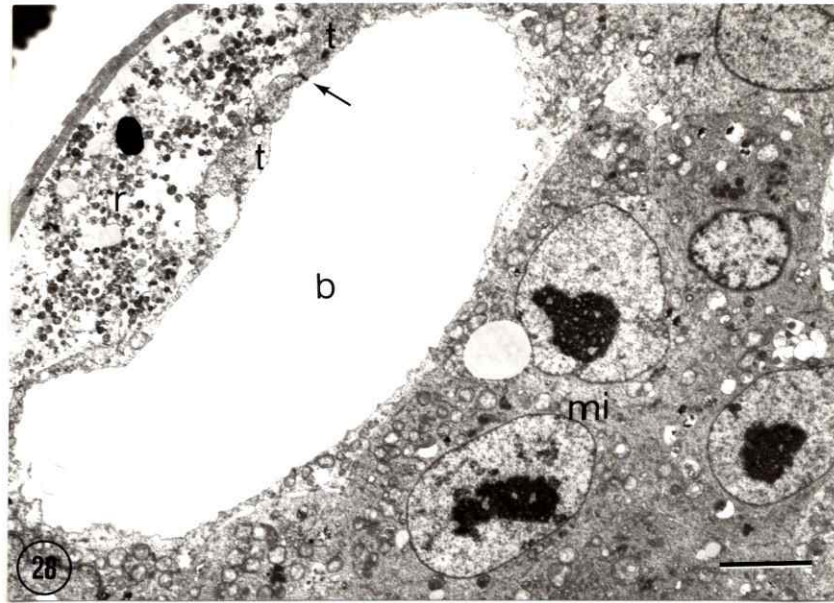


27

Figuras 28, 29 y 30. Destrucción de uno de los 16 primeros blastómeros, cultivo por 16 horas y fijación. Obsérvese masa celular interna (mi), células trofoblásticas (t) selladas entre sí (flechas), cavidad blastocélica (b) y restos del blastómero destruido (r). Entre los restos se reconoce un nucléolo (nl).

Barra Fig. 28 representa 5 μ m

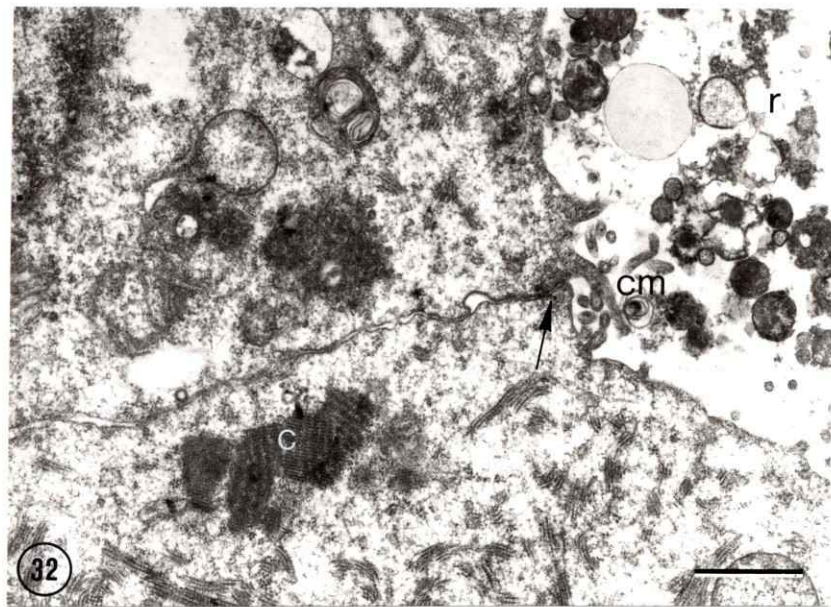
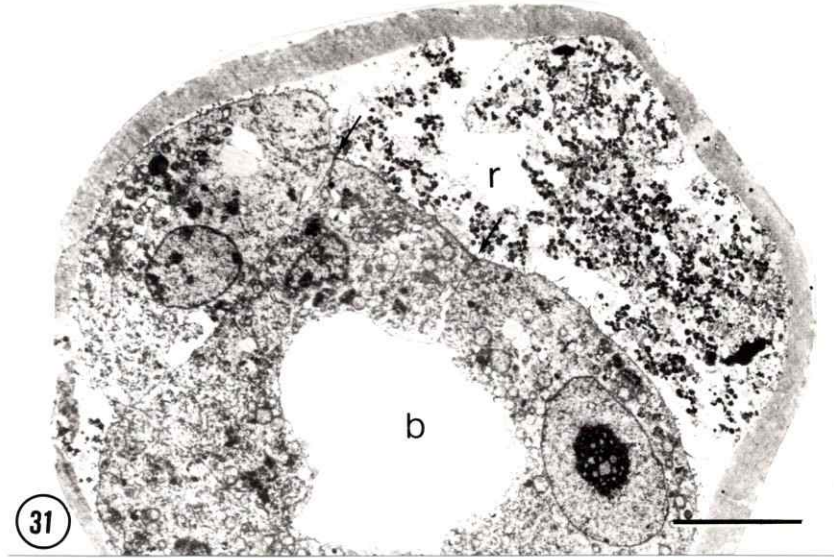
Barras Figs. 29 y 30 representan 2 μ m



Figuras 31 y 32. Destrucción de uno de los 8 primeros blastomeros, cultivo por 18 horas y fijación. Obsérvese cavidad blastocélica (b) y células trofoblásticas selladas entre si (flechas) bajo los restos del blastómero destruido (r). En el blastómero intacto se observan cuerpos cristaloides (c) y entre los restos se reconoce cuerpos multimembranosos (cm).

Barra Fig. 31 representa 10 μ m

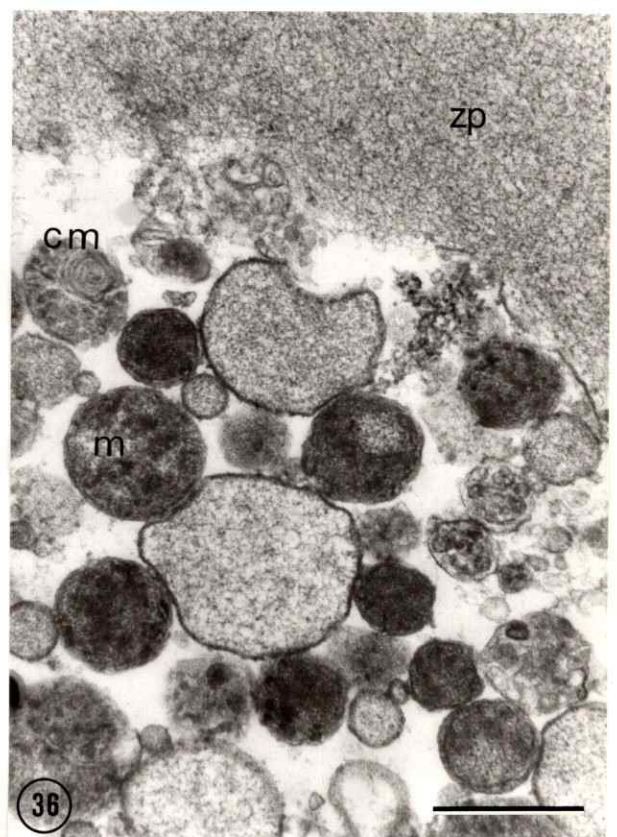
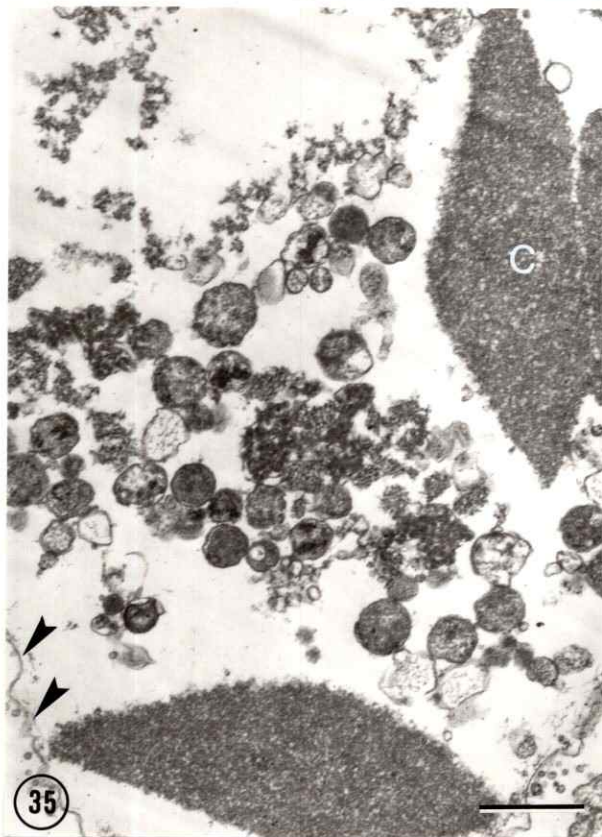
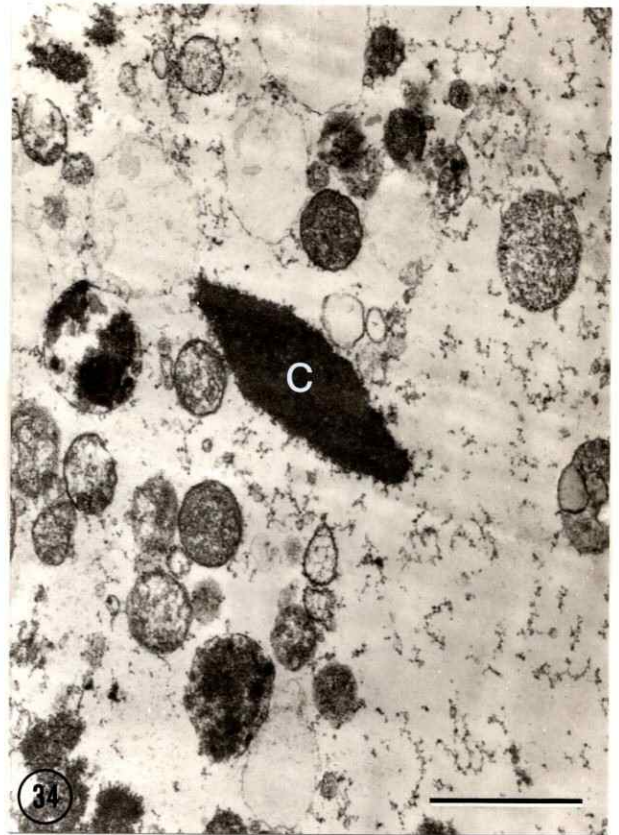
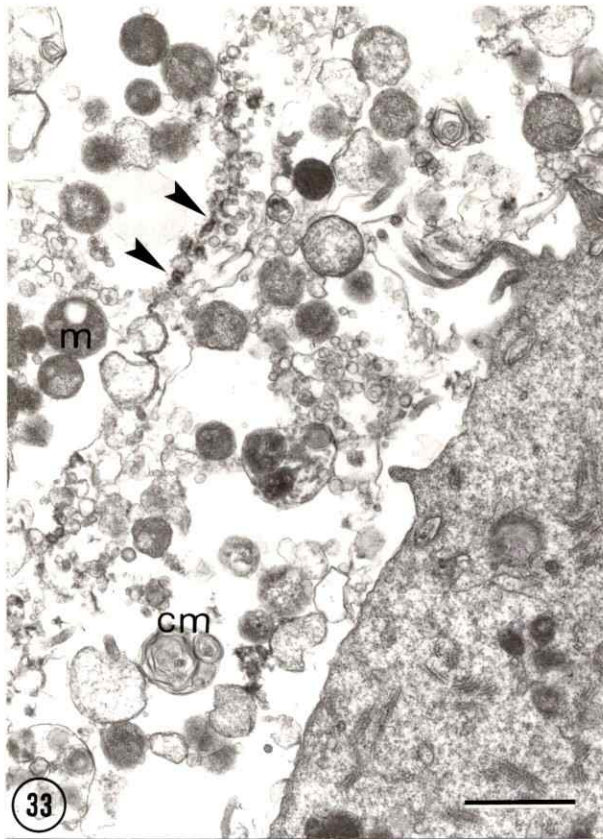
Barra Fig . 32 representa 1 μ m



Figuras 33, 34, 35 y 36. Etapas de degradación del citoplasma de células destruidas. Figs. 33 y 34 corresponden a embriones fijados a tiempo 0. Se reconoce membrana plasmática vesiculada (puntas de flecha), mitocondrias (m), cuerpos multimembranosos (cm) y cuerpos cristaloides (c). Fig. 35 corresponde a material fijado 22 horas después de la destrucción. Se reconoce membrana plasmática (puntas de flecha) y cuerpos cristaloides (c) desintegrados. Fig. 36 corresponde a material fijado 24 horas después de la destrucción. Se reconoce zona pelúcida (zp), cuerpos multimembranosos (cm) y mitocondrias desintegradas (m).

Barras Figs. 33, 34 y 35 representan 1 μ m

Barra Fig. 36 representa 0.5 μ m



DISCUSION

Capacidad de regulación

La tabla II muestra que la capacidad de regulación del embrión parcialmente destruido no disminuye significativamente durante el desarrollo, antes del estado de blastocisto. Pero si la capacidad de regulación disminuyera durante el desarrollo, nuestros experimentos podrian no haberlo detectado porque la fracción de embrión destruido fue cada vez menor mientras más avanzado era el desarrollo. En todo caso, no se advierte gran diferencia entre la destrucción de 1/2 y 2/4 de embrión (95% y 89%, respectivamente) a pesar que los estados son distintos y la fracción destruida es igual. Estos resultados concuerdan con las observaciones clásicas de Tarkowski y Wróblewska (1967), quienes aislando blastómeros y comparando el desarrollo de 1/4 con 2/8 de embrión encontraron que mientras más avanzado es el desarrollo, menor es la frecuencia de formación de blastocisto (45% y 31%, versus 95% y 89% obtenido en este trabajo). El menor éxito en el desarrollo obtenido por Tarkowski y Wróblewska seria atribuible a la menor proporción del embrión cultivado (1/2 en relación a 1/4 de embrión), además, en dichos experimentos se cultivaron los embriones sin zona pelúcida, la cual aparentemente contribuye a un mejor desarrollo del embrión (Moore, 1968).

Entre estados más avanzados, 1/8 y 1/16 de embrión, no

se observa diferencia en la capacidad de regulación. No se han realizado anteriormente experimentos de destrucción parcial, en embriones de ratón, y tampoco es posible compararlos con experimentos de aislamiento de blastómeros porque después del estado de 8 células raramente se desarrollan (Kelly, 1977). En cambio, estos resultados podrían compararse con los de agregación de embriones y se puede concluir que la capacidad de regulación después de la destrucción de blastómeros es semejante a la capacidad de regulación de embriones agregados, los que fácilmente forman quimeras siempre que se los aparee por lo menos 9 horas antes de la blastulación (Burgoyne & Ducibella, 1977).

Ubicación de los blastómeros destruidos en el embrión desarrollado

Si hubiera un plan fijo de segmentación, aunque los blastómeros fueran equivalentes, este podría haberse reconocido por producir localizaciones preferentes de los restos de blastómeros destruidos. Sin embargo, éstos se observan en cualquier posición exterior al blastocisto, sin que sea más frecuente observarlos en el hemisferio embrionario que en el abembrionario y además nunca se observó restos en posiciones interiores de la mórula o del blastocisto. Esto podría interpretarse como una exclusión solamente mecánica del blastómero destruido pero además, los resultados sugieren que al comienzo del desarrollo la organización espacial no existe o es muy lábil, porque de otra manera, cuando se destruye $1/2$, los restos podrían

ubicarse en relación con un presunto eje de polaridad.

No hay información categórica sobre el momento en que se determina la organización espacial. Las notables diferencias de apreciación entre los autores, derivan de sus distintos criterios en la elección de parámetros significativos. Unos, como Johnson y su grupo (1981), otorgan decisiva importancia a la polarización de los blastómeros al producirse la compactación, mientras otros, como Ducibella (1977) sostienen que la diferencia decisiva es el sellamiento periférico con la formación de un medio interno del embrión.

Reparación del embrión dañado

Nuestros resultados sugieren fuertemente que las membranas plasmáticas de los blastómeros tienen propiedades regionalizadas y que por lo menos se distinguen las expuestas al exterior de las que enfrentan blastómeros vecinos. Además de diferencias en propiedades citoquímicas (fosfatasa alcalina y 5'-nucleotidasa) ya descritas (Izquierdo, López & Marticorena, 1980; Izquierdo & Ebersperger, 1982), ahora comprobamos que las membranas en contacto en definitiva no se exteriorizan para la reparación y que las células vecinas periféricas se aproximan ocupando el lugar de la célula destruida. De esta manera, las regiones de membrana que estaban en contacto vuelven a estarlo. Así se reestablece una asociación entre regiones de membrana que tenían la propiedad común de enfrentarse y

no se establecen asociaciones entre estas membranas con membranas expuestas al exterior del embrión. Este fenómeno sugiere un mecanismo de afinidad que podría corresponder a una adhesividad diferencial (Steinberg, 1978; Surani, Kimber y Handyside, 1981; Kimber y Surani, 1982; Kimber, Surani y Barton, 1982; Surani y Handyside, 1983). Aun no hay estimaciones cuantitativas que apoyen esta interpretación.

Entre los blastómeros que ocupan el espacio dejado por el blastómero destruido aparecen los típicos complejos de unión descritos primeramente por Calarco y Brown (1969). En un comienzo se observa una sustancia amorfa y densa ubicada aparentemente en el espacio intercelular que se extiende a través de la membrana celular hacia el citoplasma de ambas células. Luego se reconocen uniones estrechas zonulares entre las células periféricas generando la condición indispensable para la acumulación del líquido blastocélico y la formación del blastocelo (Ducibella et al., 1975; Fernández e Izquierdo, 1980).

Calarco y Epstein (1973) sostienen que la presencia de vellosidades basales en la región de inminente contacto celular sugiere que éstas juegan un rol en la aproximación de las membranas plasmáticas de los blastómeros adyacentes y luego desaparecen cuando las membranas adyacentes toman contacto. Nuestros experimentos sugieren un proceso análogo: extensiones celulares que se ponen en contacto y luego se retraen acercando los blastómeros.

Es probable que en las células periféricas vecinas al

blastómero destruido, que se encuentran comprometidas en el proceso de reparación, sea posible observar una organización polarizada del citoesqueleto pero no hemos utilizado una fijación adecuada, por ejemplo, con ácido tánico (Van Deurs, 1975).

Información posicional

La tesis de información posicional ha sido detalladamente analizada en otros procesos morfogénéticos, especialmente en regeneración de celenterados (Gierer, 1974) y de las extremidades de aves (Wolpert, 1977), pero nunca ha sido elaborada suficientemente respecto al desarrollo preimplantacional. Sin embargo, se ha planteado la posibilidad que un gradiente de difusión centro-periferia provea a las células de información posicional y sea la base material del modelo adentro-afuera (Izquierdo y Becker, 1982). Nuestros resultados sugieren que una eventual información posicional proporcionada por los contactos de membrana se pierde después de la destrucción de 1/2 y 2/4 embrión ya que las células intactas en contacto con la célula destruida se desarrollan como si estuvieran aisladas. Esto, hasta el estado de 4 células a pesar que entonces, ciertas propiedades que diferencian regiones de membrana con o sin actividad de fosfatasa alcalina (Izquierdo, López y Marticorena, 1980) podrían ser la base material de una información posicional. Los resultados de este trabajo indican que las membranas que se aproximan reparando el

daño, en embriones de 8 y 16 células, conservan la regionalización, reconocida por actividad de fosfatasa alcalina, durante las 4 horas que permanecen expuestas al espacio extraembrionario. Además, parece posible distinguir en estas membranas una región más interior con mayor actividad de fosfatasa alcalina de una más periférica, sugiriendo que esta última corresponde a membrana externa que se ha interiorizado durante la reparación.

Si se observa como evoluciona el blastómero destruido parece comprensible que pierda la capacidad que pueda haber tenido de informar sobre su posición a las células con que se encontraba en contacto, ya que la membrana plasmática rápidamente pierde las uniones celulares, se vesiculiza e inicia una desintegración que dura largo tiempo. De hecho, las células que reparan el daño llegan a juntarse y sellarse entre si inmediatamente por debajo del resto celular como si éste fuera un cuerpo extraño que carece de toda función morfogénica.

CONCLUSIONES

1. Los restos celulares no aportan información posicional.
2. A partir de la compactación los contactos celulares contendrían información posicional.
3. La regionalización de las membranas plasmáticas, reconocida por fosfatasa alcalina, se conserva.
4. En la mórula se ha perdido la equivalencia morfogénica entre blastómeros internos y externos.

REFERENCIAS

- BABINET, C. (1980). A simplified method for mouse blastocyst injection. *Exp. Cell Res.* 130: 15-19.
- BIGGERS, J., WHITTEN, W. & WHITTINGHAM, D. (1971). The culture of mouse embryos in vitro. En: "Methods in Mammalian Embryology" (J.C. Daniel, ed.) Freeman, San Francisco. pp. 86-116.
- BURGOYNE, P. & DUCIBELLA, T. (1977). Changes in the properties of the developing trophoblast of preimplantation mouse embryos as revealed by aggregating studies. *J. Embryol. exp. Morph.* 40: 143-157.
- CALARCO, P. & BROWN, E. (1969). An structural and cytological study of preimplantation development in the mouse. *J. Exp. Zool.* 171: 235-283.
- CALARCO, P. & EPSTEIN, C. (1973). Cell surface changes during preimplantation development in the mouse. *Dev. Biol.* 32: 208-213.
- CERISOLA, H. & IZQUIERDO, L. (1969). Distribución de RNA y embriogénesis en el ratón. *Arch. Biol. Med. Exp.* 6: 10-16.
- DENKER, H. (1983). Cell lineage, determination and differentiation in earliest developmental stages in mammals. *Bibliothca Anat.* 24: 22-58.
- DUCIBELLA, T. (1977). Surface changes of the developing trophoblast cell. En: "Development in mammals" (Johnson, M.H., ed.). North Holland, Amsterdam. 1: 5-30.

- DUCIBELLA, T. & ANDERSON, E. (1975). Cell shape and membrane changes in the eight-cell mouse embryo: prerequisites for morphogenesis of the blastocysts. *Dev. Biol.* 47: 45-58.
- DUCIBELLA, T. & ANDERSON, E. (1979). The effect of calcium deficiency on the formation of the zonula occludens and blastocoel in the mouse embryo. *Dev. Biol.* 73: 46-58.
- FERNANDEZ, S. & IZQUIERDO, L. (1980). Blastocoel formation in half and double embryos. *Anat. Embryol.* 160: 77-81.
- GIERER, A. (1974). Hydra as a model for the development of biological form. *Sci. Amer.* December: 44-55.
- HILLMAN, N., SHERMAN, M. & GRAHAM, C. (1972). The effect of spatial arrangement on cell determination during mouse development. *J. Embryol. exp. Morph.* 28: 263-278.
- IZQUIERDO, L. (1977). Cleavage and differentiation. En: "Development in mammals" (M.H. Johnson, ed.). North Holland Publ., Amsterdam. 2, pp. 99-118
- IZQUIERDO, L. & BECKER, M. I. (1982). Effect of Li on preimplantation mouse embryos. *J. Embryol. exp. Morph.* 67: 51-58.
- IZQUIERDO, L. & EBENSPERGER, C. (1982). Cell membrane regionalization in early mouse embryos as demonstrated by 5'-nucleotidase activity. *J. Embryol. exp. Morph.* 69: 115-126.
- IZQUIERDO, L., LOPEZ, T. & MARTICORENA, P. (1980) Cell membrane regions in preimplantation mouse embryos. *J. Embryol. exp. Morph.* 59: 89-102.

- JOHNSON, M. (1981). Membrane events associated with the generation of the blastocyst. *Int. Rev. Cytol. Suppl.* 12: 1-37.
- JOHNSON, M. & ZIOMEK, C. (1981). Induction of polarity in mouse 8-cell blastomeres: specificity, geometry and stability. *J. Cell Biol.* 91: 303-308.
- KELLY, S. (1977). Studies of the developmental potential of 4- and 8-cell stage mouse blastomeres. *J. Exp. Zool.* 200: 365-376.
- KIMBER, S. & SURANI, M. (1982). Spreading of blastomeres from 8-cell mouse embryos on lectin coated beads. *J. Cell Sci.* 56: 191-206.
- KIMBER, S.; SURANI, M. & BARTON, S. (1982). Interactions of blastomeres suggest changes in cell surface adhesiveness during the formation of inner cell mass and trophoblast in the preimplantation mouse embryo. *J. Embryol. exp. Morph.* 70: 133-152.
- LIN, T. (1967). Micropipetting cytoplasm from the mouse egg. *Nature* 216: 162-163.
- LIN, T. (1971). Egg micromanipulation. En: "Methods in mammalian embryology". (Daniel, J., ed.). Freeman, California. 10: 157-169.
- LO, C. & GILULA, N. (1979). Gap junctional communication in the preimplantation mouse embryo. *Cell* 18: 399-409.

- 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. *Histochemie* 11: 88-96.
- McLACHLIN, J.; CAVENEY, S. & KIDDER, G. (1983). Control
of gap junction formation in early mouse embryos. *Dev.
Biol.* 98: 155-164.
- McLAREN, A. (1976). *Mammalian chimaeras*. Cambridge
University Press. Great Britain.
- MOORE, N.; ADAMS, C. & ROWSON, L. (1968). Developmental
potential of single blastomeres of the rabbit egg. *J.
Reprod. Fert.* 17: 527-531.
- MULNARD, J. (1965). Studies of regulation of mouse ova in
vitro. En: "Preimplantation stages of pregnancy".
(Wolstenholme, G.E.W. & O' Connor, M., eds.). Boston.
pp. 123-138.
- PEDERSEN, R. & SPINDLE, A. (1980). Role of the blastocoele
microenvironment in early mouse embryo differentiation.
Nature 284: 550-552.
- SPURR, A. (1969). A low-viscosity epoxy resin embedding
medium for electron microscopy. *J. Ultras. Res.* 26: 31-
43.
- STEINBERG, A. (1978). Cell-cell recognition in
multicellular assembly: levels of specificity. En:
"Cell-cell recognition". (Curtis, A., ed.). *Symp. Soc.
Biol.* 17: 25-49.

- SURANI, M. & HANDYSIDE, A. (1983). Reassortment of cells according to position in mouse morulae. *J. Exp. Zool.* 225: 505-511.
- SURANI, M.A.H.; KIMBER, S. & HANDYSIDE, A.H. (1981). Synthesis and role of cell surface glycoproteins in preimplantation mouse development. *Exp. Cell Res.* 133: 331-339.
- TARKOWSKI, A. (1959). Experiments on the development of isolated blastomeres of mouse eggs. *Nature* 184: 1286-1287.
- TARKOWSKI, A. & WROBLEWSKA, J. (1967). Development of blastomeres of mouse eggs isolated at the 4- and 8-cell stage. *J. Embryol. exp. Morph.* 18: 155-180.
- VAN DEURS, B. (1975). The use of a tannic acid-glutaraldehyde fixative to visualize gap and tight junctions. *J. Ultras. Res.* 50: 185-192.
- WILEY, L. & EGLITIS, M. (1981). Cell surface and cytoskeletal elements: cavitation in the mouse preimplantation embryo. *Dev. Biol.* 86: 493-501.
- WOLPERT, L. (1977). Positional information and morphogenetic signals: an introduction. In: "Cell interactions in differentiation" (Karkinen-Jaaskelainen, Saxén & Weiss, eds.). A. P. Londres. pp. 78-87.
- ZIOMEK, C., JOHNSON, M. & HANDYSIDE, A. (1982). The developmental potential of mouse 16-cell blastomeres. *J. Exp. Zool.* 221: 345-355.