

UCH-FC
DOC-B
M269
C. A

**PARTICIPACION DE LA MATRIZ EXTRACELULAR
Y LOS FACTORES DE CRECIMIENTO
EN LA DIFERENCIACION *IN VITRO* DEL TROFOBlasto DE
RATON**

Tesis entregada a la
Universidad de Chile
Facultad de Ciencias
en cumplimiento parcial de los requisitos
para optar al grado de
Doctor en Ciencias con mención en Biología

por

MARIA ALEJANDRA MANCILLA ESCOBAR

OCTUBRE 1994

Directores de Tesis: Dr. Luis Izquierdo (Q.E.P.D)

Dr. Luis Valladares



FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE CHILE

INFORME DE APROBACION

TESIS DE DOCTORADO

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

MARIA ALEJANDRA MANCILLA ESCOBAR

ha sido aprobada por la Comisión Informante de Tesis como requisito para la
obtención del grado de Doctor en Ciencias con mención en Biología en el Examen de
Defensa de Tesis rendido el 12 de Septiembre de 1994.

Director de Tesis Dr. Luis Valladares B. _____

Comisión Informante de Tesis

Dr. Claudio Barros _____

Dr. José Minguell _____

Dr. Alfonso González _____

Dr. Ricardo Maccioni _____



Luis Valladares
C. Barros
J. Minguell
A. González
R. Maccioni

ESTA TESIS DE DOCTORADO SE REALIZO EN EL LABORATORIO DE BIOLOGIA DEL DESARROLLO DE LA FACULTAD DE CIENCIAS DE LA UNIVERSIDAD DE CHILE, BAJO LA DIRECCION DE LOS DRS. LUIS IZQUIERDO FERNANDEZ (Q.E.P.D.) Y LUIS VALLADARES BOASI.

LOS EXPERIMENTOS DE CARACTERIZACION DEL RECEPTOR DEL FACTOR DE CRECIMIENTO EPIDERMAL SE REALIZARON EN EL LABORATORIO DE INMUNOLOGIA CLINICA Y REUMATOLOGIA DE LA FACULTAD DE MEDICINA DE LA PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATOLICA DE CHILE.

EL ANALISIS DE LA PRODUCCION DE PROGESTERONA SE REALIZO EN LA UNIDAD DE BIOLOGIA DE LA REPRODUCCION DEL INSTITUTO DE NUTRICION Y TECNOLOGIA DE LOS ALIMENTOS (INTA), UNIVERSIDAD DE CHILE.



ESTA TESIS DE DOCTORADO FUE
FINANCIADA POR FONDECYT
(PROYECTO 0838-91) Y POR EL
DEPARTAMENTO DE POSTGRADO Y
POSTITULO, VICERRECTORIA
ACADEMICA Y ESTUDIANTIL,
UNIVERSIDAD DE CHILE
(PROYECTOS PG 091-92 Y 089-
93).

ALEJANDRA MANCILLA FUE
BENEFICIARIA DE UNA BECA CONICYT
PARA ESTUDIANTES DE DOCTORADO.



AGRADECIMIENTOS

Durante el desarrollo de esta Tesis he recibido la ayuda de muchas personas, a quienes quiero agradecer.

Al Dr. Luis Valladares, por su apoyo y amistad.

Al Dr. Alfonso Gonzalez, por su gran ayuda y generosidad.

A todos mis compañeros y amigos del Laboratorio de Biología del Desarrollo, Roxana Pey, Claudia Basso, Juan Silva, Clarisa Vial, Ariel Ahumada, Florencio Espinoza, Roberto Mayor, Rodrigo Naves.

A Víctor Faúndez, por su amistad y gran ayuda.

Al Dr. Claudio Barros, por sus buenos consejos.

Al Dr. Ricardo Maccioni y al Dr. José Minguell, por su ayuda en la corrección del manuscrito de esta Tesis.

A los miembros de la Unidad de Biología de la Reproducción del INTA, en especial a la Dra. Ana María Pino.

A mis Padres.



DEDICO ESTA TESIS
AL DR. LUIS IZQUIERDO F.
(Q.E.P.D).

ABREVIATURAS

ATP	:	Trifosfato de adenosina
BSA	:	Albúmina de suero de bovino
3 β -HSD	:	3 β - hidroxiesteroide deshidrogenasa
DSS	:	Disuccinimidilsubirato
EGF	:	Factor de crecimiento epidermal
EGFr	:	Receptor del factor de crecimiento epidermal
FGF	:	Factor de crecimiento fibroblástico
FN	:	Fibronectina
FBS	:	Suero fetal de bovino
hCG	:	Gonadotrofina coriónica humana
HCl	:	Acido clorhídrico
LM	:	Laminina
MCI	:	Masa celular interna
MEC	:	Matriz extracelular
NaOH	:	Hidróxido de sodio
NGF	:	Factor de crecimiento nervioso
NH ₄ Cl	:	Cloruro de amonio
PBS	:	Amortiguador fosfato salino
PDGF	:	Factor de crecimiento derivado de plaquetas
PMS	:	Suero de yegua preñada
PMSF	:	Fenil metil sulfonil fluoruro
SDS	:	Dodecil sulfato de sodio
TCA	:	Acido tricloroacético

TGF- α : Factor de crecimiento transformante tipo α
TGF- β : Factor de crecimiento transformante tipo β
UI : Unidades internacionales.

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1 :** Esquema del desarrollo inicial del ratón.
- FIGURA 2 :** Esquema del proceso de implantación *in vitro*.
- FIGURA 3 :** Esquema del sistema de cultivo en gota colgante.
- FIGURA 4 :** Superficie de extensión del trofoblasto en distintas condiciones de cultivo.
- FIGURA 5 :** Contenido de proteínas en blastocistos implantados en distintas condiciones de cultivo.
- FIGURA 6 :** Blastocisto de ratón implantado *in vitro*.
- FIGURA 7 :** Blastocisto de ratón impedido de implantar por cultivo en gota colgante.
- FIGURA 8 :** Contenido de proteínas en blastocistos implantados e impedidos de implantar.
- FIGURA 9 :** Cultivo de blastocistos en gota colgante y efecto de LM.
- FIGURA 10:** Blastocisto implantado *in vitro* y efecto de EGF.
- FIGURA 11:** Demostración de la especificidad del efecto de EGF en los blastocistos implantados *in vitro*.
- FIGURA 12:** Síntesis de ADN en los blastocistos implantados *in vitro*: efecto de EGF.
- FIGURA 13:** Contenido de ADN en los blastocistos implantados *in vitro*: efecto de EGF.
- FIGURA 14:** Análisis de la producción de Progesterona por los blastocistos implantados *in vitro*: efecto de EGF.
- FIGURA 15:** Ensayos de unión y entrecruzamiento de [¹²⁵I]-EGF a los blastocistos implantados *in vitro*.
- FIGURA 16:** Fosforilación en tirosina del receptor de EGF (EGF-R) inducida por EGF.

INDICE

INTRODUCCION	1
1. Breve descripción del desarrollo inicial del ratón	1
2. Implantación del <i>conceptus</i> de ratón	2
2.1. Implantación <i>in vitro</i> del blastocisto de ratón: diferenciación del trofoblasto	3
3. La MEC regula el desarrollo y la diferenciación en diversos sistemas celulares: Participación en la implantación del <i>conceptus</i> de ratón	5
4. Participación de los factores de crecimiento en el desarrollo y la diferenciación de diversos sistemas celulares: posible regulación del desarrollo y la diferenciación del <i>conceptus</i> de ratón	8
4.1. El EGF en la implantación del <i>conceptus</i> de ratón	10
4.2. El receptor de EGF (EGFr) en la diferenciación del <i>conceptus</i> de ratón	12
5. Objetivo general, Hipótesis de trabajo y Objetivos específicos .	14
MATERIALES Y METODOS	16
1. Obtención de blastocistos	16
2. Eliminación de la zona pelúcida	16
3. Cultivo de blastocistos	17
3.1. Condiciones generales de cultivo	17
3.1.1. Cultivo de blastocistos implantados	17
3.1.2. Cultivo de blastocistos impedidos de implantar .	18
4. Preparación de las cápsulas recubiertas con FN o LM	18

5. Diseño experimental	19
5.1. Serie experimental 1	19
5.1.1. Cultivo en medio NCTC-135 suplementado con FBS	19
5.1.2. Cultivo en medio NCTC-135 sobre cápsulas recubiertas con FN o LM	20
5.1.3. Cultivo en medio NCTC-135 suplementado con FBS, sobre cápsulas recubiertas con FN o LM .	20
5.1.4. Medición de la extensión del trofoblasto	20
5.1.5. Medición del contenido de proteínas	20
5.2. Serie experimental 2	21
5.2.1. Cultivo en medio NCTC-135 suplementado con FBS	21
5.2.2. Cultivo en medio NCTC-135 suplementado con FN o LM	22
5.3. Serie experimental 3	22
5.3.1. Cultivo en medio NCTC-135 suplementado con FBS y EGF	22
5.3.2. Inhibición del efecto causado por el EGF en los blastocistos implantados <i>in vitro</i>	23
5.3.3. Análisis de la producción de progesterona	23
5.3.4. Análisis de la incorporación de [³ H]- Timidina	24
5.3.5. Análisis del contenido de ADN	25
5.4. Serie experimental 4	25
5.4.1. Ensayos de unión de [¹²⁵ I]- EGF a los blastocistos implantados <i>in vitro</i>	25

5.4.2. Ensayos de entrecruzamiento (cross-linking) de [¹²⁵ I]-EGF a los blastocistos implantados <i>in vitro</i>	26
5.5. Serie experimental 5	27
5.5.1. Ensayos de fosforilación de proteínas	27
5.5.2. Ensayos de inmunoprecipitación con anticuerpos monoclonales anti-fosfotirosina ..	28
RESULTADOS	29
1. Diferenciación del trofoblasto: regulación por elementos de matriz extracelular	29
1.1. Cultivo de blastocistos en gota colgante y efecto de LM	30
2. Efecto de EGF en blastocistos de ratón implantados <i>in vitro</i>	31
3. El EGF y la diferenciación del trofoblasto: un efecto de proliferación o de diferenciación ?	32
4. El EGFr en la diferenciación del trofoblasto	32
DISCUSION	54
REFERENCIAS	65

RESUMEN

La diferenciación del trofoblasto de ratón *in vitro* es modulada por proteínas de la matriz extracelular como fibronectina (FN) y laminina (LM), desconociéndose si para ello estas moléculas requieren o no formar parte de un sustrato de adhesión. Al parecer dicho proceso de diferenciación podría ser también regulado por factores de crecimiento peptídicos como el factor de crecimiento epidermal (EGF).

En esta Tesis se utilizó un sistema de implantación *in vitro* de blastocistos de ratón para determinar: 1. Si FN y LM requieren estructurar un sustrato sobre el cual el *conceptus*¹ pueda adherirse y producir diferenciación del trofoblasto. 2. Si el EGF regula la diferenciación del trofoblasto de ratón.

Los resultados indican que LM, no así FN, puede promover la diferenciación del trofoblasto aun sin formar parte de un sustrato de adhesión. El EGF por su parte provocó modificaciones tanto morfológicas como bioquímicas en los blastocistos implantados: en presencia del factor, los núcleos de las células gigantes aparecieron prominentes y el contenido de ADN de los implantes y la secreción de progesterona resultaron disminuídos. Estos efectos del EGF parecen involucrar la activación de su receptor (EGFr), ya que se detectó la presencia de EGFr funcionales en los blastocistos implantados *in vitro*. Como se discute en detalle, estos resultados sugieren que el EGF regula la diferenciación del trofoblasto de ratón *in vitro*.

¹. Término introducido en 1973 por Böving y Larsen (Implantation, En: Human Reproduction, Conception and Contraception, E.S.E Hafez & T.N. Evans (eds) Harper and Row Publishers), para referirse a aquellos estados del desarrollo en los cuales aún no hay diferenciación de capas germinales.

SUMMARY

In vitro mouse trophoblast differentiation is modulated by proteins of the extracellular matrix such as fibronectin (FN) and laminin (LM), but it is unknown if these molecules require to be part of an adhesion substrate. It has been proposed that growth factors such as the epidermal growth factor (EGF) can also regulate trophoblast differentiation.

In this Thesis it has been used an *in vitro* implantation system of mouse blastocysts to analyze: 1. If a substrate of FN and LM is required for the adhesion and differentiation of trophoblast. 2. If trophoblast differentiation is regulated by EGF.

The results show that trophoblast differentiation promoted by LM does not require an adhesion substrate. However, FN promoted differentiation does requires a substrate. On the other hand, EGF can induce morphological and biochemical modifications on implanted blastocysts: with EGF the nuclei of giant cells exhibited a prominent morphology and the amount of DNA and progesterone secretion was diminished. In addition, an activation of EGF receptors was also found. The results suggest that EGF can regulate *in vitro* trophoblast differentiation.

INTRODUCCION

1. BREVE DESCRIPCION DEL DESARROLLO INICIAL DEL RATON.

El desarrollo inicial de mamíferos ocurre *in vivo* durante el tránsito del huevo fecundado por el oviducto y finaliza con la implantación del *conceptus* en el endometrio del útero. En el ratón es posible reproducir este período del desarrollo mediante cultivos *in vitro*, lo cual ha permitido su análisis experimental (Hogan et al., 1986).

La Figura 1 muestra un esquema de las principales etapas de este período, que dura entre tres y cinco días en la mayoría de las especies estudiadas. El huevo, rodeado por la zona pelúcida, se divide en dos blastómeros aproximadamente veinticuatro horas después de la fecundación; luego cada blastómero continúa dividiéndose cada diez a doce horas, pero asincrónicamente (Graham y Deusser, 1978). Antes de la formación del blastocisto, cuando el *conceptus* tiene sólo ocho células, ocurre el proceso de **compactación**, caracterizado morfológicamente por la pérdida de la forma esférica de los blastómeros y la disminución drástica del espacio intercelular; este proceso es requerido para las etapas que siguen (Ducibella y Anderson, 1975; Ducibella et al., 1977).

Al finalizar el paso por el oviducto, el *conceptus* de ratón está compuesto por aproximadamente 24 células (Fernández e Izquierdo, 1980). En este momento ocurre el proceso de formación del blastocisto, que se reconoce por la aparición de una cavidad intercelular (el blastocele), que definirá el primer eje embrionario (Smith y McLaren, 1977).

En el blastocisto pueden reconocerse por primera vez durante el desarrollo inicial, dos tipos celulares distintos: los blastómeros periféricos constituyen un epitelio aplanado de

células estrechamente unidas entre sí denominado **trofoectodermo** 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 dará origen al embrión propiamente tal y a algunos anexos embrionarios, y el trofoectodermo, que se diferenciará en el **trofoblasto**, dará origen a la mayor parte de los anexos embrionarios, como por ejemplo la placenta.

Al quinto día de desarrollo el blastocisto contiene aproximadamente 64 células y la cavidad blastocélica se encuentra expandida. En este período el blastocisto eclosiona al emerger de la zona pelúcida y desde este momento toma contacto íntimo con el epitelio que reviste el endometrio, etapa denominada **implantación**.

2. IMPLANTACION DEL *CONCEPTUS* DE RATON

La implantación en el ratón es un proceso invasivo que ocurre en un espacio y tiempo limitados. Comienza al quinto día de gestación con el contacto inicial del blastocisto a la superficie del endometrio y continúa hasta que el trofoblasto se conecta con los vasos sanguíneos maternos. Durante este período el trofoblasto atraviesa el epitelio uterino, compuesto de células y matriz de tejido conectivo, y penetra la membrana basal antes de entrar al estroma uterino (Schlafke y Enders, 1975). Al mismo tiempo, las células trofoblásticas experimentan un proceso de diferenciación que involucra, entre otras funciones, su transformación en las llamadas células gigantes del trofoblasto, caracterizadas fundamentalmente por presentar cantidades de DNA de hasta 1024 veces la cantidad contenida en una célula haploide, es decir, son células poliploides (Hoffman y Wooding, 1993).

El proceso de implantación en el ratón puede ser reproducido *in vitro*.

2.1. IMPLANTACION *IN VITRO* DEL BLASTOCISTO DE RATON: DIFERENCIACION DEL TROFOBLASTO.

El proceso de implantación en el ratón puede ser estudiado mediante sistemas de cultivo *in vitro* (Gwatkin, 1966; Schlafke y Enders, 1975; Jenkinson, 1977; Sherman y Salomon, 1975; Sherman, 1978). En un medio de cultivo que contiene suero fetal, los blastocistos de ratón experimentan procesos de diferenciación y morfogénesis homologables a la implantación *in utero*. La Figura 2 muestra un esquema de este proceso, según Gonda y Hsu (1980). En el blastocisto obtenido a las 86 horas post hCG (Figura 2A) pueden distinguirse las células del trofoblasto (T) y las de la masa interna (MCI). A su vez el trofoblasto se compone de trofoblasto polar (Tp), en contacto con la MCI, y de trofoblasto mural (Tm), sin contactar a la MCI. El endodermo primitivo (En) se aprecia como una capa de células que delimita la MCI hacia la cavidad blastocélica. Durante el primer día de cultivo en un medio con suero fetal (Figura 2B), el blastocisto eclosiona de la zona pelúcida y comienza a adherirse a la cápsula de cultivo por medio de las células del trofoblasto mural, etapa denominada **adhesión** (Figura 2C); es probable que las moléculas de matriz extracelular (MEC) presentes en el suero fetal representen en este caso un substrato de adhesión para el blastocisto, aunque también es posible que el propio blastocisto y/o las células del epitelio uterino durante la implantación *in vivo*, produzcan y secreten proteínas de MEC que actúen como substratos de adhesión. Al mismo tiempo (Figura 2D) las células del trofoblasto mural comienzan a migrar radialmente sobre la placa de cultivo, etapa de **extensión** (Figura 2D,E); a su vez que por un proceso de replicación de DNA sin división celular, se hacen poliploides y gigantes (Barlow y Sherman, 1972; Alexandre, 1985; Ilgreen, 1981; Sellens y Sherman, 1980). Durante el cuarto día de cultivo (Figura 2F) puede observarse lo que se ha llamado un **implante** *in vitro*, caracterizado básicamente por la presencia de las células trofoblásticas totalmente extendidas sobre la placa de cultivo y la MCI sobremontando el trofoblasto.

Es interesante señalar que la implantación *in vitro* del blastocisto de ratón se puede

inhibir en forma experimental, si se impide que el *conceptus* tome contacto con un sustrato (MEC por ejemplo) sobre el cual pueda adherirse (Gwatkin, 1966; Sherman, 1978; Morris y Potter; Potter y Morris, 1985). En estas condiciones la MCI se desarrolla en forma similar a lo que sucede cuando el blastocisto toma contacto con una superficie de adhesión, sin embargo el trofoblasto se desarrolla en forma diferente, ya que las células gigantes no sufren extensión. Puede decirse entonces que la implantación *in vitro* es inhibida por alteración en las fases de adhesión y extensión de las células trofoblásticas. Considerando la extensión del trofoblasto como un evento de la implantación del blastocisto *in vitro*, su inhibición constituye un sistema muy útil para estudiar la diferenciación del blastocisto, sus requerimientos de diversas moléculas y de contacto con una superficie de adhesión.

La similitud entre la implantación *in utero* e *in vitro* no es sólo morfológica. Desde que se inicia la adhesión y extensión del trofoblasto sobre el sustrato se observa variaciones en los productos génicos expresados por este tejido, de los cuales han sido analizados la actividad de la enzima β -glucuronidasa (Sellens y Sherman, 1980), la producción de activador de plasminógeno (Strickland et al., 1976) y la actividad de la enzima $\Delta^5,3\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa (3β -HSD) (Sherman y Atienza-Samols, 1977; Chew y Sherman, 1975; Sellens y Sherman, 1980). Estos marcadores de diferenciación revelan que el orden temporal y secuencial con que cambian no varía considerablemente con lo observado *in utero*, aunque sí se observan cambios cuantitativos.

Entre estos marcadores uno de los mejor estudiados ha sido la enzima 3β -HSD, responsable de la conversión de pregnenolona en progesterona (Johnson y Everitt, 1984). Se ha demostrado que homogenizados de trofoblasto de ratón, obtenidos mediante cultivo de blastocistos *in vitro* poseen actividad 3β -HSD (Chew y Sherman, 1973, 1975), la que se puede detectar tan temprano como el día 7 de gestación (Sherman, 1975), llegando a un máximo el día 11 y decayendo a partir del día 12 (Chew y Sherman, 1975). Es interesante destacar que esta secuencia es coincidente con lo observado *in utero*, aunque la actividad

enzimática es muy inferior en trofoblasto en cultivo que en trofoblasto diferenciado *in situ* (Sherman y Salomon, 1975).

Recientemente se ha analizado el patrón temporal de proteínas secretadas por blastocistos *in situ*, blastocistos *in vitro* y blastocistos *in utero* cuya implantación es diferida por ovariectomía. Los cambios en la secreción muestran una estricta secuencia, igual en los tres casos, aunque variando la cantidad relativa de algunas proteínas, retrasándose el proceso *in vitro* e interrumpiéndose en los blastocistos diferidos, pero reanudándose cuando estos son reactivados para implantarse, mediante inyección de estradiol (Nieder, 1989; Nieder et al., 1987).

En resumen, la similitud en el desarrollo y la diferenciación de los blastocistos de ratón *in vivo* e *in vitro* durante el período perimplantacional, permiten concluir que la diferenciación del trofoblasto de ratón *in vitro* constituye un modelo útil para el estudio de la implantación del *conceptus* de mamíferos en el endometrio.

3. LA MEC REGULA EL DESARROLLO Y LA DIFERENCIACION EN DIVERSOS SISTEMAS CELULARES: PARTICIPACION EN LA IMPLANTACION DEL *CONCEPTUS* DE RATON.

La diferenciación es un proceso regulado, en donde las interacciones entre la célula y su ambiente juegan un rol fundamental. Un componente importante del medio ambiente celular es la MEC, compuesta de glicoproteínas, proteoglicanos y glicosaminoglicanos que son secretados y ensamblados localmente en una red organizada a la cual las células se adhieren (Hay, 1981).

Se ha demostrado que la MEC regula el desarrollo y la diferenciación en diversos sistemas celulares (revisado por Watt, 1986 y Adams y Watt, 1993), entre ellos el *conceptus* de ratón, durante la etapa de implantación.

La implantación del *conceptus* de ratón es dependiente de interacciones entre las células

trofoblásticas y el ambiente uterino que las rodea. En el desarrollo normal, la invasión inicial por parte del trofoblasto primario estimula la diferenciación de los fibroblastos del estroma uterino a tejido decidual. Las células del estroma aumentan de tamaño y secretan una matriz semejante a membrana basal pericelular compuesta de LM, FN y colágeno tipo IV (Wewer et al., 1986). El trofoblasto secundario, derivado del cono ectoplacental, invade la decidua para formar la porción fetal de la placenta.

De manera semejante a las células tumorales en metástasis durante la invasión de los tejidos (Liotta et al., 1986), las células trofoblásticas invadirían el estroma uterino y el tejido decidual adhiriéndose, degradando y migrando a través de la MEC que rodea las células uterinas (Yagel et al., 1988; Glass et al., 1983; Fisher et al., 1989). Para ello las células trofoblásticas secretarían, durante la etapa de implantación, proteinasas específicas como son algunas metaloproteasas y el activador del plasminógeno (Behrendtsen et al., 1992; Strickland et al., 1976; Kubo et al., 1981).

La función de los componentes de MEC durante la implantación del *conceptus* de ratón ha sido investigada *in vitro*, determinándose las propiedades adhesivas de las células trofoblásticas primarias y secundarias de blastocistos cultivados en ausencia de suero fetal, sobre cápsulas recubiertas con proteínas de MEC (Armant, 1991; Armant et al., 1986a, b; Yelian et al., 1993; Romagnano y Babiarz, 1990, 1993; Sutherland et al., 1988; Carson et al., 1988; Richa et al., 1985; Farach et al., 1987; O' Shea et al., 1990). Utilizando este modelo experimental se ha demostrado que los blastocistos de ratón pueden adherirse y formar extensión de trofoblasto sobre placas cubiertas con FN (Armant, 1991; Armant et al., 1986a, b; Sutherland et al., 1988; Farach et al., 1987), LM (Armant, 1991; Armant et al., 1986a, b; Sutherland et al., 1988; Farach et al., 1987; Romagnano y Babiarz, 1990, 1993), entactina (Yelian et al., 1993), vitronectina (Sutherland et al., 1988), trombospondina (O shea et al., 1990), ácido hialurónico (Carson et al., 1987) y diversos tipos de colágeno (Sutherland et al., 1988; Farach et al., 1987; Carson et al., 1988). La extensión de trofoblasto que se produce en estas condiciones es morfológicamente similar

a la obtenida cultivando blastocistos en presencia de suero fetal, lo que indica que probablemente las proteínas de MEC presentes en el suero del medio de cultivo podrían modular la diferenciación del trofoblasto.

Las proteínas de MEC promueven la diferenciación del trofoblasto *in vitro* actuando al parecer a través de sus receptores ubicados en la superficie de las células trofoblásticas. La presencia del hexapéptido Gly-Arg-Gly-Asp-Ser-Pro, inhibe la extensión del trofoblasto sobre matrices de FN, pero no sobre matrices de LM (Armant et al., 1986b; Yelian et al., 1993). Esto indica que las células trofoblásticas tendrían receptores independientes para FN y LM, y que esta última participaría en la diferenciación del trofoblasto a través de un sitio distinto al que contiene la secuencia Arg-Gly-Asp (RGD).

Utilizando fragmentos proteolíticos de LM se ha demostrado que el trofoblasto se extiende sobre placas recubiertas con el fragmento E8, el cual contiene el dominio de unión a heparina de la molécula de LM; no así sobre placas recubiertas con el fragmento E1-4, el cual contiene la secuencia RGD, confirmándose así los resultados anteriores (Armant, 1991). Es interesante señalar que el fragmento E8 promueve también la extensión de neuritas en cultivo (Edgard et al., 1984).

La extensión de trofoblasto sobre sustratos de LM ocurre en presencia de heparina, heparán sulfato o heparinasa, lo que indica que el dominio de unión a heparina del fragmento E8 no participaría en el proceso (Armant, 1991). Este resultado se contrapone al obtenido por Farach et al. (1987), quienes demuestran que la extensión de trofoblasto sobre FN, LM o monocapas de células del epitelio uterino es inhibida en presencia de heparina soluble. Es interesante hacer notar que el blastocisto de ratón contendría moléculas tipo heparina sobre su superficie, que participarían en la diferenciación del trofoblasto, ya que la digestión de su superficie con heparinasa disminuye considerablemente la extensión de trofoblasto en cuando son cultivados en presencia de suero fetal (Farach et al., 1987).

El hecho de que los blastocistos de ratón puedan adherirse y formar extensión del

trofoblasto en ausencia de suero fetal, al ser cultivados sobre cápsulas recubiertas con proteínas de MEC, demuestra que estas moléculas pueden promover la diferenciación del trofoblasto. ¿Es entonces el suero (o algunos de sus componentes) un elemento prescindible en el proceso ?. En otras palabras, ¿se requieren sólo proteínas de MEC para que los blastocistos puedan implantarse ?. De ser así, ¿cuál sería entonces la participación del suero ?.

Por otro lado, sería muy importante conocer cómo la MEC regula la diferenciación del trofoblasto. ¿Es necesario que estas proteínas formen una estructura organizada, que represente un substrato sobre el cual los blastocistos puedan adherirse y producir extensión de trofoblasto ?; o ¿se requiere más bien una interacción del trofoblasto con la MEC, en forma independiente de una interacción con un substrato de adhesión ?.

4. PARTICIPACION DE LOS FACTORES DE CRECIMIENTO EN EL DESARROLLO Y LA DIFERENCIACION DE DIVERSOS SISTEMAS CELULARES: POSIBLE REGULACION DEL DESARROLLO Y LA DIFERENCIACION DEL *CONCEPTUS* DE RATON.

Los factores de crecimiento son polipéptidos pequeños sintetizados y secretados por tipos celulares específicos y que actúan regulando tanto la proliferación como la diferenciación celular. Estas moléculas interactúan con receptores ubicados sobre la membrana de la célula blanco; los receptores son usualmente glicoproteínas acopladas a sistemas de segundos mensajeros intracelulares a través de cambios conformacionales, los que muchas veces involucran reacciones de autofosforilación.

Existe evidencia de que los factores de crecimiento no sólo inducen proliferación celular, sino que también pueden actuar como inductores de diferenciación embrionaria (revisado por Mercola y Stiles, 1988). Diversas evidencias sugieren la participación de

estos factores en el desarrollo y la diferenciación del *conceptus* de ratón, tanto en etapa preimplantacional como perimplantacional.

El desarrollo análogo de los blastocistos en el útero y en cultivo, aun en ausencia de suero fetal (Sellens y Sherman, 1980), ha llevado a sugerir que el desarrollo y la diferenciación de estos blastocistos estaría sujeto a una programación intrínseca, es decir el propio *conceptus* produciría factores que regulen su desarrollo.

La idea de que los blastocistos producen factores que regulan la diferenciación celular es apoyada por el hecho de que ellos son capaces de controlar la diferenciación de otros tipos celulares, por ejemplo células tumorales que son inyectadas en la cavidad blastocélica (Pierce et al., 1982).

Los blastocistos de ratón producen, durante la etapa de implantación, actividad semejante a factores de crecimiento transformantes, que promueve el crecimiento de células no transformadas, independientemente de su anclaje (Rizzino, 1985). La idea de autoregulación en la diferenciación del *conceptus* de ratón *in vitro* es apoyada por el hecho de que los *concepti* preimplantacionales cultivados en grupo, presentan una mayor proporción de desarrollo hasta blastocisto con respecto a aquellos cultivados en forma individual; a su vez el desarrollo de estos últimos incrementa agregando al medio de cultivo, factores de crecimiento como EGF, TGF- α , TGF- β 1 (Paria y Dey, 1990). Por otro lado, se ha demostrado que factores de crecimiento como el EGF regulan diversos procesos durante el desarrollo del *conceptus* de ratón. Así, EGF incrementa la síntesis de ADN y ARN en los *concepti* de 2 células (Kuo et al., 1991) y la síntesis de proteínas en mórulas y blastocistos (Wood y Kaye, 1989).

Diversos antecedentes señalan la participación del EGF en la implantación del *conceptus* de ratón, tanto *in vitro* como *in situ*.

4.1 EL EGF EN LA IMPLANTACION DEL *CONCEPTUS* DE RATON.

El EGF se compone de una cadena polipeptídica única de 53 aminoácidos y de peso molecular 6000. Es sintetizado como un precursor unido a membrana que presenta una secuencia característica, rica en cisteína, repetida nueve veces; la copia terminal de esta repetición, cuando es separada desde el precursor, forma el EGF biológicamente activo (Scott et al., 1983).

En ratón, el EGF fue aislado inicialmente desde las glándulas submaxilares (el principal sitio de su síntesis) (Cohen, 1962); sin embargo se distribuye también en una amplia variedad de tejidos (Kasselberg et al., 1985).

Dependiendo del tejido sobre el cual actúe, el EGF ejerce diversos efectos; uno de los mejor caracterizados es el efecto mitogénico, por ejemplo en tejido conectivo, células gliales y células de la granulosa ovárica (Carpenter y Cohen, 1979). Sin embargo, numerosa evidencia sugiere también un efecto sobre la diferenciación en diversos sistemas celulares, entre ellos el *conceptus* de ratón pre y perimplantacional (Haimovici y Anderson, 1993; Wood y Kaye, 1989; Kuo et al., 1991; Paria y Dey, 1990) y el trofoblasto humano y de ratón (Morrish et al., 1987; Maruo et al., 1987, 1992).

En trofoblasto humano, la localización del EGF ha sido descrita casi exclusivamente en el citotrofoblasto en placentas de 4 a 5 semanas, ejerciendo aquí un efecto estimulador de la proliferación celular; mientras que en placentas de 6 a 12 semanas se localiza predominantemente en el sinciotrofoblasto, en donde estimula el fenotipo diferenciado, promoviendo la transformación de citotrofoblasto en sinciotrofoblasto y la secreción de hCG y lactógeno placentario por parte de este último tejido (Ladines-Llave et al., 1991; Morrish et al., 1987; Maruo et al., 1987, 1992). Es interesante señalar que se ha descrito también la localización de TGF- α en trofoblasto humano, postulándose una acción autocrina/paracrina para este factor (Hoffman et al., 1993; Horowitz et al., 1993).

EGF y TGF- α se localizan también en tejidos del tracto reproductivo de la madre: epitelio uterino y oviductal y decidua (Horowitz et al., 1993; Morishige et al., 1993); al

mismo tiempo, la expresión de estos factores en el epitelio del oviducto es proporcional al incremento en los niveles de estradiol séricos (Morishige et al., 1993). Todos estos antecedentes sugieren que EGF/TGF- α pueden tener algún rol en el desarrollo embrionario del ratón, regulando ya sea la diferenciación del propio *conceptus* y/o el desarrollo endometrial y la función del trofoblasto, durante la etapa de implantación.

Se ha descrito que, en el ratón, la concentración de EGF en glándulas submaxilares y en el plasma incrementa en el curso de la gestación (Kurachi y Oka, 1985). Al respecto, un dato muy importante es que la deficiencia de EGF durante la gestación en el ratón (causada por ejemplo por sialoadenectomía de las hembras preñadas) causa aborto en cerca del 50% de las hembras y además, retardo en el crecimiento uterino (Tsutsumi y Oka, 1987; Kamel et al., 1993). Además, EGF reemplaza a estradiol en la iniciación de la implantación en ratas hipofisectomizadas (Johnson y Chatterjee, 1993). Así, EGF podría regular la mantención de la preñez en el ratón, al parecer actuando a nivel del proceso de implantación.

Un análisis reciente del efecto de varios factores de crecimiento en la diferenciación del *conceptus* de ratón, indica que el EGF promueve la diferenciación del trofoblasto *in vitro* medida como extensión del tejido sobre la placa de cultivo (Haimovici y Anderson, 1993); esto sugiere la posibilidad de que el EGF regule la implantación, modulando la diferenciación del trofoblasto. Sin embargo, pensamos que este resultado no necesariamente pudiera significar un efecto del EGF sobre la diferenciación del trofoblasto. El EGF estimula la proliferación en diversos tipos celulares en cultivo y los autores recién mencionados obtienen una mayor superficie de extensión de trofoblasto en presencia del factor. Así, el resultado obtenido podría significar sólo un efecto sobre la proliferación del trofoblasto y no sobre su diferenciación. De esta forma, para determinar si el EGF regula la diferenciación del trofoblasto es necesario: 1. descartar un efecto de proliferación y 2. evaluar un efecto de diferenciación analizando algún marcador específico.

El EGF ejerce su acción biológica uniéndose a receptores específicos localizados en la superficie de la célula blanco; numerosa evidencia indica la presencia de receptores para EGF en el *conceptus* de ratón.

4.2 EL RECEPTOR DE EGF (EGFr) EN LA DIFERENCIACION DEL *CONCEPTUS* DE RATON.

El EGFr se compone de una cadena polipeptídica única de 1186 aminoácidos y de peso molecular 170000; contiene además una cantidad sustancial (40 kDa aproximadamente) de residuos oligosacáridos N-ligados (Carpenter y Cohen, 1990). El receptor comprende dos dominios funcionales unidos por una región de transmembrana (Cohen et al., 1980; Ushiro y Cohen, 1980; Ulrich y Schlessinger, 1990); el dominio extracelular es glicosilado (Cummings et al., 1985) y representa el sitio de unión de los ligandos EGF y TGF- α (Wewer et al., 1984), mientras que la porción intracelular posee un dominio tirosina quinasa intrínseco, el que fosforila varios sustratos solubles (Glenney et al., 1986) y de membrana (Margolis et al., 1989b), así como también el propio receptor (Ulrich y Schlessinger, 1990; Hunter y Cooper, 1981; Honegger et al., 1989; Margolis et al., 1989a), todo lo cual lleva finalmente a la ocurrencia de la respuesta celular.

Durante el desarrollo preimplantacional del ratón, la expresión del EGFr incrementa considerablemente luego del estado de 4 células (Wiley et al., 1992). En el estado de blastocisto, el receptor se localiza preferentemente en las células del trofoblasto (Dardik et al., 1992), ya sea cuando este tejido está aún no diferenciado (Paria y Dey, 1990; Dardik et al., 1992; Adamson, 1990) como cuando se extiende en una monocapa luego de un cultivo de tres días (Adamson y Meek, 1984). Por otro lado, se ha demostrado que la vía de transducción de la señal dependiente de EGF es funcional en blastocistos de ratón y al parecer sería importante en la regulación del desarrollo preimplantacional (Paria et al., 1991). Utilizando diversos agentes que modulan la funcionalidad del EGFr, se ha demostrado el requerimiento de un receptor funcional (es decir acoplado a sistemas de

transducción que determinen la ocurrencia de una respuesta celular) para el inicio de la cavitación en el *conceptus* de ratón, proceso que es considerado como el inicio de la diferenciación del trofoblasto (Brice et al., 1993). Un resultado muy interesante es que la expresión del EGFr es regulada por el nivel de hormonas esteroidales maternas, ya que decae fuertemente en blastocistos cuya implantación ha sido retardada por ovariectomía e inyección de progesterona; a su vez que aumenta cuando los blastocistos son reactivados por inyección de estradiol (Paria et al., 1993).

Se ha observado un aumento en la unión de [125 I]-EGF en úteros de hembras de ratón preñadas, con respecto a úteros de hembras no preñadas; la diferencia en la unión parece ser debida a un aumento en el número de receptores más que a cambios en la afinidad (Brown et al., 1989). Por otro lado, en trofoblasto humano, los niveles de EGFr aumentan concomitantemente con la diferenciación del tejido *in vitro* (Alsat et al., 1993), existiendo así una relación directa entre el estado de diferenciación del trofoblasto y la presencia de receptores para EGF (Maruo et al., 1987; Maruo y Mochizuki, 1987; Hofmann et al., 1992; Ladines-Llave et al., 1991; Lai y Guyda, 1984).

De acuerdo a los antecedentes señalados se ha propuesto que el EGFr podría participar en la implantación del blastocisto de ratón, tal vez regulando la diferenciación del trofoblasto. Sin embargo no se ha demostrado ni la presencia ni la funcionalidad del EGFr en los blastocistos implantados *in vitro*.

5. OBJETIVO GENERAL, HIPOTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS ESPECIFICOS.

El problema planteado en esta Tesis se refiere en general a la implantación del *conceptus* de mamíferos en el endometrio. Para aproximarse a una explicación de este proceso, es útil estudiar la diferenciación del trofoblasto de ratón, mediante sistemas de cultivo *in vitro*.

De acuerdo a los antecedentes expuestos anteriormente, existe evidencia que sugiere la participación del suero fetal, FN y LM en la diferenciación del trofoblasto de ratón *in vitro*; sin embargo, no existen antecedentes acerca de cómo estas moléculas ejercen su acción en el proceso. Al mismo tiempo es necesario determinar si el EGF y su receptor regulan la diferenciación del trofoblasto de ratón *in vitro*.

HIPOTESIS DE TRABAJO: 1. Se propone distinguir entre las dos siguientes hipótesis alternativas: a) la MEC requiere formar un substrato organizado que permita la adhesión del *conceptus* y la diferenciación del trofoblasto; b) la MEC requiere sólo interactuar con el tejido trofoblástico, sin necesidad de actuar como un substrato de adhesión. 2. Se propone que el EGF y su receptor regulan la diferenciación del trofoblasto de ratón *in vitro*.

OBJETIVOS ESPECIFICOS.

1. Determinar el efecto del suero fetal y la MEC (FN y LM) en la diferenciación del trofoblasto de ratón *in vitro*.
2. Determinar cómo FN y LM regulan la diferenciación del trofoblasto, distinguiendo entre las dos posibilidades mencionadas en la hipótesis.
3. Determinar si el EGF regula la diferenciación del trofoblasto de ratón *in vitro*.

4. Reconocer receptores para EGF en blastocistos implantados *in vitro*.
5. Determinar la funcionalidad del EGFr en blastocistos de ratón implantados *in vitro* y su posible relación con la diferenciación del trofoblasto.

MATERIALES Y METODOS

1. OBTENCION DE BLASTOCISTOS.

Se utilizaron blastocistos de ratón provenientes del cruce de hembras de 5 semanas de edad de la cepa Swiss-Rockefeller, con machos de la misma cepa.

Las hembras, que fueron mantenidas en un régimen de luz (13 horas)- oscuridad (11 horas) se indujeron a superovular inyectándoles intraperitonealmente 5 UI de suero de yegua preñada (PMS, Sigma) y 48 horas más tarde, 5 UI de gonadotrofina coriónica (hCG, Sigma). La cópula se reconoció por la presencia del tapón vaginal y se presume que ocurrió 12 horas después de la inyección de hCG.

Las hembras cruzadas se sacrificaron por dislocación cervical a las 86 horas post hCG, se extrajeron los cuernos uterinos y se obtuvo los blastocistos por perfusión de los mismos con medio de cultivo NCTC-135 (Sigma) (Sherman, 1975; Sherman y Salomon, 1975).

2. ELIMINACION DE LA ZONA PELUCIDA.

Cuando se realizaron cultivos sobre substratos de matriz extracelular, un cierto porcentaje de los blastocistos no eclosionaba de la zona pelúcida espontáneamente, por lo que se optó por eliminarla en la totalidad de los mismos antes de iniciar el cultivo en cualquiera de las condiciones que se describirán más adelante.

La zona pelúcida fue digerida incubando los blastocistos en medio salino ácido Tyrode , pH 2.4 durante 10 a 20 segundos (Pratt, 1987). Luego los blastocistos se lavaron varias veces en medio NCTC-135 y se dejaron por al menos media hora en el incubador para

permitir su recuperación después del tratamiento ácido, antes de iniciar el cultivo experimental.

3. CULTIVO DE BLASTOCISTOS.

3.1 Condiciones generales de cultivo.

Los blastocistos obtenidos a las 86 horas post hCG se cultivaron en medio NCTC-135 suplementado o no con los siguientes componentes o mezclas de los mismos: suero fetal de bovino (FBS, Gibco), fibronectina de plasma humano (FN, Sigma), laminina de membrana basal de sarcoma de ratón (LM, Sigma) o factor de crecimiento epidermal recombinante humano (EGF, Chiron Co.). El medio de cultivo fue siempre suplementado con antibióticos: penicilina 30 µg/ml y estreptomicina 100 µg/ml.

De acuerdo al experimento en realización, los blastocistos se cultivaron ya sea en forma individual, en gotas de 10 µl de medio de cultivo en cápsulas de 35 mm (Nunclon) ya sea recubiertas o no con FN o LM, o en grupos de diverso número en cápsulas de 4 pocillos (Nunclon) en un volumen de 200 µl de medio de cultivo y se mantuvieron en una atmósfera de 5% (v/v) de CO₂ en aire húmedo a 37° C. Para evitar la evaporación del medio de cultivo las cápsulas fueron mantenidas en cámaras húmedas herméticas equilibradas con la misma mezcla de gases.

A menos que se indique en el texto, los análisis en todas las condiciones experimentales fueron realizados a las 72 horas de cultivo.

Se realizaron dos modalidades de cultivo de blastocistos: a) adheridos a la placa de cultivo, lo que denominaremos blastocistos implantados o implantes y b) no adheridos, lo que denominaremos blastocistos impedidos de implantar.

3.1.1 Cultivo de blastocistos implantados.

Los blastocistos se cultivaron en forma individual o en grupos (se indicará en el experimento), de acuerdo a las condiciones descritas en 3.1. En estas condiciones los

blastocistos experimentan todos los cambios que llevan finalmente a la obtención de implantes (véase Figura 2).

3.1.2 Cultivo de blastocistos impedidos de implantar.

Los blastocistos se cultivaron en forma individual de acuerdo a las condiciones descritas en 3.1. Para este tipo de cultivo la cápsula fue invertida, de manera que los blastocistos quedaran suspendidos en la gota de medio de cultivo, no tomando contacto con la cápsula. Véase descripción del método en Figura 3. Esta técnica ha sido descrita por Morris et al. (1982, 1983) y Potter y Morris (1985) y es designada como **Gota Colgante**, por lo que los blastocistos cultivados en esta forma los denominaremos impedidos de implantar o cultivados en gota colgante.

Este sistema de cultivo permite evaluar el efecto de diversos agentes sobre la diferenciación del trofoblasto, ya que, en estas condiciones, el tejido no se diferencia como una monocapa (no se extiende). Así, cualquier agente que estimule la extensión del trofoblasto en gota colgante estaría promoviendo su diferenciación.

4. PREPARACION DE LAS CAPSULAS RECUBIERTAS CON FN O LM.

Las soluciones de FN y LM fueron preparadas en agua destilada estéril, a una concentración de 25 µg/ml; esta es la concentración habitualmente utilizada en experimentos de diferenciación de trofoblasto *in vitro* (Armant et al., 1986a, b; Sutherland et al., 1988). Para la preparación de las cápsulas se utilizó el protocolo descrito por Armant et al., (1986a, b). Las soluciones se colocaron como gotas individuales de 10 µl en cápsulas de cultivo plásticas y se incubaron por al menos 4 horas a 37° C en una atmósfera de 5% (v/v) de CO₂ en aire húmedo. Luego la solución de proteína fue removida y los puntos sobre los cuales la gota se aplicó se lavaron varias veces con agua destilada estéril y medio de cultivo Biggers suplementado con BSA (ultrapura, Sigma) 4 mg/ml (Hogan et al., 1986). Finalmente los puntos se cubrieron con medio de cultivo y el

sistema se equilibró por media hora con la mezcla de gases ya mencionada, antes de introducir los embriones.

5. DISEÑO EXPERIMENTAL.

5.1 Serie experimental 1.

Objetivo: Determinar el efecto del FBS y la MEC (FN y LM) en la diferenciación del trofoblasto de ratón *in vitro*.

Metodología: Se realizó cultivos de blastocistos implantados en las siguientes condiciones: 1. medio NCTC-135 suplementado con FBS; 2. medio NCTC-135 sobre cápsulas recubiertas con FN; 3. medio NCTC-135 sobre cápsulas recubiertas con LM; 4. medio NCTC-135 suplementado con FBS, sobre cápsulas recubiertas con FN; 5. medio NCTC-135 suplementado con FBS, sobre cápsulas recubiertas con LM. En cada condición se midió la superficie de extensión del trofoblasto, como una medida de su diferenciación y el contenido de proteínas de los embriones, como una medida de su crecimiento.

5.1.1. Cultivo en medio NCTC-135 suplementado con FBS.

Los blastocistos se cultivaron en forma individual como se indicó en 3.1. El medio de cultivo fue suplementado con FBS 10%; esta es la concentración óptima para el desarrollo de los blastocistos de ratón durante el período perimplantacional (Sherman, 1975; Sherman y Salomon, 1975). Se realizó al menos 6 experimentos por separado utilizando un número no inferior a 20 embriones en cada uno.

5.1.2. Cultivo en medio NCTC-135 sobre cápsulas recubiertas con FN o LM.

Los blastocistos se cultivaron en forma individual como se indicó en 3.1. Se utilizó cápsulas que fueron recubiertas con FN o LM como se indicó en el punto 4. Se realizó al menos 7 experimentos por separado utilizando un número no inferior a 30 embriones en cada uno.

5.1.3. Cultivo en medio NCTC-135 suplementado con FBS, sobre cápsulas recubiertas con FN o LM.

Los blastocistos se cultivaron en forma individual como se indicó en 3.1. Se utilizó cápsulas que fueron recubiertas con FN o LM como se indicó en el punto 4. El medio de cultivo fue suplementado con FBS 10%. Se realizó al menos 7 experimentos por separado utilizando como mínimo, 30 embriones en cada uno.

5.1.4. Medición de la extensión del trofoblasto.

La superficie de extensión del trofoblasto se cuantificó pesando la silueta de implantes recortada en papel diamante; el dibujo de la silueta se obtuvo a partir de fotografías ampliadas tomadas a microscopía de luz. Se usó como patrón el peso de 1 cm², cortado del mismo papel.

5.1.5. Medición del contenido de proteínas.

El contenido de proteínas se evaluó como una medida del crecimiento del *conceptus*; esto permite discriminar si el efecto de los agentes analizados es sobre la diferenciación del trofoblasto o sobre el crecimiento del embrión.

La cuantificación del contenido de proteínas se realizó de acuerdo al método de Bradford (Bradford, 1976), utilizando BSA como patrón. Al final del tercer día de cultivo los implantes se lavaron varias veces con amortiguador fosfato salino (PBS) y se

agruparon de 4 o 5 para realizar la medición. Cabe señalar que los blastocistos implantados se despegaron cuidadosamente de la placa de cultivo por medio de una micropipeta sellada en punta roma. La ruptura del tejido se realizó mediante tres ciclos de congelación-descongelación.

Las mediciones se realizaron en un Spectronic 20, Bausch Lomb.

5.2. Serie experimental 2.

Objetivo: Determinar cómo la matriz extracelular (FN y LM) regula la diferenciación del trofoblasto de ratón *in vitro*: a) requerimiento de una matriz organizada que represente un substrato sobre el cual el *conceptus* pueda adherirse y formar extensión del trofoblasto o b) requerimiento de una interacción matriz-trofoblasto en forma independiente de un contacto *conceptus*-substrato.

Metodología: Se realizó cultivos de blastocistos utilizando el sistema de la gota colgante (véase punto 3.1.2) y medio de cultivo NCTC-135 suplementado con FBS o bien FN o LM. De esta forma FN y LM no forman una matriz organizada como un substrato de adhesión, sino que se encuentran en solución. En estas condiciones se evaluó la extensión del trofoblasto mediante observación microscópica, teniendo en cuenta que en el *conceptus* cultivado en gota colgante con FBS el trofoblasto nunca se extiende. Además se cuantificó el contenido de proteínas de los *concepti* en las distintas condiciones de cultivo (véase punto 5.1.5.).

5.2.1. Cultivo en medio NCTC-135 suplementado con FBS.

Los blastocistos se cultivaron en forma individual de acuerdo a lo descrito en 3.1, pero en gota colgante. El medio de cultivo fue suplementado con FBS 10%. Se realizó al menos 6 experimentos por separado con un mínimo de 20 embriones cada uno.

5.2.2. Cultivo en medio NCTC-135 suplementado con FN o LM.

Los blastocistos se cultivaron en forma individual de acuerdo a lo descrito en 3.1, pero en gota colgante. El medio de cultivo fue suplementado con FN 25 µg/ml o LM en un rango de concentraciones entre 10 y 50 µg/ml. Se realizó al menos 6 experimentos por separado con un mínimo de 20 concepti cada uno.

5.3. Serie experimental 3.

Objetivo: Determinar si el EGF regula la diferenciación del trofoblasto de ratón *in vitro*.

Metodología: Se realizó cultivos de blastocistos implantados en medio NCTC-135 suplementado con FBS 10%, en presencia o ausencia de EGF. En estas condiciones se cuantificó la progesterona secretada, como un marcador de diferenciación del trofoblasto y la incorporación de [³H]-Timidina y el contenido de ADN, con el fin de evaluar un posible efecto del EGF sobre la proliferación celular en el embrión. El efecto del EGF se verificó utilizando un anticuerpo policlonal anti-EGF que inhibe la unión del ligando a su receptor.

5.3.1. Cultivo en medio NCTC-135 suplementado con FBS y EGF.

Los blastocistos se cultivaron en forma individual como se indicó en 3.1. El medio fue suplementado con FBS 10% y EGF 100 ng/ml. Se utilizó EGF recombinante humano, el que tiene una homología cercana al 80% con el EGF murino; además es el único que compite con el EGF de ratón en ensayos de unión de radioligando (Carpenter y Cohen, 1979), por lo que puede ser utilizado en nuestro sistema. Se ensayaron concentraciones de EGF entre 10 y 100 ng/ml, obteniéndose los cambios morfológicos más pronunciados con esta última concentración. Por lo tanto fue la elegida para realizar los experimentos.

5.3.2. Inhibición del efecto causado por el EGF en los blastocistos implantados *in vitro*.

Para verificar la especificidad del efecto causado por EGF en los blastocistos implantados se utilizó un anticuerpo policlonal anti-EGF recombinante humano producido en conejo, en el laboratorio del Dr. Alfonso Gonzalez (P.U.Católica de Chile). Este anticuerpo es capaz de inhibir la unión del EGF a su receptor, es decir bloquea el efecto del EGF (V. Faúndez, comunicación personal).

Los blastocistos fueron cultivados en forma individual como se indicó en 3.1 por 72 horas, ya sea en presencia o ausencia de EGF y/o el anticuerpo anti-EGF en diluciones de 1:10 y 1:100. La evaluación se efectuó al final del tercer día de cultivo observando y fotografiando los implantes en un fotomicroscopio Zeiss con óptica de Normarski.

Como control se utilizó el anticuerpo anti-EGF 1:10 preabsorbido por tres horas con EGF y suero preinmune 1:10.

5.3.3. Análisis de la producción de progesterona.

La producción de progesterona por los blastocistos implantados en las distintas condiciones de cultivo se analizó determinando la conversión de Pregnenolona a Progesterona (mediante la acción de la enzima 3 β -HSD), en grupos de 30 a 40 blastocistos. Ya que toda la progesterona producida por el *conceptus* es sintetizada y secretada por las células del trofoblasto (Sellens y Sherman, 1980), cualquier diferencia entre las condiciones analizadas indicaría un efecto sobre la diferenciación del trofoblasto. Los blastocistos se cultivaron como se indicó en 3.1, en presencia de 35 μ Ci de [3 H]-Pregnenolona ([7- 3 H (N)]-Pregnenolona, actividad específica 25 Ci/mmol, Du Pont-New England Nuclear) durante 48 o 72 horas. Al final del período de incubación, se colectó el medio condicionado por los implantes para cuantificar la progesterona secretada. Datos de otros autores (Sellens y Sherman, 1980) indican que el 95% o más de la progesterona formada por el blastocisto puede detectarse en el medio condicionado.

El medio condicionado se calentó por un minuto a 100°C. La separación y cuantificación de la [³H]-progesterona producida se determinó de acuerdo a la metodología descrita por O'Shaughnessy y Payne (1982). Los esteroides fueron extraídos con tolueno (2 x 3 ml); el extracto orgánico fue secado y resuspendido en 300 µl de metanol y sometido a cromatografía en capa fina (TLC). Se utilizó placas de poliéster cubiertas con sílica gel (Sigma), las cuales fueron analizadas en cloroformo-metanol (99:1). La identificación de la [³H]-progesterona en las placas cromatográficas se estableció con estándares internos de progesterona no radioactiva, visualizados por u.v a 258 nm.

La eficiencia del proceso de extracción de esteroides por tolueno se estableció de acuerdo a la radioactividad colocada en cada tubo; el porcentaje de recuperación en las distintas condiciones experimentales fue de un 85-90%. La eficiencia de la TLC en la recuperación y separación de la [³H]-progesterona fue de un 100% y fue medida en muestras paralelas.

Es necesario señalar que en algunos experimentos preliminares se trató de medir la progesterona producida por los blastocistos implantados mediante radioinmunoensayo, utilizando un anticuerpo monoclonal para progesterona; sin embargo, la medición de la progesterona endógena no fue posible debido a que la producción del esteroide estaba bajo la sensibilidad del método (500 fmoles/tubo).

5.3.4. Análisis de la incorporación de [³H]-Timidina.

Para la realización de estos experimentos se utilizó [³H]-Timidina ([metil-³H] Timidina, actividad específica 46 Ci/mmol, Amersham). Se siguió el protocolo descrito por Heyner et al. (1989), con algunas modificaciones. Los blastocistos, en grupos de 15 por punto, se cultivaron como se indicó en 3.1. El ensayo se inició ya sea a las 24 o a las 48 horas de cultivo, dándose un pulso de 12 horas de 50 µCi de [³H]-Timidina. La incubación fue terminada eliminando el medio de cultivo que contenía el trazador

radiactivo excedente y lavando los concepti tres veces con PBS enfriado a 4° C. Posteriormente se realizaron tres precipitaciones en frío con TCA 10%, cada una por 20 minutos. Luego se lavó una vez con metanol puro y el tejido fue disuelto en 200 µl de NaOH 1N, acidificado con HCl a neutralidad y traspasado a los correspondientes viales para luego contarlo en un contador de centelleo Beckman.

5.3.5. Análisis del contenido de ADN.

Para analizar el contenido de ADN de los blastocistos implantados se utilizó el método descrito por Labarca y Paigen (1980), utilizando Hoescht 33258.

Los blastocistos, en grupos de 20, se cultivaron como se indicó en 3.1. Al final del tercer día de cultivo, se lavaron dos veces en PBS y se disolvieron en 100 µl de SDS 2% en amortiguador ETN (Leake y Habib, 1987). Una vez disueltos se les agregó 2.4 ml de Hoescht 33258 100 µM en amortiguador ETN y se incubaron por 15 minutos a temperatura ambiente. La fluorescencia fue leída en un espectrofluorímetro Perkin Elmer a 450 nm, con una longitud de onda de excitación de 360 nm.

5.4. Serie experimental 4.

Objetivo: Reconocer receptores para EGF en los blastocistos de ratón implantados *in vitro*.

Metodología: Se utilizó dos estrategias experimentales: 1. ensayos de unión de radioligando; 2. ensayos de entrecruzamiento (cross-linking), a los blastocistos implantados *in vitro*.

5.4.1. Ensayos de unión de [¹²⁵I]-EGF a los blastocistos implantados *in vitro*.

[¹²⁵I]-EGF fue gentilmente proporcionado por el Dr. Alfonso González. La actividad específica promedio fue de 300.000 cpm/ng. Para la realización de este tipo de

experimento se empleó un número no inferior a 100 blastocistos por punto, ya que hubo varios intentos sin éxito cuando se utilizó una cantidad inferior de embriones. Se siguió el protocolo descrito por Faúndez et al. (1992).

Los blastocistos se cultivaron como se indicó en 3.1, por 72 horas. Aproximadamente 3 horas antes de realizar el ensayo de unión; el medio de cultivo de los implantes fue reemplazado por uno carente de suero, con el propósito de evitar que el EGF probablemente presente en el suero pudiera provocar internalización de los receptores de EGF.

Los implantes se lavaron una vez con PBS y luego se les agregó el amortiguador de ensayo (Faúndez et al., 1992). El experimento se inició exponiendo los implantes a 15 ng/ml de [125 I]-EGF, ya sea en ausencia o en presencia de 2 μ g/ml de EGF no marcado para determinar la unión inespecífica. La unión de radioligando se efectuó a 4° C durante 2 horas (tiempo al cual se logra el equilibrio en otros sistemas conocidos, véase Faúndez et al., 1992) en agitación contnua, al final de lo cual el EGF no unido fue eliminado con 4 lavados en PBS 0.1% BSA (libre de proteasas) enfriado en hielo. Las cuentas unidas específicamente se solubilizaron con NaOH 1N y se contaron en un contador gamma (RackGamma, Pharmacia LKB Biotechnology, Inc.).

5.4.2. Ensayos de entrecruzamiento (cross-linking) de [125 I]-EGF a los blastocistos implantados *in vitro*.

Para la realización de los experimentos de entrecruzamiento de [125 I]-EGF, primero se efectuó el ensayo de unión de radioligando como se describió en el punto anterior. Posterior a los lavados con PBS-BSA se lavó dos veces con PBS solo para eliminar el BSA de la cápsula de cultivo. Los implantes fueron luego incubados con 2 mM de DSS (Pierce,Co.) por media hora a temperatura ambiente en agitación contnua (Neufeld et al., 1987). Luego de este tiempo se bloqueó el DSS libre incubando con $\text{NH}_4 \text{Cl}$ 6 mM por 10 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente las muestras se mezclaron con

amortiguador de carga (Hames, 1981) y las proteínas se separaron en geles de electroforesis de poliacrilamida con SDS (Hames, 1981), los cuales fueron expuestos a -80°C utilizando películas Kodak X-Omat AR con placas intensificadoras, por un mes aproximadamente.

5.5. Serie experimental 5.

Objetivo: Determinar la funcionalidad del EGF r en los blastocistos implantados *in vitro* y su posible relación con la diferenciación del trofoblasto.

Metodología: Se realizó ensayos de fosforilación de proteínas en residuos tirosina, seguido de inmunoprecipitación con anticuerpos monoclonales anti-fosfotirosina. Los ensayos se realizaron tanto en blastocistos implantados como impedidos de implantar.

5.5.1. Ensayos de fosforilación de proteínas.

Al unirse EGF a su receptor se produce la fosforilación en residuos tirosina, de varios sustratos solubles y de membrana, como también del propio receptor. Entonces, mediante experimentos de fosforilación e inmunoprecipitación con anticuerpos monoclonales anti-fosfotirosina debiéramos poder detectar el receptor y otros sustratos fosforilados.

Los ensayos de fosforilación se realizaron según protocolos descritos, con algunas modificaciones (Faúndez et al., 1992), utilizando $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ (actividad específica 6000 Ci/mmol, Du Pont-New England Nuclear).

Los blastocistos, en número de 70 por punto, se cultivaron como se indicó en 3.1, por 72 horas. Al final del tercer día de cultivo, los implantes se rompieron por tres ciclos de congelación a -80°C y descongelación a 37°C , en amortiguador de fosforilación (Faúndez et al., 1992). El ensayo se inició preincubando los implantes por 10 minutos a 0°C (en un baño de agua-hielo) ya sea en ausencia o presencia de $1\ \mu\text{g}$ de EGF no marcado, en el amortiguador ya mencionado. La reacción de fosforilación propiamente tal se inició agregando $20\ \mu\text{Ci}$ de $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ + $15\ \mu\text{M}$ de ATP no marcado por 10

minutos a 0° C. El ensayo se detuvo agregando 1 ml. de amortiguador de lisis (Faúndez et al., 1992) y solubilizando por 20 minutos a 4° C en agitación rotatoria. Posteriormente las muestras se centrifugaron a 14.000 rpm en una microcentrífuga Eppendorf y el sobrenadante (que contenía las proteínas fosforiladas) fue utilizado para el ensayo de inmunoprecipitación.

5.5.2. Ensayos de inmunoprecipitación con anticuerpos monoclonales anti-fosfotirosina.

Las proteínas fosforiladas en tirosina por acción de EGF presentes en el sobrenadante obtenido del ensayo de fosforilación, se inmunoprecipitaron utilizando el anticuerpo monoclonal de ratón anti-fosfotirosina 2G8.D6 (catálogo ATCC n° HB8190). El ensayo se realizó siguiendo protocolos establecidos (Kriss et al., 1985; Margolis et al., 1989, 1990), con algunas modificaciones. Los sobrenadantes se incubaron por 3 horas a temperatura ambiente en agitación continúa, con el complejo resina-anticuerpo. La resina utilizada fue Sefarosa-Proteína G (Pharmacia, Uppsala, Sweden), la que ha resultado apropiada para ensayos de inmunoprecipitación con el anticuerpo monoclonal utilizado (Faúndez et al., 1992). Los complejos antígeno-anticuerpo unidos a la resina se lavaron varias veces en PBS y se centrifugaron a 14.000 rpm. Los precipitados se resuspendieron en amortiguador de carga y las proteínas fosforiladas en tirosina se separaron en geles de electroforesis de poliacrilamida con SDS como se señaló anteriormente, pero exponiendo por un período de dos semanas.

RESULTADOS

1. DIFERENCIACION DEL TROFOBLASTO: REGULACION POR ELEMENTOS DE MATRIZ EXTRACELULAR.

Al cuantificar la superficie de extensión del trofoblasto en las diversas condiciones de cultivo analizadas (**Figura 4**), observamos diferencias significativas, lo cual no se había descrito anteriormente. En concordancia con lo demostrado por otros autores (Armant et al., 1986a,b; Sutherland et al., 1988), nuestros resultados indican que los blastocistos de ratón de día 4 de gestación cultivados sobre cápsulas recubiertas con FN y LM se adhieren a la placa y forman extensión de trofoblasto. Sin embargo, la superficie de extensión obtenida en estas condiciones resultó ser significativamente menor con respecto a la de blastocistos cultivados en presencia de FBS. La mayor superficie de extensión se logró al utilizar cápsulas recubiertas con FN o LM y además, medio de cultivo que contiene FBS. En estas condiciones se obtuvo una superficie de extensión de trofoblasto mayor que la que se obtendría al sumar las superficies logradas con FN o LM solas y con FBS solo.

El incremento en la superficie de extensión que se obtiene en las distintas condiciones podría deberse sólo a un incremento en el crecimiento del *conceptus*. Para descartar esta posibilidad medimos el contenido de proteínas en los blastocistos implantados, obteniéndose los resultados que se ilustran en la **Figura 5**. De acuerdo a estos resultados el suero, FN y LM no afectan el crecimiento del *conceptus*, por lo que actuarían promoviendo la diferenciación del trofoblasto.

1.1 CULTIVO DE BLASTOCISTOS EN GOTA COLGANTE Y EFECTO DE LM.

Al cultivar blastocistos de ratón por tres días en un medio suplementado con FBS, se obtiene un blastocisto implantado (**Figura 6**). Puede observarse claramente el trofoblasto (T) extendido como una monocapa sobre la placa de cultivo y la masa celular interna (MCI), sobremontándolo. Al realizar el cultivo en condiciones similares pero en gota colgante, los blastocistos se aprecian como el ilustrado en la **Figura 7**. En este caso es posible distinguir la región embriónica (Em), es decir la MCI, en un extremo y las células trofoblásticas (T) en el otro. Comparando con la **Figura 6**, puede apreciarse claramente la ausencia de células trofoblásticas extendidas.

Al cuantificar el contenido de proteínas de los blastocistos cultivados en ambas condiciones (**Figura 8**), no se obtuvo diferencias significativas, es decir la inhibición de la implantación no altera el crecimiento del *conceptus*, pero sí la diferenciación del trofoblasto, medida como extensión.

Al cultivar los blastocistos en gota colgante por tres días en un medio en presencia de LM (**Figura 9a**), se obtuvo un desarrollo similar a la situación control, es decir a blastocistos implantados *in vitro* en un medio con FBS. Se observa las células trofoblásticas formando una monocapa (T) y la MCI sobremontando el trofoblasto (cabe hacer notar que la superficie de extensión de trofoblasto obtenida en estas condiciones fue muy inferior a la situación control). Con aumento mayor (**Figuras 9b y c**) es posible observar las prolongaciones de las células trofoblásticas y sus núcleos gigantes (N). Al cuantificar el contenido de proteínas de estos implantes vimos que no hay diferencias con respecto al control (**Tabla 1**). Es interesante hacer notar que, a distintas concentraciones de LM, entre 10 y 50 $\mu\text{g/ml}$, se observó que la mayor proporción de blastocistos con trofoblasto extendido se obtenía entre los 25 y 40 $\mu\text{g/ml}$.

Al realizar el cultivo en gota colgante con LM y además en presencia de FBS,

observamos que el efecto de LM fue inhibido, es decir los blastocistos se desarrollaron en forma similar a los cultivados sólo con FBS, en gota colgante.

Por otro lado, los blastocistos cultivados en gota colgante con FN se desarrollaron morfológicamente similares a aquellos cultivados en iguales condiciones, en presencia de FBS, es decir FN no produjo ningún efecto aparente.

2. EFECTO DE EGF EN BLASTOCISTOS DE RATON IMPLANTADOS *IN VITRO*.

Al cultivar los blastocistos por tres días en presencia de FBS y EGF, se obtuvo implantes con un trofoblasto de superficie comparable a la de implantes controles cultivados sólo con FBS. Sin embargo, los blastocistos implantados en presencia de EGF mostraron cambios morfológicos (**Figura 10**), caracterizados fundamentalmente por la presencia de núcleos muy prominentes (N) en las células gigantes del trofoblasto (T) (comparar con **Figura 6**).

Al utilizar un anticuerpo policlonal anti-EGF para demostrar la especificidad del efecto causado por el factor, obtuvimos los resultados ilustrados en la **Figura 11**. La **Figura 11 A** muestra un blastocisto cultivado por tres días en presencia de FBS y EGF; se observó la prominencia de los núcleos, similar a la **Figura 10**. Al realizar el cultivo en las mismas condiciones, pero en presencia del anticuerpo anti-EGF en una dilución de 1:10, el efecto de EGF fue totalmente inhibido (**Figura 11 B**), ya que no se observaron núcleos prominentes; es interesante notar, como se esperaba, la similitud de estos implantes con aquellos cultivados sólo con FBS (**Figura 6**). Como control se utilizó el anticuerpo que había sido preabsorbido por 3 horas con EGF (**Figura 11 C**) y suero preinmune (**Figura 11 D**). En ambas condiciones el efecto de EGF no fue inhibido.

3. EL EGF Y LA DIFERENCIACION DEL TROFOBLASTO: UN EFECTO DE PROLIFERACION O DE DIFERENCIACION ?

Al cuantificar la incorporación de [³H]-Timidina en los blastocistos cultivados por 24 y 48 horas (**Figura 12**) observamos que, a las 24 horas, EGF no modifica la síntesis de ADN; sin embargo a las 48 horas de cultivo, EGF causa una disminución en la síntesis de ADN casi en un 50%. Es interesante notar que ya a las 48 horas, puede observarse el efecto de EGF sobre los blastocistos implantados ilustrado en la **Figura 10**, vale decir habría una correlación temporal entre la ocurrencia de este efecto y la inhibición en la síntesis de ADN.

Al cuantificar el contenido de ADN en los blastocistos implantados a los tres días de cultivo (**Figura 13**) se constató que EGF provocaba una disminución considerable, cercana al 50%, con respecto a los blastocistos controles cultivados en ausencia de EGF.

Al analizar la progesterona secretada por los blastocistos implantados *in vitro*, a las 48 y a las 72 horas de cultivo (**Figura 14**) pudimos observar que, a las 48 horas, los medios condicionados por los blastocistos cultivados ya sea en ausencia o en presencia de EGF presentaban niveles similares de progesterona; sin embargo a las 72 horas de cultivo, EGF causa una disminución en los niveles del esteroide.

4. EL EGFr EN LA DIFERENCIACION DEL TROFOBLASTO.

La presencia de receptores se verificó mediante un ensayo de unión de [¹²⁵I]-EGF, en el cual se obtuvo una unión específica de [¹²⁵I]-EGF (2016 cpm /128 implantes), la que fue casi totalmente inhibida en presencia de un exceso de EGF no marcado (204 cpm /128 implantes).

Al analizar la presencia del EGFr mediante ensayos de unión y entrecruzamiento de

[¹²⁵I]-EGF (**Figura 15**) detectamos una banda única cuya masa molecular correspondió al del complejo EGF (6 kDa)-EGFr (170 kDa); esta banda no fue detectada en la presencia de EGF no marcado, lo que concuerda con los resultados obtenidos en el ensayo de unión.

A continuación era necesario verificar la funcionalidad de los receptores. La **Figura 16** ilustra el resultado de los experimentos de fosforilación e inmunoprecipitación con anticuerpos monoclonales anti-fosfotirosina, realizados tanto en blastocistos con el trofoblasto diferenciado, es decir implantados *in vitro* (**I**), como en blastocistos en los cuales la diferenciación del trofoblasto se encuentra inhibida, es decir cultivados en gota colgante (**G**). Cuando los blastocistos fueron expuestos a EGF (véase punto 5.5.1 de Materiales y Métodos), los resultados revelaron, en ambos casos, la presencia de una proteína fosforilada cuya masa molecular corresponde al del EGFr (170 kDa). Queda entonces en evidencia que la actividad tirosina quinasa del EGFr es gatillada por el EGF en el *conceptus* de ratón perimplantacional, como era esperable para un receptor funcional. Sin embargo, y como puede observarse en la **Figura 16**, el nivel de fosforilación en tirosina disminuyó cuando el trofoblasto se encontraba en un estado no diferenciado, es decir en los blastocistos impedidos de implantar.

Tabla 1. Contenido de proteínas en conceptus cultivados en gota colgante

Suplemento del medio de cultivo	Contenido de proteínas ($\mu\text{g}/\text{conceptus} \pm \text{d.s.}$)
Suero	1.39 ± 0.14
Laminina	1.37 ± 0.17 (*)

* $p > 0.05$ versus conceptus cultivados sin laminina

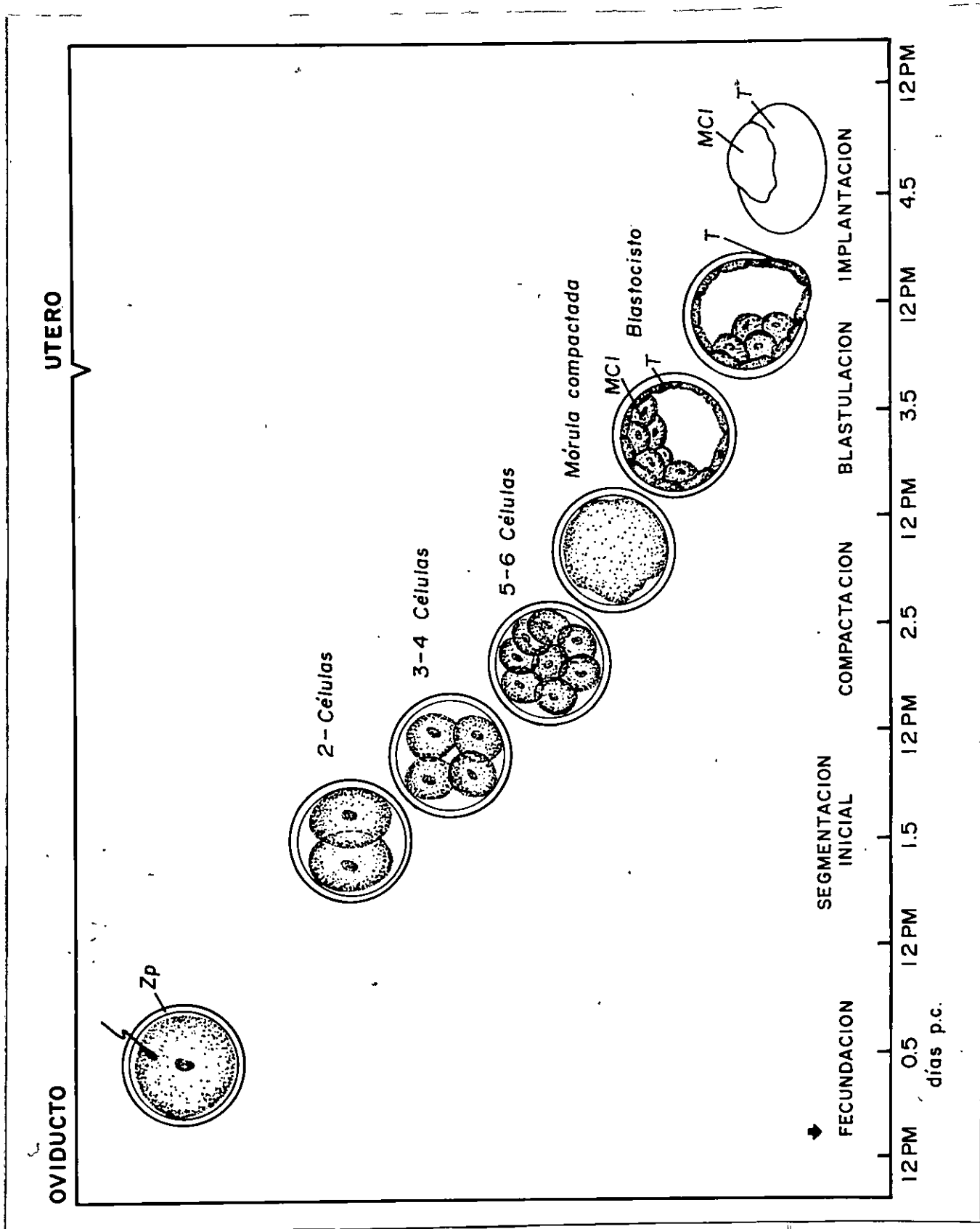


FIGURA 1. Esquema del desarrollo inicial del ratón (adaptado de Hogan et al., 1986).

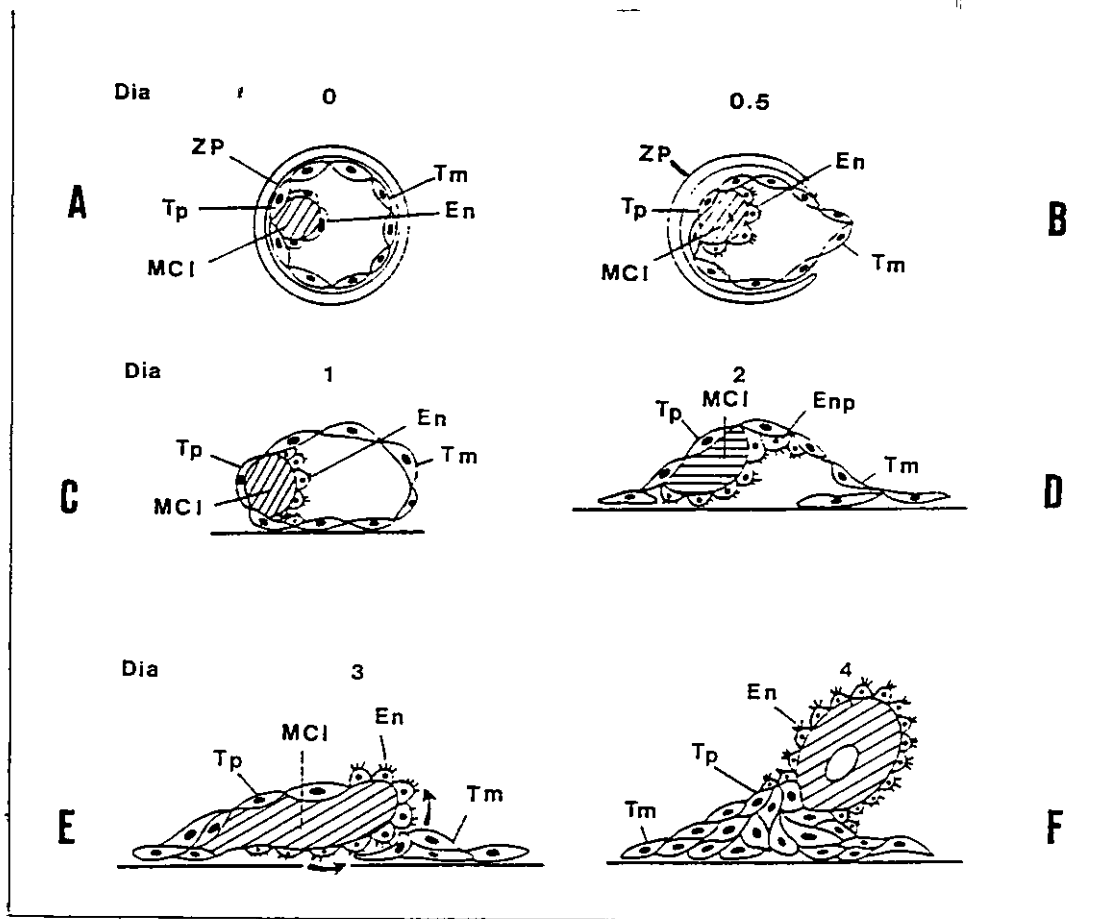


FIGURA 2. Esquema del proceso de **implantación *in vitro***, (adaptado de Gonda y Hsu 1980), mostrando las fases de **eclosión, adhesión y extensión** (véase Introducción).

zp: zona pelúcida; Tp: trofoblasto polar; Tm: trofoblasto mural; En: endodermo; MCI: masa celular interna; Enp: endodermo primitivo.

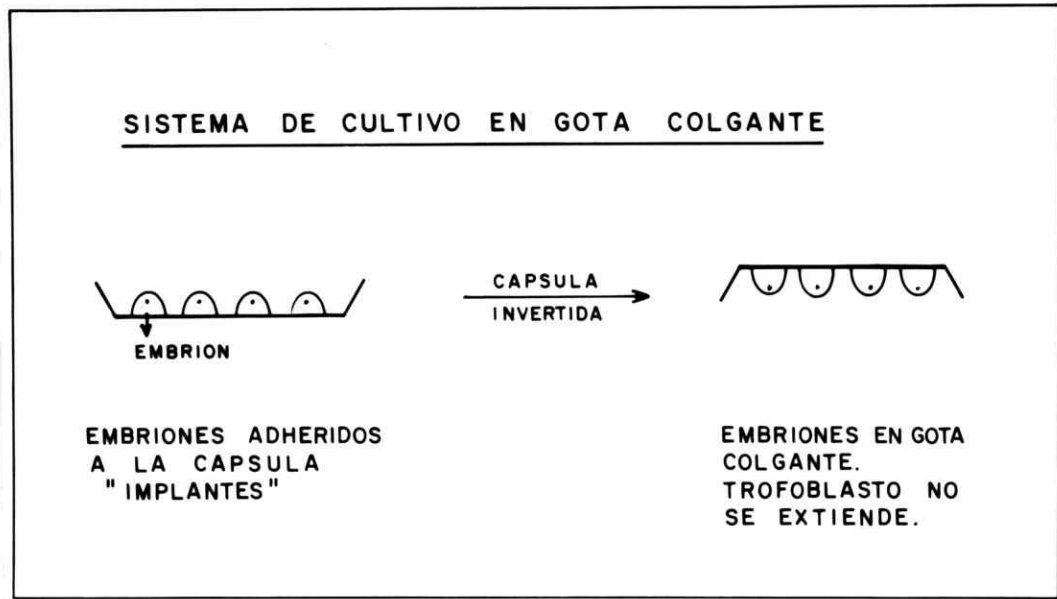


FIGURA 3. Esquema del sistema de cultivo en **gota colgante**. Los blastocistos son cultivados en forma individual en microgotas de medio de cultivo; inmediatamente la cápsula es invertida, de tal modo que los blastocistos queden suspendidos en la gota, no tomando contacto con la cápsula de cultivo. De esta forma se impide la adhesión del blastocisto y la extensión del trofoblasto, es decir la implantación *in vitro*.

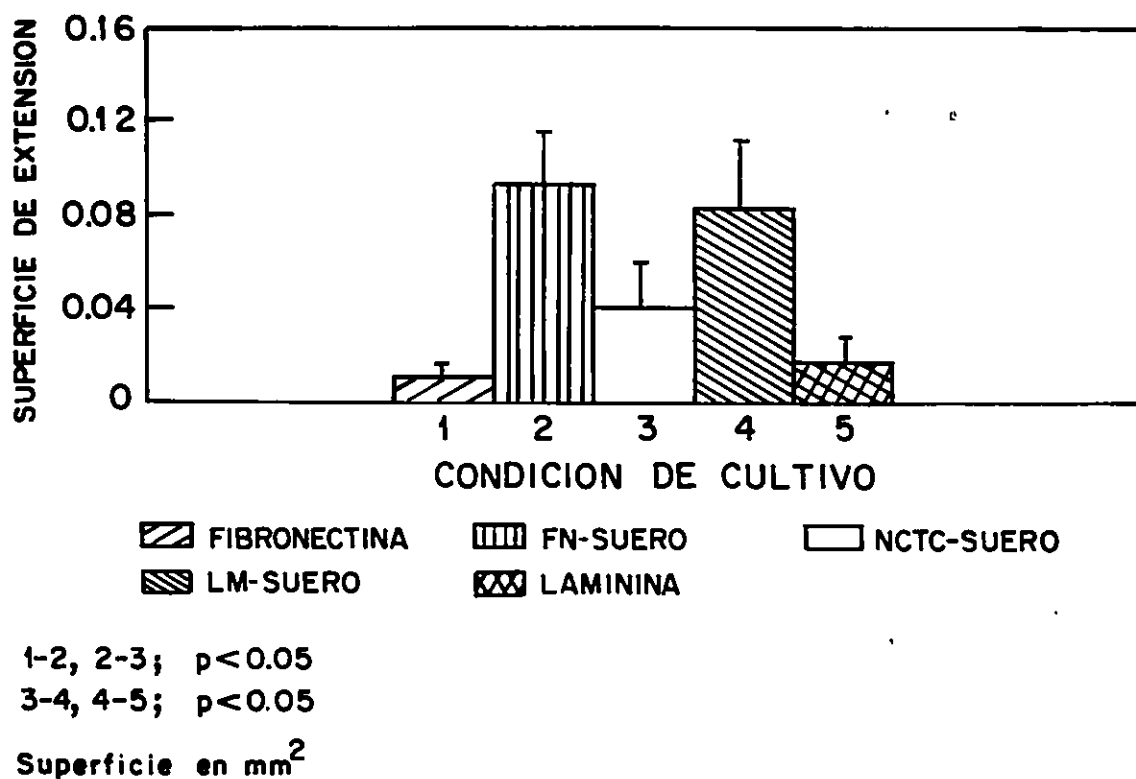
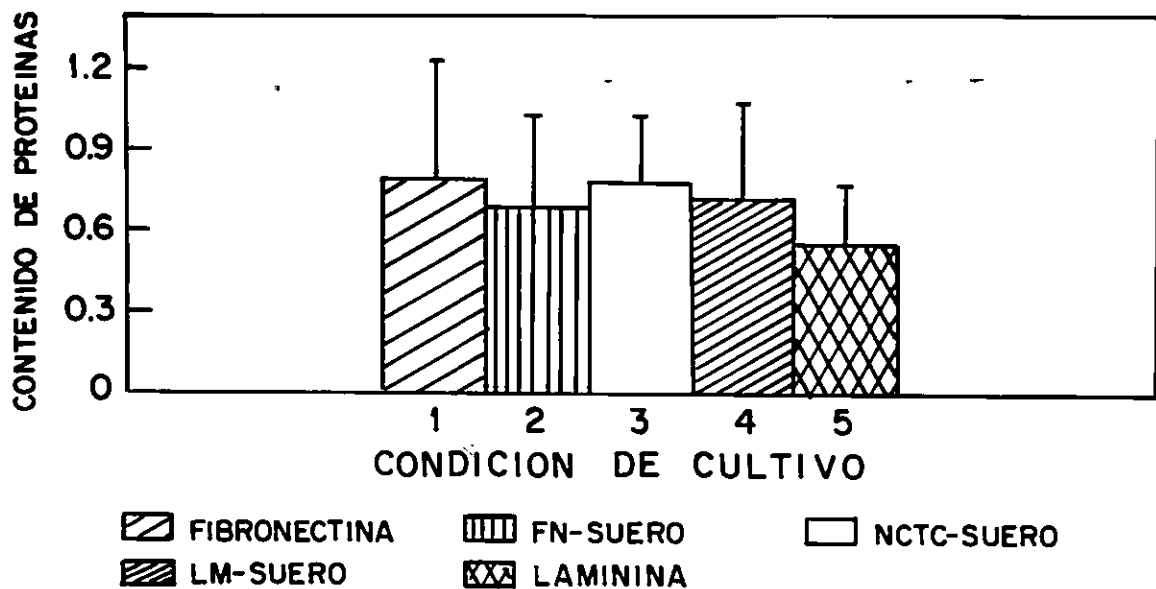


FIGURA 4. Superficie de extensión del trofoblasto en distintas condiciones de cultivo. Los blastocistos se cultivaron por tres días en las siguientes condiciones: a) medio NCTC-135 suplementado con FBS (NCTC-SUERO); b) cápsulas recubiertas con FN (FIBRONECTINA); c) cápsulas recubiertas con LM (LAMININA); d) cápsulas recubiertas con FN y medio con FBS (FN-SUERO); e) cápsulas recubiertas con LM y medio con FBS (LM-SUERO). Los resultados se analizaron por la prueba de Mann-Whitney.



1-2, 2-3, $p > 0.05$

3-4, 4-5, $p > 0.05$

Mediciones expresadas en µg/embrión

FIGURA 5. Contenido de proteínas en blastocistos implantados en diversas condiciones de cultivo. Los blastocistos se cultivaron por tres días en las siguientes condiciones: a) medio NCTC-135 suplementado con FBS (NCTC-SUERO); b) cápsulas recubiertas con FN (FIBRONECTINA); c) cápsulas recubiertas con LM (LAMININA); d) cápsulas recubiertas con FN y medio con FBS (FN-SUERO); e) cápsulas recubiertas con LM y medio con FBS (LM-SUERO). Los resultados se analizaron por la prueba de t' student.

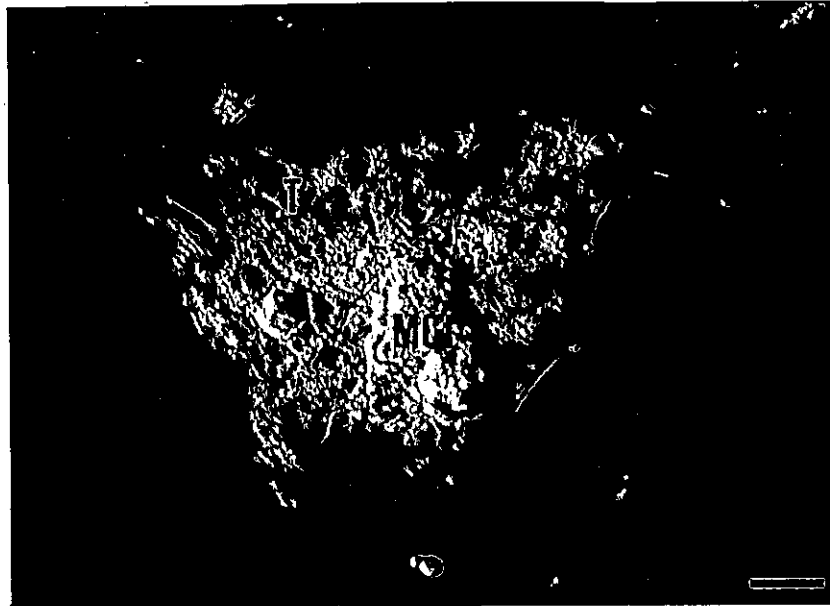


FIGURA 6. Blastocisto de ratón implantado *in vitro*. Los blastocistos se obtuvieron al cuarto día de gestación y se cultivaron por tres días en medio NCTC-135 suplementado con FBS 10%. Se observan las células trofoblásticas (T) extendidas sobre la cápsula de cultivo y la masa celular interna (MCI) sobremontando el trofoblasto (esta imagen correspondería al esquema F de la Figura 2). Fotografía tomada a microscopía de luz con óptica de Nomarski. Barra: 36 μ m.

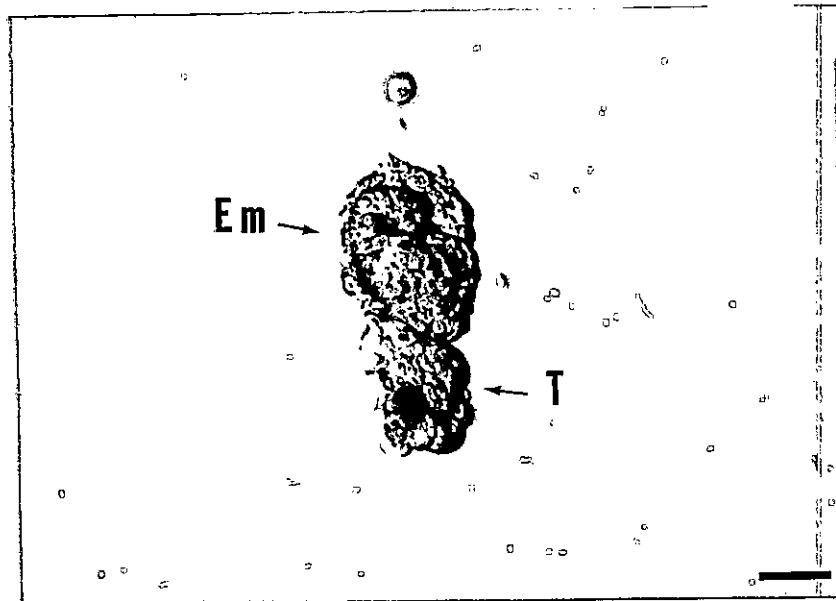


FIGURA 7. Blastocisto de ratón impedido de implantar por cultivo en gota colgante. Los blastocistos se obtuvieron al cuarto día de gestación y se cultivaron en gota colgante por tres días, en medio NCTC-135 suplementado con FBS 10%. Los blastocistos se observan en un estado colapsado y de apariencia bilobulada; en uno de los lóbulos pueden distinguirse las células gigantes del trofoblasto (T) y en el extremo opuesto, correspondiente a la región embriónica (Em), células más pequeñas que forman la MCI. El rasgo más notable de estos embriones es la ausencia de células trofoblásticas extendidas (comparar con Figura 6). Fotografía tomada a microscopía de luz. Barra: 36 μ m.

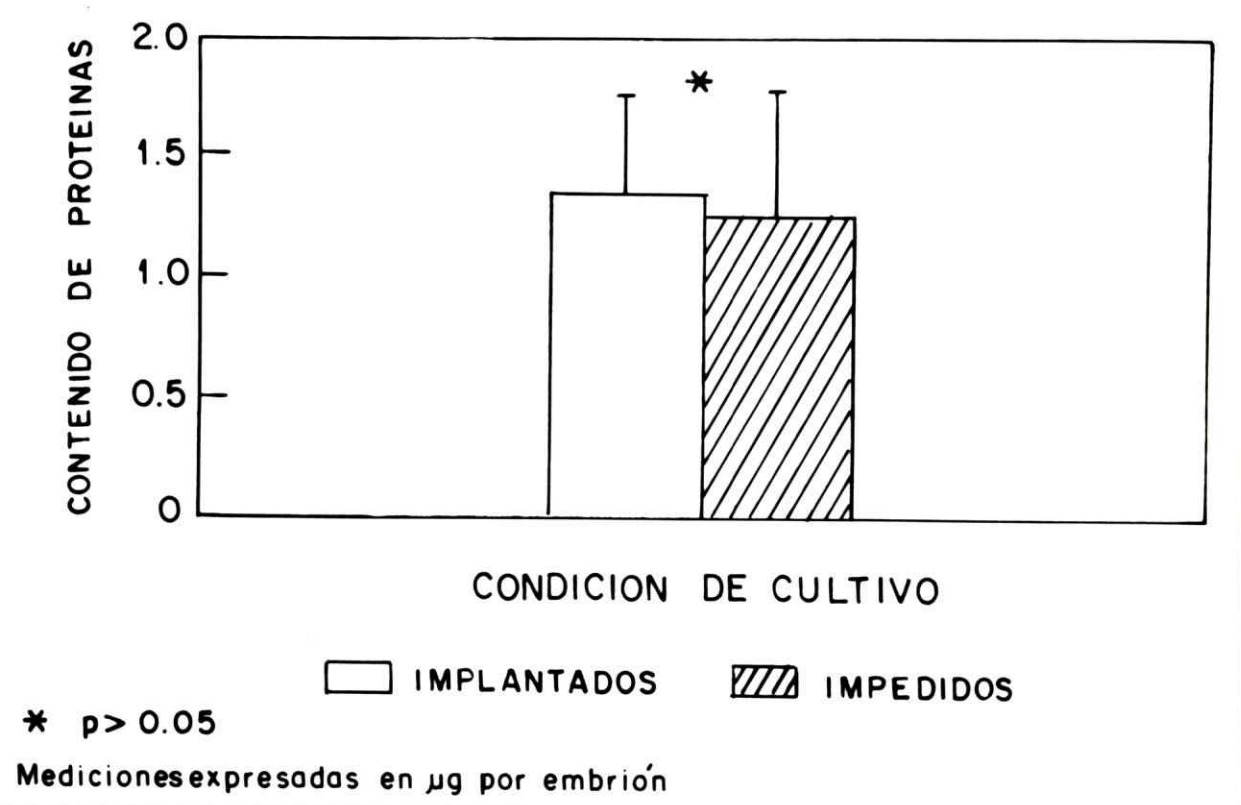
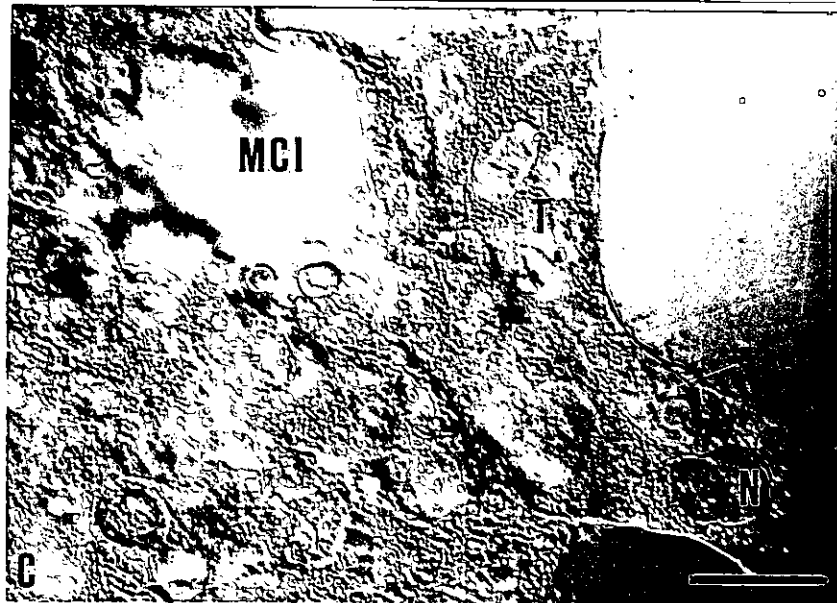
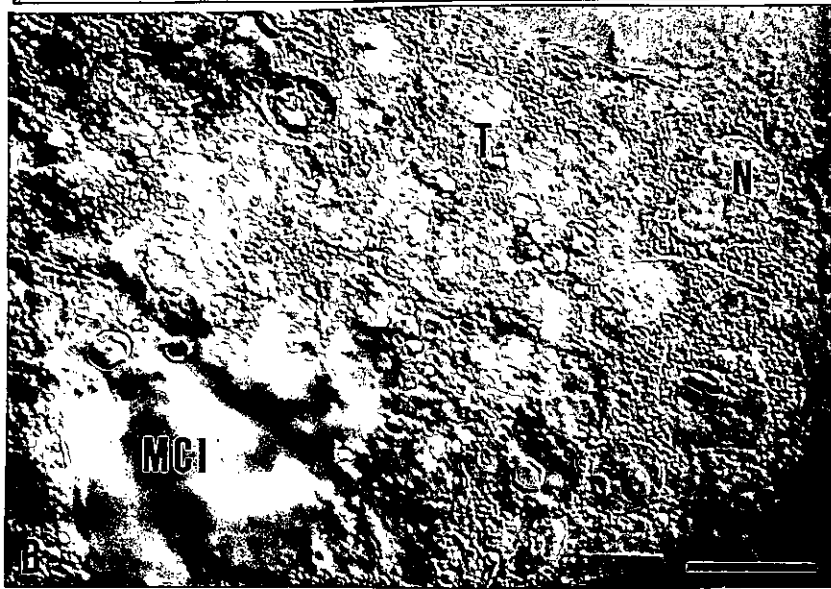


FIGURA 8. Contenido de proteínas en blastocistos implantados e impedidos de implantar. Los blastocistos se cultivaron por tres días en medio NCTC-135 suplementado con FBS 10% . Los resultados se analizaron por la prueba de t' student.

FIGURA 9. Cultivo de blastocistos en gota colgante y efecto de LM. Los blastocistos se cultivaron por tres días en gota colgante, en medio NCTC-135 suplementado con LM 25 µg/ml. A) Con aumento menor puede apreciarse el trofoblasto (T) extendido como una monocapa y la masa celular interna (MCI) sobremontándolo. Cabe hacer notar la similitud entre estos blastocistos implantados y aquellos cultivados *in vitro* en un medio con suero (comparar con Figura 6). B) y C) Con aumento mayor se distinguen más claramente las células trofoblásticas (T) y los núcleos gigantes característicos de estas células. Fotografías tomadas a microscopía de luz con óptica de Nomarski. Barra: 36 µm.



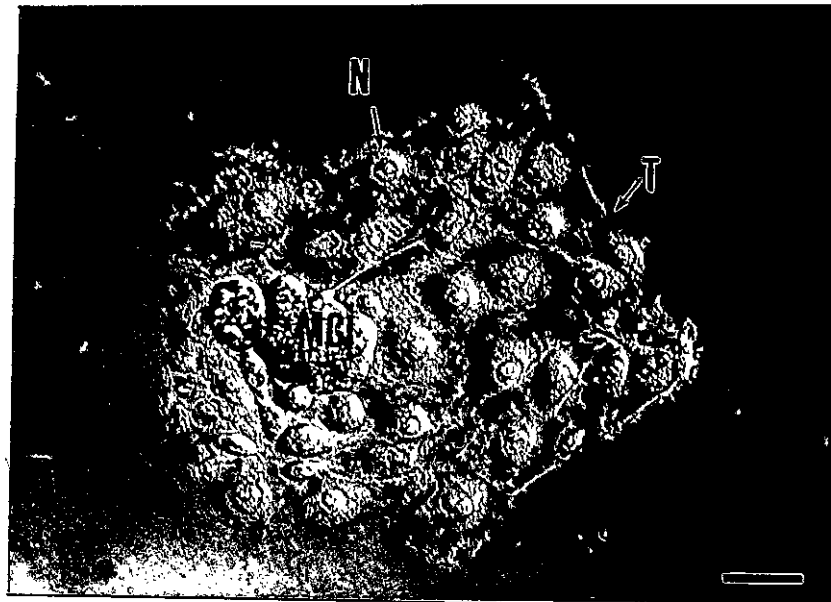
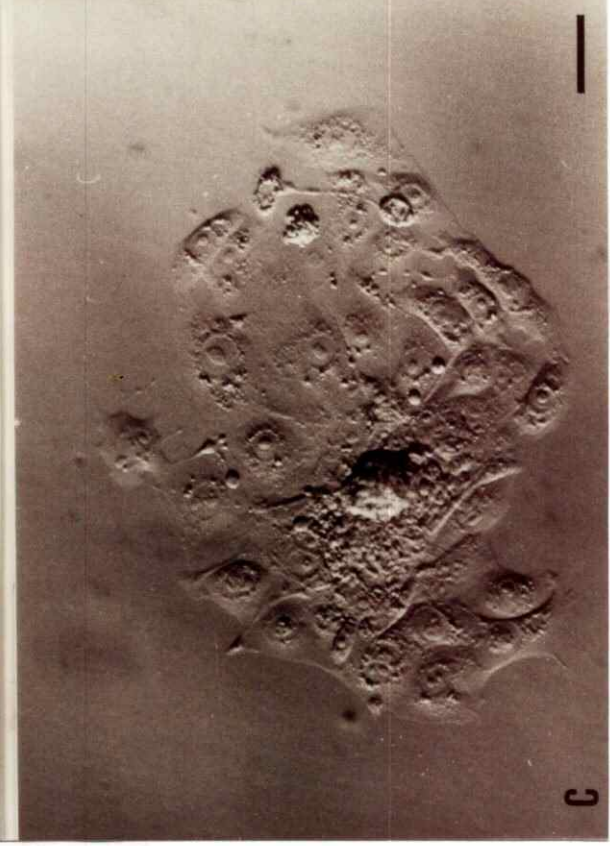
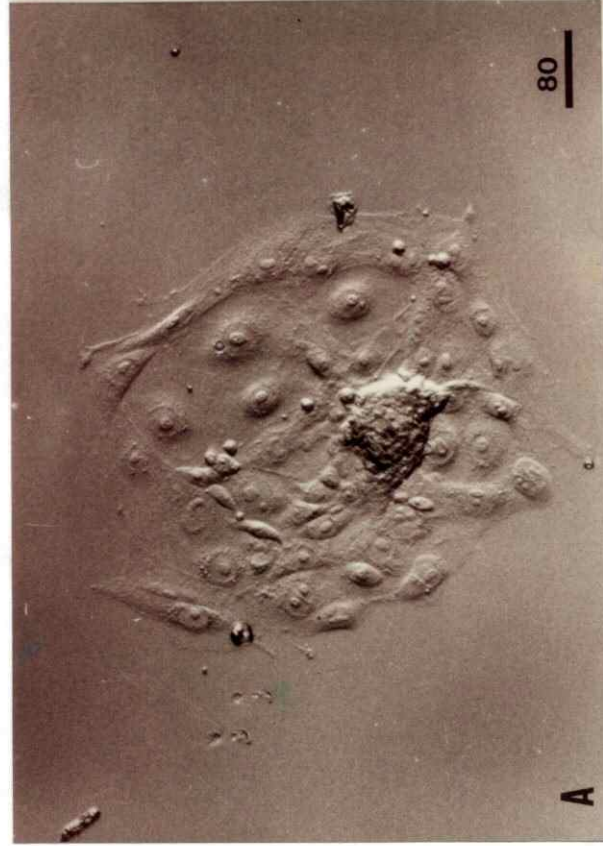
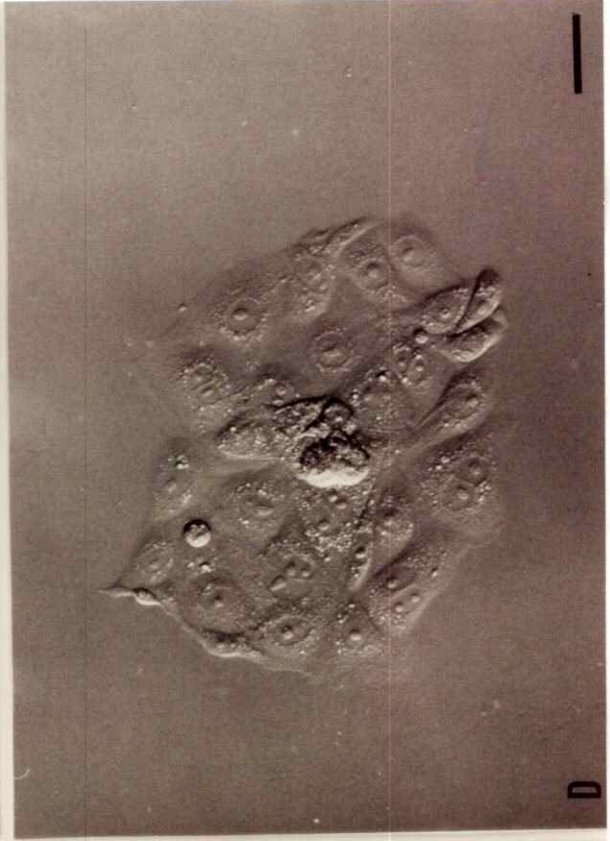


FIGURA 10. Blastocisto implantado *in vitro* y efecto de EGF. Los blastocistos se cultivaron por tres días en medio NCTC-135 suplementado con FBS 10% y EGF 100 ng/ml. Se observa diferencias morfológicas con respecto a los embriones controles (Figura 6A), caracterizadas básicamente por la presencia de núcleos muy prominentes (N) en las células gigantes del trofoblasto (T). La masa celular interna (MCI) se localiza sobremontando el trofoblasto. Como control véase Figura 6. Fotografía tomada a microscopía de luz con óptica de Nomarski. Barra: 80 μ m.

FIGURA 11. Demostración de la especificidad del efecto de EGF en los blastocistos implantados *in vitro*. Los blastocistos se cultivaron por tres días en medio NCTC-135 en presencia de FBS 10%, suplementado con: a) EGF 100 ng/ml; b) EGF 100 ng/ml + anticuerpo policlonal anti-EGF; c) EGF 100 ng/ml + anticuerpo policlonal anti-EGF preabsorbido por tres horas con EGF; d) EGF 100 ng/ml + suero preinmune. Los resultados demuestran la inhibición del efecto de EGF en presencia del anticuerpo anti-EGF. Fotografías tomadas a microscopía de luz con óptica de Nomarski. Barra: 80 μ m.



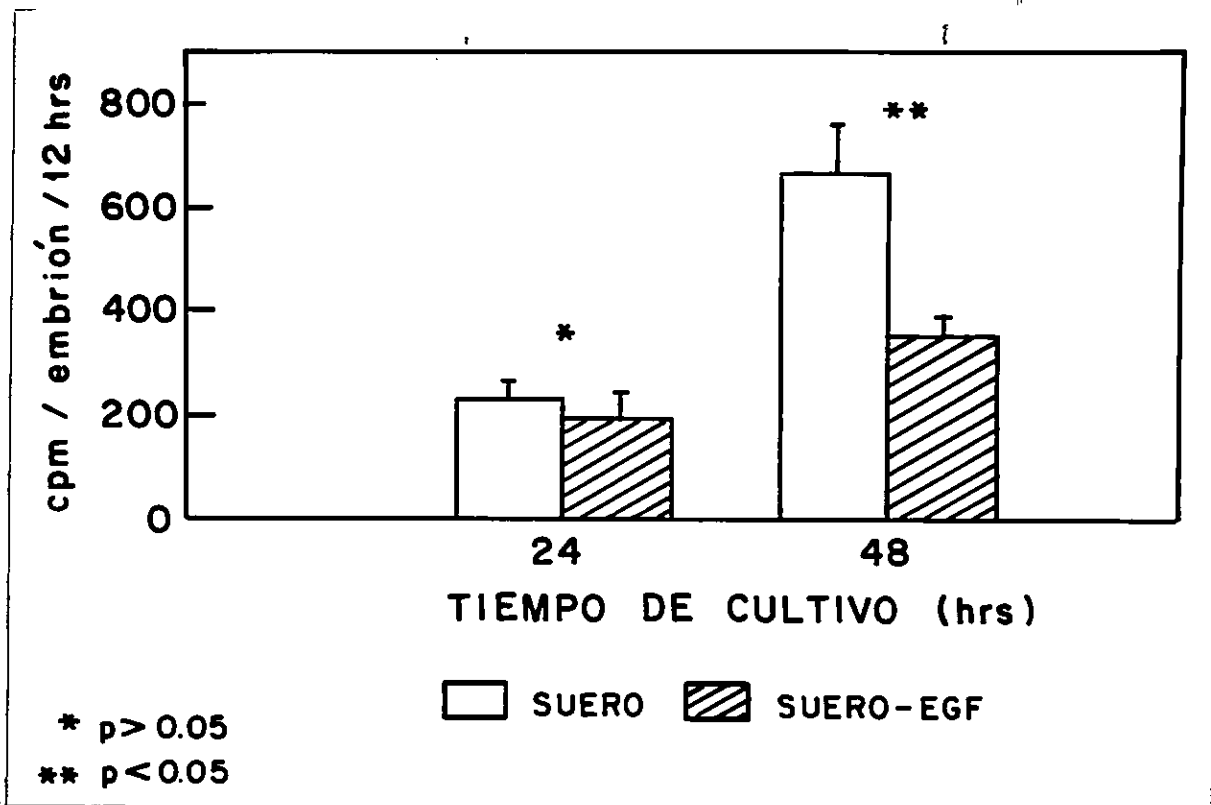


FIGURA 12. Síntesis de ADN en los blastocistos implantados *in vitro*: efecto de EGF. Los blastocistos se cultivaron en medio NCTC-135 suplementado con FBS 10%, ya sea en ausencia o en presencia de EGF 100 ng/ml, por 24 y 48 horas; dando un pulso de 12 horas de [³H]-Timidina. Al final de la incubación, es decir a las 36 y 60 horas de cultivo, se cuantificó la incorporación del ligando radiactivo, como se describió en Materiales y Métodos. Los resultados demuestran que, a las 24 (36) horas de cultivo, EGF no modifica la síntesis de ADN con respecto a los implantes controles; sin embargo a las 48 (60) horas, EGF provoca una caída en la síntesis de ADN, en cerca de un 50%.

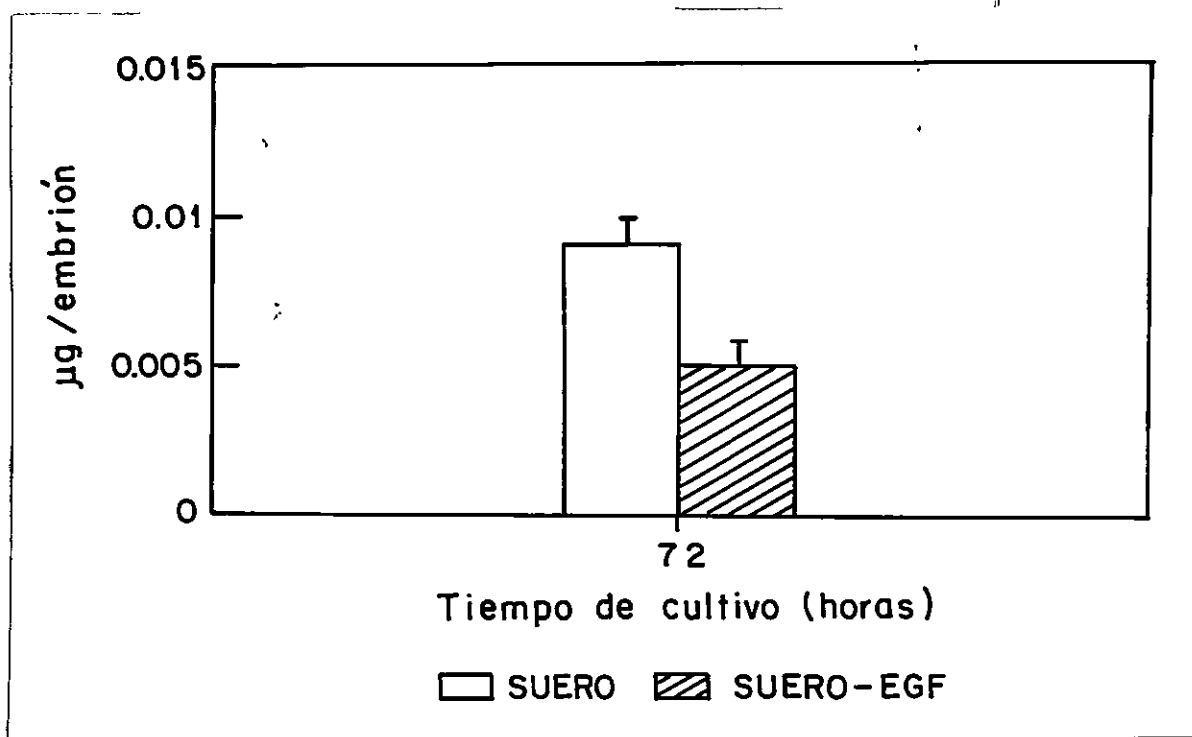


FIGURA 13. Contenido de ADN en los blastocistos implantados *in vitro*: efecto de EGF. Los blastocistos se cultivaron por tres días en medio NCTC-135 suplementado con FBS 10%, ya sea en ausencia o en presencia de EGF. El contenido de ADN se determinó utilizando Hoechst 33258 como se describió en Materiales y Métodos. Los resultados muestran que EGF provoca una disminución en el contenido de ADN en cerca de un 50%, lo que concuerda con la disminución en la síntesis de ADN causada por este factor de crecimiento a las 60 horas de cultivo (Figura 12).

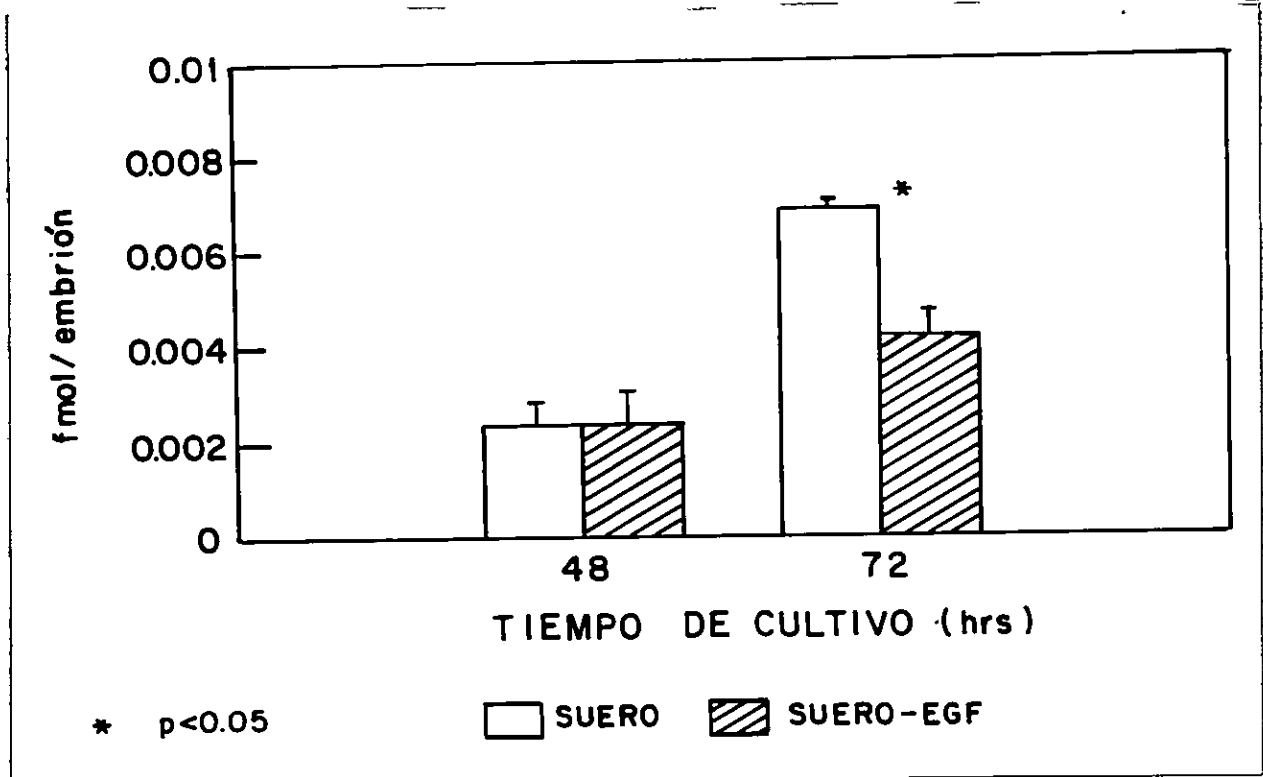


FIGURA 14. Análisis de la producción de Progesterona por los blastocistos implantados *in vitro*: efecto de EGF. Los blastocistos se cultivaron en medio NCTC-135 suplementado con FBS 10%, ya sea en ausencia o en presencia de EGF, por 48 y 72 horas; durante estos tiempos de cultivo los embriones permanecieron en presencia de 35 μ Ci de [3 H]-Pregnenolona. Al final del período de incubación se colectó el medio condicionado por los embriones para cuantificar la progesterona secretada (véase Materiales y Métodos). Puede observarse que EGF no provoca modificaciones en los niveles de progesterona a las 48 horas de cultivo; a las 72 horas en cambio, este factor de crecimiento provoca una disminución considerable en los niveles del esteroide analizado.

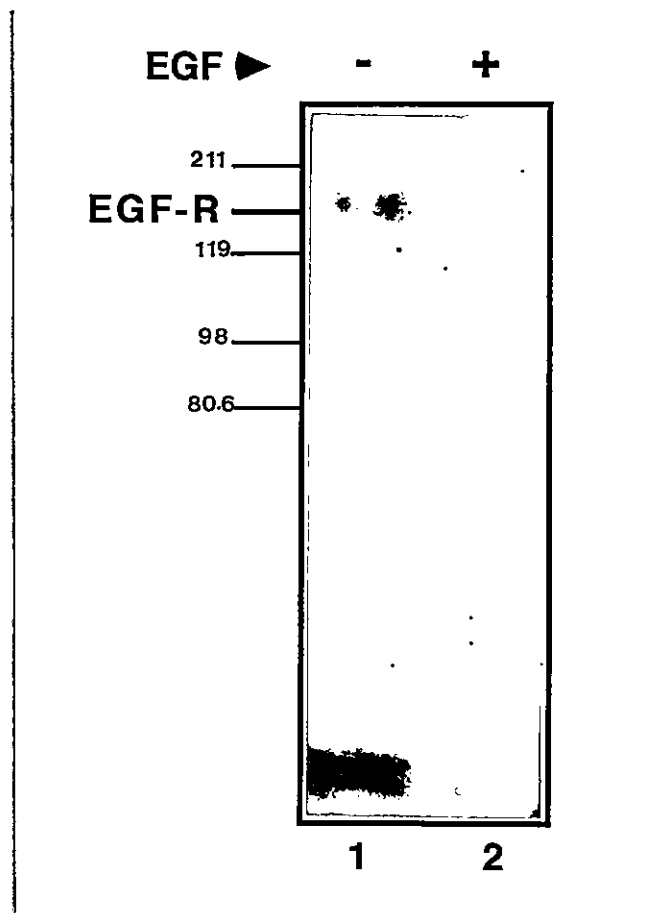
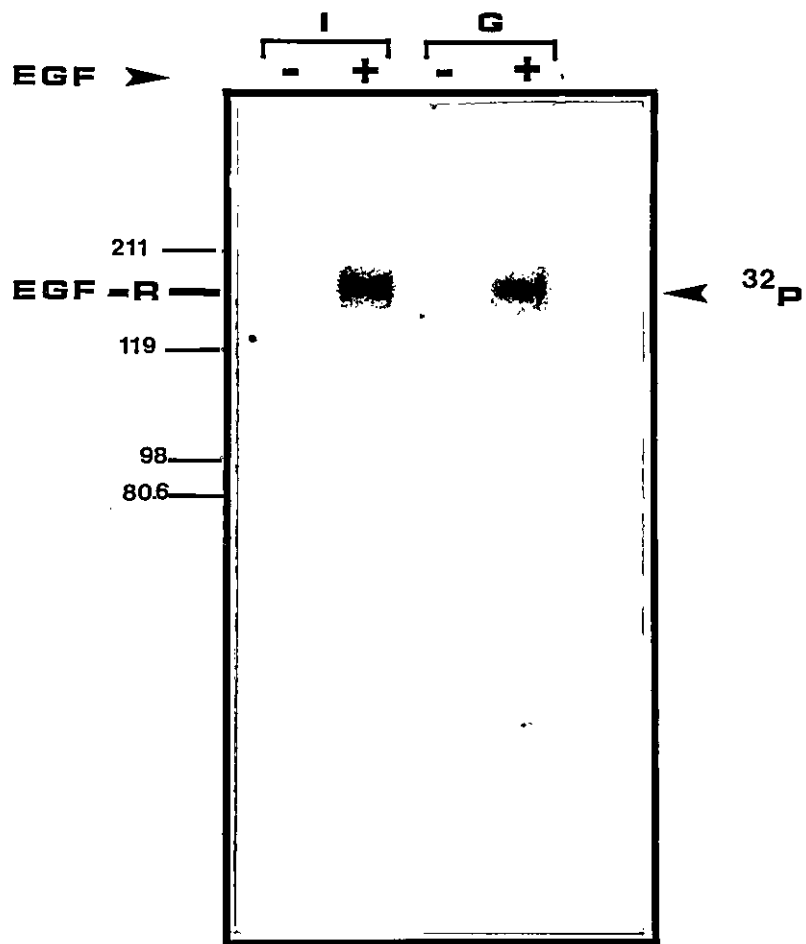


FIGURA 15. Ensayos de unión y entrecruzamiento de $[^{125}\text{I}]\text{-EGF}$ a los blastocistos implantados *in vitro*. Los blastocistos se cultivaron por tres días en medio NCTC-135 suplementado con FBS 10%. Puede observarse una banda (carril 1) cuyo peso molecular corresponde al descrito para el receptor de EGF (EGF-R); como se esperaba, esta banda desapareció en la presencia de EGF no marcado (carril 2).

FIGURA 16. Fosforilación en tirosina seguida de inmunoprecipitación con anticuerpos monoclonales anti-fosfotirosina. Los blastocistos se cultivaron por tres días en medio NCTC-135 suplementado con FBS 10%, en dos condiciones: implantados (I) e impedidos de implantar (G). Dando un pulso de EGF, puede observarse, tanto en los blastocistos implantados como en los impedidos de implantar, la presencia de una proteína fosforilada en tirosina, cuyo peso molecular corresponde al descrito para el EGF-R (170 kd). Al mismo tiempo se observa que la intensidad de esta banda es menor en los blastocistos impedidos de implantar.



DISCUSION

EL SUERO FETAL APORTARIA MOLECULAS QUE COMPLEMENTARIAN LA ACCION DE FN Y LM EN LA DIFERENCIACION DEL TROFOBLASTO DE RATON *IN VITRO*.

Nuestros resultados indican que los blastocistos de ratón de día 4 de gestación cultivados sobre cápsulas recubiertas con proteínas de MEC como FN y LM, se adhieren a la placa y forman extensión de trofoblasto, lo cual se considera una expresión de su diferenciación. Aunque esto había sido descrito por otros autores (Armant et al., 1986a, b; Sutherland et al., 1988), nuestras observaciones mostraron además una menor superficie de extensión del trofoblasto de estos implantes, con respecto a aquellos cultivados en un medio suplementado con FBS. Como el FBS contiene moléculas del tipo FN, esto sugiere que otros factores séricos también contribuyen adicionalmente a la diferenciación del trofoblasto. En efecto, la máxima superficie de extensión se obtuvo utilizando cápsulas recubiertas ya sea con FN o LM y medio suplementado con FBS, siendo mayor el efecto que la suma de los efectos individuales. Así, parece haber una interacción sinérgica entre algunos componentes del FBS y las proteínas de MEC, actuando sobre el proceso de diferenciación del trofoblasto. Un trabajo reciente indica que algunos factores de crecimiento como el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) y el factor de crecimiento fibroblástico (FGF) actuarían en forma sinérgica con matrices de FN promoviendo la extensión del trofoblasto de ratón *in vitro*, y probablemente el proceso de implantación (Haimovici y Anderson, 1993). El mecanismo de esta regulación múltiple es desconocido, sin embargo, los datos de la literatura permiten algunas especulaciones.

Se han descrito diversos tipos de relación funcional entre las proteínas de MEC y los factores de crecimiento (revisado por Adams y Watt, 1993). Interacciones directas entre las proteínas de MEC y los factores de crecimiento pueden afectar tanto la concentración local como la actividad biológica de estos últimos. La unión del FGF a su receptor requiere la formación de un complejo ya sea con cadenas de heparán sulfato de un proteoglicán de membrana del mismo tipo, o con cadenas de heparina libres (Ruoslahti y Yamaguchi, 1991), lo que induciría un cambio conformacional en el factor. Esto aumentaría la afinidad por su receptor y lo protegería de la degradación (revisado por Flaumenhaft y Rifkin, 1991). Por otro lado, se ha descrito también una interacción funcional entre el factor de crecimiento transformante de tipo β 1 (TGF- β 1) y colágeno IV de membrana basal, importante en procesos de proliferación y diferenciación celulares (Paralkar et al., 1991). TGF- β también se une a proteoglicanos de MEC (revisado por Ruoslahti y Yamaguchi, 1991; Flaumenhaft y Rifkin, 1991), como por ejemplo betaglicán y decorina. Esta última molécula no sólo se une a TGF- β , sino que además puede neutralizar su actividad.

Por otro lado, la MEC y los factores de crecimiento pueden ejercer una regulación recíproca a nivel de la expresión génica, influenciando mutuamente la producción de ligandos (elementos MEC y factores de crecimiento) y sus correspondientes receptores. Así por ejemplo la interleukina 3 (IL-3), la interleukina 5 (IL-5) y el factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF) estimulan la síntesis de proteoglicanos en eosinófilos (revisado por Adams y Watt, 1993). El TGF- β por su parte promueve la transcripción de una variedad de componentes de MEC, a su vez que altera la expresión de receptores de adhesión celular y regula la expresión de colagenasa y del inhibidor de metaloproteinasas, TIMP (revisado por Adams y Watt, 1993). Por otro lado, la inducción de la expresión de FN es una respuesta primaria de los fibroblastos de embriones de ratón estimulados con EGF (Blatti et al., 1988).

Además existen mecanismos de transmodulación de los receptores de los factores de

crecimiento por otros factores, lo cual podría a su vez determinar un cambio en la relación funcional de dichos factores con la MEC. Así por ejemplo el PDGF reduce la afinidad del EGFr por su ligando en células Swiss 3T3 (Collins et al., 1983). Como ya se señaló, el EGF induce la expresión de FN en fibroblastos embrionarios de ratón, de tal manera que la transmodulación del EGFr podría así alterar la expresión de dicha proteína de MEC y su probable interacción con los factores de crecimiento.

Todos los antecedentes mencionados sugieren la idea de que los factores de crecimiento y las proteínas de MEC colaboran en crear distintos microambientes celulares que regularían la proliferación y la diferenciación. En nuestro sistema, dichas moléculas podrían colaborar para promover la diferenciación del trofoblasto; durante la implantación del *conceptus* de ratón en el endometrio del útero, estos elementos podrían ser aportados ya sea por el *conceptus* o por el tracto reproductivo de la madre y actuarían en conjunto con la MEC producida ya sea por el propio *conceptus* o por el microambiente uterino, regulando la diferenciación del trofoblasto y así el proceso de implantación.

FN Y LM PROMUEVEN LA DIFERENCIACION DEL TROFOBLASTO A TRAVES DE MECANISMOS DIFERENTES.

Nuestros resultados mostraron que LM es capaz de promover la extensión del trofoblasto aún en blastocistos cultivados en gota colgante en un medio sin FBS, es decir cuando el *conceptus* carece de un substrato sobre el cual pueda adherirse. En cambio, FN y el FBS requieren la adhesión del *conceptus* para ejercer este efecto. La diferencia en las condiciones requeridas por LM y FN o FBS no habían sido descritas, quedando por dilucidar el mecanismo subyacente. Machperson et al.,(1981) demostraron que cuando los blastocistos de ratón son transferidos a la cámara anterior del ojo de hamster, se desarrollan hasta más allá del estado de blastocisto expandido y más aun, las células trofoblásticas sufren extensión tres días luego de ocurrida la transferencia. El sistema de

la cámara anterior del ojo sería similar a nuestro sistema en gota colgante, ya que los blastocistos se encuentran flotando, es decir ocurre extensión de trofoblasto aunque el *conceptus* no esté en contacto con un substrato de adhesión. Es posible que el tejido de la cámara anterior del ojo secrete moléculas tipo LM que promuevan la diferenciación del blastocisto en estas condiciones.

Es interesante hacer notar que el efecto de la LM mostró una dependencia particular de la concentración, observándose máximo efecto entre 25 y 40 $\mu\text{g/ml}$ y disminuyendo a concentraciones mayores. Una posibilidad es que ocurra un fenómeno de **down regulation** de los receptores para LM.

Durante el desarrollo de mamíferos, LM es la primera proteína extracelular sintetizada, siendo detectada sobre la superficie celular luego de la primera división, en el ratón (Dziadek y Timpl, 1985); además, esta proteína se localiza en el tejido uterino en el momento de la implantación (Senior et al., 1988). *In vivo*, LM podría ser producida ya sea por el tejido embrionario o uterino, regulando el proceso de implantación en forma autocrina/paracrina.

Al parecer la adquisición del estado invasivo del trofoblasto se correlaciona con la expresión celular de las integrinas (Armant et al., 1986 a,b; Sutherland et al., 1988), una familia de glicoproteínas de superficie celular que incluye los receptores para varios componentes de MEC (Hynes, 1987), entre ellos FN y LM. La diferencia en los resultados obtenidos con FN y LM podría explicarse por lo siguiente: 1. Una regulación diferencial de la expresión de los receptores de tipo integrina para ambas moléculas. Es probable que las integrinas que unen FN no sean expresadas si el *conceptus* no se adhiere a un substrato, en cambio en estas condiciones podrían expresarse los receptores de tipo integrina para LM. Es interesante hacer notar que un trabajo reciente acerca de la expresión de receptores de MEC en células de trofoblasto humano muestra efectivamente expresión diferencial de receptores para LM y FN, que puede determinar tanto la morfología como el comportamiento del trofoblasto durante la implantación (Burrows et

al., 1993). La expresión de las integrinas puede ser regulada durante la embriogénesis en relación a la diferenciación. Por ejemplo la expresión de la integrina $\beta 1$ cambia con la diferenciación de los mioblastos a miotubos. En *Xenopus*, la síntesis de la integrina $\beta 1$ a partir del ARNm materno es observada durante la fase de pregástrula, pero durante el estado de blástula sólo pequeñas cantidades son procesadas a la forma madura (para revisión ver Adams y Watt, 1993).

2. Una modulación diferencial de la función de las integrinas que reconocen FN y LM. Para que las interacciones célula-MEC causen cambios en la expresión génica, las integrinas deben ser capaces de transducir señales hacia el núcleo celular. Existe evidencia de que las vías de transducción de señales desde las integrinas involucran tanto al citoesqueleto como a sistemas de segundos mensajeros (revisado por Adams y Watt, 1993). Las integrinas se colocan con proteínas del citoesqueleto en los contactos focales que se forman en los extremos de los manojos de microfilamentos de actina, en las células adheridas a un sustrato. La asociación dinámica de los dominios citoplasmáticos de las integrinas con el citoesqueleto de actina y los cambios de forma celular que ocurren durante diversos procesos de desarrollo y diferenciación, sugieren que el citoesqueleto participa en la transducción de la señal. En efecto, los cambios de forma celular inducidos experimentalmente alteran la capacidad de las células para proliferar (Folkman y Moscona, 1978) y para diferenciarse (Watt et al., 1988). Existe evidencia de que los estímulos físicos aplicados a la superficie celular vía la MEC, pueden resultar en cambios en la polimerización y organización del citoesqueleto, el cual a su vez puede alterar la distribución y función de algunas proteínas de membrana, incluyendo receptores celulares (revisado por Singer, 1992). El ensamblaje del citoesqueleto de actina es requerido para la mantención de la morfología celular extendida (Watt, 1986). Cabe la posibilidad de que exista una organización diferente del citoesqueleto en el trofoblasto adherido a un sustrato respecto de la condición en gota colgante y que pudiera reflejarse en una diferente transducción de la señal inducida por LM o por FN.

Otros cambios celulares observados en respuesta a la interacción de un ligando de MEC con su receptor incluyen alcalinización del citoplasma, alteraciones en los niveles de AMP cíclico, aumento o disminución en la concentración de calcio intracelular y alteraciones en la fosforilación de proteínas intracelulares (revisado por Adams y Watt, 1993). Las reacciones de fosforilación en serina y treonina involucran tanto a las integrinas como a varias proteínas intracelulares; así, la activación de las integrinas $\beta 2$ y $\beta 3$ se correlaciona con la fosforilación de sus dominios citoplasmáticos. Sin embargo hay casos en los cuales la fosforilación de la integrinas se asocia con la pérdida de su actividad (revisado por Hynes, 1992). Es posible que los receptores de LM y de FN utilicen distintos sistemas de transducción que se afecten de manera diferente en el trofoblasto adherido o en gota colgante.

En resumen, el hecho de que LM promueva la diferenciación del trofoblasto aun sin encontrarse formando parte de una matriz sugiere que, *in vivo*, el contacto del *conceptus* con una matriz de LM podría requerirse tal vez para permitir la migración del trofoblasto más que su diferenciación propiamente tal.

EGF PODRIA ACTUAR COMO UN FACTOR DE DIFERENCIACION DEL TROFOBLASTO EN LOS BLASTOCISTOS IMPLANTADOS *IN VITRO*.

El EGF se caracteriza fundamentalmente por estimular la proliferación en diversos tipos celulares en cultivo; sin embargo este factor de crecimiento también induce diferenciación celular (Carpenter y Cohen, 1979). Para evaluar el posible rol de los factores de crecimiento en la implantación del blastocisto de ratón, estudiamos el efecto del EGF en el desarrollo y la diferenciación de blastocistos cultivados hasta el período de implantación. Elegimos este factor de crecimiento básicamente por los efectos demostrados que causa durante el desarrollo preimplantacional del ratón (Kuo et al., 1991; Wood y Kaye, 1989;

Paria y Dey, 1990) y durante la diferenciación del trofoblasto humano en cultivo (Morrish et al., 1987; Maruo et al., 1987) (véase Introducción).

Los blastocistos cultivados en un medio suplementado con FBS 10% y EGF 100 ng/ml mostraron cambios morfológicos drásticos, los que se caracterizaron básicamente por la presencia de núcleos muy prominentes en las células trofoblásticas. Este efecto fue inhibido por un anticuerpo anti EGF que inhibe la unión del ligando a su receptor, por lo que podemos decir que el EGF estaría actuando en forma específica a nivel del tejido trofoblástico. No sabemos, sin embargo, si este efecto del EGF se relaciona con la diferenciación del trofoblasto durante la implantación.

Es interesante señalar que un efecto similar de EGF ha sido descrito en células de carcinoma epidermal humano (A-431) (Chinkers et al., 1979, 1981), las cuales se caracterizan por presentar un número extraordinariamente alto de receptores para EGF, alrededor de 2-3 millones por célula (Haigler et al., 1978). Aproximadamente 20 minutos luego de iniciado el cultivo de estas células en presencia de suero y EGF 100 ng/ml, adoptan una morfología aplanada con una prominencia nuclear. Este efecto del EGF parece ser dependiente de microfilamentos de actina y requiere bajas concentraciones de calcio intracelular (Chinkers, 1981). El EGF inhibe la proliferación en estas células, presumiblemente induciendo en ellas cierto grado de diferenciación (Barnes, 1982; Gill y Lazar, 1981).

Los cambios morfológicos causados por el EGF que observamos en las células gigantes del trofoblasto se acompañaron de una disminución en el contenido de ADN de los implantes, al parecer por una inhibición en la síntesis de la macromolécula. Como se ha descrito, los receptores para el EGF del *conceptus* se ubicarían casi exclusivamente en las células del trofoblasto (Adamson y Meek, 1984; Paria y Dey, 1990; Wood y Kaye, 1989), lo que sugiere entonces que la disminución en el contenido de ADN del *conceptus* podría deberse a un efecto específico sobre las células del trofoblasto. Las células trofoblásticas en el ratón son poliploides, conteniendo hasta 1024 veces la cantidad

haploide de ADN (Barlow y Sherman, 1972; Gardner, 1972), de tal manera que no podemos concluir que la disminución en el contenido de ADN se traduzca en una inhibición de la proliferación celular. Si bien es imposible distinguir límites celulares en el trofoblasto extendido sobre la placa de cultivo, no es imposible distinguir los núcleos gigantes de las células. A simple vista y morfológicamente, no observamos una variación en el número de núcleos en la monocapa de trofoblasto de los blastocistos implantados en ausencia de EGF con respecto a aquellos implantados en la presencia del factor. Como las células trofoblásticas son mononucleares es posible que el EGF no esté alterando la proliferación celular. Esta idea es corroborada por el hecho de que, al parecer, las células trofoblásticas afectadas por el tratamiento con EGF corresponden a aquellas que no contactan la MCI, es decir el trofoblasto mural. Estas células detienen su capacidad de división y se diferencian adquiriendo características invasivas, es decir estarían "programadas" y "determinadas" para cesar su división. Entonces, durante la implantación *in vivo*, el EGF podría formar parte de un mecanismo que regule el cese de la proliferación de las células trofoblásticas. Esta hipótesis es apoyada por el hecho de que los blastocistos de ratón producen factores capaces de revertir el fenotipo transformado de células tumorales (Pierce, 1982).

Durante el desarrollo del ratón, el EGF parece no ser producido por las células del *conceptus*; sin embargo, sí sintetizan el factor de crecimiento transformante de tipo α (TGF- α) (Rappolee et al., 1988), el cual es capaz de unirse al receptor de EGF y desencadenar respuestas celulares similares a las provocadas por EGF. Entonces, TGF- α podría actuar *in vivo* en forma autocrina regulando la proliferación del trofoblasto y así la invasión del tejido uterino; aunque no puede descartarse la posibilidad de que el propio tejido uterino produzca EGF/TGF- α que regule la proliferación del trofoblasto en forma paracrina.

Para analizar la posibilidad de que el EGF pudiera regular la diferenciación del trofoblasto, cuantificamos la progesterona secretada por los blastocistos implantados *in*

vitro, en la presencia y ausencia de EGF. Pudimos observar que el tratamiento con EGF causaba una disminución en los niveles de progesterona secretada, a las 72 horas de cultivo, lo que podría indicar un efecto del factor sobre la diferenciación del trofoblasto.

La disminución en los niveles de progesterona registrados en los blastocistos implantados en presencia de EGF podría deberse a: a) un efecto sobre la síntesis de la hormona o b) un efecto sobre su metabolización, es decir su interconversión en otros metabolitos. Al respecto existen antecedentes que señalan que el EGF ya sea, no tiene efectos o bien tiene un efecto estimulador de la biosíntesis de progesterona en cultivos de coriocarcinoma humano, al parecer por un aumento en la biosíntesis de colesterol (revisado por Albrecht y Pepe, 1990); por otro lado este factor de crecimiento activa la biosíntesis de progesterona en células de Leydig de origen tumoral (Ascoli et al., 1987). También se han reportado efectos del EGF sobre la metabolización de progesterona (Sordoillet, 1991); en células de Leydig de porcino en cultivo, este factor de crecimiento provoca un aumento en la acumulación de testosterona, ya sea por un aumento en el colesterol disponible como sustrato, como por un aumento en la conversión de pregnenolona y dehidroepiandrosterona. ¿Cómo explicar la disminución en la secreción de progesterona causada por el EGF en nuestro sistema, si pensamos que esta hormona es requerida para la mantención de la preñez?. Esta pregunta puede ser contestada si analizamos la posibilidad de que el EGF esté activando la conversión de progesterona en otros metabolitos, por ejemplo estradiol, hormona necesaria para que ocurra implantación (Bullock, 1977). Los blastocistos de ratón no sólo tienen la capacidad de producir progesterona; se ha descrito que también pueden metabolizarla (Sherman y Atienza, 1977; Sherman et al., 1977), aunque los metabolitos no han sido identificados. Por otro lado, diversos estudios indican que estos blastocistos sintetizarían estrógenos (revisado por Bullock, 1977). Así, estos resultados, sumados a la evidencia de que el EGF modula la esteroidogénesis, permiten sugerir la posibilidad de que este factor estimule la biosíntesis de estradiol en el trofoblasto de ratón, regulando de esta forma el proceso de

implantación.

EL EGF EJERCERÍA SU EFECTO SOBRE EL TROFOBLASTO ACTUANDO A TRAVÉS DE SU RECEPTOR.

Ensayos de autoradiografía han sugerido anteriormente la presencia del EGFr en los *concepti* implantados (Adamson y Meek, 1984; Paria y Dey, 1990). En este trabajo evidenciamos la proteína receptora mediante ensayos de unión de radioligando y entrecruzamiento de [125I]-EGF, en los blastocistos implantados *in vitro*. Además, mediante un ensayo de fosforilación de proteínas en presencia y ausencia de EGF verificamos la inducción de la actividad quinasa del receptor, tanto en los blastocistos implantados como en los impedidos de implantar. Así, nuestros resultados refuerzan la hipótesis que predice la participación del EGF, a través de la activación de su receptor, en la implantación del blastocisto de ratón.

Al unirse el EGF a su receptor, además de producirse la fosforilación de este último, se fosforilan varios sustratos celulares, tanto solubles como de membrana, algunos de los cuales son proteínas que participan en diversas vías de transducción de señales (revisado por Carpenter y Cohen, 1990). La activación de estas vías llevará finalmente a respuestas que involucrarán proliferación o diferenciación celular. Uno de los componentes principales de las vías de transducción activadas por factores de crecimiento que interactúan con receptores que tienen actividad tirosina quinasa, son las isoformas p42 y p44 de la proteína quinasa activada por mitógenos (MAP quinasa). La MAP quinasa fosforila, entre otros sustratos, diversos factores de transcripción (Davis, 1993); cuando es activada en respuesta a los factores de crecimiento, esta proteína (p42 y p44) sufre la translocación desde el citoplasma, al núcleo (Traverse et al., 1994). Los factores de crecimiento que activan la MAP quinasa pueden provocar respuestas de proliferación o diferenciación, dependiendo del tipo celular sobre el cual actúen. En células PC12, tanto

el factor de crecimiento nervioso (NGF) como el EGF activan las quinasas p42 y p44, sin embargo sólo el NGF promueve la diferenciación; el EGF por su parte provoca un efecto mitogénico débil (Huff et al., 1981). Al mismo tiempo se ha demostrado que la activación de la MAP quinasa por NGF es sostenida y provoca su translocación al núcleo, no así la activación inducida por el EGF (Traverse et al., 1992). Así, las respuestas de proliferación y diferenciación celulares frente a un factor de crecimiento podrían estar determinadas por la extensión y duración de la activación de la vía de transducción de la señal que involucra a la MAP quinasa. Estas quinasas no han sido estudiadas en los blastocistos implantados. Nuestros resultados sugieren que podrían estar presentes en esta etapa.

En resumen, el EGF induce cambios en la morfología del trofoblasto, a su vez que inhibe la síntesis de ADN y la producción de progesterona, sugiriendo que podría modular el proceso de diferenciación relacionado con la implantación. Este efecto del EGF parece involucrar la activación de su receptor.

El EGF y su receptor podrían participar en la implantación del blastocisto de ratón, modulando la diferenciación del trofoblasto, y tal vez actuar en sinergia con proteínas de MEC.

REFERENCIAS

ADAMS, J.C. & WATT, F.M. (1993). Regulation of development and differentiation by the extracellular matrix. *Development* 117: 1183-1198.

ADAMSON, E.D. (1990). EGF receptor activities in mammalian development. *Molec. Reprod. Dev.* 27: 16-22.

ADAMSON, E.D. & MEEK, J. (1984). The ontogeny of epidermal growth factor receptors during mouse development. *Dev. Biol.* 103: 62-70.

ALBRECHT, E.D. & PEPE, G.J. (1990). Placental steroid hormone biosynthesis in primate pregnancy. *Endocrine Rev.* 11: 124-150.

ALEXANDRE, H. (1985). Involvement of DNA polymerase activities in mouse blastocyst differentiation *in vitro*. *Differentiation* 29: 152-159.

ALSAT, E., HAZIZA, J. & EVAIN-BRION, D. (1993). Increase in epidermal growth factor receptor and its messenger ribonucleic acid levels with differentiation of human trophoblast cells in culture. *J. Cell Physiol.* 154: 122-128.

ARMANT, D.R., KAPLAN, H.A. & LENNARZ, W.I. (1986a). Fibronectin and Laminin promote *in vitro* attachment and outgrowth of mouse blastocysts. *Dev. Biol.* 116: 519-523.

ARMANT, D.R., KAPLAN, H.A., MOVER, H. & LENNARZ, W.I. (1986b). The effect of hexapeptides on attachment and outgrowth of mouse blastocysts cultured *in vitro*: Evidence for the involvement of the cell recognition tripeptide Arg-Gly-Asp. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 83: 6751-6755.

ARMANT, D.R. (1991). Cell interactions with laminin and its proteolytic fragments during outgrowth of mouse primary trophoblast cells. *Biol. Reprod.* 45: 664-672.

ASCOLI, M., EUFFA, J. & SEGALOFF, D.L. (1987). Epidermal growth factor activates steroid biosynthesis in cultured Leydig tumor cells without affecting the levels of cAMP and potentiates the activation of steroid biosynthesis by choriogonadotropin and cAMP. *J.Biol.Chem.* 262: 9196-9203.

BARLOW, P.W. & SHERMAN, M.I. (1972). The biochemistry of differentiation of mouse trophoblast: studies on poliploidy. *J. Embryol. exp. Morphol.* 27: 447-465.

BARNES, D.W. (1982). Epidermal growth factor inhibits growth of A-431 human epidermoid carcinoma in serum-free cell culture. *J.Cell Biol.* 93: 1-4.

BEHRENDTSEN, O., ALEXANDER, C.M. & WERB, Z. (1992). Metalloproteinases mediate extracellular matrix degradation by cells from mouse blastocyst outgrowth. *Development* 114: 447-456.

BLATTI, S.P., FOSTER, D.N., RANGANATHAN, G., MOSES, H.L. & GETZ, M.J. (1988). Induction of fibronectin gene transcription and mRNA is a primary response to growth-factor stimulation of AKR-2B cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85: 1119-1123.

BRADFORD, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-258.

BRICE, E.C., WU, J.X., MURARO, R., ADAMSON, E.D. & WILEY, L.M. (1993). Modulation of mouse preimplantation development by epidermal growth factor receptor antibodies, antisense RNA, and deoxyoligonucleotides. *Dev. Genet.* 14: 174-184.

BROWN, M.J., ZOGG, J.L., SCHULTZ, G.S & HILTON, F.K. (1989). Increased binding of epidermal growth factor at preimplantation sites in mouse uteri. *Endocrinology* 124: 2882-2888.

BULLOCK, D.W. (1977). Steroids from the pre-implantation blastocysts. In "Development in mammals", vol. II (Johnson, M.H., ed.) North Holland Publ., Amsterdam. pp. 199-208.

BURROWS, T.D., KING, A. & LOKE, Y.N. (1993). Expression of integrins by human trophoblast and differential adhesion to laminin or fibronectin. *Human Reprod.* 8: 475-484.

CARPENTER, G. & COHEN, S. (1979). Epidermal growth factor. *Ann.Rev.Biochem.* 48: 193-216.

CARPENTER, G. & COHEN, S. (1990). Epidermal growth factor. *J. Biol. Chem.* 265: 7709-7712.

CARSON, D.D., DUTT, A. & TANG, J.P. (1987). Glycoconjugate synthesis during early pregnancy: hyaluronate synthesis and function. *Dev. Biol.* 120: 228-235.

CARSON, D.D., TANG, J.P. & GAY, S. (1988). Collagens support embryo attachment and outgrowth *in vitro*: effects of the Arg-Gly-Asp sequence. *Dev. Biol.* 127:368-375.

CHEW, N.J. & SHERMAN, M.I. (1975). Biochemistry of differentiation of mouse trophoblast: $5,3\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase. *Biol. Reprod.* 12: 351-359.

CHEW, N.J. & SHERMAN, M.I. (1973). $\delta 5,3\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase activity in mouse giant trophoblast cells *in vivo* and *in vitro*. *Biol. Reprod.* 9: 79.

CHINKERS, M., McKANNA, J.A. & COHEN, S. (1979). Rapid induction of morphological changes in human carcinoma cells A-431 by Epidermal growth factor. *J. Cell Biol.* 83: 260-265.

CHINKERS, M., McKANNA, J.A. & COHEN, S. (1981). Rapid rounding of human epidermoid carcinoma cells A-431 induced by Epidermal growth factor. *J. Cell Biol.* 88: 422-429.

COHEN, S. (1962). Isolation of a submaxillary gland protein accelerating incisor eruption and eyelid opening in the newborn animal. *J. Biol. Chem.* 237: 1555-1562.

COHEN, S., CARPENTER, G. & KING, L. (1980). Epidermal growth factor-receptor-protein kinase interactions. Copurification of receptor and epidermal growth factor-enhanced phosphorylation activity. *J. Biol. Chem.* 255: 4834-4842.

COLLINS, M.K.L., SINNETT-SMITH, J.W. & ROZENGURT, E. (1983). Platelet-derived growth factor treatment decreases the affinity of the epidermal growth factor receptors of Swiss 3T3 cells. *J. Biol. Chem.* 258: 11689-11693.

CUMMINGS, R.D., SODERQUIST, A.M. & CARPENTER, G. (1985). The oligosaccharide moieties of the epidermal growth factor receptor in A431 cells. Presence of complex-type N-linked chains that contain terminal N-acetylgalactosamine residues. *J. Biol. Chem.* 260: 11944-11952.

DAVIS, R.J. (1993). The mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway. *J. Biol. Chem.* 268: 14553-14556.

DARDIK, A., SMITH, R.M. & SCHULTZ, R.M. (1992). Colocalization of transforming growth factor- α and a functional epidermal growth factor receptor (EGFR) to the inner cell mass and preferential localization of the EGFR on the basolateral surface of the trophectoderm in the mouse blastocyst. *Dev. Biol.* 154: 396-409.

DUCIBELLA, T. & ANDERSON, E. (1975). Cell shape and changes in the eight-cell mouse embryo: prerequisites for morphogenesis of the blastocyst. *Dev. Biol.* 47: 45-58.

DUCIBELLA, T., UKENA, T., KARNOVSKY, M. & ANDERSON, E. (1977). Changes in cell surface and cortical cytoplasmic organization during early embryogenesis in the preimplantation mouse embryo. *J. Cell. Biol.* 74: 153-167.

DZIADEK, M. & TIMPL, R. (1985). Expression of nidogen and laminin in basement membranes during embryogenesis and in teratocarcinoma cells. *Dev. Biol.* 111:

372-382.

EDGARD, D., TIMPL, R. & THOENEN, H. (1984). The heparin-binding domain of laminin is responsible for its effects on neurite outgrowth and neuronal survival. *Embo J.* 3: 1463-1468.

FARACH, M.C., TANG, J.P., DECKER, G.L. & CARSON, D.D. (1987). Heparin/Heparan sulfate is involved in attachment and spreading of mouse embryos *in vitro*. *Dev. Biol.* 123: 401-410.

FAUNDEZ, V., KRAUSS, R., HOLUIGUE, L., GARRIDO, J. & GONZALEZ, A. (1992). Epidermal growth factor receptor in synaptic fractions of the rat central nervous system. *J. Biol. Chem.*

FERNANDEZ, M.S. & IZQUIERDO, L. (1980). Blastocoel formation in half and double embryos. *Anat. Embryol.* 160: 77-81.

FISHER, S.J., CUI, T., ZHANG, L., HARTMAN, L., GRAHL, K., GUO-YANG, Z., TARPEY, J. & DAMSKY, C.H. (1989). Adhesive and degradative properties of human placental cells *in vitro*. *J. Cell Biol.* 109: 891-902.

FLAUMENHAFT, R. & RIFKIN, D.B. (1991). Extracellular matrix regulation of growth factor and protease activity. *Curr. Opin. Cell Biol.* 3: 817-823.

FOLKMAN, J. & MOSCONA, A. (1978). Role of cell shape in growth control. *Nature* 273: 345-349.

GARDNER, R.L. & JOHNSON, M.H. (1972). An investigation of inner cell mass and trophoblast tissue following their isolation from the mouse blastocyst. *J. Embryol. exp. Morphol.* 28: 279-312.

GILL, G.N. & LAZAR, Ch.S. (1981). Increased phosphotyrosine content and inhibition of proliferation in EGF-treated A-431 cells. *Nature* 293: 305-307.

GLASS, R.H., AGGELER, J., SPINDLE, A., PEDERSEN, R.A. & WERB, Z. (1983). Degradation of extracellular matrix by mouse trophoblast outgrowths: A model for implantation. *J. Cell Biol.* 96: 1108-1116.

GLENNEY, J. (1986). Two related but distinct forms of the Mr 36,000 tyrosine kinase substrate (calpactin) that interact with phospholipid and actin in Ca²⁺-dependent manner. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 83: 4258-4262.

GONDA, M. & HSU, Y. (1980). Correlative scanning electron, transmission electron and light studies of the *in vitro* development of mouse embryos on a plastic substrate at the implantation stage. *J. Embryol. exp. Morphol.* 56:23-39.

GRAHAM, C.F. & DEUSSER, Z.A. (1978). Features of cell lineage in preimplantation mouse embryos. *J. Embryol. exp. Morphol.* 48: 53-72.

GWATKIN, R.B. (1966). Amino acid requirements for attachment and outgrowth of the mouse blastocyst *in vitro*. *J. Cell. Physiol.* 68: 335-344.

HAIGLER, H., ASH, J.F., SINGER, S.J., & COHEN, S. (1978). Visualization by fluorescence of the binding and internalization of epidermal growth factor

in human carcinoma cells A-431. Proc. Natl. Acad. Sci. 75: 3317-3321.

HAIMOVICI, F. & ANDERSON, D.J. (1993). Effects of growth factors and growth factor-extracellular matrix interactions on mouse trophoblast outgrowth *in vitro*. Biol. Reprod. 49: 124-130.

HAMES, B.D. (1981). An introduction to polyacrilamide gel electrophoresis. En "Gel electrophoresis of proteins. A practical approach". (Hames, B.D. & Rickwood, D. eds.). IRL Press, Publ. pp. 1-86.

HAY, E. (1981). Cell Biology of extracellular matrix. (Hay, E.D. ed.) New York: Plenum Press Publ.

HEYNER,S., RAO, L.V., JARRETT, L. & SMITH, R.M. (1989). Preimplantation mouse embryos internalize maternal insulin via receptor-mediated endocytosis: Pattern of uptake and functional correlations. Dev. Biol. 134: 48-58.

HOFMANN, G.E., DREWS, M.R., SCOTT, R.T., NAVOT, D., HELLER, D. & DELIGDISCH, L. (1992). Epidermal growth factor and its receptor in human implantation trophoblast. Immunohistochemical evidence for autocrine/paracrine function. J. Clin. End. Met. 74: 981-988.

HOFMANN, G.E., HOROWITZ, G.M., SCOTT, R.H. & NAVOT, D. (1993). Transforming growth factor a in human implantation trophoblast: immunohistochemical evidence for autocrine/paracrine function. J. Clin. End. Met. 76: 781-785.

HOFMANN, G. & WOODING, A. (1993). Giant and binucleate trophoblast cells of mammals. *J.Exp.Zool.* 266: 559-577.

HOGAN, B., CONSTANTINI, F. & LACY, E. (1986). Manipulating the mouse embryo. A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory.

HONEGGER, A.M., KRIS, R.M., ULRICH, A. & SCHLESSINGER, J. (1989). Evidence that autophosphorylation of solubilized receptors for epidermal growth factor is mediated by intermolecular cross-phosphorylation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 86: 925-929.

HOROWITZ, G.M., SCOTT, R.H., DREWS, M.R., NAVOT, D. & HOFMANN, G.E. (1993). Immunohistochemical localization of transforming growth factor- α in human endometrium, decidua and trophoblast. *J. Clin. End. Met.* 76: 786-792.

HUFF, K., END, D. & GUROFF, G. (1981). Nerve growth factor-induced alteration in the response of PC12 pheochromocytoma cells to epidermal growth factor. *J. Cell Biol.* 88: 189-198.

HUNTER, T. & COOPER, J.A. (1981). Epidermal growth factor induces rapid tyrosine phosphorylation of proteins in A431 human tumor cells. *Cell* 24: 741-752.

HYNES, R.O. (1987). Integrins: a family of cell surface receptors. *Cell* 127: 368-375.

HYNES, R.O. (1992). Integrins: versatility, modulation and signalling in cell adhesion. *Cell* 69: 11-25.

ILGREN, E.B. (1981). On the control of trophoblastic giant-cells transformation in the mouse: homotypic cellular interactions and poliploidy. *J. Embryol. exp. Morphol.* 62: 183-202.

JENKINSON, E.J. (1977). The *in vitro* blastocyst outgrowth system as a model for the analysis of peri-implantation development. En "Development in mammals", vol. II (Johnson, M.H., ed.) North Holland Publ., Amsterdam. pp. 151-172.

JOHNSON, M. & EVERITT, B. (1984). *Essential Reproduction*. Blackwell Scientific Publications (Eds.).

JOHNSON, D.C. & CHATTERJEE, S. (1993). Epidermal growth factor (EGF) replaces estradiol for the initiation of embryo implantation in the hypophysectomized rat. *Placenta* 14: 429-438.

KAMEL, Y., TSUTSUMI, O., KUWABARA, Y. & TAKETANI, Y. (1993). Intrauterine growth retardation and fetal losses are caused by epidermal growth factor deficiency in mice. *Am. J. Physiol.* 264: 597-600.

KASSELBERG, A.G., ORTH, D.N., GRAY, M.E. & STAHLMAN, M.T. (1985). Immunocytochemical localization of human epidermal growth factor/urogastrone in several human tissues. *J. Histochem. Cytochem.* 33: 315-122.

KRISS, R.M., LAX, I., GULLICK, W., WATERFIELD, M.D., ULRICH, A., FRIDKIN, M. & SCHLESSINGER, J. (1985). *Cell* 40: 619-625.

KUBO, H., SPINDLE, A. & PEDERSEN, R.A. (1981). Inhibition of mouse

blastocyst attachment and outgrowth by protease inhibitors. *J. Exp. Zool.* 216: 445-451.

KUO, T.M., TAKETANI, Y., AYABE, T., TSUTSUMI, O. & MIZUNO, M. (1991). Stimulatory effect of epidermal growth factor on the development of mouse early embryos *in vitro*. *Endocrinol. Japon.* 38: 485-490.

KURACHI, H. & OKA, T. (1985). Changes in epidermal growth factor concentrations of submandibular gland, plasma and urine of normal and sialoadenectomized female mice during various reproductive stages. *J. Endocrinol.* 106: 197-202.

LABARCA, C. & PAIGEN, K. (1980). A simple, rapid and sensitive DNA assay procedure. *Anal. Biochem.* 102: 344-352.

LADINES-LLAVE, C.A., MARUO, T., MANALO, A. & MOCHIZUKI, M. (1991). Cytologic localization of epidermal growth factor and its receptor in developing human placenta varies over the course of pregnancy. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 165: 1377-1382.

LAI, W.H. & GUYDA, H.J. (1984). Characterization and regulation of epidermal growth factor receptors in human placental cell cultures. *J. Cil. End. Met.* 58: 344-352.

LEAKE, R.E. & HABIB, F. (1987). Steroid hormone receptors: assay and characterization. En "Steroid hormones. A practical approach". (Green, B., Leake, R.E. eds.) IRL Press, Publ. pp: 90.

LIOTTA, L.A., RAO, C.N. & WEWER, U.M. (1986). Biochemical interactions

of tumor cells with the basement membrane. *Ann. Rev. Biochem.* 55: 1037-1057.

MACPHERSON, A.M., ROGERS, P.A.W., & BEATON, L.A. (1989). Vascular response in a non-uterine site to implantation-stage embryos following interspecies transfers between the rat, mouse and guinea pig. *Cell Tissue Res.* 258: 417-423.

MARGOLIS, B.L., LAX, I., KRIS, R., DOMBALAGIAN, M., HONEGGER, A.M., HOWK, R., GIVOL, D., ULRICH, A. & SCHLESSINGER, J. (1989a). All autophosphorylation sites of epidermal growth factor (EGF) receptor and HER2/neu are located in their carboxyl-terminal tails. *J. Biol. Chem.* 264: 10667-10671.

MARGOLIS, B.L., RHEE, S.G., FELDER, S., NERVIC, M., LYALL, R., LEVITZKI, A., ULRICH, A., ZILBERSTEIN, A. & SCHLESSINGER, J. (1989b). EGF induces tyrosine phosphorylation of phospholipase C-II: A potential mechanism for EGF receptor signaling. *Cell* 57: 1101-1107.

MARUO, T. & MOCHIZUKI, M. (1987). Immunohistochemical localization of epidermal growth factor receptor and *myc* oncogene product in human placenta. Implication for trophoblast proliferation and differentiation. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 156: 721-727.

MARUO, T., MATSUO, H., OISHI, T., HAGASHI, M., NISHINO, R. & MOCHIZUKI, M. (1987). Induction of differentiated trophoblast function by epidermal growth factor: relation of immunohistochemically detected cellular epidermal

growth factor receptor levels. *J. Clin. End. Met.* 64: 744-750.

MARUO, T., MATSUO, H., MURATA, K. & MOCHIZUKI, M. (1992). Gestational age-dependent dual action of epidermal growth factor on human placenta early in gestation. *J. Clin. End. Met.* 75: 1362-1367.

MERCOLA, M. & STILES, C.D. (1988). Growth factor superfamilies and mammalian embryogenesis. *Development* 102: 451-460.

MORRIS, J.E., POTTER, S.W. & BUCKLEY, P.M. (1982). Mouse blastocysts and uterine epithelia show implantation interactions in culture. *J. Exp. Zool.* 222: 195-198.

MORRIS, J.E., POTTER, S.W., RYND, L.S. & BUCKLEY, P.M. (1983). Adhesion of mouse blastocysts to uterine epithelium in culture. A requirement for mutual surface interactions. *J. Exp. Zool.* 225: 467-479.

MORISHIGE, K.J., KURACHI, H., AMEMIYA, K., ADACHI, H., ADACHI, K., SAKOYAMA, Y., MIYAKE, A. & TANIZAWA, O. (1993). Menstrual stage-specific expression of epidermal growth factor and transforming growth factor- α in human oviduct epithelium and their role in early embryogenesis. *Endocrinology* 133: 199-207.

MORRISH, D.W., BHARDWAY, D., DABBAGH, L.K., MARUSYK, H. & SIY, O. (1987). Epidermal growth factor induces differentiation and secretion of human chorionic gonadotropin and placental lactogen in normal human placenta. *J. Clin. End. Met.* 65: 1282-1290.

NEUFELD, G., GOSPODAROWICZ, D., DODGE, L. & FUJII, D.K. (1987). *J. Cell Physiol.* 131: 131-140.

NIEDER, G.L., WEITLAUF, H.M. & SUDA-HARTMAN, M. (1987). Synthesis and secretion of stage-specific proteins by perimplantation mouse embryos. *Biol. Reprod.* 36: 687-699.

NIEDER, G.L. (1989). Analysis of proteins secreted by mouse embryos developing *in vivo* and *in vitro*. *J. Exp. Zool.* 252: 134-142.

O' SHAUGHNESSY, P.J. & PAYNE, A. (1982). Differential effects of single and repeated administration of gonadotropins on testosterone production and steroidogenic enzymes in Leydig cell populations. *J. Biol. Chem.* 257: 11503-11509.

O' SHEA, K.S., LIU, L.H.J., KINNUNEN, L.H. & DIXIT, V.M. (1990). Role of the extracellular matrix protein thrombospondin in the early development of the mouse embryo. *J. Cell Biol.* 111: 2713-2723.

PARALKAR, V.M., VUKICEVIC, S. & REDDI, A.H. (1991). Transforming growth factor β type 1 binds to collagen IV of basement membrane matrix: implications for development.

PARIA, B.C. & DEY, S.K. (1990). Preimplantation embryo development *in vitro*: cooperative interactions among embryos and role of growth factors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 87: 4756-4760.

PARIA, B.C., TSUKAMURA, H. & DEY, S.K. (1991). Epidermal growth factor-specific protein tyrosine phosphorylation in preimplantation embryo development.

Biol. Reprod. 45: 711-718.

PARIA, B.C., DAS, S.K., ANDREWS, G.K. & DEY, S.K. (1993). Expression of the epidermal growth factor receptor gene is regulated in mouse blastocysts during delayed implantation. Proc. Natl. Acad. Sci. 90: 55-59.

PIERCE, G.B., PANTAZIS, C.G., CALDWELL, J.E. & WELLS, R.S. (1982). Specificity of the control of tumor formation by the blastocyst. Cancer Res. 42: 1082-1087.

POTTER, S.W. & MORRIS, J.E. (1985). Development of mouse embryos in hanging drop culture. Anat. Records 211: 48-56.

PRATT, H.P.M. (1987). Isolation, culture and manipulation of pre-implantation mouse embryos. En "Mammalian development. A practical approach". (Monk, M. ed.). IRL Press, Publ. pp. 13-41.

RAPPOLEE, D.A., BRENNER, C.A., SCHULTZ, R., MARK, D. & WERB, A. (1988). Developmental expression of PDGF, TGF- α and TGF- β genes in preimplantation mouse embryos. Science 241: 1823-1825.

RICHA, J., DAMSKY, C.H., BUCK, C.A., KNOWLES, B.B. & SOLTER, D. (1985). Cell surface glycoproteins mediate compaction, trophoblast attachment and endoderm formation during early mouse development. Dev. Biol. 108: 513-521.

RIZZINO, A. (1985). Early mouse embryos produce and release factors with

transforming growth factor activity. *In vitro Cell. Dev. Biol.* 21: 531-536.

ROMAGNANO, L. & BABIARZ, B. (1990). The role of murine cell surface galactosyltransferase in trophoblast: laminin interactions *in vitro*. *Dev. Biol.* 14: 254-261.

ROMAGNANO, L., BABIARZ, B. (1993). Mechanisms of murine trophoblast interaction with laminin. *Biol. Reprod.* 49: 374-380.

RUOSLAHTI, E. & YAMAGUCHI, Y. (1991). Proteoglycans as modulators of growth factor activities. *Cell* 64: 867-869.

SCHLAFKE, S. & ENDERS, A.C. (1975). Cellular basis of interaction between trophoblast and uterus at implantation. *Biol. Reprod.* 12: 41-65.

SCOTT, J., URDEA, M., QUIROGA, M., SANCHEZ-PESCADOR, R., FONG, N., SELBY, M., REUTTER, W.J., & BELL, G.I. (1983). Structure of a mouse sub-maxillary messenger RNA encoding epidermal growth factor and seven related proteins. *Science* 221: 236-239.

SELLENS, M.H. & SHERMAN, M.I. (1980). Effects of culture conditions on the developmental programme of mouse blastocysts. *J. Embryol. exp. Morphol.* 56: 1-22.

SENIOR, P.V., CRITCHLEY, D.R., BECK, F., WALKER, R.A. & VARLEY, J.M. (1988). The localization of laminin mRNA and protein in the postimplantation embryo and placenta of the mouse: an *in situ* hybridization and immunocytochemical study. *Development* 104: 431-446.

SHERMAN, M.I. (1975). The culture of cells derived from mouse blastocysts. *Cell* 5: 343-349.

SHERMAN, M.I. & SALOMON, D.S. (1975). The relationships between the early mouse embryo and its environment. En "The Developmental Biology of Reproduction". Academic Press Inc. Publ. pp. 277-309.

SHERMAN, M.I. (1978). Implantation of mouse blastocysts *in vitro*. En "Methods in mammalian reproduction". (Daniel, E.C. ed.) Academic Press Inc. Publ. pp. 247-258.

SHERMAN, M.I. & ATIENZA, S.B. (1977). Production and metabolism of Progesterone and Androstenedione by cultured mouse blastocysts. *Biol. Reprod.* 16: 190-199.

SHERMAN, M.I., ATIENZA, S.B., SALOMON, D.S. & WUDL, L.R. (1977). Progesterone formation and metabolism by blastocysts and trophoblast cells *in vitro*. En "Development in mammals", vol. II (Johnson, M.H., ed.) North Holland Publ., Amsterdam. pp. 209-233.

SINGER, R.H. (1992). The cytoskeleton mRNA localisation. *Curr. Opin. Cell Biol.* 4: 15-19.

SMITH, R. & McLAREN, A. (1977). Factors affecting the time of formation of the mouse blastocoel. *J. Embryol. exp. Morphol.* 1: 79-92.

SORDOILLET, C., CHAUVIN, M.A., PERETTI, E., MORERA, A.M. & BENAHMED, M. (1991). Epidermal growth factor directly stimulates steroidogenesis

in primary cultures of porcine Leydig cells: actions and sites of action. *Endocrinology* 128: 2160-2168.

STRICKLAND, S., REICH, E., & SHERMAN, M.I. (1976). Plasminogen activator in early embryogenesis: enzyme production by trophoblast and parietal endoderm. *Cell* 9: 231-240.

SUTHERLAND, A., CALARCO, P. & DAMSKY, C. (1988). Expression and function of cell surface extracellular matrix receptors in mouse blastocysts attachment and outgrowth. *J. Cell Biol.* 106: 1331-1348.

TRAVERSE, S., SEEDORF, K., PATERSON, H., MARSHALL, C.J., COHEN, P. & ULLRICH, A. (1994). EGF triggers neuronal differentiation of PC12 cells that overexpress the EGF receptor. *Curr. Opin. Cell Biol.* 4: 694-701.

TRAVERSE, S., GOMEZ, N., PATERSON, H., MARSHALL, C. & COHEN, P. (1992). Sustained activation of the mitogen-activated protein (MAP) kinase cascade may be required for differentiation of PC12 cells. Comparison of the effects of nerve growth factor and epidermal growth factor. *Biochem. J.* 288: 351-355.

TSUTSUMI, O. & OKA, T. (1987). Epidermal growth factor deficiency during pregnancy causes abortion in mice. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 156: 241-244.

ULLRICH, A. & SCHLESSINGER, J. (1990). Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity. *Cell* 61: 203-212.

USHIRO, H. & COHEN, S. (1980). Identification of phosphotyrosine as a product

of epidermal growth factor-activated protein kinase in A-431 cell membrane. *J. Biol. Chem.* 255: 8363-8365.

WATT, F.M. (1986). The extracellular matrix and cell shape. *T.I.B.S.* 11: 482-485.

WATT, P.M., JORDAN, P.W. & O' NEILL, C.H. (1988). Cell shape controls terminal differentiation of human epidermal keratinocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85: 5576-5580.

WEBER, W., BERTICS, J.P. & GILL, G.N. (1984). Immunoaffinity purification of the epidermal growth factor receptor. Stoichiometry of binding and kinetics of self phosphorylation. *J. Biol. Chem.* 259: 14631-14636.

WEWER, U.M., DAMJANOV, A., WEISS, J., LIOTTA, L.A. & DAMJANOV, I. (1986). Mouse endometrial stromal cells produce basement-membrane components. *Differentiation* 32: 49-58.

WILEY, L.M., WU, J.X., HARARI, I. & ADAMSON, E.D. (1992). Epidermal growth factor receptor mRNA and protein increase after the four-cell preimplantation stage in murine development. *Dev. Biol.* 149: 247-260.

WOOD, S.A. & KAYE, P.L. (1989). Effects of epidermal growth factor on preimplantation mouse embryos. *J. Reprod. Fertil.* 85: 575-582.

YELIAN, F.D., EDGEWORTH, N.A., DONG, L.J., CHUNG, A.E. & ARMANT, D.R. (1993). Recombinant entactin promotes mouse primary trophoblast cell adhesion and migration through the Arg-Gly-Asp (RGD) recognition sequence. *J.*

