

ESTUDIO DE LA SUPERFICIE CELULAR  
DEL EMBRION INICIAL DE MAMIFEROS  
MEDIANTE  
ANTICUERPOS MONOCLONALES

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

MARIA INES BECKER CONTRERAS

AGOSTO 1988



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

Asesor : Dr. Alfredo De Ioannes I.  
Unidad de Inmunología  
Facultad de Ciencias Biológicas,  
P. Universidad Católica de Chile.

FACULTAD DE CIENCIAS  
UNIVERSIDAD DE CHILE

Informe de aprobación de Tesis de Doctorado.

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

MARIA INES BECKER CONTRERAS

ha sido aprobada por la Comisión Informante de Tesis, para el Grado de Doctor en Ciencias con Mención en Biología, en el Examen de Defensa de Tesis rendido el día de de 1988.

Director de Tesis

Dr. Luis Izquierdo

Luis Izquierdo

Asesor de Tesis

Dr. Alfredo De Ioannes

[Signature]

Comisión Informante de Tesis

Dr. Hermann Niemeyer

[Signature]

Dr. Mario Roseblatt

[Signature]

Dr. Esteban Rodriguez

Dra. Miriam Santos

Miriam Santos



Esta tesis fue realizada en la Unidad de Inmunología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Pontificia Universidad Católica de Chile y en el Laboratorio de Biología del Desarrollo de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile.



*A mis padres  
A mi esposo  
A mis hijos:  
Rodrigo  
Pablo, Emilio  
Clara y Gabriel*



## AGRADECIMIENTOS

A la ayuda y generosidad de Alfredo De Ioannes y de Luis Izquierdo, quienes hicieron posible la realización de esta tesis.

A la amistad y ayuda de Mónica Imarai, con quien fue posible la obtención de la mayoría de los híbridos.

A la colaboración de Viviana Cachicas, sin su ayuda no tendríamos los interesantes resultados de fosfatasa alcalina.

A la generosa colaboración de Ximena Soza, imposible olvidar las tardes de conversación en el criostato.

A la amistad de Raúl Barnier, siempre dispuesto a ayudar y a explicar lo inexplicable.

A todos mis amigos del Laboratorio de Biología del Desarrollo. A Carlos Doggenweiler por sus buenos consejos y su buena disposición para escuchar. A Soledad Fernández por sus palabras de aliento. A Soledad Sepúlveda siempre dispuesta a colaborar en los experimentos y a su infinita paciencia al corregir este manuscrito. A Teresa López, Roberto Mayor, y Roxana Pey. A Florencio Espinoza, Víctor Monasterio, Luis Oñate, Juan Silva, Ana Valdés y Lilio Yáñez por su valiosa ayuda.

A mis compañeros y amigos del Laboratorio de Inmunología quienes siempre siguieron con interés el desarrollo de este trabajo. A Luz Pamela Blanco y Claudia López por su entusiasmo y alegría al escuchar mis resultados. A Macarena Silva por sus comentarios críticos. A María Eugenia Cifuentes, María Elena Fuentes, Fernando González, Patricio Hinrichsen, Macarena Irigoyen, Beltrán Jaureguiberry, Lisette Leyton y Andro Vojkovic. A Carlos Echeverría y Germán Fernández por su valiosa ayuda.

A la colaboración y buena voluntad de Franklin Juica, Alfonso González y Jorge Garrido del Laboratorio de Histología.

A la generosa ayuda de Patricio Abarzúa y Pablo Valenzuela.

A mis amigos del Laboratorio de Citología Bioquímica y de Bioquímica, por su desinteresada colaboración.

Agradezco en forma especial a toda la comunidad que conforma la Facultad de Ciencias Biológicas de la P. Universidad Católica de Chile, porque me integró con confianza y cariño como uno más de sus miembros.

A Hermann Niemeyer, Miriam Santos, Esteban Rodríguez y Mario Roseblatt por la cuidadosa revisión de esta tesis y a sus valiosas críticas.

A la dedicación de María Teresa Pino al escribir este trabajo.

A la ayuda incondicional de mis padres.

## LISTA DE TABLAS

	Pág.
TABLA 1: Rendimiento de las fusiones somáticas para obtener hibridomas contra antígenos de superficie embrionarios.	69
TABLA 2: Clasificación según la localización de los antígenos reconocidos por los anticuerpos monoclonales en embriones y células de teratocarcinoma, mediante inmunofluorescencia indirecta.	74
TABLA 3: Localización de los antígenos reconocidos por los anticuerpos monoclonales del Grupo I, mediante inmunofluorescencia indirecta.	76
TABLA 4: Efecto citotóxico de anticuerpos monoclonales del Grupo I en diferentes estados de desarrollo preimplantacional.	80
TABLA 5: Localización de los antígenos reconocidos por los anticuerpos monoclonales del Grupo I y III en algunos tejidos embrionarios y adultos mediante inmunofluorescencia indirecta.	86

TABLA 6:	Localización de los antígenos reconocidos por los anticuerpos monoclonales del Grupo III, mediante inmunofluorescencia indirecta.	98
TABLA 7:	Localización de los antígenos reconocidos por los anticuerpos monoclonales del Grupo IV, mediante inmunofluorescencia indirecta.	104
TABLA 8:	Localización de los antígenos reconocidos por los anticuerpos monoclonales del Grupo V, mediante inmunofluorescencia indirecta.	105
TABLA 9:	Localización de los antígenos reconocidos por los anticuerpos monoclonales del Grupo VI, mediante inmunofluorescencia indirecta.	111
TABLA 10:	Localización de los antígenos reconocidos por los anticuerpos monoclonales del Grupo VI en algunos tejidos embrionarios y adultos, mediante inmunofluorescencia indirecta.	118
TABLA 11:	Localización de los antígenos reconocidos por los anticuerpos monoclonales del Grupo VIII, mediante inmunofluorescencia indirecta.	120
TABLA 12:	Inhibición de la confluencia de células de teratocarcinoma <i>in vitro</i> por AMC o mezclas de AMC.	125



TABLA 13: Determinación de anticuerpos monoclonales que se unen a FA1 extraída de células de teratocarcinoma, mediante ELISA.	132
TABLA 14: Determinación de anticuerpos monoclonales que se unen a FA1 extraída de tejidos diferenciados de ratón, mediante ELISA.	135
TABLA 15: Tipificación de subclase de anticuerpos monoclonales dirigidos contra antígenos de superficie de células embrionarias.	138
TABLA 16: Localización durante el desarrollo inicial de mamíferos, de algunos antígenos característicos de células embrionarias, mediante sueros policlonales o anticuerpos monoclonales descritos en la literatura: Grupos I, II y III.	147
TABLA 17: Localización durante el desarrollo inicial de mamíferos, de algunos antígenos característicos de células embrionarias, mediante sueros policlonales o anticuerpos monoclonales descritos en la literatura: Grupo V.	153
TABLA 18: Localización durante el desarrollo inicial de mamíferos, de algunos antígenos característicos de células embrionarias, mediante sueros policlonales o anticuerpos monoclonales descritos en la literatura: Grupo VI.	158

## LISTA DE FIGURAS

	Pág.
<b>Figura 1:</b> Desarrollo inicial del ratón.	5
<b>Figura 2:</b> Regionalización durante el desarrollo inicial de mamíferos.	9
<b>Figura 3:</b> Compactación del embrión de ratón.	11
<b>Figura 4:</b> Patrones de localización de los antígenos reconocidos por los anticuerpos monoclonales en células TC-F9 observadas mediante inmunofluorescencia indirecta.	72
<b>Figura 5:</b> Localización de los antígenos reconocidos por los anticuerpos monoclonales del Grupo I en diferentes estados de desarrollo preimplantacional de ratón observados mediante inmunofluorescencia indirecta.	79
<b>Figura 6:</b> Localización de los antígenos reconocidos por anticuerpos monoclonales del Grupo I en mórulas de 8 células de ratón observadas mediante inmunofluorescencia indirecta: Redistribución de los antígenos de superficie durante la compactación.	82

- Figura 7:** Localización de los antígenos reconocidos por anticuerpos monoclonales del Grupo I en blastocistos de ratón implantados *in vitro* observados mediante inmunofluorescencia indirecta. 84
- Figura 8:** Localización de anticuerpos monoclonales del Grupo I en cortes de tejidos congelados de ovario y de oviducto de ratón observados mediante inmunofluorescencia indirecta. 88
- Figura 9:** Localización de antígenos reconocidos por anticuerpos del grupo I en cortes de criostato de placenta de fetos de ratón de 14 días de gestación, observados mediante inmunofluorescencia indirecta. 90
- Figura 10:** Localización de los antígenos reconocidos por anticuerpos monoclonales del Grupo I en células de teratocarcinoma inducidas a diferenciarse, observadas mediante inmunofluorescencia indirecta. 92
- Figura 11:** Localización de los antígenos reconocidos por los anticuerpos monoclonales del Grupo I en blastocistos de ratón implantados *in vitro*, observados mediante inmunofluorescencia indirecta. 95

- Figura 12:** Localización de antígenos reconocidos por anticuerpos monoclonales del Grupo III en oocitos y embriones preimplantacionales de ratón, observados mediante inmunofluorescencia indirecta. 100
- Figura 13:** Localización de los antígenos reconocidos por anticuerpos monoclonales del Grupo III en blastocistos de ratón implantados *in vitro*, observados mediante inmunofluorescencia indirecta. 102
- Figura 14:** Diferentes patrones de localización de antígenos reconocidos por anticuerpos monoclonales del Grupo V en blastocistos implantados *in vitro*, observados mediante inmunofluorescencia indirecta. 107
- Figura 15:** Localización del antígeno reconocido por el anticuerpo TC-5C7 en células de teratocarcinoma inducidas a diferenciarse, observadas mediante inmunofluorescencia indirecta. 110
- Figura 16:** Localización de antígenos reconocidos por anticuerpos monoclonales del Grupo VI en embriones de ratón en diferente estado de desarrollo, observados mediante inmunofluorescencia indirecta. 114

- Figura 17:** Localización de antígenos reconocidos por anticuerpos monoclonales del Grupo VI en blastocistos de ratón implantados *in vitro*, observados mediante inmunofluorescencia indirecta. 117
- Figura 18:** Efecto de anticuerpos monoclonales sobre la adhesividad de células de teratocarcinoma *in vitro*. 123
- Figura 19:** Esquema del ELISA usado para determinar anticuerpos que se unen a fosfatasa alcalina. 127
- Figura 20:** Efecto de diferentes detergentes no-iónicos sobre la actividad de fosfatasa alcalina de un extracto de células de teratocarcinoma. 129
- Figura 21:** Efecto de la concentración de Tritón X-100 sobre la actividad de fosfatasa alcalina de un extracto de células de teratocarcinoma. 131
- Figura 22:** Segregación de antígenos de superficie durante la segmentación del embrión preimplantacional de mamíferos. 156

## LISTA DE ABREVIATURAS

ABTS	Acido 2,2-azimo-di-3-etil-benzitiazolina sulfónico
AMC	Anticuerpo monoclonal
BSA	Sero-albúmina de bovino
cAMP	N6-2'-O-dibutiriladenosina 3'-5' monofosfato
Con-A	Concanavalina-A
DMSO	Dimetilsulfóxido
DPD	2,5-difeniloxazole
EDTA	Acido etilendiaminotetraacético
ELISA	Inmunoensayo en fase sólida de enzimas
FAL	Fosfatasa alcalina
FCS	Suero fetal de ternero
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
GKN	Solución salina con amortiguador de fosfato modificada
HAT	Hipoxantina-aminopterina-timidina
HGPRT	Hipoxantina-guanina-fosforribosil-transferasa
HT	Hipoxantina-timidina
MEM	Medio mínimo esencial
MHC	Complejo mayor de histocompatibilidad
PBS	Solución salina con amortiguador de fosfato
PEG	Polietilenglicol

PAGE	Electroforesis en geles de poliacrilamida
PMSF	Parametilsulfonilfluoruro
PNA	Aglutinina de mani
pNpp	Paranitrofenilfosfato
PVC	Cloruro de polivinilo
SDS	Dodecilsulfato de sodio
Sefarosa	Sepharose
TC-F9	Células de teratocarcinoma de la línea F9
TLX	Antígenos con reactividad cruzada en trofoblasto y linfocitos
Tris	Tris (hidroximetil)-aminometano

## RESUMEN

Durante el desarrollo preimplantacional de mamíferos, ocurre un proceso de diferenciación celular y morfogénesis que culmina con la formación del blastocisto, en el cual se distinguen dos tejidos: la masa celular interna, que dará origen al embrión, y el trofoblasto, que dará origen a parte de los anexos embrionarios. Se supone que en este proceso participan moléculas de la superficie celular que no se expresan en otros estados de desarrollo y pueden considerarse, por lo tanto, antígenos de diferenciación. En su búsqueda hemos utilizado la metodología de anticuerpos monoclonales porque permite analizar separadamente los componentes de una mezcla de antígenos. Los inmunógenos fueron mórulas de ratón de 8 células y teratocarcinoma de ratón, de la línea F9. Las células F9 presentan diversas propiedades comunes con los embriones y pueden reemplazarlos en procedimientos inmunológicos y bioquímicos, cuando se requiere mayores cantidades de material.

Linfocitos esplénicos provenientes de ratas inmunizadas con mórulas de 8 células o con células F9 se fusionaron con células de la línea mieloide NS0/2 de ratón. Los hibridomas secretores de anticuerpos fueron seleccionados por inmunofluorescencia indirecta en células F9 fijadas en



formaldehído. Luego, por igual método, se estudió la reactividad de los anticuerpos producidos por los hibridomas con la superficie celular de oocitos y embriones de distintos estados.

Obtuvimos 61 anticuerpos monoclonales que intentamos clasificar en 8 grupos, posibles según su reactividad con oocitos y la masa o trofoblasto de blastocistos implantados *in vitro*. El Grupo I comprende 17 monoclonales que reconocen antígenos expresados en el oocito y que también se expresan más tarde en la masa celular y en el trofoblasto de blastocistos implantados *in vitro*. El Grupo II correspondería a monoclonales que reconocen antígenos en el oocito y luego sólo en la masa celular, pero no hemos encontrado anticuerpos con dichas propiedades. El Grupo III comprende 9 monoclonales que reconocen antígenos en el oocito y luego sólo en el trofoblasto. El Grupo IV comprende 4 monoclonales que reconocen antígenos presentes en el oocito y que desaparecen en estados más avanzados. El Grupo V comprende 4 monoclonales que reconocen antígenos cuya expresión se inicia durante el estado de segmentación y que se reconocen tanto en la masa celular como en el trofoblasto. El Grupo VI comprende 14 monoclonales que también reconocen antígenos desde el estado de segmentación pero que más tarde sólo se reconocen en la masa celular. Al Grupo VII corresponderían los monoclonales que reconocen antígenos desde el estado de segmentación y que más tarde

sólo se reconocen en el trofoblasto, pero no hemos encontrado anticuerpos con dichas propiedades. Finalmente, el Grupo VIII comprende 13 monoclonales que reconocen antígenos de células F9 pero no antígenos que se expresen en oocitos y embriones preimplantacionales.

Estudiamos el efecto de cada uno de los anticuerpos monoclonales sobre el desarrollo preimplantacional y la implantación *in vitro* de embriones de ratón, comprobando que en las condiciones ensayadas no se modifica la morfogénesis ni la diferenciación celular. Sin embargo, mezclas definidas de estos monoclonales inhiben la extensión de células F9 *in vitro*, dependiendo de la edad del cultivo. Este efecto sobre la adhesión celular no lo hemos estudiado aún en células embrionarias.

Iniciamos estudios con el fin de caracterizar los antígenos reconocidos por nuestros anticuerpos monoclonales. Se analizó mediante un método de ELISA la unión de los monoclonales con la fosfatasa alcalina (FAL) extraída por tritón X-100 de células F9, encontrándose que 16 anticuerpos de 4 grupos distintos se unen a la enzima en forma directa o indirecta, sugiriendo la presencia de más de una forma de FAL durante esta etapa del desarrollo. Estas observaciones tienen especial interés porque dicha enzima presentaría propiedades de antígeno de diferenciación y además durante el desarrollo preimplantacional su actividad se reconoce regionalizada en la membrana basolateral de los blastómeros, desde

el estado de 4 células en adelante (Izquierdo et al., 1980).

En conclusión, hemos obtenido 48 anticuerpos monoclonales que reconocen, por inmunofluorescencia indirecta, antígenos de superficie que son comunes a embriones preimplantacionales y a células F9. La clasificación de estos monoclonales en 5 Grupos, de acuerdo con su distribución temporal y espacial, sugiere que reconocen por lo menos 5 moléculas antigénicas distintas, una o varias de las cuales podrían corresponder a fosfatasa alcalina. La distribución de los antígenos revela que disponemos de marcadores de linaje de células trofoblásticas (Grupo III) y marcadores de linaje de la masa celular interna (Grupo VI). Por último, la presencia de numerosos anticuerpos en el Grupo III y la ausencia de anticuerpos monoclonales que puedan clasificarse en el Grupo VII sugiere que la determinación del trofoblasto se iniciaría durante la ovogénesis y procedería por segregación de componentes hacia la periferia del embrión.

## ABSTRACT

In mammals cell differentiation and morphogenesis occur during preimplantation, culminating with the formation of the blastocyst in which two tissues may be distinguished: the inner cell mass that will give rise to the embryo and the trophoblast that will originate part of the embryonary annexes. It is assumed that molecules of the cell surface which are not expressed in other developmental stages would be involved in this process; they can therefore be considered differentiation antigens. In search for these molecules we have used here the methodology of monoclonal antibodies because it allows to analyse separately the components of a mixture of antigens. Immunogens used were 8-cell mouse morulae and mouse teratocarcinoma of the F9 cell line. These cells share several properties with the embryos and may replace early embryos in immunological and biochemical procedures, when large amounts of material are required.

Splenic lymphocytes from rats immunized either with 8-cell morulae or with F9 cells, were fused with cells of the NS0/2 myeloid mouse line. Antibody-secreting hybridomas were selected by indirect immunofluorescence in F9 cells fixed with formaldehyde. The same method was used to study reactivity of antibodies produced by the hybridomas in oocytes and embryos, at different stages.

We obtained 61 monoclonal antibodies which we clasified in 8 groups according to their reactivity with the cell surface of oocytes or with the cell surface of the inner mass or trophoblast of blastocysts implanted *in vitro*. Group I includes 17 monoclonals that recognize antigens expressed in the oocyte, and later, in the cell mass and the trophoblast of blastocysts implanted *in vitro*. Group II should include monoclonals that recognize antigens in the oocyte and thereafter only in the cell mass, however, antibodies of this kind were not found. Group III includes 9 monoclonals that recognize antigens in the oocyte and afterwards only in the trophoblast. Group IV includes 4 monoclonals that recognize antigens in the oocyte which disappear at later stages. Group V includes 4 monoclonals that recognize antigens whose expression is initiated during the segmentation stage and that are later recognized both in the cell mass and in the trophoblast. Group VI includes 14 monoclonals that recognize antigens since the segmentation stage but thereafter are only found in the cell mass. Group VII should include monoclonals that recognize antigens since the segmentation stage and thereafter are only found in the trophoblast, however, such antibodies were not detected. Group VIII includes 13 monoclonals that recognize antigens of F9 cells but not antigens expressed in oocytes and preimplantation embryos.

We studied the effect of each of the monoclonals on preimplantation development and *in vitro* implantation of mouse embryos. We verified that, under the conditions studied, neither morphogenesis nor cell differentiation were altered. However, defined mixtures of these monoclonals inhibited the extension of F9 cells *in vitro*, depending on their culture age. We have not yet studied this effect on adhesion of embryonic cells.

We also performed studies in order to characterize the antigens recognized by our monoclonal antibodies. We examined by ELISA the binding of monoclonals with alkaline phosphatase (ALP) extracted by Triton X-100 from F9 cells; it was found that 16 antibodies of 4 different groups bind to the enzyme either directly or indirectly, suggesting the presence of more than one form of ALP, at this stage of development. These observations are of interest because this enzyme has the properties of a differentiation antigen and also because during preimplantation development, from the 4-cell stage onwards, its activity is restricted to the contact zones between blastomeres (Izquierdo et al., 1980).

In conclusion, we have obtained 48 monoclonal antibodies that recognize, through indirect immunofluorescence, surface antigens shared by preimplantational embryos and F9 cells. The classification of these monoclonals in 5 groups, according to their temporal and spatial distribution, suggests that they recognized at least 5 antigenic mole-

cules, some of which may correspond to ALP. This antigen distribution reveals that we have obtained lineage markers for trophoblastic cells (Group III) and for inner cell mass (Group VI). Finally, the presence of a number of antibodies in Group III and the absence of monoclonal antibodies that could be classified in Group VII suggests that the trophoblast determination might be initiated during oogenesis and proceed by segregation of components towards the embryo periphery.

## INDICE DE MATERIAS

	Pág.
<b>INTRODUCCION.....</b>	<b>1</b>
Descripción del desarrollo pre- implantacional de mamíferos.....	4
Las células de teratocarcinoma como modelo para estudiar el desarrollo preimplantacional.....	16
Composición de la superficie celular del embrión preimplantacional.....	18
Objetivos.....	33
Aproximación Experimental.....	34
 <b>MATERIALES Y METODOS</b>	
 <b>I. OBTENCION DE ANTICUERPOS</b>	
Protocolos de inmunización.....	36
Obtención de sueros inmunes.....	38
Titulación de los sueros.....	39
Obtención de hibridomas.....	39
 <b>II. MATERIAL BIOLOGICO</b>	
Obtención de embriones preimplantacionales.....	43
Obtención de oocitos.....	44
Obtención de linfocitos.....	45



Obtención de espermatozoides.....	45
Implantación de blastocistos <i>in vitro</i> .....	46
Células de teratocarcinoma de la línea F9.....	46
Obtención de tejidos de ratón adulto.....	47
Inducción de la diferenciación de células de teratocarcinoma de la línea F9.....	48
 III. TECNICAS INMUNOHISTOQUIMICAS	
Imunofluorescencia indirecta.....	49
Citotoxicidad.....	51
 IV. BIOENSAYOS	
Efecto de los anticuerpos monoclonales sobre la adhesividad de células de teratocarcinoma F9.....	52
Efecto de los anticuerpos monoclonales sobre el desarrollo preimplantacional.....	53
Efecto de los anticuerpos monoclonales sobre la implantación de blastocistos <i>in vitro</i> .....	54
 V. TECNICAS INMUNOQUIMICAS	
Identificación de anticuerpos monoclonales que se asocian a fosfatasa alcalina.....	54
Preparación de extractos de tejidos diferenciados.....	57
Purificación de anticuerpos monoclonales de rata.....	58
Tipificación de subclase de los anticuerpos monoclonales.....	59
Electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS.....	60

Transferencia a nitrocelulosa e inmunorrevelado.....	60
Inmunoprecipitación.....	61

## RESULTADOS

Inmunización de animales.....	65
Producción de hibridomas.....	66
Localización de los antígenos reconocidos por los anticuerpos monoclonales mediante immuno- fluorescencia indirecta.....	70
Efecto morfogénico de los anticuerpos.....	119
Caracterización inmunoquímica de los antígenos reconocidos por los anticuerpos monoclonales.....	126

## DISCUSION

Inmunización y producción de hibridomas.....	140
Clasificación de los anticuerpos monoclonales según la localización de los antígenos.....	145
Efecto morfogénico de los anticuerpos.....	160
Caracterización de los antígenos.....	164

CONCLUSIONES.....	170
-------------------	-----

REFERENCIAS.....	172
------------------	-----

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

El desarrollo inicial de los mamíferos, entre la fecundación y la implantación en el endometrio, culmina con la formación de un blastocisto en que se distinguen los dos primeros tejidos: la masa celular interna que dará origen al embrión y el trofoblasto que dará origen a parte de los anexos embrionarios. En este período del desarrollo se plantea el problema de cómo explicar la diferenciación celular observada en un blastocisto que se desarrolla a partir de un huevo fecundado donde no se distinguen regiones citoplasmáticas y cuya segmentación genera células constituidas por citoplasmas semejantes que rodean núcleos supuestamente iguales.

Durante esta etapa se observa expresión génica diferencial (Van Blerkom y Manes 1977; Howlett y Bolton, 1985), multiplicación celular, regionalización de la membrana plasmática (Izquierdo, 1986; Handyside et al., 1987), cambios de adhesividad (Hyafil et al., 1980; Yoshida y Takeichi, 1982; Peyriera et al., 1983; Yoshida-Noro et al., 1984), establecimiento de uniones especializadas (Izquierdo, 1986; Lee et al., 1987), cambios en la organización del citoesqueleto (Ducibella et al., 1977; Lehtonen y Badley, 1980; Johnson y Marc, 1984; Damjanov et al., 1986 b), muerte

celular y otros procesos menos estudiados. También ocurren eventos supracelulares que tienen especial significado por su carácter morfogénico, como la compactación y la formación del blastocisto. Además, se manifiestan propiedades características de los embriones iniciales, como es la regulación que se pone en evidencia cuando los embriones perturbados experimentalmente - aislando, destruyendo o fusionando blastómeros - normalizan su desarrollo (Izquierdo, 1986).

Por la generalidad de estos procesos y porque la descripción de esta etapa en diferentes especies de mamíferos, incluyendo la especie humana, revela grandes semejanzas, el desarrollo inicial de los mamíferos, y en especial del ratón, ha sido un modelo ampliamente utilizado para elucidar algunos mecanismos involucrados en la diferenciación celular y la morfogénesis.

En esta tesis, nuestro propósito ha sido identificar y analizar el papel que desempeñan durante el desarrollo inicial del ratón, algunos antígenos que se expresan en la superficie celular del embrión. Aún no se han descrito antígenos de superficie que sean específicos de algún estado del desarrollo preimplantacional y que permitan establecer en la mórula el linaje masa celular interna-trofoblasto. La literatura disponible muestra que durante esta etapa se expresan moléculas que podrían ser características aunque no exclusivas de células embrionarias, como es el caso de

algunos antígenos, llamados de diferenciación, que también se expresan en células tumorales como los teratocarcinomas (Graham, 1977; Martin, 1980; Rossant y Papaioannou, 1984); y la misma literatura sugiere la existencia de antígenos de superficie cuya expresión estaría asociada sólo a este período del desarrollo, como es el caso de algunos antígenos codificados por el complejo T del ratón (Bennett, 1975; Silver, 1986). Sin embargo, el concepto antígeno de diferenciación es ambiguo y admite distintas interpretaciones, como se analizará más adelante.

La hipótesis general de este trabajo puede resumirse como sigue:

1. Durante el desarrollo inicial de los mamíferos se expresarían moléculas de superficie específicas de estado o de tipo celular.
2. Algunas de estas moléculas estarían necesariamente comprometidas en la diferenciación del blastocisto.

## DESCRIPCION DEL DESARROLLO PREIMPLANTACIONAL DE MAMIFEROS.

El desarrollo preimplantacional de mamíferos ocurre *in vivo* durante el tránsito del huevo fecundado por el oviducto y finaliza con la implantación del embrión en el endometrio del útero. En el ratón es posible reproducir este periodo del desarrollo mediante cultivos *in vitro*, lo cual ha permitido su análisis experimental (véase Hogan et al., 1986). La Figura 1 muestra un esquema de las principales etapas de este periodo, 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 Deussen, 1978). En esta etapa, denominada segmentación, hay una intensa actividad génica, que se manifiesta tempranamente después de la fecundación y se caracteriza por una rápida sustitución de la información codificada en el mRNA materno del oocito, por la propia del embrión (West y Green, 1983). Durante el primer ciclo celular del embrión se produce una degradación específica de mRNA maternos almacenados durante la oogénesis (Clegg y Pico, 1983; Giebelhaus et al., 1983); también se producen cambios en el patrón de proteínas los cuales son el resultado de una activación diferencial de mRNA, de modificaciones en la velocidad de recambio de algunas proteínas y también modifi-

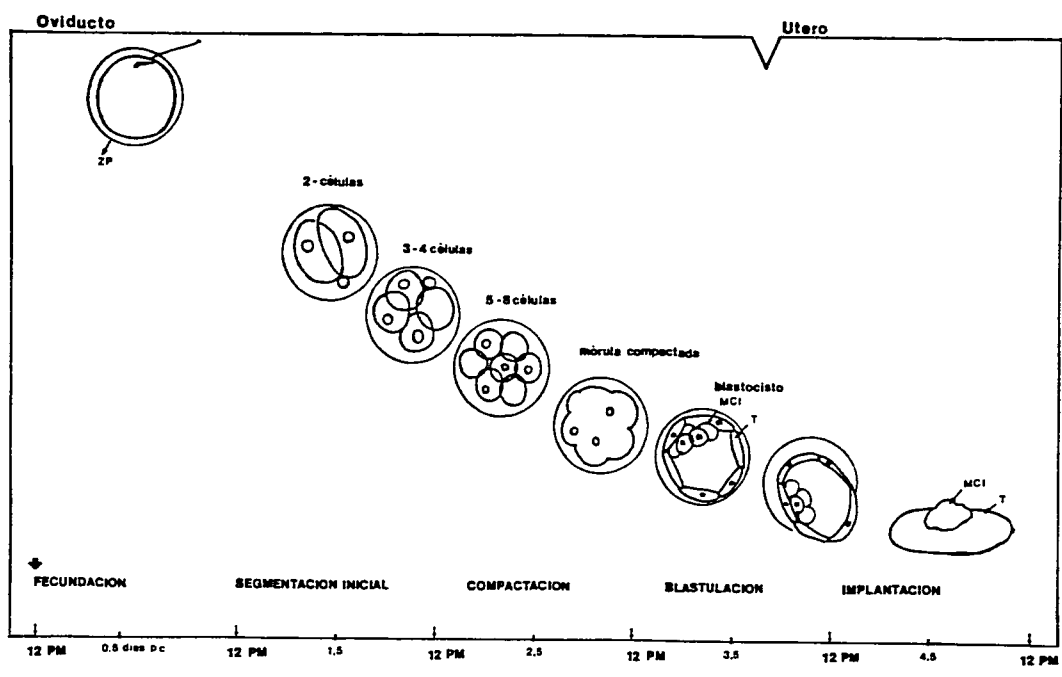


FIGURA 1

DESARROLLO INICIAL DEL RATON. (Adaptado de Hogan et al., 1986).

caciones post-transcripcionales (Van Elerkom, 1981; Cascio y Wassarman, 1982). El conjunto de estos cambios pone de manifiesto el programa genético dependiente de la oogénesis y el programa genético dependiente de la fecundación (Howlett y Bolton, 1985). Prueba directa de la actividad temprana del genoma embrionario se obtiene por experimentos en que se han cultivado embriones en presencia de inhibidores de la transcripción como  $\alpha$ -amanitina, la cual produce una detención del desarrollo (Braude, 1979) y por el uso de mutantes del locus T que se manifiestan precozmente, los cuales en condición homocigota también detienen el desarrollo (Magnuson, 1983).

Desde el estado de cuatro células en embriones de ratón ya sea desarrollados *in situ* o *in vitro*, y también en embriones de rata y de hamster *in situ*, es posible reconocer mediante técnicas citoquímicas la distribución regionalizada de algunas proteínas de la membrana plasmática como fosfatasa alcalina y 5'-nucleotidasa (Izquierdo *et al.*, 1980; Izquierdo y Ebensperger, 1982; Lois e Izquierdo, 1984). Así puede distinguirse en los blastómeros la región en contacto de la región expuesta al medio. Esta regionalización de la membrana también se puede observar usando lectinas y análogos de lípidos (Handyside *et al.*, 1987). La distribución en el espacio de estos componentes muestra que durante el comienzo del desarrollo, aunque no haya diferencias entre células puesto que son morfogénicamente

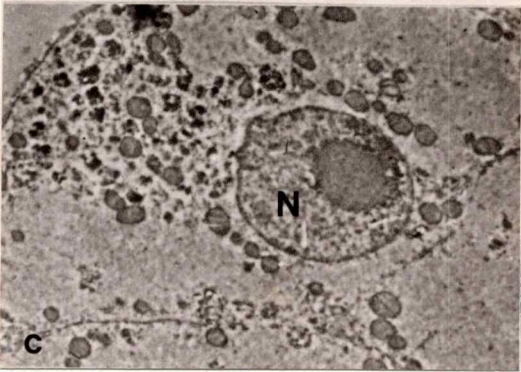
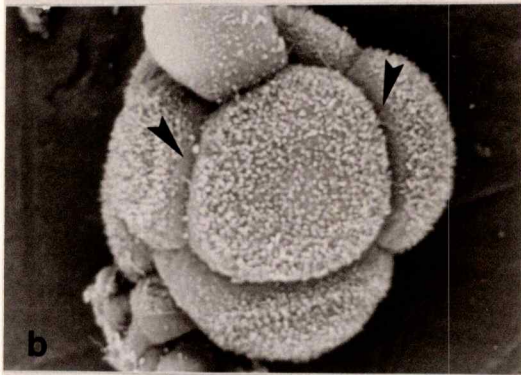
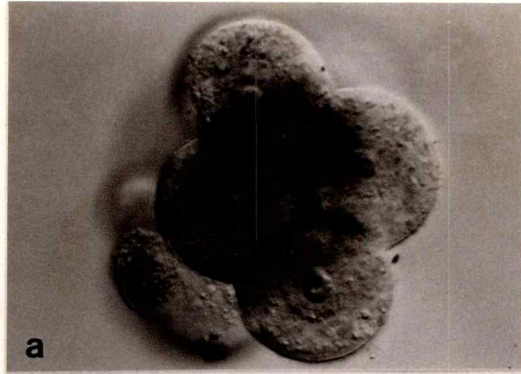


equivalentes (totipotentes), hay un orden espacial que se reconoce por diferencias entre las partes de las células (Johnson et al., 1986) (véase Figura 2). Este fenómeno, que se ha denominado regionalización o especificación regional, puede observarse durante el desarrollo inicial de diversas clases animales y referirse tanto a partes celulares como a partes del embrión (Slack, 1983).

Diferencias en el orden espacial de los componentes celulares también se pueden demostrar tempranamente, desde el estado de dos células, observando la distribución de algunos elementos del citoesqueleto de los blastómeros como miosina (Sobel, 1983 a, b) y espectrina (Sobel y Alliegro, 1985; Damjanov et al., 1986). El proceso de regionalización permite pasar de un estado en que los componentes celulares tienen una distribución espacial homogénea a un estado de heterogeneidad espacial, el cual teóricamente es requisito para explicar la diferenciación celular observada en el blastocisto.

Antes de la blastulación, cuando el embrión tiene sólo 8 células, ocurre el proceso de compactación que es requisito para las etapas que siguen. La compactación se caracteriza morfológicamente por una pérdida de la forma esférica de los blastómeros y una disminución dramática del espacio intercelular. En una mórula no compactada es posible distinguir claramente los blastómeros; una vez ocurrida la compactación es difícil distinguir los límites celulares con





el microscopio de luz y la mórula que tenía un contorno lobulado, adquiere uno esférico (Ducibella y Anderson, 1975; Ducibella et al., 1977) (véase Figura 3). Con la compactación, la regionalización de la membrana plasmática se hace evidente y es posible distinguir una zona apical de una baso-lateral en los blastómeros. Mediante microscopía electrónica de barrido se observa que las regiones con escasas microvellosidades corresponden a las áreas en contacto celular y las con abundantes microvellosidades a las áreas expuestas al medio ambiente (Sepúlveda et al., 1985) (véase Figura 2).

Desde el punto de vista fisiológico, uno de los rasgos más notables de la compactación es el establecimiento de las primeras uniones celulares. Estas son de tipo *gap junction*, reconocidas por la ultraestructura típica que presentan al microscopio electrónico (Ducibella y Anderson, 1975) y por el acoplamiento iónico que demuestran los estudios electrofisiológicos; además se ha reconocido la existencia de *gap junctions* por el paso de péptidos fluorescentes entre los blastómeros (Lo y Gilula, 1979; McLachlin et al., 1983; Goodall y Johnson, 1984; Lee et al., 1987). Al analizar la compactación desde un punto de vista bioquímico, se observa que está precedida por una síntesis importante de mensajeros, lo que se traduce posteriormente en cambios significativos en el perfil electroferético de proteínas con respecto a los estados previos de desarrollo (Van Blerkom y Manes, 1977).

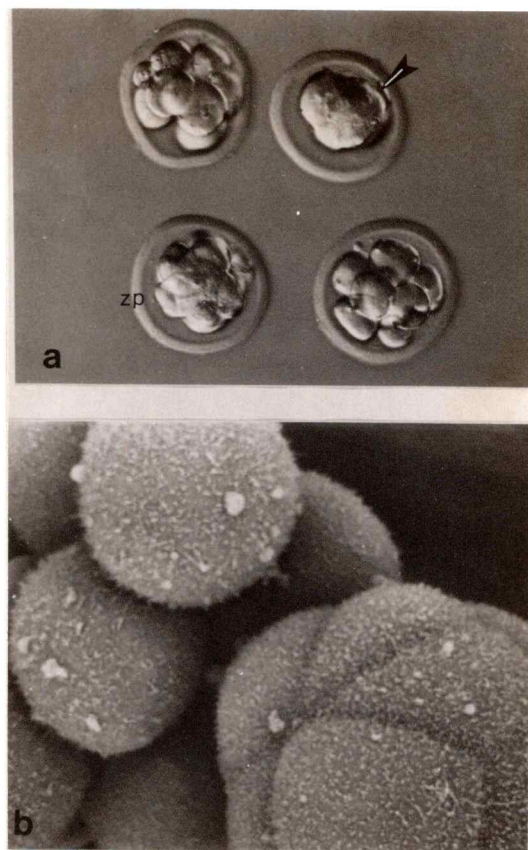


FIGURA 3

COMPACTACION DEL EMBRION DE RATON

- a) Mórulas no compactadas y compactadas (flecha).  
Microscopía de contraste de fase. Zona pelúcida (ZP).
- b) Mórula no compactada (izquierda) y mórula compactada (derecha). Se observa un cambio de la forma celular y la disminución del espacio interblastomérico. Microscopía Electrónica de Barrido. Fotografía sin publicar de Soledad Sepúlveda.

Durante la compactación se producen cambios en la adhesividad de los blastómeros que corresponden a la expresión de algunas glicoproteínas cuya función depende de la presencia de  $Ca^{+2}$  en el medio (Hyafil et al., 1981; Shirayoshi et al., 1983). En esta etapa no se sintetiza propiamente una matriz extracelular típica compuesta de fibronectina o algún tipo de colágeno (Leivo et al., 1980; Leivo, 1983), pero se ha observado la presencia de laminina, heparán-sulfato y nidógeno (Dziadek y Timpl, 1985; Dziadek et al., 1985). Aunque histoquímicamente se ha demostrado laminina entre las células (Wu et al., 1983), el antisuero contra esa proteína no inhibe ni revierte la compactación (Hogan et al., 1986). Más adelante se describirán con mayor detalle algunas moléculas presentes en la superficie celular, las que han sido funcionalmente involucradas en la compactación.

Durante la compactación se observa también una polarización de los componentes celulares internos reconocida por la posición basal del núcleo desde donde se ordenan hacia la periferia columnas radiales de organelos. Este fenómeno no es tan evidente en el ratón, pero es claramente visible en el embrión de rata, véase Figura 2 (Lois e Izquierdo, 1984).

Johnson et al., (1981) han propuesto que la polarización de los blastómeros en esta etapa podría dar cuenta del establecimiento de los dos linajes celulares que se reconocen por primera vez en el blastocisto, suponiendo que

las divisiones celulares son paralelas a la superficie de la mórula compactada, lo que generaría células internas y externas. Los cambios descritos son dependientes del citoesqueleto, puesto que los agentes que alteran la estabilidad de microtúbulos y microfilamentos producen alteraciones en la compactación (Ducibella et al., 1977; Pratt et al., 1982; Izquierdo et al., 1984).

Cinco a seis horas antes de la formación del blastocisto las regiones apicales de los blastómeros externos de la mórula avanzada se sellan entre si mediante complejos de unión, que comprenden *tight junctions* (Izquierdo et al., 1976; Magnuson et al., 1977) y desmosomas, los cuales tienen asociados manojos de filamentos intermedios (Jackson et al., 1981). Con el sellamiento entre los blastómeros periféricos, el embrión queda impermeable al medio externo y ya no penetran al interior trazadores como el lantano (Izquierdo et al., 1976). Luego aparece el blastocelo, una cavidad que se llena por el vaciamiento de líquido acumulado en el citoplasma de los blastómeros y también por el transporte activo de metabolitos hacia el interior (Benos y Biggers, 1981). El blastocisto de ratón se forma normalmente cuando el embrión tiene entre 24 y 30 células (Smith y McLaren, 1977; Fernández e Izquierdo, 1980). Sin embargo, se ha demostrado experimentalmente que su formación no depende del número de células ni del número de ciclos celulares (Fernández e Izquierdo, 1980; Izquierdo y Becker, 1982).

Como consecuencia de la multiplicación celular y del sellamiento, los blastómeros centrales de la mórula quedan en un microambiente diferente del medio externo, al cual sólo están expuestos los blastómeros periféricos. La diferencia de microambiente o la sola diferencia de posición de los blastómeros en la mórula se han invocado como causa de la diferenciación de las células internas hacia masa celular y de las células externas hacia trofoblasto. Este modelo, que se ha denominado "adentro - afuera", fue formulado primeramente por Tarkowski y Wróblewska (1967). El trofoblasto resultante es el primer tejido determinado del embrión puesto que al aislarlo mediante microcirugía del blastocisto, no es capaz de regenerar masa celular en tanto, que la masa celular aislada mediante inmunocirugía es capaz de regenerar trofoblasto tanto *in vitro* como *in situ* (Gardner, 1972; Solter y Knowles, 1975; Hogan y Tilly, 1978a).

Una explicación de la diferenciación celular que ocurre en el blastocisto, basada exclusivamente en la posición de las células en la mórula avanzada, es una explicación - a nuestro parecer - incompleta, porque no propone un mecanismo que explique como las células reconocen su posición en el conjunto. Izquierdo y colaboradores (1977, 1980, 1986) han propuesto que la regionalización de la membrana plasmática por efecto del contacto celular sería el mecanismo que informa a los blastómeros sobre su posición en el embrión.



Al quinto día de desarrollo, el blastocisto contiene aproximadamente 64 células y la cavidad blastocélica se encuentra expandida. En este período el blastocisto emerge de la zona pelúcida a través de una abertura en la zona, producida por acción de una proteasa, con propiedades similares a tripsina, sintetizada por células del trofoblasto mural (Perona y Wassarman, 1986) y, además, por la expansión y contracción del blastocisto (Wassarman et al., 1984). Desde este momento el blastocisto toma contacto íntimo con el epitelio que reviste el endometrio, etapa denominada implantación. Esta etapa también puede ser reproducida *in vitro* (Fernández e Izquierdo, 1983), lo cual ha permitido analizar algunos eventos característicos de este período, especialmente los relacionados con la diferenciación e invasividad del trofoblasto (Glass et al., 1983). Las células trofoblásticas que están más cerca de la masa celular interna proliferan rápidamente manteniendo su diploidía mientras que las células del trofoblasto mural, que rodean la cavidad blastocélica, pero que no están en contacto con la masa celular, cesan de dividirse haciéndose más grandes y poliploides y pueden contener hasta 1000 veces más la cantidad haploide de DNA (Ilgren, 1981).

## LAS CELULAS DE TERATOCARCINOMA COMO MODELO PARA ESTUDIAR EL DESARROLLO PREIMPLANTACIONAL

La principal limitación de los embriones iniciales de mamíferos como modelo para analizar diferenciación celular y morfogénesis es su escasez, que sólo se remedia parcialmente utilizando el método de superovulación (Gates, 1971). Las células de teratocarcinoma, que se cultivan en grandes cantidades, pueden reemplazar a los embriones iniciales en diversos procedimientos de laboratorio. Su uso ha permitido obtener gran parte de la información sobre algunos antígenos característicos de etapas iniciales del desarrollo del ratón.

Los teratocarcinomas son tumores malignos que tienen su origen en las células germinales del ovario y del testículo y en embriones tempranos (Stevens, 1970). Se caracterizan por la presencia de un tipo de células troncales indiferenciadas - denominadas carcinoma embrionario - y además por contener numerosos tipos celulares diferenciados que normalmente se originan en una o más hojas germinales (Martin, 1980).

Los teratocarcinomas tienen varias propiedades en común con las células embrionarias, entre las cuales se destaca, en primer lugar, su capacidad de integrarse al embrión en desarrollo al ser implantadas en la masa celular interna de

un blastocisto; así llegan a normalizarse y formar parte de todos los tejidos del embrión, incluyendo la línea germinal, y hasta originar una progenie normal (Brinster, 1974; Papaioannou et al., 1978; Hanoaka et al., 1985). En segundo lugar, las células de teratocarcinoma presentan algunas especificidades antigénicas de la superficie celular que también se expresan en las primeras etapas del desarrollo de mamíferos (Artz et al., 1973; Kemler et al., 1977). En tercer lugar, cuando a estas células se les impide la adhesión al sustrato y se dejan en suspensión en condiciones apropiadas de cultivo, se organizan de una manera similar a lo que ocurre en la embriogénesis (cuerpos embrioides) que comprenden una masa de células internas, análogas a la masa celular de un blastocisto de 5 días, separadas por una matriz extracelular de las células externas, de tipo endodermal (Leivo, 1983).

Finalmente, aunque los embriones de mamíferos no reaccionen en igual forma, es importante destacar que es posible inducir la diferenciación de células de teratocarcinoma hacia derivados de las 3 hojas germinales, mediante la adición al medio de cultivo de ciertos factores como ácido retinoico y cAMP (Strickland y Mahdavi, 1978; Kuff y Fewel, 1980).

## COMPOSICION DE LA SUPERFICIE CELULAR DEL EMBRION PREIMPLANTACIONAL

No se ha demostrado la presencia de moléculas de superficie que sean exclusivas del embrión y que estén funcionalmente comprometidas en alguna etapa del desarrollo preimplantacional, sin embargo, la información resumida a continuación sugiere su existencia.

De los trabajos realizados con el propósito de caracterizar los componentes de la superficie de las células embrionarias - mediante extracciones diferenciales, ensayos enzimáticos, efectos de lectinas e inhibidores de glicosilación de proteínas - puede concluirse que la gran mayoría sino todas las moléculas descritas son glicoproteínas o glicolípidos (Webb, 1983).

Los primeros estudios se hicieron marcando glicoproteínas con glucosamina radioactiva agregada al medio de cultivo de embriones en diferentes estados de segmentación. Así fue demostrado que antes de la formación de blastocisto ocurren cambios significativos en la expresión y síntesis de glicoproteínas (Pinsker y Mintz, 1973).

Numerosos trabajos en que se han utilizado lectinas para estudiar la aglutinabilidad y la distribución de algunas glicoproteínas sobre embriones preimplantacionales de ratón, sugieren que no hay cambios significativos en la unión de

lectinas previo a la compactación (Yanagimachi y Nicolson, 1975; Rowinski et al., 1976; Magnuson y Stackpole, 1978). Sin embargo, durante la compactación se producen cambios en la aglutinación de proteínas de la superficie mediante concanavalina A (Con-A), que tiene afinidad por manosa y glucosa (Rector y Granholm, 1978) y también cambios en la distribución de Con-A y de aglutinina de maní (PNA), que tiene afinidad por galactosa, los cuales son reflejo de la polarización de las células durante esta etapa (Handyside, 1980).

La participación de glicoproteínas durante este período inicial del desarrollo, también encuentra apoyo en estudios sobre el efecto de tunicamicina. Embriones de dos células, tratados con dosis de este antibiótico, que inhibe la glicosilación de los residuos asparagina de las glicoproteínas, muestra que la segmentación continúa, mientras que la compactación se interrumpe de manera irreversible (Surani, 1979; Atienza-Samols et al., 1980; Webb y Duksin, 1981). Analizando con precursores marcados la fracción glucídica de las glicoproteínas en geles de poliacrilamida-SDS (Dodecil sulfato sódico), se ha podido correlacionar este efecto con una inhibición de la incorporación de glucosamina y manosa, y también con una disminución de la unión de Con-A y PNA a los embriones. Por su parte, Surani et al. (1981) demostraron la presencia, mediante marcación con  $I^{125}$  e inmunoprecipitación, de dos

glicoproteínas con pesos moleculares de 68 y 165 kD cuya síntesis es afectada por tunicamicina y están funcionalmente involucradas en la compactación de los embriones. El microensayo de diferentes glicosiltransferasas, en diferentes estados de desarrollo preimplantacional, muestra que sus actividades disminuyen durante la fecundación y aumentan notablemente en el estado de blastocisto, cuando las interacciones celulares alcanzan su nivel máximo (Armant et al., 1986).

Se ha identificado un oligosacárido que parece ser exclusivo de tejidos embrionarios indiferenciados (Muramatsu et al., 1979). Se trata de un carbohidrato fucosilado de alto peso molecular (10 a 25 kD), denominado embrioglican. En tejidos adultos es raro encontrar glicoproteínas que tengan unidos carbohidratos de este tamaño y las glicoproteínas que los contienen, presentan un peso molecular que excede los 100 kD (Ozawa et al., 1981 a y b; Muramatsu et al., 1983). En embriones de ratón se encuentran glicoproteínas que contienen embrioglican en la membrana plasmática desde el estado de 2-células hasta mórula (Muramatsu et al., 1983). Estas glicoproteínas también se reconocen en células de teratocarcinoma murinas y humanas indiferenciadas, pero no se detectan cuando se las induce a diferenciar (Muramatsu y Muramatsu, 1982).

Finalmente, conviene destacar un tipo de glicoproteínas con función enzimática, que se encuentran regionalizadas en la

membrana plasmática de los blastómeros desde muy al comienzo del desarrollo. Su función en esta etapa no ha sido suficientemente definida, probablemente por la limitación que representa en la mayoría de los casos el uso de los métodos citoquímicos convencionales. Se trata de la fosfatasa alcalina (Izquierdo y Marticorena, 1975; Ishiyama e Izquierdo, 1977; Izquierdo *et al.*, 1980) y la 5'-nucleotidasa (Izquierdo y Ebensperger, 1982). En esta tesis hemos considerado especialmente la fosfatasa alcalina (FAL) porque es una glicoproteína que podría corresponder a un antígeno de diferenciación característico de esta etapa del desarrollo.

Fosfatasa alcalina (FAL) (fosfohidrolasa-monoéster-ortofosfórica, EC 3.1.3.1) es el nombre dado a una familia de isoenzimas que catalizan la hidrólisis de ésteres fosfóricos orgánicos a pH alcalino. Presentan una amplia distribución en tejidos y órganos, siendo especialmente alta su actividad en células embrionarias iniciales, en células germinales primordiales, en la placenta y también en algunas células tumorales como las de teratocarcinoma (Fishman, 1974). Son metalo-enzimas que en su forma nativa contienen cuatro átomos de zinc: dos están asociados a la actividad catalítica y dos contribuyen a la integridad estructural de la molécula. Están altamente glicosiladas, siendo ácido siálico uno de los azúcares que se han reconocido. Generalmente tienen una estructura dimérica, en que el peso

molecular de cada subunidad varía entre 64 y 72 kD. La función de FAL se desconoce, sin embargo, su actividad ha sido asociada a la formación de proteínas fibrilares y también al pasaje de metabolitos a través de la membrana celular (Burstone, 1962; Fishman, 1974; Hertz, 1985).

Las diferentes isoenzimas de FAL - la forma placentar y de intestino que corresponden a las formas específicas de tejido y la de riñón, hígado y hueso que corresponden a las formas no específicas de tejidos - pueden distinguirse por una combinación de propiedades que incluyen termoes-  
tabilidad, inhibición por L-fenilalanina o L-homoarginina (Berstine et al., 1973; Benham et al., 1981), movilidad electroforética, grado de glicosilación y propiedades inmunológicas (Hass et al., 1979; Hertz, 1985). En seres humanos las diferentes isoformas de FAL se encuentran codificadas por al menos 3 loci genéticos separados estructuralmente, los cuales determinan la porción proteica de las diferentes formas. Un locus codifica para la forma placentar, otro locus - aunque está en discusión si son dos - codifica para la forma intestinal (fetal y adulta); y otro locus codifica para las formas no específicas que se expresan en el hígado, hueso y riñón (Seargeant y Stinson, 1979; McKenna et al., 1979). También se ha propuesto la existencia de 2 ó 3 loci genéticos que determinan las diferentes isoformas en el ratón, sin embargo, la relación entre estos genes y sus productos no es clara (Terao y



Mintz, 1987). De las isoenzimas de FAL se ha estudiado especialmente la forma placentar porque define un antígeno que se expresa sólo en este tejido, codificado por el genoma del feto y en algunos tejidos tumorales de diverso origen, motivo por el cual se la considera un típico ejemplo de proteína onco-fetal (Hamilton et al., 1979; McLaughlin et al., 1984).

Como ya se ha señalado más arriba, la fosfatasa alcalina se detecta durante el desarrollo preimplantacional desde el estado de cuatro células en adelante y se localiza en forma regionalizada en las zonas de contacto de blastómeros adyacentes (Izquierdo et al., 1980). Más tarde, en el blastocisto, se encuentra una alta actividad de FAL en la masa celular interna. No se sabe a cual isoenzima corresponde. Se han preparado varios anticuerpos monoclonales contra la isoenzima de placenta humana (McLaughlin et al., 1982), y recientemente se ha clonado el gen que codifica esta forma en ratón (Terao y Mintz, 1987) pero no se ha estudiado la relación entre fosfatasa alcalina placentaria y la o las isoenzimas del embrión preimplantacional.

Mediante el uso de anticuerpos, se han caracterizado numerosos antígenos de la superficie celular del embrión preimplantacional, los cuales han sido definidos como antígenos de diferenciación. Sin embargo, el término antígeno de diferenciación usado habitualmente en

inmunología es ambiguo porque comprende tanto los antígenos específicos de estado como los antígenos específicos de tejido. Es necesario distinguir estas categorías para dejar en claro los objetivos de este trabajo y más adelante discutir sus resultados.

Un antígeno que se reconoce durante los procesos de morfogénesis o de diferenciación celular, pero que luego no es reconocido en células diferenciadas terminalmente, es propiamente un antígeno específico de estado mientras que un antígeno reconocido en cierto tipo celular diferenciado y que sirve como marcador para distinguirlo de otro es propiamente un antígeno específico de tejido.

El significado que tienen estas distintas categorías para el análisis del desarrollo no debe confundirse porque de hecho un antígeno específico de estado puede ser a la vez específico de tejido. Si consideramos también como antígeno específico de tejido a los que pueden reconocerse en tipos celulares que no han alcanzado su diferenciación terminal, entonces debe admitirse una categoría intermedia que corresponde a los llamados marcadores de linaje celular.

El término antígeno de diferenciación surgió de estudios en que se observaba la reagregación después de separar células embrionarias de diferentes organismos: erizo de mar (Giudice, 1962; McClay y Chambers, 1978); esponjas (Moscona, 1968); hongos (Beug et al., 1970; Beug et al., 1973a) y en

células neurales de embriones de pollo (Thiery *et al.*, 1977; Rutishauser y Edelman, 1978) entre otros. Estos trabajos demuestran que las células embrionarias pueden reconocerse en cuanto a histotipo y complementariedad funcional, asociándose de manera específica, proceso que puede ser inhibido mediante anticuerpos. Esto indica que las células embrionarias de diferentes tejidos poseen diferentes antígenos en la superficie celular - o marcadores moleculares específicos de tejido - los cuales funcionan como ligandos intercelulares (Goldschneider y Moscona, 1972; Babinet y Condamine, 1980). Esta descripción corresponde a lo que se entiende por antígeno de diferenciación específico de tejido y en este contexto, la diferenciación celular se reflejaría en la aparición de un patrón cualitativo, cuantitativo y estructural único de moléculas sobre la superficie celular (Monod y Jacob, 1961; Goldschneider y Moscona, 1972). El mecanismo molecular que operaría para generar este estado diferenciado, sería una regulación diferencial de la expresión génica en respuesta a señales del medio, explicada en parte por la formación de complejos estables de transcripción y genes establemente reprimidos (Brown, 1984).

No habría limitación en las funciones que los antígenos de superficie podrían ejercer, por ejemplo, ser enzimas de superficie, receptores de hormonas, moléculas que desencadenen algún evento de diferenciación o morfogénico como

es el caso del antígeno H-Y, o ser componentes de superficie involucrados en reconocimiento celular (Babinet y Condamine, 1980).

En este trabajo el término antígeno de diferenciación se ha utilizado en general para designar un conjunto de moléculas cuya expresión es decisiva para la realización de un evento morfogénico, pero sin excluir que la expresión sea específica de tejido. Estudios recientes en anfibios son un buen ejemplo de este concepto. Se ha demostrado, mediante el análisis de la expresión de mRNA maternos, que el desarrollo procede sin síntesis de mensajeros hasta el estado de blástula avanzada, en el cual aparecen algunos mRNA propios del embrión. Estos mensajeros han sido caracterizados mediante técnicas de biología molecular y se ha determinado que están codificados por dos familias de genes denominados DG (genes diferencialmente expresados en el estado de gástrula). Unos codifican para una familia de proteínas del citoesqueleto, dos citoqueratinas del tipo I y una del tipo II, las que forman uno de los componentes principales de las células epiteliales de la epidermis y cuyos mRNA se encuentran exclusivamente en este tejido. Los otros genes codifican para mRNA que se localiza exclusivamente en el endoderma de la gástrula del embrión. El conjunto de estos genes es activo sólo durante el desarrollo previo a la metamorfosis y no se expresan en anfibios adultos (Dawid y Sargent, 1986). Este hecho

sugiere que la función de los genes DG está asociada al proceso de diferenciación inicial del embrión de anfibio.

En el embrión inicial de mamíferos no se han descrito aún casos tan evidentemente específicos de estado. Wiley y Calarco (1975) utilizando antisueros policlonales producidos contra blastocistos, después de repetidas adsorciones con tejidos de animales adultos, mostraron la presencia de un grupo de glicoproteínas cuya expresión surge durante la segmentación y es máxima en el estado de 8 células, sugiriendo que estas moléculas correspondían a antígenos específicos de estado. Además, su neutralización por los anticuerpos detiene el desarrollo. Un resultado similar se observó con un antisuero preparado contra blastocistos, demostrándose que el efecto de los anticuerpos sobre el desarrollo podía evitarse tratando los embriones con  $\beta$ -N-acetilglucosaminidasa. Los antígenos reconocidos por este antisuero son dos glicoproteínas de peso molecular 65 kD. y 70 kD, las cuales contienen residuos de N-acetilglucosamina que estarían comprometidos en el sitio de unión de los anticuerpos (Johnson y Calarco, 1980a).

Abundante información sobre la composición antigénica de la superficie celular y la función de algunas glicoproteínas se ha logrado inmunizando ratones singénicos con células irradiadas de una línea nulipotente de teratocarcinoma, la línea F9. El antisuero obtenido presenta actividad citotóxica contra antígenos de la superficie de células F9,

de células testiculares y también de embriones preimplantacionales de ratón (Artz et. al., 1973). Al cultivar embriones de dos células en un medio que contiene los anticuerpos divalentes no se observa efecto pero en la presencia de fragmentos monovalentes Fab, aunque continúa la segmentación no ocurre la compactación ni la diferenciación del blastocisto. El efecto de los Fab se puede revertir devolviendo los embriones al medio normal de cultivo (Kemler et al, 1976). Estos resultados sugieren que el efecto primario del suero anti-F9 es impedir la interacción normal entre los blastómeros de la mórula en compactación. Estudios mediante inmunoprecipitación para caracterizar el antígeno F9, muestran que el material antigénico consiste de una proteína principal de peso molecular entre 40 y 43 kD y otra menor, con peso molecular de 24 kD. Estas moléculas contienen una cadena oligosacárida compuesta de fucosa, galactosa y glucosamina (Muramatsu et al., 1979).

Los resultados de los trabajos anteriormente mencionados no son siempre concluyentes debido a la mezcla compleja de especificidades de los sueros policlonales y por lo mismo, el uso de anticuerpos monoclonales ha sido una herramienta decisiva. Utilizando como inmunógeno células de teratocarcinoma, se han logrado caracterizar algunos antígenos que podrían ser específicos de etapas tempranas del desarrollo embrionario de ratón y hombre. El antígeno SSEA-1 es una glicoproteína que contiene una cadena

constituida por Gal- $\beta$ 1-4Glc Nac, similar a la cadena que define el grupo sanguíneo I (Gooi et al., 1981). Está presente en embriones de ocho células, en los tejidos del blastocisto (Solter y Knowles, 1978) y en el ectoderma embrionario y endoderma visceral (Fox et al., 1981). Otro antígeno caracterizado por anticuerpos monoclonales corresponde a un glicosfingolípido denominado antígeno de Forssman, que se ha denominado SSEA-3, el cual aparece en embriones preimplantacionales desde el estado de oocito hasta blastocisto (Shevinsky et al., 1982) y en embriones peri-implantacionales se localiza sólo en el endoderma primitivo y visceral, pero no en el parietal (Fox et al., 1984). A pesar de su considerable especificidad de estado no ha podido demostrarse, mediante el efecto inhibitorio de anticuerpos, la función de SSEA-1 ni de SSEA-3 en el desarrollo normal ni en células de teratocarcinoma inducidas a diferenciarse (Rosentraus, 1983).

Mediante anticuerpos monoclonales se ha purificado y caracterizado una glicoproteína de aproximadamente 140 kD (denominada uvomorulina por Hyafil et al., 1980; Peryieras, et al., 1983; Westveber y Kemler, 1984; y cadherina por Yoshida y Takeichi, 1982; Yoshida-Noro, et al., 1984), que está comprometida en las interacciones célula-célula en teratocarcinomas y en la compactación del embrión. Los anticuerpos monoclonales contra uvomorulina, obtenidos por inmunización xenogénica con células de teratocarcinoma de la

línea F9, tienen una actividad descompactante similar a la observada al cultivar embriones en ausencia de  $Ca^{+2}$  (Ducibella y Anderson, 1975). Al realizar digestiones con tripsina en ausencia de  $Ca^{+2}$ , la uvomorulina se rompe originando un fragmento de 84 kD. Sin embargo, en la presencia de  $Ca^{+2}$  en el medio, esta molécula no es afectada por la acción proteolítica de la tripsina. Se pensó que la uvomorulina podría representar un antígeno de diferenciación característico de esta etapa del desarrollo, pero estudios más recientes muestran que también se expresa en diversos tejidos epiteliales embrionarios y adultos (Westveber y Kemler, 1984; Boller et al., 1985). Esto significa que algunos mecanismos que operan al comienzo del desarrollo - por ejemplo, cambios de adhesividad, regionalización de la membrana plasmática y cambios de organización del citoesqueleto - dependen de moléculas como la uvomorulina que tienen una vasta distribución y una función probablemente similar en diferentes estados y en otros tejidos. Sin embargo, no puede descartarse la existencia de mecanismos de diferenciación celular y morfogénesis que operen durante una etapa determinada del desarrollo utilizando moléculas que no se sintetizaban en etapas más tempranas ni volverán a sintetizarse después.

La expresión durante el desarrollo preimplantacional de algunos antígenos codificados por el locus T del ratón, sugiere fuertemente que algunos productos génicos normales



sean específicos de estado. Los genes de este locus codifican para una serie de haplotipos en el cromosoma 17 del ratón, al lado de la región que codifica para los antígenos del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC). Algunos alelos codificados por el locus T son letales o semiletales en condición homocigota y tienen efectos pleiotrópicos sobre la fertilidad, la recombinación meiótica, la morfogénesis del embrión, la longitud de la cola, etc. (Silver, 1986). Mediante electroforesis bidimensional se han estudiado en células testiculares los patrones de proteínas expresadas por ratones que tienen diferentes genotipos T y se han identificado nueve polipéptidos que definen haplotipos t independientes (Silver et al., 1983). Trabajos recientes sugieren que estas proteínas podrían corresponder a glicosiltransferasas o a sus enzimas reguladoras (Shur y Bennett, 1979; Cheng y Bennett, 1980) debido a que los genes de este locus afectan la glicosilación. También se ha sugerido que algunos productos génicos de este complejo podrían ser componentes de la matriz extracelular (Silver y White, 1982).

Tiene especial interés para esta tesis la condición  $t_{12}/t_{12}$  porque causa la detención del desarrollo en el estado de mórula, aparentemente por un defecto en la compactación. Quimeras de embriones normales con  $t_{12}/t_{12}$  forman blastocistos iniciales que generalmente no llegan a expandirse (Mintz, 1964). Se ha postulado que los

mutantes serían incapaces de asociarse con otras células. Estas alteraciones de la superficie celular de los embriones también se han demostrado mediante ensayos de inmunofluorescencia y citotoxicidad (Marticorena *et al.*, 1978) utilizando anticuerpos específicos contra células embrionarias. Sin embargo, otros autores estiman que la letalidad se explica por un metabolismo anormal que afecta autónomamente cada célula (Mintz, 1964; Hillman *et al.*, 1970).

## OBJETIVOS

El objetivo general de esta tesis ha sido identificar y analizar el papel que desempeñan algunos antígenos de la superficie celular durante el desarrollo preimplantacional del ratón.

Los objetivos específicos han sido:

1. Producir anticuerpos monoclonales contra antígenos de superficie que se expresen durante el desarrollo preimplantacional del ratón.
2. Estudiar la distribución espacial y temporal de los antígenos de superficie de embriones preimplantacionales y de células de teratocarcinoma y de algunos tejidos diferenciados para determinar si algunos de los antígenos que se expresan en esta etapa del desarrollo son específicos de estado o específicos de tejido, incluyéndose en éstos los marcadores de linaje celular.
3. Estudiar el efecto de los anticuerpos monoclonales que por su localización y/o especificidad resulten de interés para el estudio de la morfogénesis inicial, especialmente sobre la compactación y la blastulación.
4. Determinar algunas propiedades de los antígenos de interés por su localización o función.

## ENFOQUE EXPERIMENTAL

Se han utilizado en general dos estrategias diferentes para caracterizar - mediante métodos inmunológicos - antígenos de la superficie celular que sean específicos de estado o específicos de tejido o que teniendo vasta distribución estén funcionalmente involucrados en el desarrollo embrionario (véase Babinet y Condamine, 1980).

La primera ha consistido en producir anticuerpos contra un antígeno previamente purificado y del cual se conoce la función. Con esta aproximación experimental se han obtenido anticuerpos policlonales y monoclonales que han permitido determinar en qué momento del desarrollo aparece el antígeno, cuál es su distribución tanto celular como subcelular y qué procesos son afectados cuando se trata con el anticuerpo completo o con sus fragmentos. Esta metodología se ha aplicado con éxito en el caso de antígenos codificados por el complejo mayor de histocompatibilidad (Ostrand-Rosenberg, 1980), de enzimas y glicoproteínas de la superficie celular (Webb, 1983), de componentes de la matriz extracelular (Leivo, 1983), y de antígenos expresados por el trofoblasto y por células tumorales como es el caso de la fosfatasa alcalina placentar (Johnson et al., 1981).

La otra estrategia ha consistido en producir anticuerpos policlonales contra embriones, tejidos embrionarios o adultos, y también células tumorales, infiriendo la función

de los antígenos por el efecto de los anticuerpos sobre las células o tejidos con que se inmunizó. Sin embargo, debido a la mezcla compleja de anticuerpos que presenta un antisuero convencional la caracterización de los antígenos ha sido difícil (Johnson y Calarco, 1980b; Hyafil et al., 1980). El advenimiento de la metodología de anticuerpos monoclonales ha perfeccionado esta estrategia y ha proporcionado una herramienta poderosa para la búsqueda de antígenos de estado o de diferenciación, como por ejemplo, en la identificación de las subpoblaciones de linfocitos T (Reinherz et al., 1979).

Fuesto que el propósito principal de esta tesis es identificar antígenos comprometidos en el desarrollo preimplantacional, decidimos utilizar la técnica de anticuerpos monoclonales e inmunizar con antígenos complejos, que se encuentran en mórulas de ocho células o en células de teratocarcinoma de la línea F9 de ratón. Aunque inmunizar contra fosfatasa alcalina hubiera sido una alternativa interesante, la descartamos porque no disponíamos de la enzima purificada. Por otra parte, el uso de los inmunógenos antes mencionados nos abría la posibilidad de analizar otras moléculas y a la vez de obtener anticuerpos contra fosfatasa alcalina que eventualmente nos permitiría caracterizarla. De acuerdo con publicaciones recientes, cuando se inmuniza con células de trofoblasto o de teratocarcinoma se obtienen hibridomas que secretan anticuerpos contra dicha enzima (Anderson et al., 1987).

## MATERIALES Y METODOS

### I. OBTENCION DE ANTICUERPOS

#### PROTOCOLOS DE INMUNIZACION

##### i. INMUNIZACION DE RATONES CON MORULAS DE 8 CELULAS DE RATON

Ratones Balb/c y Swiss Rockefeller, machos y hembras, de 6 semanas de edad fueron inmunizados isogénicamente inyectando 20 a 40 mórulas con zona pelúcida, por vía endovenosa, en medio Biggers (Biggers et al., 1971) con 4 mg/ml de albúmina de suero bovino (BSA). Diez días después de la primera inyección se anestesiaron los animales con Equitesian (pentobarbital sódico 0,96 %,  $MgSO_2 \times 7 H_2O$  2,12 %, hidrato de cloral 4,26 %, propilen glicol 43 % (v/v) pH 7.0) y se sangraron por vía retro-ocular. El título de anticuerpos se midió por citotoxicidad con mórulas de la misma cepa.

##### ii. INMUNIZACION DE RATAS CON MORULAS DE 8 CELULAS DE RATON

Ratas Sprague-Dawley, machos y hembras, de 10 semanas de edad fueron inmunizadas inyectando mórulas de ratón, con zona pelúcida, obtenidas del cruzamiento de hembras de la cepa CF1 con machos Swiss-Rockefeller, por vía femoral con micropipeta de vidrio en medio Biggers que contenía 4 mg/ml de BSA. Cada rata recibió 3 inyecciones, con 200 mórulas

U cada una, en un lapso de tres meses. Diez días después de cada inyección las ratas fueron anestesiadas con éter o Equitesian y se sangraron vía retro-ocular o por la cola. El título de anticuerpos se midió en el suero mediante inmunofluorescencia indirecta o citotoxicidad con mórulas de ratón.

Después de la tercera inmunización, las ratas se dejaron reposar durante 6 a 9 meses. Se eligió para realizar la fusión el animal que presentó el mayor título. Como inmunización de refuerzo se le inyectó tres días antes del experimento 300 mórulas de 8 células de ratón, con zona pelúcida por vía endovenosa.

### iii. INMUNIZACION DE RATAS CON CELULAS DE TERATOCARCINOMA DE RATON DE LA LINEA F9 (TC-F9)

Ratas Sprague-Dawley, machos y hembras, de 10 semanas de edad se inmunizaron por vía endovenosa con células de teratocarcinoma de la línea F9 (TC-F9) cosechadas con una solución salina con amortiguador de fosfato de sodio glucosado (GKN) el cual contiene NaCl 0,14 M, KCl 5.4 mM,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  10 mM,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  5 mM, glucosa 12 mM y Rojo de fenol 0,01 g.

Se emplearon diferentes protocolos de inmunización variando el número de inyecciones, entre una y tres. En cada inmunización se inyectó 0,5 ml de una suspensión de  $1 \times 10^6$  células/ml en GKN y en la inyección de refuerzo se inyectó  $3 \times 10^6$  células/ml en GKN. El procedimiento de obtención

del suero inmune y el criterio para decidir la inyección de refuerzo fue similar al descrito anteriormente. El título de anticuerpos se midió mediante inmunofluorescencia indirecta en células TC-F9 crecidas sobre placas de 96 pocillos.

#### iv. INMUNIZACION DE RATAS CON CELULAS DE BAZO DE RATON

Ratas hembras, de la cepa Sprague-Dawley, de 10 semanas de edad, se inyectaron intraperitonealmente con células de bazo de ratón (aproximadamente medio bazo) obtenido en condiciones estériles, en GKN. A los diez días de la primera inyección se hizo una segunda inoculación, con la misma cantidad de células, pero esta vez por vía endovenosa. Aproximadamente un mes después de esta última inyección, las ratas se anestesiaron con éter y se sangraron por punción cardíaca o por la cola. Se separó el suero y se determinó el título por citotoxicidad.

#### OBTENCION DE SUEROS INMUNES

La sangre obtenida de los animales inmunizados y de los animales controles sin inmunizar, se incubó por 1 h a temperatura ambiente y luego a 4 ° durante 12 h para que se retrajera el coágulo. Después se centrifugó a 1.000 rpm durante 10 min y se separó el suero. Se inactivó el complemento por calentamiento a 56 ° por 30 min.



## TITULACION DE LOS SUEROS

Los sueros inmunes se diluyeron sucesivamente a la mitad en placas de lucita y posteriormente se transfirieron a placas de 96 pocillos (Limbro o Nunc) que contenian mórulas de ratón sin fijar, para titular por citotoxicidad, o bien mórulas o células TC-F9 fijadas con formaldehído al 3,7 % en PBS para determinar el título del suero por inmunofluorescencia indirecta.

El título se definió como la última dilución en que se observó reactividad, tanto para el ensayo de citotoxicidad como para el de inmunofluorescencia indirecta.

## OBTENCION DE HIBRIDOMAS

Se utilizó básicamente el procedimiento descrito por Kohler y Milstein (1975) con las modificaciones señaladas a continuación:

### i. PREPARACION DE LOS LINFOCITOS ESPLENICOS

Tres días después de la inyección de refuerzo, la rata seleccionada para la fusión se sacrificó por asfixia con éter para narcosis. Se abrió la cavidad peritoneal y se retiró el bazo en forma aséptica, depositándolo en una placa de Petri estéril que contenía aproximadamente 15 ml de solución GKN. Las células esplénicas se disgregaron por presión con una espátula metálica y la suspensión celular de tejido y agregados se centrifugó en un tubo cónico de 15 ml a 1.000

rpm durante 10 min a temperatura ambiente. El lavado con GKN se repitió dos veces. Este procedimiento rinde aproximadamente  $2 \times 10^8$  linfocitos por bazo.

#### ii. PREPARACION DE LAS CELULAS MIELOIDES

Una semana antes de la fusión se descongeló un inóculo mantenido a  $-180^\circ$  con células de la línea mieloides NSD/2, deficientes en la enzima hipoxantina-guanina-fosforibosil-transferasa (HGPRT) donadas por el Dr. Cesar Milstein del Laboratorio de Biología Molecular, Cambridge, Inglaterra. Las células se cultivaron hasta alcanzar una densidad de  $6 \times 10^4$  cél/ml en medio Dulbecco suplementado con 10 % de suero fetal de bovino (SFB) de Hyclone Labs., y antibióticos ( $7,5 \times 10^{-5}$  M de estreptomycin y 200 UI/ml de penicilina).

Se colectaron  $10^7$  células NSD/2 mediante centrifugación en un tubo cónico a 1.000 rpm durante 10 min. Las células se lavaron por centrifugación con solución GKN en un tubo cónico de 50 ml a 1000 rpm para eliminar el suero fetal.

#### iii. FUSION SOMATICA

Las células esplénicas del animal inmunizado y las células mieloides se mezclaron y centrifugaron en un tubo cónico de 50 ml. El sedimento celular se desempacó con golpes suaves al tubo y se agregó lentamente por goteo durante un min 0,5 ml de polietilenglicol 4.000 (PEG) al 50 % p/v en GKN. La

agitación se continuó en forma suave por 90 s a 37 °. La fusión de las células se detuvo diluyendo el PEG con 10 ml de GKN agregados gota a gota durante 5 min con agitación suave. La suspensión de células fusionadas se dejó reposar durante 5 min y se llevó el volumen a 40 ml con GKN. Las células se centrifugaron durante 10 min a 1.000 rpm. El sedimento celular se resuspendió en 40 ml de medio Dulbecco suplementado con 10 % de SFB, hipoxantina  $1 \times 10^{-4}$  M, aminoptericina  $4 \times 10^{-7}$  M y  $6 \times 10^{-5}$  M timidina (medio de selección HAT) y antibióticos. Esta suspensión se sembró repartiendo 0,1 ml en cada uno de los 96 pocillos de placas de microcultivo (Limbro o NUNC). Se usaron en cada experimento entre 4 y 8 placas de 96 pocillos.

Los microcultivos se incubaron a 37 ° en una atmósfera húmeda al 10 % de CO<sub>2</sub> en aire. Al cabo de una semana de iniciado el cultivo se adicionó a los pocillos 0,1 ml de medio de cultivo con suero y antibióticos, suplementado con hipoxantina y timidina (medio HT).

#### iv. SELECCION DE HIBRIDOMAS SECRETORES DE ANTICUERPOS ESPECIFICOS

Los pocillos que contenían microcultivos con crecimiento vigoroso, que se manifiesta por la acidificación del medio de cultivo, fueron ensayados por inmunofluorescencia indirecta con células fijadas de teratocarcinoma F9 que habían sido crecidas en placas de 96 pocillos.

#### v. EXPANSION DE HIBRIDOMAS

Los microcultivos productores de anticuerpos de interés se transfirieron a placas de 24 pocillos, que contenían 1 ml de medio condicionado, preparado con 40 ml de medio de cultivo completo y  $2 \times 10^7$  linfocitos esplénicos provenientes de un ratón no inmune (células alimentadoras). Más tarde, cuando las células alcanzaban una densidad adecuada eran transferidas a botellas de 25 cm<sup>2</sup> hasta alcanzar una densidad de aproximadamente  $6 \times 10^5$  células/ml.

#### vi. RECLONACION

Para asegurar la monoclonalidad de los cultivos, los hibridomas de interés fueron sometidos a reclonación de la siguiente manera: se determinó el número de células por ml del microcultivo primario y se hizo una dilución de tal manera que quedaran dos células por cada 0,1 ml. Se sembró 0,1 ml de esta suspensión en placas de 96 pocillos y diluyendo en cada fila el número de células a la mitad de la densidad anterior. Las diluciones se realizaron con medio de cultivo completo suplementado con células alimentadoras.

El sobrenadante de los microcultivos que presentaron crecimiento vigoroso se volvió a probar con el antígeno de la manera antes descrita. Los monoclonos secretores de anticuerpos específicos se expandieron al volumen requerido en presencia de células alimentadoras.

## vii. CRIOPRESERVACION DE LAS CELULAS EN NITROGENO LIQUIDO

Para este propósito se centrifugaron entre  $6 \times 10^5$  y  $2 \times 10^6$  células de cada hibridoma de interés, a 1.000 rpm durante 10 min. El sedimento se resuspendió en 1 ml de suero fetal suplementado con 10 % (v/v) de dimetilsulfóxido (DMSO). La suspensión fue enfriada a  $-80^\circ$  por 24 horas y luego se sumergió en nitrógeno líquido a  $-196^\circ$ .

## II. MATERIAL BIOLÓGICO

### OBTENCION DE EMBRIONES PREIMPLANTACIONALES

Hembras de ratón de 6 a 8 semanas de edad, de la cepa CF1 adquiridas en el Instituto de Salud Pública, fueron inducidas a superovular con una inyección intraperitoneal de 4 UI de gonadotrofina de suero de yegua preñada (Sigma), seguida 44 h después por una inyección intraperitoneal de 5 UI de gonadotrofina coriónica humana (Sigma). Las hembras se cruzaron con machos Swiss-Rockefeller o con machos CF1. Los animales fueron sacrificados por dislocación cervical y se expuso la vía genital para aislar el oviducto o el útero. Mediante este procedimiento se recolectaron embriones de 2 células y mórulas por perfusión de los oviductos, o blastocistos mediante perfusión del útero, con medio Biggers suplementado con 4 mg de BSA por ml. Para determinar la edad de los embriones, se consideró el inicio del desarrollo la hora 0 del día en que se observó el tapón vaginal. Embriones de dos células, mórulas y blastocistos se

recolectaron a las 36, 60 y 85 horas de desarrollo respectivamente.

También se utilizaron ratones Balb/c, del Vivero Central de la Facultad de Ciencias Biológicas de la P. Universidad Católica de Chile. Estas hembras se cruzaron con machos de la misma cepa sin inducir superovulación y la recolección de embriones se hizo de la manera anteriormente descrita.

#### OBTENCION DE OOCITOS

Se usaron hembras jóvenes de la cepa CF1 sacrificadas mediante dislocación cervical. Una vez expuesta la vía genital se les extrajeron los ovarios. Los órganos se lavaron con solución salina con amortiguador de fosfato (PBS), antes de ser colocados en una cápsula de Petri con medio Biggers suplementado con 4 mg de BSA/ml. Los ovarios se aplastaron con una espátula de acero inoxidable, los restos de tejido ovárico se eliminaron y se buscaron los oocitos en el fondo de la cápsula con la ayuda de un microscopio estereoscópico. Se colectaron con una pipeta fina los oocitos que presentaban las siguientes características: citoplasma transparente, vesícula germinativa visible, ausencia de espacio perivitelino y zona pelúcida completa.

### OBTENCION DE LINFOCITOS

Se colectaron 4 ml de sangre de ratones CF1 por punción cardíaca. La sangre se diluyó con 4 ml de PBS y después de agitar suavemente se colocó la suspensión de células sobre 3 ml de Ficoll-Paque (Sigma) en un tubo de centrifuga cónico y se centrifugó por 30 min a 1000 rpm y a temperatura ambiente. La capa que contenía los linfocitos y monocitos se separó aspirando con una pipeta. Las células se resuspendieron en solución PBS.

Para eliminar los glóbulos rojos de la preparación se agregó cloruro de amonio al 0,67 % y se incubó durante 10 min a 37 °. Luego las células se lavaron dos veces más con PBS y se depositaron gotas de 15 µl sobre portaobjetos esmaltados de 8 pocillos, los cuales se dejaron secar al aire para su posterior fijación.

### OBTENCION DE ESPERMATOZOIDES

Se usaron ratones de la cepa Swiss-Rockefeller del vivero central de la P. Universidad Católica. Los animales fueron sacrificados por dislocación cervical para exponer la vía genital, aislar los conductos deferentes y perfundirlos con PBS a 37 °. Se prepararon portaobjetos esmaltados con 8 pocillos, depositando 15 µl de la suspensión de espermios por pocillo. Las preparaciones fueron secadas al aire para su posterior fijación.

## IMPLANTACION DE LOS BLASTOCISTOS *IN VITRO*

Se empleó el procedimiento descrito por Fernández e Izquierdo (1983). Los blastocistos provenientes de hembras superovuladas de la cepa CF1 fueron recuperados mediante perfusión del útero con medio Biggers suplementado con 4 mg de BSA/ml. Los blastocistos recolectados se lavaron con medio NCTC-135 (GIBCO) y se distribuyeron en placas de 96 pocillos (NUNC) o cápsulas de cultivo (Falcon) que contenían el siguiente medio de implantación: NCTC-135 suplementado con SFB al 10 %, penicilina (100 UI/ml) y estreptomycin (100 ug/ml). Los embriones se incubaron a 37 °, en una atmósfera húmeda con CO<sub>2</sub> al 10 %, durante 2 a 4 días según el estado de implantación deseado.

## CELULAS DE TERATOCARCINOMA DE LA LINEA F9

Las células de la línea nulipotente F9 de teratocarcinoma de ratón (TC-F9) usadas en este trabajo fueron donadas por el Dr. M. S. Sherman del Roche Institute, New Jersey, USA. Estas células fueron cultivadas sobre material de plástico desechable o sobre vidrio previamente tratado con gelatina al 1 % (p/v). Las células fueron crecidas en medio Dulbecco (DMEM-10) suplementado al 10 % con SFB, 7,5 10<sup>-5</sup> M de estreptomycin y 200 UI/ml de penicilina. Las botellas se incubaron a 37 ° en una atmósfera húmeda con CO<sub>2</sub> al 10 %.

Una vez que las células establecían una monocapa



subconfluente, se cosechaban lavando la botella, cápsula o placa de 96 pocillos 2 a 3 veces con medio GKN y después se incubaban durante 4 a 5 min con una solución de tripsina-EDTA (Sigma) para desprender las células. La acción de la Tripsina se detenía agregando medio de cultivo suplementado con SFB al 10 %. Para continuar el cultivo las células se volvían a sembrar, a una densidad aproximada de  $10^4$  células/ml en botellas tratadas previamente con gelatina.

El procedimiento utilizado para criopreservar inóculos de estas células fue similar al usado para mantener hibridomas en nitrógeno líquido.

#### **OBTENCION DE TEJIDOS DE RATON ADULTO**

Con este propósito se sacrificaron hembras (en algunos casos preñadas) por dislocación cervical, se expuso la cavidad peritoneal y se aislaron diferentes órganos (ovarios, oviductos, placenta, riñones, hígado e intestino delgado). Los órganos se colocaron inmediatamente en un porta muestra metálico que contenía solución Tissue Tek (Miles Lab) y se congelaron sumergiéndolos lentamente en nitrógeno líquido. Se prepararon cortes de 6-8  $\mu$ m de grosor en un criostato Sakura y se recibieron en porta-objetos nuevos, desgrasados con alcohol al 75 %. Luego fueron fijados y procesados de la manera habitual para inmunofluorescencia indirecta, que se describirá posteriormente.

## INDUCCION DE LA DIFERENCIACION DE CELULAS DE TERATOCARCINOMA DE LA LINEA F9

### i. INDUCCION DE LA DIFERENCIACION HACIA ENDODERMA PARIETAL

La técnica usada fue descrita por Strickland y Mahdavi (1978). Para iniciar los cultivos se sembraron inóculos que contenían  $5 \times 10^3$  células TC-F9 en placas de 24 pocillos o sobre cubre objetos de vidrio previamente cubiertos con gelatina al 1 %. Se usó medio de cultivo Dulbecco, con alta concentración de glucosa (4,5 g/l) suplementado con SFB al 10 %, antibióticos y ácido retinoico  $10^{-8}$  M. Las células se dejaron crecer durante 4 días en este medio, renovándolo cuando se acidificaba.

### ii. INDUCCION DE LA DIFERENCIACION HACIA TEJIDO DE TIPO NERVIOSO

Se usaron para este fin células que habían crecido durante 4 días de la manera anteriormente descrita, a las cuales se les agregó N6-2'-O-dibutiriladenosina-3':5'-monofosfato ciclico (cAMP)  $10^{-4}$  M de Sigma.

Una vez agregado el cAMP, la concentración de suero del medio de cultivo se redujo al 2 %. Las células se cultivaron bajo estas condiciones durante 5 días (Kuff y Fewell, 1980). La observación del estado de diferenciación alcanzado se determinó con un microscopio invertido Nikon equipado con contraste de fase.

### III. TECNICAS INMUNOHISTOQUIMICAS

#### INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA

El material biológico (embriones preimplantacionales, blastocistos implantados, cortes de tejido, frotis de células, y células TC-F9 adheridas a plástico o vidrio) empleado en los ensayos de inmunofluorescencia fue preparado de la siguiente manera:

##### i. FIJACION

Procedimiento 1: El material fue fijado en una solución de formaldehído al 3,7 % (v/v) en PBS o medio de cultivo, durante 20-30 min a temperatura ambiente. Para preparar esta solución se usó formaldehído en solución p.a. de Merck que viene al 37%. Luego se lavó con PBS por aproximadamente 12 min con 3 cambios de PBS. Finalmente se incubó con GKN-glicina 0,2 M durante 1 hora a temperatura ambiente, para bloquear los grupos reactivos dejados por la fijación con formaldehído.

Procedimiento 2: El material fue fijado en paraformaldehído al 4% en PBS durante 30 min a temperatura ambiente. Para disolver el paraformaldehído se calentó a 60 ° y se agregaron unas gotas de NaOH 10N. El procedimiento de lavado fue similar al descrito más arriba. No se observaron diferencias entre ambos procedimientos de fijación.

#### ii. INCUBACION CON EL PRIMER ANTICUERPO (ESPECIFICO)

El material fue incubado durante 1-2 h a 37 ° o a 4 ° durante toda la noche con el sobrenadante de los hibridomas sin diluir. Luego se lavó con PBS, durante aproximadamente 12 min haciendo varios cambios.

#### iii. INCUBACION CON EL SEGUNDO ANTICUERPO (CONJUGADO)

El material tratado con el primer anticuerpo fué incubado entre 30 min y 1 h a 37 ° con suero de conejo anti-IgG de rata conjugado con Isotiocianato de Fluoresceína (FITC) (Sigma), diluido 1:40 con PBS-BSA al 1 %. Luego se lavó de la manera descrita más arriba. El lavado final se hizo con PBS-Tween 20 al 0,05 % (v/v), durante 2 a 3 min para eliminar los anticuerpos adheridos en forma no específica.

#### iv. TINCIÓN Y MONTAJE

Se usó como tinción de contraste para inmunofluorescencia indirecta azul de Evans al 0,5 % en PBS. La preparación se incubó en esta solución durante 3 y 5 min. El exceso de colorante fue eliminado por lavados en PBS y finalmente el material se montó con solución DABCO (Sigma).

#### v. OBSERVACION Y FOTOGRAFIA

Las preparaciones fueron observadas con un microscopio Nikon o Zeiss, ambos equipados con epifluorescencia. Se usó película Kodak-VR de 400 ASA para las fotografías en color y TRI-X de 400 ASA para las fotografías en blanco y negro.

#### vi. CONTROLES DE ESPECIFICIDAD

Se hicieron los siguientes controles para asegurar la especificidad de la reacción:

a) Material solamente fijado; b) Omisión del anticuerpo específico; c) Reemplazo del anticuerpo específico por un anticuerpo no específico. Como control positivo se usó un suero de rata anti-mórula o anti-bazo de ratón, diluido entre 1:10 y 1:20 en medio de cultivo o PBS.

#### CITOTOXICIDAD

Se empleó el procedimiento descrito por Solter y Knowles (1975). En algunos experimentos, los embriones fueron incubados durante 1 a 2 h con el anticuerpo monoclonal específico, a 37 ° en un ambiente húmedo con CO<sub>2</sub> al 10 % en aire. Luego se agregó complemento de cuy diluido 1:10 o 1:20 en PBS y se incubó durante 30 min en las mismas condiciones. En otros experimentos, el material fue co-incubado con el anticuerpo específico y complemento. Los resultados obtenidos fueron similares en ambos casos. Finalmente, los embriones fueron teñidos con Azul Tripán al 0,2 % en PBS y observados al microscopio de luz.

Se hicieron los siguientes controles para determinar la especificidad de las reacciones: a) incubación sólo con complemento de cuy; b) omisión del anticuerpo específico; c) reemplazo del anticuerpo específico por un suero pre-inmune.

Como control positivo se utilizó suero de rata anti-bazo de ratón diluido 1:10 o 1:20 en medio de cultivo o PBS.

#### IV. BIENSAYOS

##### EFFECTO DE LOS ANTICUERPOS MONOCLONALES SOBRE LA ADHESIVIDAD DE CELULAS TC-F9

###### i. EFECTO SOBRE CELULAS RECIEN SEMBRADAS.

En una placa de 96 pocillos se sembraron 50  $\mu$ l de una suspensión de células TC-F9 cosechadas con tripsina/EDTA, a una densidad de  $10^4$  cél/ml. A los microcultivos se les agregó al momento de sembrar y 6 h post siembra, 100  $\mu$ l del sobrenadante de cultivo de cada hibridoma, o 100  $\mu$ l de una mezcla de sobrenadantes. La preparación se incubó durante 24 horas a 37 ° en un ambiente húmedo con CO<sub>2</sub> al 10 %.

Las mezclas de sobrenadantes se prepararon tomando 100  $\mu$ l de cada uno de los componentes y luego agitando la mezcla suavemente, para evitar la formación de espuma.

El efecto de los anticuerpos sobre las células TC-F9 se observó en un microscopio invertido Nikon. Se evaluó el estado de adhesión de las células al sustrato, la adhesión entre células y la morfología general del cultivo comparada con las células del cultivo control, sin anticuerpos.

## ii. EFECTO SOBRE CULTIVOS SUBCONFLUENTES

En estos experimentos los anticuerpos se agregaron a cultivos subconfluentes de teratocarcinoma en placas de 96 pocillos. A cada pocillo se agregaron 100  $\mu$ l de sobrenadante de cada hibridoma o 100  $\mu$ l de una mezcla de sobrenadantes. El efecto de los anticuerpos se observó a las 24 h de incubación a 37 ° y en un ambiente húmedo con CO<sub>2</sub> al 10 %.

## EFECTO DE LOS ANTICUERPOS MONOCLONALES SOBRE EL DESARROLLO PREIMPLANTACIONAL

Se usaron embriones de 2 a 4 células y mórulas tempranas (no compactadas) obtenidos en forma estéril por perfusión de oviductos con medio Biggers suplementado con 4 mg/ml de BSA y cultivados con el mismo medio, que además contenía sobrenadante de hibridomas diluido 1:1 o 1:4. Los cultivos experimentales y controles se mantuvieron durante 48 h en una estufa a 37 ° y en un ambiente húmedo de CO<sub>2</sub> al 10 %. Los embriones se observaron a intervalos de 6 y 12 h en un microscopio invertido Nikon, para estudiar el efecto de los anticuerpos sobre la compactación y sobre la formación del blastocisto. En todos los experimentos se usó como control el medio de cultivo Biggers con 4 mg/ml de BSA sin anticuerpos.

## EFFECTO DE LOS ANTICUERPOS MONOCLONALES SOBRE LA IMPLANTACION DE BLASTOCISTOS *IN VITRO*

Se obtuvieron blastocistos al cuarto día de desarrollo, en forma estéril. Los embriones se colocaron en cápsulas Falcon o en placas de 96 pocillos, y se incubaron en medio NCTC-135 suplementado con suero fetal al 10 %, 200 UI/ml de penicilina y estreptomina  $7,5 \times 10^{-5}$  M, en la presencia de sobrenadante de cultivo de hibridomas diluido 1:1 y 1:4. El cultivo se mantuvo 4 días a  $37^{\circ}$  en un ambiente húmedo con  $CO_2$  al 10 %, durante los cuales se observó la emergencia del blastocisto de la zona pelúcida y su implantación sobre la superficie de las cápsulas plásticas, observándose con especial cuidado el proceso de expansión del trofoblasto.

## V. TECNICAS INMUNOQUIMICAS

### IDENTIFICACION DE ANTICUERPOS MONOCLONALES QUE SE ASOCIAN A FOSFATASA ALCALINA (FAL)

#### i. PREPARACION DE UN EXTRACTO DE CELULAS DE TERATOCARCINOMA DE LA LINEA F9, CON ACTIVIDAD DE FOSFATASA ALCALINA.

Se ensayaron varios detergentes para extraer la enzima (Tween-20, Nonidet P-40 y Tritón X-100) finalmente se adoptó el siguiente procedimiento: Las células TC-F9 fueron cosechadas con tripsina/EDTA (Sigma) o con GKN y



posteriormente fueron lavadas 2 veces más con GKN y se resuspendieron en una solución amortiguada con bicarbonato de sodio 5 mM pH 8.1, sacarosa 0.25 mM, p-metil-sulfonil-fluoruro (PMSF) 1 mM y trasilol 1 mM, luego se agregó Tritón X-100 hasta una concentración final del 1 % (v/v) dejando actuar el detergente durante 5 min a temperatura ambiente. El extracto se centrifugó a 12.000 rpm durante 15 min y se colectó el sobrenadante. Se determinaron proteínas según el método de Lowry (1951) y actividad de FAL, según el método descrito a continuación. El sobrenadante se guardó a  $-20^{\circ}$  hasta ser usado.

#### ii. DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD DE FAL EN EL SOBRENADANTE DE CELULAS TC-F9 TRATADAS CON TRITON X-100.

Se utilizó el método descrito por Bessey (1946) con algunas modificaciones. Se tomaron 200  $\mu$ l del sobrenadante de células TC-F9 extraídas con Tritón en 250  $\mu$ l de amortiguador glicina 100 mM, pH 10,4 que contiene  $MgCl_2$  2 mM,  $ZnCl_2$  2 mM, titriplex 1 mM. La mezcla se preincubó durante 5 min a  $37^{\circ}$  y la reacción se inició agregando 25  $\mu$ l del sustrato p-nitro-fenil-fosfato (Sigma) 0.4 % (p/v) en 1 mM de HCl. La mezcla se incubó durante 15 min a  $37^{\circ}$  y la reacción se detuvo agregando 50  $\mu$ l de NaOH 3 N.

El producto de la reacción se determinó espectrofotométricamente a 407 nm, descontando la hidrólisis espontánea del sustrato. Los resultados de actividad de FAL

se expresaron en unidades totales de actividad enzimática.

### iii. SELECCION DE ANTICUERPOS MONOCLONALES QUE DETECTAN ACTIVIDAD DE FAL EN UN INMUNDENSAYO EN FASE SOLIDA (ELISA).

Se utilizó la técnica descrita por Crowther y Abu-Elzein (1980) con las modificaciones que se indican. Se activaron pocillos de una placa de cloruro de polivinilo (PVC) de Dynatech Laboratories Inc., durante 2 h con 50  $\mu$ l de una solución que contenía 5  $\mu$ g de gamma globulina de conejo anti-gamma globulina de rata purificada por afinidad en una columna de Sepharose 4B activada con BrCN que tenía unida covalentemente IgG de rata. Una vez activada la placa los sitios reactivos remanentes se bloquearon con una solución de PBS con BSA al 1 % durante 1-2 h a temperatura ambiente, luego la placa se lavó con PBS-Tween-20 al 0.5 % durante 4 min. A los pocillos de las placas activadas con anti-anticuerpos de rata se agregaron 50  $\mu$ l de los sobrenadantes de los hibridomas y los controles, las placas se incubaron durante 3 h a temperatura ambiente o toda la noche a 4 °. Luego se lavaron 4 veces por 4 min con PBS-Tween-20 al 0.5 % y se incubaron durante la noche a 4 ° con el sobrenadante del extracto de células TC-F9 tratadas con Tritón X-100, que presentaba actividad de FAL. Las placas se lavaron de la manera ya descrita y se revelaron agregando a cada pocillo 50  $\mu$ l de p-Nitro-fenil-fosfato 1 mg/ml en amortiguador bicarbonato pH 9,6 y  $MgCl_2$  2 mM. Las placas se incubaron por 2 h a temperatura ambiente y la

reacción se detuvo agregando 50  $\mu$ l de NaOH 3 N.

El producto de la reacción enzimática se determinó de la manera antes descrita, diluyendo cada pocillo con 200  $\mu$ l de agua bidestilada y se leyó en una cubeta de 0.5 ml. Los resultados del ELISA se expresaron en unidades totales de actividad enzimática.

#### PREPARACION DE EXTRACTOS DE TEJIDOS DIFERENCIADOS

Hembras de ratón de la cepa CF1 fueron sacrificadas por dislocación cervical y se les extrajeron los riñones, el hígado y el intestino delgado. Previo a la homogenización los órganos se lavaron con PBS y se pusieron en PBS que contenía PMSF 1 mM y trasilol 1 mM a 4 °. El hígado y los riñones se homogenizaron en un aparato de Dounce. El intestino se llenó con PBS y se incubó 30 min a 37 ° y el epitelio de revestimiento del lumen se extrajo raspando con un cubre objeto. A cada una de estas preparaciones se les agregó, durante 5 min, Triton X-100 hasta una concentración final del 2 % v/v. Luego se centrifugó a 12.000 rpm durante 15 min, se colectó el sobrenadante y dializó contra PBS durante 2 h.

Debido a que los extractos preparados de esta manera presentaron hemolisis, se realizaron experimentos con animales perfundidos. La perfusión se realizó inyectando por la cola 500 UI de heparina, y luego se perfundió con

PBS-Heparina 100 UI/ml.

Previo a los ensayos con los anticuerpos se determinó la actividad de FAL de los extractos.

#### **PURIFICACION DE ANTICUERPOS MONOCLONALES DE RATA**

Para purificar los anticuerpos monoclonales de mayor interés se utilizó la técnica del ácido caprílico (Steinbuch & Audran, 1969). Se tomó 1 ml del sobrenadante de cada hibridoma concentrado aproximadamente 10 veces mediante liofilización. Los anticuerpos concentrados se diluyeron con 2 ml de amortiguador acetato 0,06 M pH 4, obteniéndose una solución con pH 4.8. Se agregaron lentamente 74,7 ul de ácido caprílico al 99 % (Sigma) y se dejó en agitación vigorosa durante 30 min a temperatura ambiente. Se centrifugó a 9.000 rpm durante 30 min y se separó el sobrenadante. El precipitado se resuspendió en 2 ml de amortiguador acetato 0,015 M pH 4,8 y se volvió a centrifugar durante 30 min a la misma velocidad. Se juntaron los sobrenadantes. Se ajustó el pH a 5,7 y se dializó contra amortiguador acetato 0,015 M pH 5,7 y luego contra PBS. Se determinó la cantidad de proteínas purificadas según el método de Lowry (1951).

## TIPIFICACION DE ISOTIPOS DE ANTICUERPOS MONOCLONALES

La determinación de clases y subclases de los anticuerpos monoclonales de interés, se realizó con un test comercial obtenido de Zymed Laboratories Inc, que utiliza anticuerpos monoclonales dirigidos contra los siguientes isotipos: Ig2a, Ig2b, Ig2c, IgA, IgM e IgE, marcados con biotina (Bazin et al., 1986). Para determinar los isotipos se activaron placas de PVC con 50  $\mu$ l del sobrenadante de cada hibridoma o con anticuerpos monoclonales purificados, durante 30 min a 37 °. Las placas se lavaron 4 veces con PBS-Tween 20 al 0,05 % y se agregó a diferentes pocillos 50  $\mu$ l de una solución que contenía los anticuerpos anti-isotipo biotinilados en PBS (0,01M pH 7.4), BSA al 1 % y azida de sodio 0,05 %, durante 30 min a 37 °. Las placas se lavaron de la misma manera antes descrita y luego se incubó con una solución que contenía streptavidina conjugada con peroxidasa en PBS (0,01 M, pH 7,4), BSA al 1 %, glicerol al 40 % y mertiolato al 0,05 %, durante 30 min a temperatura ambiente. Finalmente las placas lavadas se revelaron agregando 100  $\mu$ l de una solución que contenía el sustrato ABTS (ácido 2,2-azimo-di-3-etil-benzitiazolina sulfónico) durante 30 min a temperatura ambiente.

Como control positivo se usó suero de rata diluido 1:10 con PBS. Los pocillos positivos se reconocieron visualmente por su intenso color turquesa y también espectrofotométricamente, midiendo la absorbancia a 415 nm.

## ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA-SDS

La electroforesis se realizó en geles verticales de poliacrilamida al 11 % p/v en SDS al 0,1 %, según el método descrito por Laemli et al. (1973). Las muestras se prepararon mezclando 30  $\mu$ l de extracto (con un contenido aproximado de 50  $\mu$ g de proteínas) y 30  $\mu$ l de una solución que contenía 15 % de Glicerol, 5 % de 2-mercaptoetanol y 3 % de SDS en amortiguador Tris-HCl 62,5 mM pH 6.8. Esta mezcla se hirvió a 100 ° durante 4 min y se aplicaron al gel. La electroforesis se realizó a 40 volts por 15 h. Los geles se fijaron y se tiñeron con azul de coomassie como describe la técnica original, y luego se eliminó el exceso de colorante en una solución de Metanol al 50 % y ácido acético al 10 %.

## TRANSFERENCIA A NITROCELULOSA E INMUNORREVELADO

Las proteínas separadas por electroforesis en geles de poliacrilamida, se transfirieron desde el gel a papel de nitrocelulosa, de acuerdo a la técnica descrita por Towbin et al. (1979) mediante un aparato que consiste en un *sandwich* de 2 esponjas plásticas, 2 láminas de papel 3 MM, la lámina de nitrocelulosa y el gel, todo esto prensado por flejes plásticos, entre 2 soportes de plástico perforado. El traspaso se hizo a 4 ° y 30 V en una solución que contenía tris 75 mM y metanol 20 %, pH 8.4.

Todas las etapas siguientes se realizaron a 4 °C y en

agitación suave. El papel de nitrocelulosa con las proteínas transferidas, se trató durante 3 h con una solución de BSA al 3 % en PBS, para cubrir los sitios reactivos libres de la nitrocelulosa. Después el papel se cortó en tiras de 0,5 a 1 cm de ancho que se incubaron durante 24 h con el primer anticuerpo sin diluir (sobrenadante de hibridoma). Luego se lavaron 4 veces durante 4 min con PBS-Tween-20 al 0,1 % y se incubaron durante 12 h con un segundo anticuerpo anti-rata conjugado con peroxidasa (Sigma) diluido 1:1000 con PBS/BSA al 1 %. Después se procedió a lavar de la manera antes descrita y finalmente se agregó el sustrato precipitante 4-cloro-1 naftol 0,6 mg/ml en tris-HCl 50 mM, NaCl 200 mM, pH 7.4, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,03 %. La reacción se detuvo por dilución con agua destilada.

## INMUNOPRECIPITACION

### i. MARCACION Y PREPARACION DEL EXTRACTO

Se utilizó la técnica descrita por Kessler (1985) con algunas modificaciones. Los cultivos de células de teratocarcinoma se marcaron de la siguiente manera: Se cultivaron células en placas de 3,5 cm de diámetro (Falcon) y una vez alcanzada la confluencia se retiró el medio de cultivo y se lavaron 2 veces con GKN. A las células adheridas al sustrato se agregó 1,5 ml de medio mínimo esencial (MEM) de Gibco fresco sin metionina, que contenía

suero fetal de bovino al 2 % dializado más 50  $\mu$ Ci de metionina- $S^{35}$  (Amersham Labs.). Las células se cultivaron en presencia del aminoácido marcado durante 15 h. Luego se eliminó el sobrenadante y se lavó con GKN. Finalmente se agregó 0,5 ml de solución GKN y se sacaron las células suavemente con una espátula de goma. La suspensión de células colectada en un tubo de plástico se centrifugó 1 min a 12.000 rpm, al sobrenadante se le agregó una solución que contenía NaCl 190 mM, tris HCl 50 mM, pH 7.4, EDTA 6 mM pH 6.8, Tritón X-100 2,5 %, 1 mM de trasilol y 1 mM de PMSF (Solución A). La mezcla se agitó suavemente en un vortex para soltar el pellet, se agregó 2 % de SDS en tampón tris-HCl y se calentó durante 5 min a 75 °. El DNA se rompió por sonicación durante 20 s.

#### ii. PREINCUBACION CON PROTEINA-A-SEFAROSA.

Para eliminar los componentes del extracto que se unen en forma inespecífica a la proteína-A-sefarosa (Sigma) se preincubó cada extracto marcado con 30  $\mu$ l de Proteína-A-Sefarosa, previamente lavada con solución A, durante 15 min y con agitación suave. Se centrifugó 1 min a 12.000 rpm y se eliminó el sobrenadante.

#### iii. INCUBACION CON LOS ANTICUERPOS.

Se agregó a cada extracto adsorbido con proteína A, 250  $\mu$ g de inmunoglobulinas purificadas de los hibridomas con caprilato. Se incubó con el anticuerpo durante



aproximadamente 15 h a 4 °C, en agitación suave. Debido a que los anticuerpos monoclonales eran de rata, fue necesario incubar previamente a la proteína-A-sefarosa, con un antisuero de conejo contra inmunoglobulinas de rata porque las Ig de rata no se unen a proteína A (Bazin et al., 1986). Se agregó 15 µl de suero anti-rata obtenido en conejo (Sigma) y se incubó durante 1 h a temperatura ambiente y con agitación suave.

#### iv. INCUBACION CON PROTEINA-A-SEFAROSA Y LAVADO.

Se agregó 30 µl de proteína-A-sefarosa y se incubó durante 4 h a 4 °C, con agitación rotatoria suave. Se centrifugó y se eliminó el sobrenadante. Las partículas de sefarosa se resuspendieron en 1 ml de solución A, 0,2 % SDS. La suspensión se agitó durante 5 min, se centrifugó a 12.000 rpm durante 1 min y se eliminó el sobrenadante. Este procedimiento de lavado se repitió 5 veces. Finalmente se lavó de la misma manera pero con tris EDTA 10 mM dos veces.

#### v. ELECTROFORESIS.

Los sedimentos obtenidos se resuspendieron en 30 µl de mezcla denaturante. Las muestras se calentaron durante 2 min en un baño de agua en ebullición. Luego los polipeptidos marcados se separaron por electroforesis, en geles de poliacrilamida-SDS al 11 %, como se describió anteriormente. La electroforesis se realizó a 80 V hasta que las proteínas salieron del gel concentrador y luego se subió el voltaje a 180 V.

## vi. FLUOROGRAFIA

Antes de la exposición, el gel se deshidrató toda la noche en DMSO, con agitación suave y renovando 2 veces el DMSO durante la última hora de lavado. Luego se incubó 3 h a temperatura ambiente y en oscuridad con una solución de DMSO y 2,5-difeniloxazole (PFO) al 15 % p/v. El gel se lavó 1 h con agua de la llave en oscuridad y posteriormente se secó en un papel filtro Whatman de 3 mm de espesor.

El gel seco, se colocó en un chasis en donde se expuso durante 4 días, a  $-80^{\circ}$ , a una película Kodak-X-OMAT-AR.

## RESULTADOS

### INMUNIZACION DE ANIMALES

Considerando la diversidad de métodos de inmunización que se han usado para la obtención de anticuerpos policlonales y monoclonales dirigidos contra antígenos que se expresan durante el desarrollo preimplantacional, fue necesario iniciar nuestro trabajo determinando las condiciones óptimas de inmunización como: el animal de experimentación (ratas o ratones), el antígeno (embriones preimplantacionales o células TC-F9), la vía de inmunización (peritoneal o endovenosa) y el uso de coadyuvantes, para obtener un buen nivel de inmunización, sin lo cual la producción de anticuerpos monoclonales no habría tenido buen éxito.

Se iniciaron en forma paralela dos protocolos de inmunización diferentes: uno singénico y otro xenogénico. En el primero, se inmunizaron ratones jóvenes de la cepa Balb/c (un macho y una hembra) y de la cepa Swiss-Rockefeller (un macho y dos hembras), por vía endovenosa con mórulas de ratón de 8 células con zona pelúcida. Este protocolo no dió resultados satisfactorios y no se intentó repetirlo.

El segundo, consistió en inmunizar ratas jóvenes (2 machos y 3 hembras) de la cepa Sprague-Dawley, por vía endovenosa con

mórulas de ratón de 8 células, de la cepa Swiss-Rockefeller. Con este protocolo después de la tercera inyección, las ratas presentaron títulos de alrededor de 1.000 diluciones, medido por citotoxicidad o inmunofluorescencia indirecta con mórulas de ratón de 8 células. Estos animales se consideraron bien inmunizados y se dejaron reposar para que descendiera el título de anticuerpos, previo a la inyección de refuerzo y la fusión somática.

Más tarde se ensayó un tercer protocolo de inmunización también xenogénico. En este caso se inyectaron ratas vía endovenosa con células de teratocarcinoma de la línea F9 de ratón. Después de la primera inyección los animales (4 hembras y un macho), presentaron un título de alrededor de 500 diluciones, medido por inmunofluorescencia indirecta con células TC-F9. Después de la inmunización secundaria se alcanzó un título de 1.000 diluciones, medido de la misma manera. La inmunización terciaria de los animales no aumentó significativamente el título.

#### PRODUCCION DE HIBRIDOMAS

Se realizaron 5 fusiones somáticas, con los linfocitos esplénicos de los animales que mostraron respuesta inmunológica contra mórulas y células de teratocarcinoma de ratón. Sin embargo, sólo en dos de ellas se obtuvieron hibridomas que crecieron en forma estable y permitieron

congelar inóculos. En ambas fusiones se utilizaron ratas hembras. Una de ellas inmunizada con mórulas de ratón y la otra inmunizada con células de teratocarcinoma. En ambos casos se utilizaron células de ratón de la línea mieloide parental NS0/2 para producir los hibridomas. A los 14 días después de cada fusión se inició la selección de hibridomas secretores de anticuerpos mediante inmunofluorescencia indirecta con células de teratocarcinoma cultivadas en placas de 96 pocillos y fijadas con formaldehído al 3,7 %. Esta fijación no permeabiliza las células, por lo tanto, la reacción positiva por inmunofluorescencia corresponde a epítomos que se encuentran expuestos en la superficie celular.

Los hibridomas seleccionados se expandieron verificando en cada etapa su reacción positiva con células TC-F9 mediante inmunofluorescencia indirecta. De los hibridomas que cumplieron este requisito y presentaron crecimiento vigoroso se prepararon 3 inóculos de aproximadamente  $1 \times 10^6$  células por frasco y se guardaron congelados en nitrógeno líquido.

Los hibridomas secretores de anticuerpos de interés se designaron de la siguiente manera: En primer lugar se indicó el antígeno en forma abreviada: Mor (mórula), TC (teratocarcinoma). Luego, si era necesario, se indicó el número de la placa en que creció el microcultivo y la posición de éste en un eje de coordenadas cartesianas. En el caso de las reclonaciones, se antepuso la posición del

monoclón a la designación original del hibridoma.

En la Tabla 1 se muestra el rendimiento de cada una de las fusiones somáticas. De un total de 632 pocillos con crecimiento se obtuvieron 176 hibridomas que fueron positivos por inmunofluorescencia indirecta con células TC-F9. En la primera fusión, se sembraron 384 pocillos y en todos hubo crecimiento. El sobrenadante de 22 hibridomas fue positivo con células TC-F9 y de ellos, 13 mostraron reacción cruzada con embriones preimplantacionales. Cuando se expandieron, sólo 7 crecieron en forma estable y permitieron congelar inóculos. Finalmente, de esta fusión se logró reclonar 3 hibridomas: Mor-F2A6, Mor-H6B2 y Mor-G6D2.

En la segunda fusión, de 684 pocillos sembrados se obtuvieron 248 pocillos con crecimiento. Después de la primera selección, con células TC-F9, se expandieron a placas de 24 pocillos 154 microcultivos, y 58 de ellos crecieron lo suficiente para congelar inóculos. De éstos, 43 presentaron reacción cruzada con embriones. En esta fusión se intentó reclonar sólo aquellos que por su localización o efecto son de interés.

TABLA 1

RENDIMIENTO DE LAS FUSIONES SOMATICAS PARA OBTENER  
HIBRIDOMAS CONTRA ANTIGENOS DE SUPERFICIE EMBRIONARIOS

Animal Exper.	Inmunógeno	Hibridomas:				
		Tot.*	+TC-F9 <sup>b</sup>	+Embr. <sup>c</sup>	Cong. <sup>d</sup>	Recl. <sup>e</sup>
Rata	Mor. 8 cel.	384	22	13	7	3
Rata	TC-F9	248	154	43	54	7/12*

a: Pocillos con crecimiento, generalmente más de un hibridoma.

b: Selección de hibridomas positivos por inmunofluorescencia indirecta con células TC-F9.

c: Hibridomas positivos por inmunofluorescencia indirecta con ovocitos o embriones en cualquier etapa inicial de desarrollo.

d: Hibridomas en que se mantuvo la reactividad después de expandidos.

e: Hibridomas en los cuales se recuperó la reactividad inicial después de sembrar por dilución límite.

\*: De un total de 12 hibridomas que se han reclonado, 7 han dado buen éxito.

LOCALIZACION HISTOLOGICA MEDIANTE INMUNOFLUORESCENCIA  
INDIRECTA DE LOS ANTIGENOS QUE REACCIONAN CON LOS  
ANTICUERPOS MONOCLONALES.

De acuerdo al método de selección primario usado en este trabajo, todos los anticuerpos reaccionan por inmunofluorescencia indirecta con células de teratocarcinoma. Sin embargo se observaron diferentes patrones de localización de los antígenos en dichas células, predominando una distribución que marca el contorno poligonal de las células, con variaciones de intensidad entre los anticuerpos. Los patrones menos frecuentes fueron el de manchas, que corresponden a cuerpos con intensa fluorescencia que parecen sobresalir de la superficie de las células, y el patrón difuso en que todas las células se observaron levemente fluorescentes. Los diferentes patrones de localización en células de teratocarcinoma se muestran en la Figura 4 y los resultados se resumen en las Tablas 3, 5, 6, 7, 8, 9 y 11.

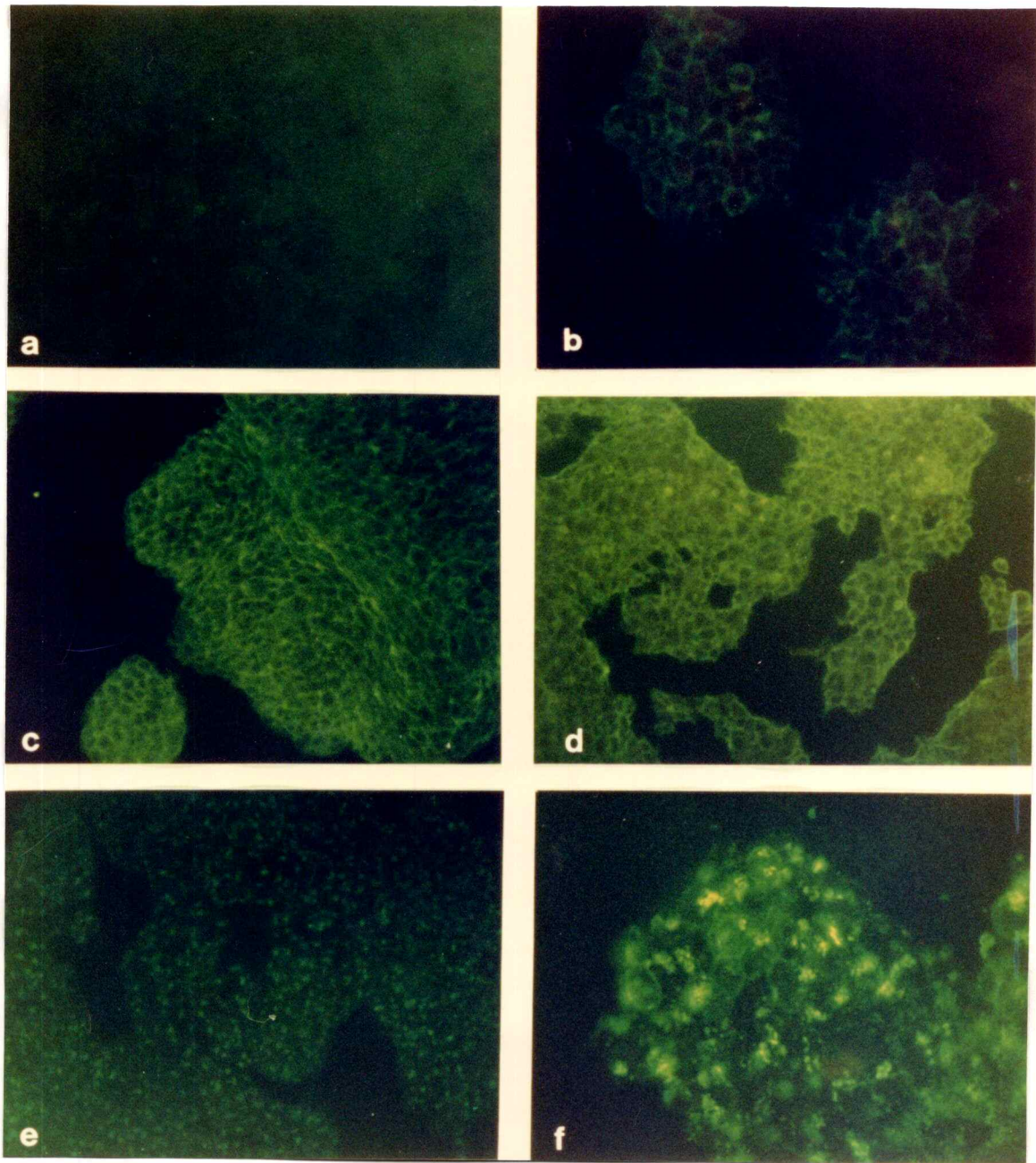
La localización de los antígenos reconocidos por los anticuerpos también fue estudiada mediante inmunofluorescencia indirecta usando 3 a 5 embriones tomados de varias hembras inducidas a superovular. En este estudio se incluyeron los siguientes estados de desarrollo: oocitos extraídos del ovario, los cuales en algunos casos tenían adheridas células foliculares; embriones de 2-células recobrados desde el oviducto al segundo día de preñez;



#### FIGURA 4

PATRONES DE LOCALIZACION DE LOS ANTIGENOS RECONOCIDOS POR LOS ANTICUERPOS MONOCLONALES EN CELULAS TC-F9, OBSERVADAS MEDIANTE INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA.

- a) Control por omisión del anticuerpo específico. Incubación con suero de conejo anti-gama-globulina de rata marcado con FITC.
  - b) Patrón de localización que sigue el contorno poligonal de las células, anticuerpo TC-1G13D4. Aumento 350 X.
  - c) y d) Modificaciones de intensidad en la fluorescencia del patrón poligonal, anticuerpos TC-6F4 y TC-5B7 respectivamente. Aumento 180 X.
  - e) y f) Patrón de manchas característico del antígeno reconocido por el anticuerpo monoclonal TC-5C7 en que fluorescen intensamente sólo algunas regiones de la membrana plasmática de las células.
- En e, fotografía tomada directamente de la placa de 96 pocillos muestra el aspecto de las células con bajo aumento. Aumento 180 X.
- En f, preparación de células desarrolladas sobre cubreobjetos observadas con mayor aumento 350 X.



mórulas de 8 células recuperadas desde el oviducto al tercer día de preñez, y blastocistos implantados *in vitro* durante 4 días. Los implantes tienen expuesta la masa celular y el trofoblasto, por lo tanto, los anticuerpos alcanzan libremente ambos tejidos, a diferencia del blastocisto aún no implantado, en que las células del trofoblasto están selladas por complejos de unión que impiden el paso de los anticuerpos, dejando la masa celular aislada en su interior.

Además, se estudió la localización de estos antígenos en espermatozoides de ratón, debido a que las células de teratocarcinoma de la línea F9 son originarias de células germinales masculinas (Graham, 1977); también se estudió su presencia en linfocitos de ratón, para descartar aquellos anticuerpos que pudieran reconocer antígenos de histocompatibilidad, preparación que permitió además observar su reactividad con fantasmas de glóbulos rojos. Para los antígenos de mayor interés se estudió su localización en otros tejidos: endoderma parietal y tejido nervioso obtenido de células de teratocarcinoma inducidas a diferenciarse con cAMP y ácido retinoico más cAMP respectivamente; útero, oviducto, placenta de ratón de 14 días de preñez, fetos de ratón de esta misma edad; y placenta humana de término.

Los resultados de la localización en oocitos y en blastocistos implantados *in vitro*, nos permitieron elaborar una clasificación en 8 grupos, la cual se muestra en la Tabla 2. Es importante destacar en esta tabla que se han

TABLA 2

CLASIFICACION SEGUN LA LOCALIZACION DE LOS ANTIGENOS RECONOCIDOS POR LOS ANTICUERPOS MONOCLONALES, EN EMBRIONES Y CELULAS DE TERATOCARCINOMA, MEDIANTE INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA

Grupo	Numero de Hibridomas (Total 61)	TC-F9	Oocito	Blast. Implantado	
				MC	T
I	17	+	+	+	+
II*	0	+	+	+	-
III	9	+	+	-	+
IV	4	+	+	-	-
V	4	+	-	+	+
VI	14	+	-	+	-
VII*	0	+	-	-	+
VIII	13	+	-	-	-

\* : Grupos que corresponden a una categoría posible; pero en este trabajo no se han obtenido anticuerpos dirigidos contra antígenos que muestren esta localización.

MC: Masa celular.

T : Trofoblasto.

incluido dos grupos, el II y VII, que corresponden a una categoría teórica, puesto que no encontramos anticuerpos que se unan a antígenos que se encuentren desde el estado de oocito y que durante la implantación se expresen sólo en la masa celular (Grupo II) ni tampoco anticuerpos que se unan a antígenos que aparezcan durante la segmentación y que luego se localicen en el trofoblasto (Grupo VII).

La autofluorescencia que normalmente presenta el material biológico fijado y observado con filtro para fluoresceína fue eliminada tiñendo las preparaciones con azul de Evans. Las preparaciones controles tratadas con este colorante muestran color rojo. En las zonas de unión de los anticuerpos específicos se observa un color amarillo-verdoso, ver por ejemplo la Figura 5.

#### GRUPO I

Comprende 17 anticuerpos monoclonales que reconocen antígenos que se expresan primero en el oocito y que luego, durante la implantación se encuentran en la masa celular y en el trofoblasto, como se muestra en la Tabla 3.

A este grupo de antígenos corresponden las moléculas reconocidas por los 7 anticuerpos obtenidos de la fusión en que se utilizó el bazo de una rata inmunizada con mórulas de 8 células. La inmunofluorescencia indirecta reveló que ninguno de estos antígenos se encuentra en espermatozoides,

TABLA 3

LOCALIZACION DE LOS ANTIGENOS RECONOCIDOS POR LOS ANTICUERPOS MONOCLONALES DEL GRUPO I,  
MEDIANTE INMUNOFLOURESCENCIA INDIRECTA

HIBRIDOMA	TC-F9/PATRON	OOCITO	SEGMENTACION		IMPLANTES		Esper*	OTROS		OBS.	
			2-cél.	8-cél.	MCI	T/patrón		Linf	GR		C.Fol
Mor-F2A6	+/c	+	+	+	+	+/-d	-	-	+	-	Region +
Mor-H6B2	+/c	+	+	+	+	+/-d	-	-	+	-	Region +
Mor-66D2	+/c	+	+	+	+	+/-d	-	-	-	-	Region +
Mor-B5	+/c	+	-	+/-		ND	-	-	-	-	Region -
Mor-C2	+/c	+	+	+	+	+/de	-	-	-	-	Region -
Mor-C3	+/c	+	+	+		ND	-	-	-	-	Region -
Mor-D3	+/c	+	+	+		ND	-	-	-	-	Region -
TC-2E4	+/c	+	+	+/-	+/-	+/-do	-	-	-	ND	No region
TC-5B7	+/c	+	+	+/-	+	+/-do	-	-	-	-	No region
TC-3B4	+/c	+/-	ND	ND	+	+/tc	-	ND	ND	ND	No region
TC-366	+/c	+/-	+/-	-	+	+/de	-	-	-	ND	No region
TC-263	+/c	+/-	+/-	+/-	+	+/d	-	-	-	ND	No region
TC-4B10	+/c	+	ND	+	+	+/do	ND	ND	ND	ND	No region
TC-5D1	+/c	+	-	-	+	+/-d	-	-	-	ND	Region -
TC-6B11	+/c	+	+	+	+	+/tc	-	-	-	+	No region
TC-1C3	+/c	+	+	+	+	+/-de	-	-	-	+	Region -
TC-4D10	+/-c	+	-	-	+	+/d	-	ND	ND	+	No region

+ : inmunofluorescencia positiva intensa  
 +/- : inmunofluorescencia tenue  
 - : inmunofluorescencia negativa  
 c : inmunofluorescencia en contorno celular  
 ■ : inmunofluorescencia en manchas  
 d : inmunofluorescencia difusa

do : inmunofluorescencia difusa homogénea  
 de : inmunofluorescencia difusa heterogénea  
 tc : inmunofluorescencia contorno celular trofoblásticas  
 tcp : inmunofluorescencia en contorno células periféricas trofoblásticas  
 ND : no determinado

en células foliculares, ni en linfocitos, sin embargo, 2 de ellos (Mor-F2A6 y Mor-H6B2), fueron intensamente positivos en fantasmas de glóbulos rojos de ratón. La localización de los antígenos en diferentes estados de desarrollo pre-implantacional, muestra que los epitopes reconocidos por estos anticuerpos, están presentes en la superficie de los blastómeros durante todo este período (Figura 5), lo cual está de acuerdo con los resultados del test de citotoxicidad, que se muestra en la Tabla 4.

En la Tabla 4, se observa que con ninguno de los anticuerpos se alcanzó un 100 % de efecto citotóxico usando mórulas de 8 células. El efecto podría atribuirse a pequeñas diferencias en el tiempo de desarrollo de los embriones, las cuales se traducen en variaciones tanto de la cantidad como de la distribución de los antígenos expuestos en la superficie durante el proceso de compactación. Este fenómeno se aprecia claramente mediante inmunofluorescencia indirecta, observándose que los embriones en un estado avanzado de compactación, muestran fluorescencia con distinta intensidad (Figura 6).

Al estudiar la localización de los antígenos reconocidos por Mor-F2A6, Mor-H6B2 y Mor-G6D2 en blastocistos implantados *in vitro*, se observó que todos presentan una fluorescencia intensa en la masa celular, en cambio débil en las células del trofoblasto (Figura 7).

## FIGURA 5

LOCALIZACION DE LOS ANTIGENOS RECONOCIDOS POR LOS ANTICUERPOS MONOCLONALES DEL GRUPO I EN DIFERENTES ESTADOS DE DESARROLLO PREIMPLANTACIONAL DE RATON OBSERVADOS MEDIANTE INMUNOFLUORESCENCIA.

- a) Control por omisión del anticuerpo específico. Incubación con suero de conejo anti-gamaglobulina de rata marcado con FITC. Los embriones (de 2, 4 células y mórulas) han sido contrastados con Azul Evans. Aumento 180 X.
- b) Los mismos estados que en a, incubados con el anticuerpo monoclonal TC-G6D2 que se une a un antígeno localizado en toda la superficie de los blastómeros. Aumento 180 X.



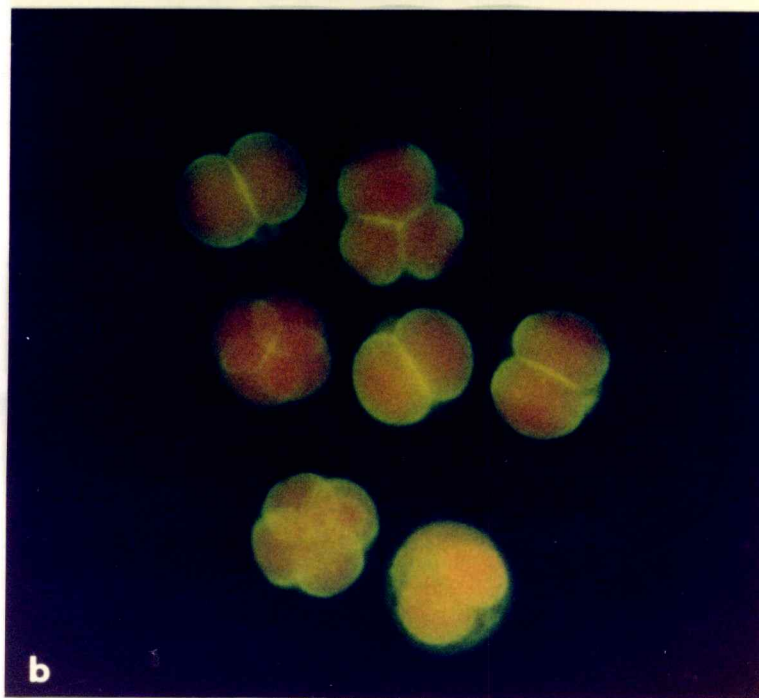
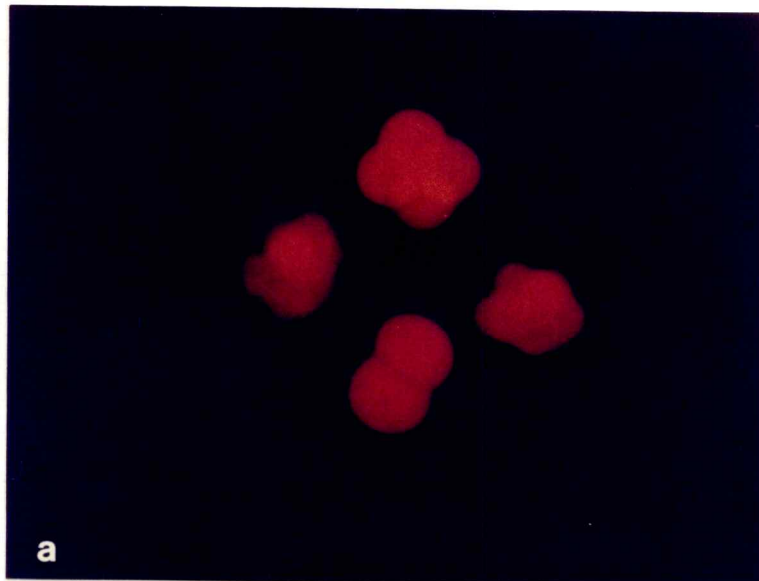


TABLA 4

## EFECTO CITOTOXICO DE ANTICUERPOS MONOCLONALES DEL GRUPO I EN DIFERENTES ESTADOS DE DESARROLLO PREIMPLANTACIONAL

Hibridoma	Estado de desarrollo preimplantacional			
	2-cel.	4-cel.	Morula	8-cel. Blastocisto
Mor-F2A6	1/1	3/3	10/13	8/8
Mor-H6B2	1/1	3/3	12/15	9/9
Mor-G6D2	1/1	3/3	12/14	4/4
Mor-B5	0/1	2/3	1/20	10/10
Mor-C2	1/1	3/3	10/14	6/6
Mor-C3	1/1	2/3	8/13	6/6
Mor-D3	1/1	2/3	11/15	5/5

Nota: Los resultados se expresan por el número de embriones citolizados sobre el total de embriones observados.

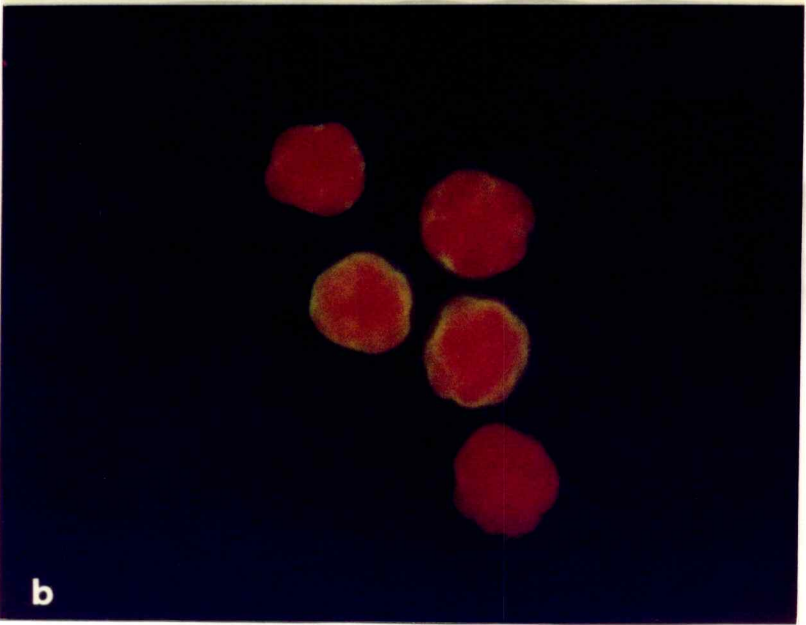
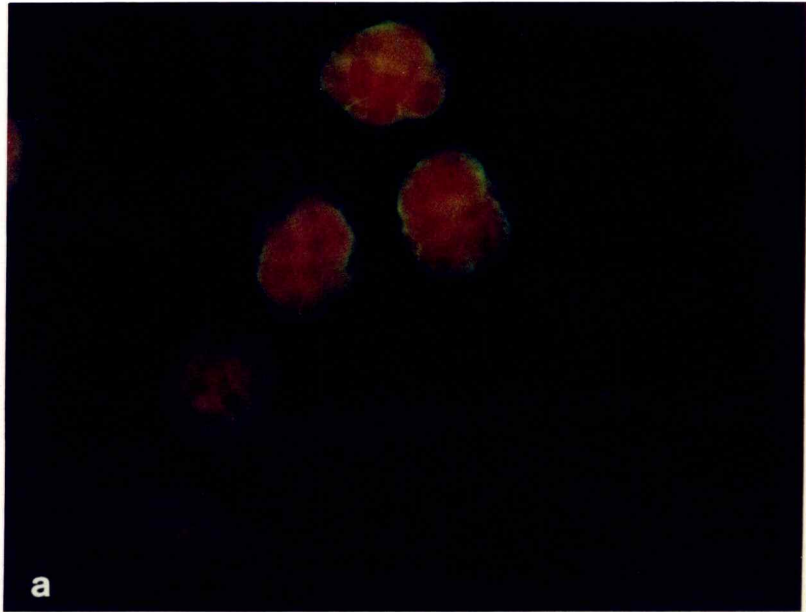
Como control negativo se usó medio de cultivo más complemento de cuy diluido 1:10. Como control positivo se usó suero de rata anti-bazo de ratón diluido 1:20 en medio de cultivo.

25

**FIGURA 6**

LOCALIZACION DE LOS ANTIGENOS RECONOCIDOS POR ANTICUERPOS MONOCLONALES DEL GRUPO I EN MORULAS DE 8 CELULAS DE RATON OBSERVADAS MEDIANTE INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA: REDISTRIBUCION DE LOS ANTIGENOS DE SUPERFICIE DURANTE LA COMPACTACION.

- a) Mórulas semi-compactadas incubadas con el anticuerpo monoclonal TC-6GD2. Aumento 180 X.
- b) Mórulas compactadas incubadas con el mismo anticuerpo. Obsérvese las diferencias en cuanto a intensidad de la fluorescencia en los distintos embriones. En ambas fotografías se ha usado como tinción de contraste Azul Evans. Aumento 180 X.



## FIGURA 7

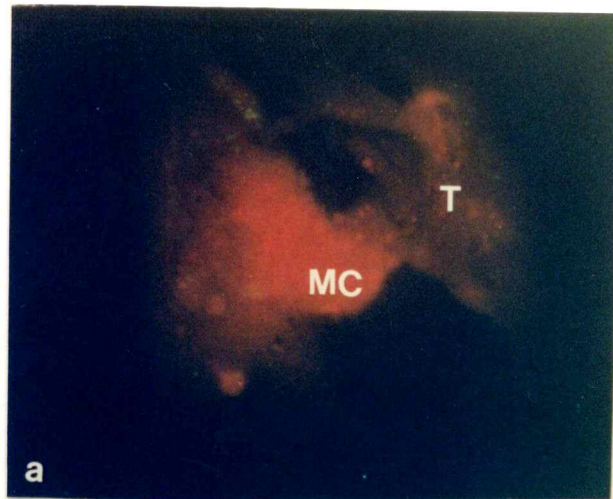
LOCALIZACION DE LOS ANTIGENOS RECONOCIDOS POR ANTICUERPOS MONOCLONALES DEL GRUPO I EN BLASTOCISTOS DE RATON IMPLANTADOS *IN VITRO* OBSERVADOS MEDIANTE INMUNO-FLUORESCENCIA INDIRECTA.

a) Control por omisión del anticuerpo específico.

Incubación con suero de conejo anti-gama-globulina de rata marcado con FITC. Tinción de contraste con Azul Evans. Masa Celular (MC) Trofoblasto (T). Aumento 100 X.

b) y c) Localización de los antígenos reconocidos por los anticuerpos Mor-F2A6 y Mor-H6B2 respectivamente.

Intensa fluorescencia en la superficie de las células de la masa celular interna y tenue en la superficie de las células del trofoblasto. Aumento 100 X.



La localización de los antígenos blancos de estos anticuerpos también se estudió en otros tipos celulares (Tabla 5). En cortes de tejido de ovario, los anticuerpos monoclonales se unen a la superficie de los oocitos en diferentes estados de maduración, siendo negativos en los otros tipos celulares que componen el estroma del ovario (Figura 8). En cortes de oviducto se observó que los tres se localizaron en algunas regiones del epitelio de revestimiento del lumen (Figura 8). En placenta de fetos de ratón de 14 días de gestación, el antígeno reconocido por Mor-G6D2, se expresa en la superficie de las células trofoblásticas gigantes, que están sobre el trofoblasto esponjoso (Figura 9). En vellosidades coriónicas de placentas humanas de término, no se observó reacción por inmunofluorescencia. En los cortes sagitales de fetos de 14 días de gestación, Mor-H6B2 y Mor-G6D2 reaccionan con los centros de formación de las vértebras. Además, los tres anticuerpos reconocen antígenos presentes en los tipos celulares obtenidos de la inducción de la diferenciación de células de teratocarcinoma: endoderma parietal y tejido nervioso (Figura 10). Al estudiar su localización en cortes de riñón, Mor-F2A6 y Mor-H6B2 fueron reactivos con la membrana basal y el lumen de algunos túbulos de la corteza renal, no así Mor-G6D2. La similitud en la localización de los antígenos reconocidos por Mor-F2A6 y Mor-H6B2 y sugiere que podría tratarse de epítomos diferentes de una misma molécula, o epítomos que se encuentran en moléculas

TABLA 5

LOCALIZACION DE ANTIGENOS RECONOCIDOS POR LOS ANTICUERPOS MONOCLONALES DEL GRUPO I Y III  
EN ALGUNOS TEJIDOS ENBRIONARIOS Y ADULTOS MEDIANTE INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA

Grupo	Hibridoma	TEJIDOS ENBRIONARIOS				TEJIDOS ADULTOS				
		Endo P.	T. Nerv.	Embr.14 dias	Pla.raton 14 dias	Pla.hum termino	Ovario	Oviducto	Riñon	Higado
I	Mor-F2A6	+	+	ND	ND	ND	+/ooc	+/epit	+/mb,epit	ND
	Mor-H6B2	+	+	+/fv	ND	-	+/ooc	+/epit	+/mb,epit	ND
	Mor-66D2	+	+	+/fv	+/dec	-	+/ooc	+/epit	-	-
	TC-5D1	ND	ND	+/mc,fv	+/mf	ND	ND	ND	ND	-
	TC-1C3	ND	ND	+/mc,fv	+/mf	-	ND	ND	ND	-
III	TC-A34F5	+	+	+/mc,fv	+/mf	-	ND	ND	-	-

Endo P: endodermo parietal

T nerv: tejido nervioso

Pla : placenta

ooc : oocito

epit : células epiteliales

dec : células deciduales

mb : membrana basal

mf : material fibrilar

mc : mesenquima cara

fv : centros formación vértebras

ND : no determinado

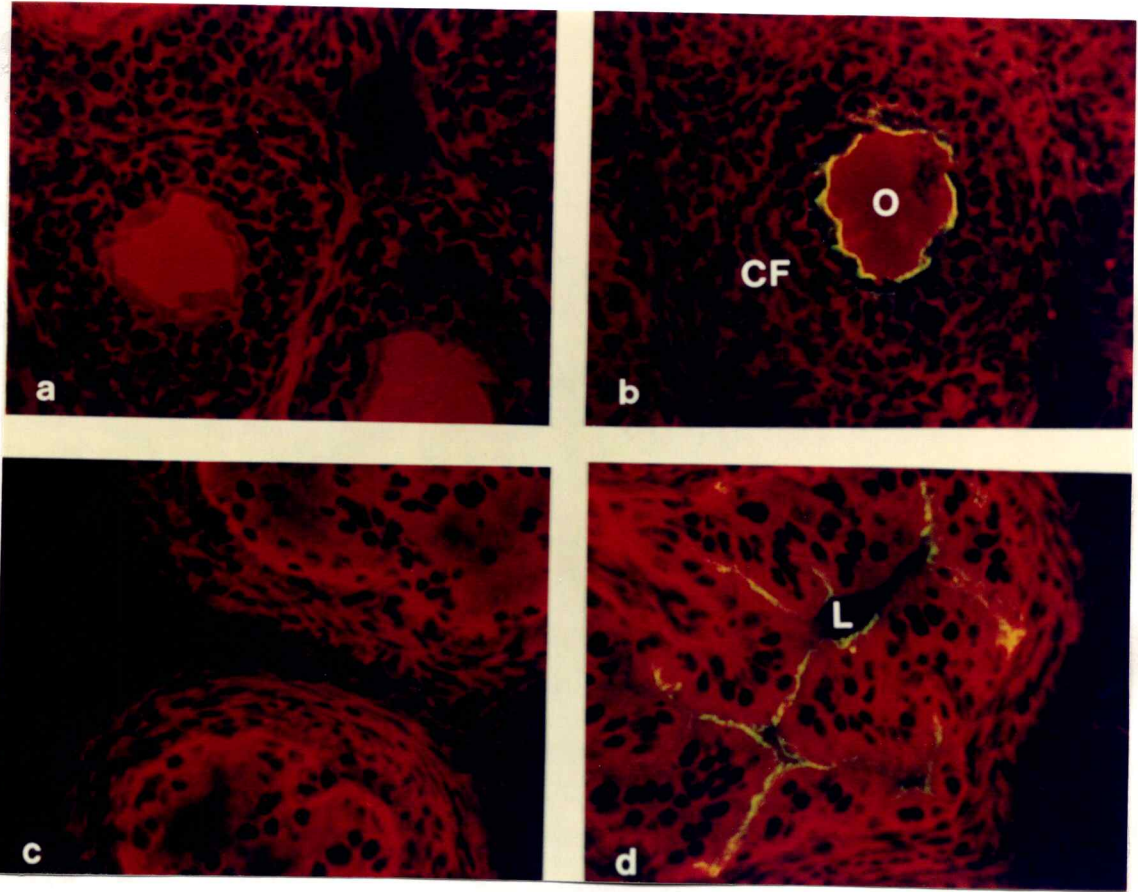


74

**FIGURA 8**

LOCALIZACION DE ANTICUERPOS MONOCLONALES DEL GRUPO I EN CORTES DE TEJIDOS CONGELADOS DE OVARIO Y DE OVIDUCTO DE RATON OBSERVADOS MEDIANTE INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA.

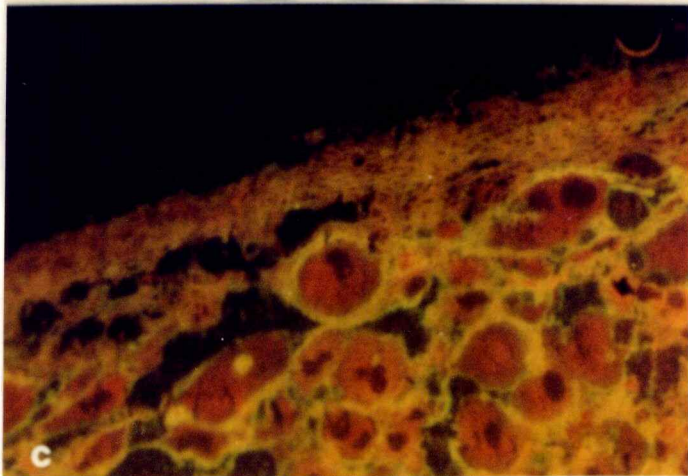
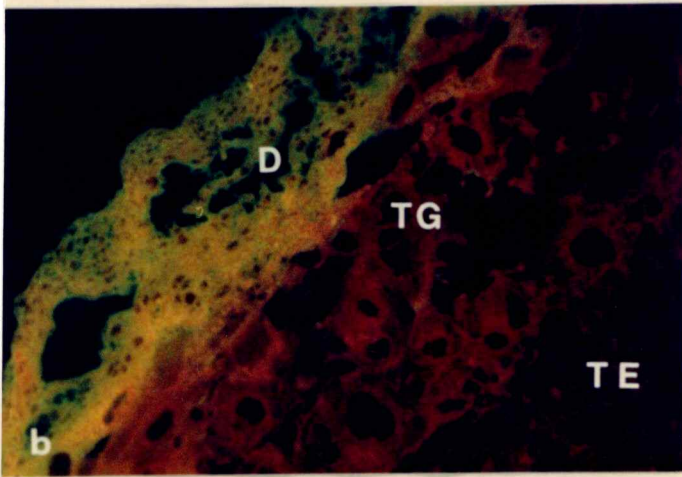
- a) Corte de ovario incubado sólo con el segundo anticuerpo: suero de conejo anti-gama-globulina de rata marcado con FITC. Aumento 200 X.
- b) El mismo tejido que en a, incubado con el anticuerpo Mor-G6D2, obsérvese la intensa fluorescencia en la superficie celular del oocito (O) y la ausencia de reactividad del resto de los tejidos. Células foliculares (CF). Aumento 200 X.
- c) Corte de oviducto incubado en las mismas condiciones que en a. Aumento 200 X.
- d) El mismo tejido que en c, incubado con el anticuerpo Mor-F2A6. Nótese la intensa fluorescencia en la superficie del epitelio que reviste el lumen (L) del oviducto. Aumento 200 X.



## FIGURA 9

LOCALIZACION DE ANTIGENOS RECONOCIDOS POR ANTICUERPOS DEL GRUPO I EN CORTES DE CRIOSTATO DE PLACENTA DE FETOS DE RATON DE 14 DIAS DE GESTACION, OBSERVADOS MEDIANTE INMUNOFUORESCENCIA INDIRECTA.

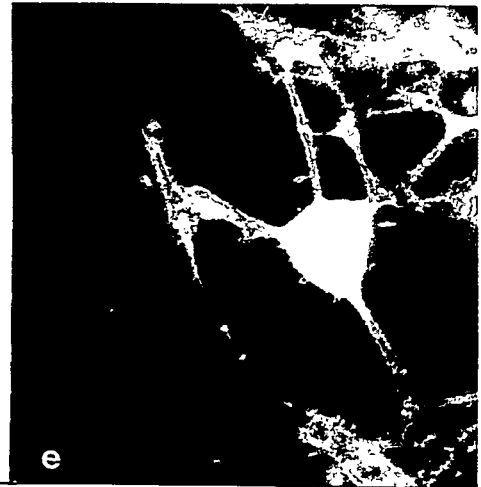
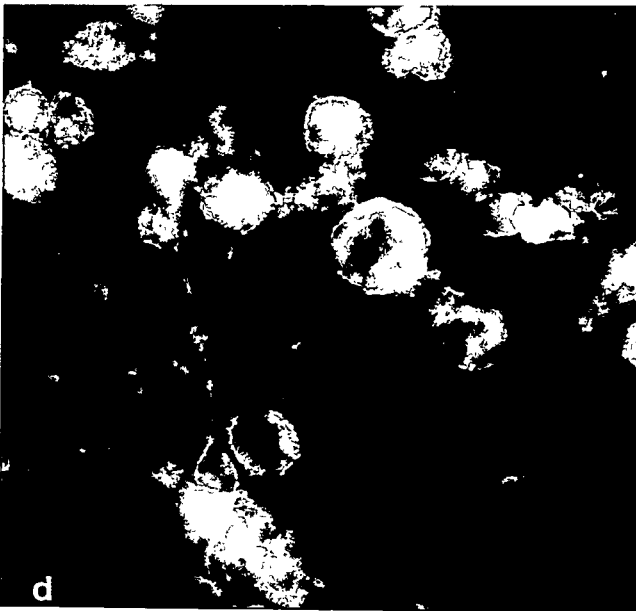
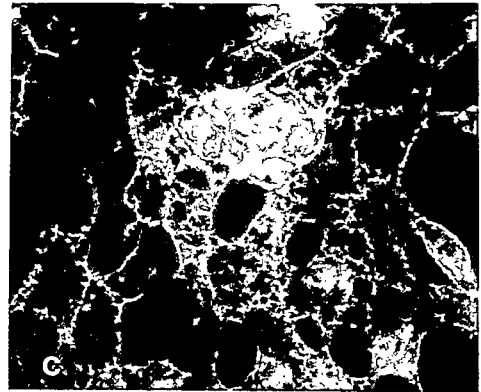
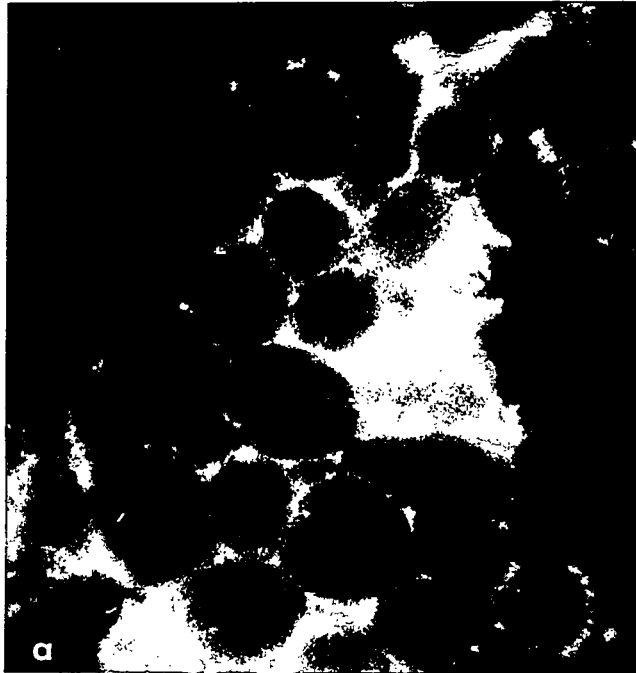
- a) Control, omisión del anticuerpo específico en incubación con suero de conejo anti-gama-globulina marcado con FITC. Aumento 300 X.
- b) Localización del antígeno reconocido por el anticuerpo TC-5D1. Nótese la intensa fluorescencia en la región de la decidua (D) y la falta de reactividad en las células del trofoblasto esponjoso (TE). Aumento 300 X.
- c) Localización del antígeno reconocido por el anticuerpo Mor-66D2, en la superficie de las células trofoblásticas gigantes (TG). Aumento 300 X. En todos los casos se usó Azul Evans como tinción de contraste.



## FIGURA 10

LOCALIZACION DE LOS ANTIGENOS RECONOCIDOS POR ANTICUERPOS MONOCLONALES DEL GRUPO I EN CELULAS DE TERATOCARCINOMA INDUCIDAS A DIFERENCIARSE, OBSERVADAS MEDIANTE INMUNOFLOURESCENCIA INDIRECTA.

- a) Localización del antígeno reconocido por el anticuerpo monoclonal Mor-H6B2 en células de teratocarcinoma indiferenciadas. Aumento 1.500 X.
- b) Control por omisión del anticuerpo específico, se incubó sólo con el conjugado: suero de conejo anti-gama-globulina de rata marcado con FITC.
- c) Células inducidas a diferenciarse hacia endoderma parietal con ácido retinoico. Incubación con el anticuerpo monoclonal Mor-F2A6. Aumento 350 X.
- d) y e) células inducidas a diferenciarse hacia tejido nervioso con ácido retinoico y cAMP. Incubación con el anticuerpo Mor-F2A6 y Mor-G6D2 respectivamente. Aumento 350 X.



3200/100

diferentes que tienen una localización semejante.

Los otros 10 anticuerpos de este grupo fueron obtenidos de la fusión en que se utilizó el bazo de una rata inmunizada con células de teratocarcinoma, reconocen antígenos que poseen las siguientes características. Ninguno de ellos se localizó por inmunofluorescencia indirecta en espermatozoides, en linfocitos, ni en glóbulos rojos, sin embargo, 3 de ellos (TC-6G11, TC-1C3 y TC-4D10), se localizaron en la superficie de las células foliculares. En embriones preimplantacionales, todos se localizaron en la superficie de los blastómeros, con excepción del antígeno reconocido por el anticuerpo TC-5D1 y TC-4D10.

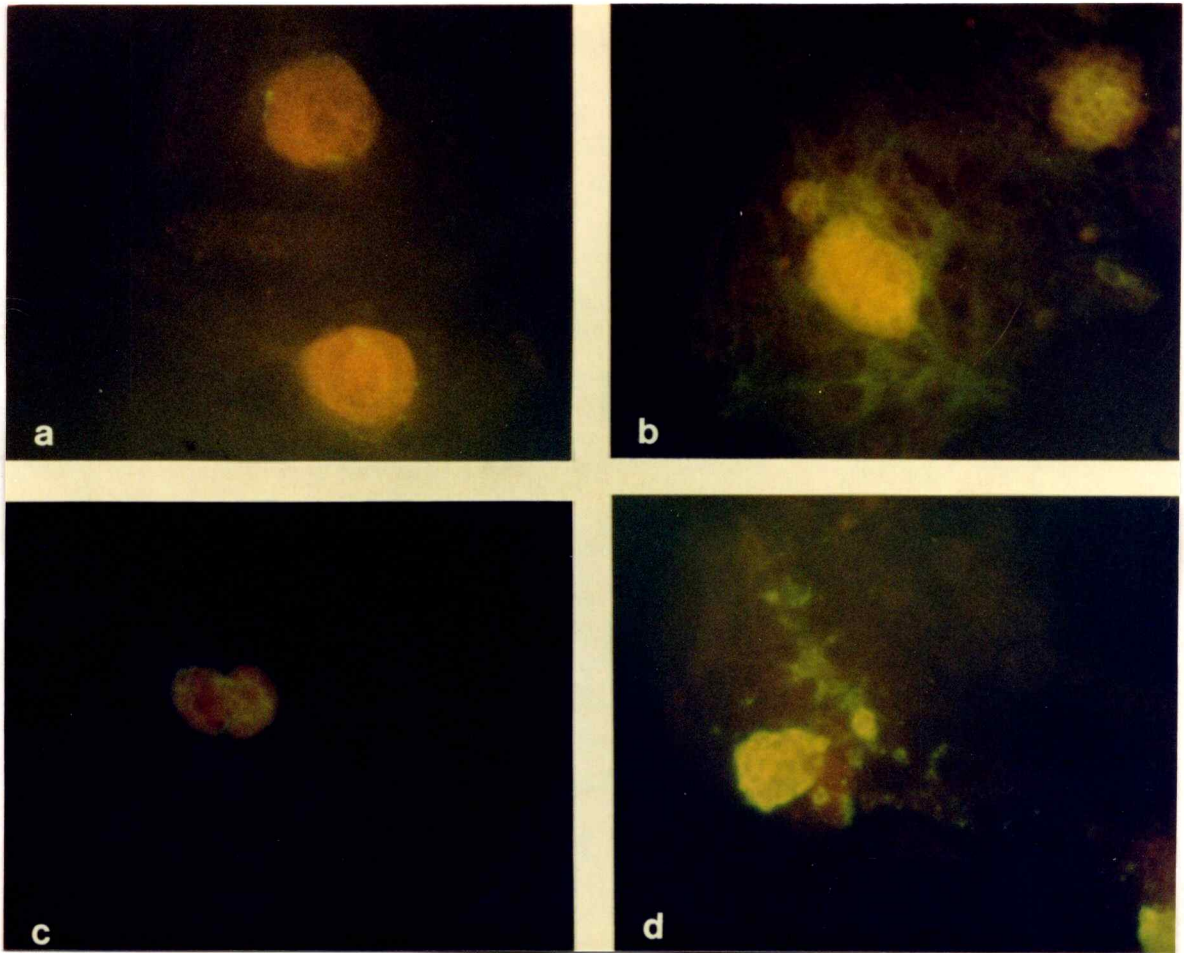
En blastocistos implantados *in vitro*, los 10 anticuerpos se unen a la masa celular, sin embargo, en este tipo celular fue difícil reconocer patrones, pues las células forman un grupo pequeño y compacto. En cambio, en el trofoblasto, en que las células están extendidas sobre el sustrato, se distinguieron varios patrones de localización, lo cual sugiere la existencia de diversos antígenos reconocidos por estos anticuerpos. En el trofoblasto, algunos mostraron una fluorescencia intensa en el contorno de las células, como es el caso de los antígenos reconocidos por los anticuerpos TC-3B4 y TC-6G11 o en forma tenue, como es el caso de los antígenos reconocidos por los anticuerpos TC-2E4, TC-5D1 y TC-4D10 (Figura 11). Otros, presentaron un patrón de localización difuso y heterogéneo, es decir sólo fluorecían

## FIGURA 11

LOCALIZACION DE LOS ANTIGENOS RECONOCIDOS POR LOS ANTICUERPOS MONOCLONALES DEL GRUPO I EN BLASTOCISTOS DE RATON IMPLANTADOS *IN VITRO*, OBSERVADOS MEDIANTE INMUNO-FLUORESCENCIA INDIRECTA.

- a) Control por incubación con el segundo anticuerpo. Dos blastocistos implantados. Tinción de contraste con Azul Evans. Aumento 100 X.
- b) Localización del antígeno reconocido por el anticuerpo TC-6G11 en 2 blastocistos implantados. Intensa fluorescencia en la superficie de las células de la masa interna y en la superficie de las células trofoblásticas de ambos embriones. Aumento 100 X.
- c) Localización del antígeno reconocido por el anticuerpo TC-2E4. Fluorescencia tenue en la superficie de las células de la masa interna y en el trofoblasto. Aumento 100 X.
- d) Localización del antígeno reconocido por el anticuerpo TC-1C3. Intensa fluorescencia en la superficie de las células de la masa interna. En el trofoblasto la fluorescencia es intensa sólo en la superficie de algunas células. Tinción de contraste con Azul Evans. Aumento 100 X.





algunas células del trofoblasto, como es el caso de los antígenos reconocidos por los anticuerpos TC-5B7, TC-1C3 y TC-3G6 (Figura 11).

La expresión de estos antígenos en otros tejidos, se resume en la Tabla 5, donde sólo figuran aquellos que tienen interés por algunas características que se describirán más adelante. Como es el caso de los antígenos reconocidos por los anticuerpos TC-5D1 y TC-1C3. En cortes de placenta de fetos de 14 días, ambos se localizaron en la región de las células deciduales, región que contiene abundante material fibrilar (Figura 10); TC-1C3 no se localizó en las vellosidades coriónicas de placenta humana de término. En cortes sagitales de fetos de ratón de 14 días de gestación, ambos se localizaron en forma intensa en el mesénquima de la cara y en los centros de formación de vértebras. La similitud en los patrones de localización de los epitopes reconocidos por estos dos anticuerpos, en todos los tipos celulares analizados, sugiere que podría tratarse de un mismo antígeno o bien que se encuentran asociados entre sí.

## GRUPO II

Como ya se ha señalado, no hemos obtenido anticuerpos que reconozcan antígenos en el occito y que más tarde se expresen en la masa celular interna pero no en el trofoblasto.

### GRUPO III

Comprende 9 anticuerpos monoclonales que se unen a antígenos que se expresan en el oocito y luego en el blastocisto implantado se localizan sólo en el trofoblasto, como se muestra en la Tabla 6.

En este grupo, todos los antígenos reconocidos por los anticuerpos monoclonales se encuentran en los diferentes estados de segmentación, pero muestran diferencias en intensidad de la fluorescencia (Figura 12). Su distribución en blastocistos implantados *in vitro* revela algunos patrones de localización no observados en el grupo descrito anteriormente. Los antígenos reconocidos por los anticuerpos TC-2D10, TC-3F4 y TC-4E5, se localizaron solo en el contorno de las células periféricas del trofoblasto (Figura 13). Ninguno de los antígenos analizados, se localizó en espermatozoides, en linfocitos, ni en glóbulos rojos. En células foliculares no se detectó su presencia, con la excepción del antígeno reconocido por el anticuerpo TC-4C3.

Tiene especial interés, por algunas características que describiremos más adelante, el antígeno reconocido por el anticuerpo TC-A34F5, por lo cual se estudió su expresión en diversos tejidos (Tabla 5). En placenta de ratón de 14 días de gestación, se localizó en la región de la decidua, sobre las células gigantes de trofoblasto, pero no da reacción positiva en vellosidades coriónicas de placenta humana de

TABLA 6

LOCALIZACION DE LOS ANTIGENOS RECONOCIDOS POR LOS ANTICUERPOS MONOCLONALES  
MEDIANTE INMUNOFLORESCENCIA INDIRECTA EN EL GRUPO III

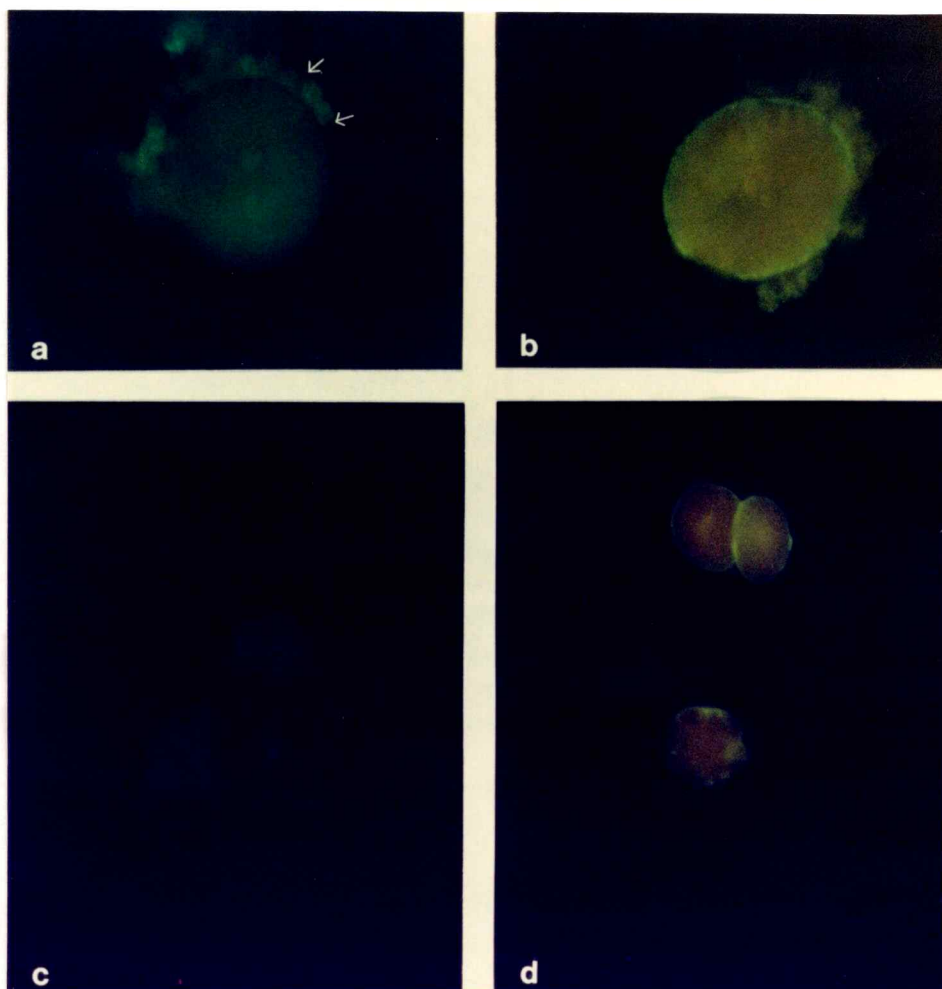
HIBRIDOMA	TC-F9/PATRON	GAMETOS Ovo.	CLIVAJE		IMPLANTES		OTROS			OBS.	
			2-cél.	8-cél.	MCI	T/patrón	Eperm	Linf.	GR.		C.Fol.
TC-2D10	+/c	+	+	+	-	+/tcp	-	-	-	-	No reclin
TC-3F4	+/c	+	+	+	-	+/tcp	-	-	-	ND	No reclin
TC-4E5	+/c	+	-	+-	-	+/tcp	-	-	-	ND	No reclin
TC-A34F5	+/c	+-	+	+-	-	+/-d	-	-	-	ND	Reclin +
TC-4B6	+/c	+	ND	+-	-	+/d	-	-	-	-	No reclin
TC-6F2	+/c	+	+	+	-	+/d	-	-	-	-	No reclin
TC-7D8	+/#	+	+	+	-	+/d	-	ND	ND	-	No reclin
TC-5B9	+-/pc	+	ND	ND	-	+/d	ND	ND	ND	ND	No reclin
TC-4C3	+/d	+-	ND	+	-	+/tc	ND	ND	ND	+-	No reclin

+ : inmunofluorescencia positiva intensa      do : inmunofluorescencia difusa homogénea  
 +- : inmunofluorescencia tenue                      de : inmunofluorescencia difusa heterogénea  
 - : inmunofluorescencia negativa                      tc : inmunofluorescencia contorno celular trofoblásticas  
 c : inmunofluorescencia en contorno celular      tcp: inmunofluorescencia en contorno células  
 # : inmunofluorescencia en manchas                      periféricas trofoblásticas  
 d : inmunofluorescencia difusa.

## FIGURA 12

LOCALIZACION DE ANTIGENOS RECONOCIDOS POR ANTICUERPOS MONOCLONALES DEL GRUPO III EN OOCITOS Y EMBRIONES PRE-IMPLANTACIONALES DE RATON, OBSERVADOS MEDIANTE INMUNO-FLUORESCENCIA INDIRECTA.

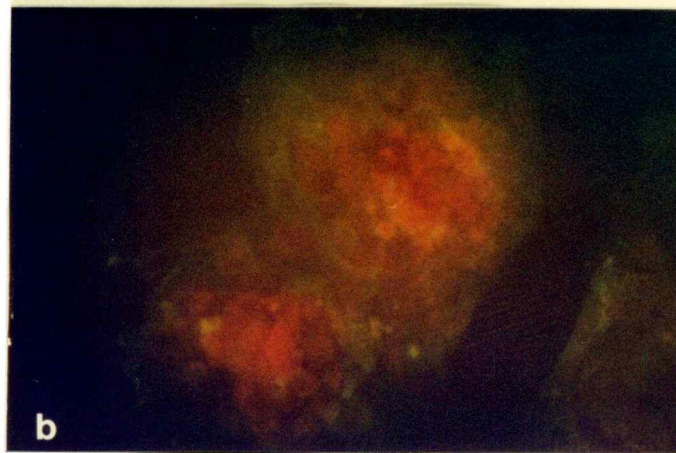
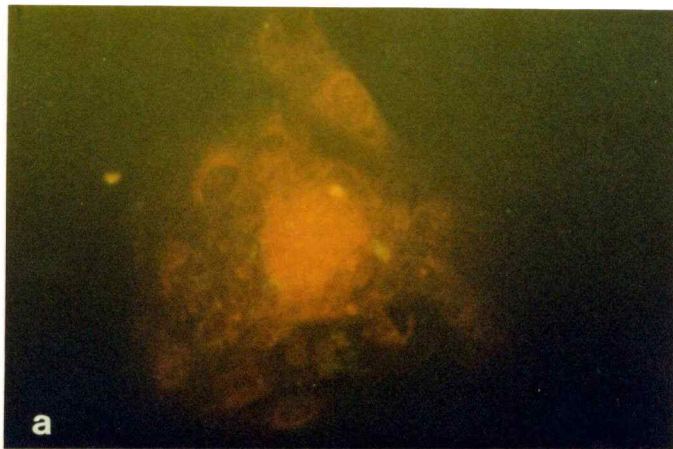
- a) Oocito con algunas células foliculares adheridas (flechas). Control, incubación con el segundo anticuerpo, suero de conejo anti-gamma-globulina de rata. Aumento 250 X.
- b) El mismo estado que en a, muestra la localización del antígeno reconocido por el anticuerpo monoclonal TC-6C2. Aumento 250 X.
- c) Mórulas de 8 células. Control, incubación con el segundo anticuerpo, suero de conejo anti-gamma-globulina de rata.. Aumento 150 X.
- d) Embrión de 2 células y Mórula de 8 células compactadas, incubadas con el anticuerpo TC-6F2. Obsérvese las diferencias en cuanto a intensidad y distribución de la fluorescencia entre ambos estados. En la mórula compactada la fluorescencia es más tenue y no es posible distinguir el contorno de los blastómeros. Aumento 150 X.



## FIGURA 13

LOCALIZACION DE LOS ANTIGENOS RECONOCIDOS POR ANTICUERPOS MONOCLONALES DEL GRUPO III EN BLASTOCISTOS DE RATON IMPLANTADOS *IN VITRO*, OBSERVADOS MEDIANTE INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA.

- a) Control, incubación con el segundo anticuerpo, suero de conejo anti-gamma-globulina de rata. Tinción de contraste con Azul Evans. Aumento 100 X.
- b) Localización del antígeno reconocido por el anticuerpo TC-2D10 en 3 blastocistos implantados. Se observa una fluorescencia tenue en la superficie de las células trofoblásticas gigantes. Aumento 100 X.





término. En fetos de ratón este anticuerpo se une al mesénquima de la cara y en los centros de formación de vértebras. También se localizó en células de endoderma parietal y células de tipo nervioso, obtenidas por inducción de la diferenciación de células de teratocarcinoma. En cortes de tejidos de animales adultos, no se detectó en el riñón ni en el hígado.

#### GRUPO IV

Comprende 4 anticuerpos monoclonales que se unen a antígenos que se expresan en el oocito pero que en el blastocisto implantado no se reconocen en la masa celular ni en el trofoblasto, como se muestra en la Tabla 7.

Durante la segmentación, con la excepción del antígeno reconocido por el anticuerpo TC-104 que fue positivo hasta el estado de mórula, los demás no se detectan, por inmunofluorescencia indirecta en esta etapa del desarrollo. Ninguno reaccionó con espermatozoides, linfocitos, glóbulos rojos, ni en células foliculares.

#### GRUPO V

Comprende 4 anticuerpos monoclonales que se unen a antígenos cuya expresión se inicia durante la segmentación. No aparecen en el oocito y en el blastocisto implantado están tanto en la masa celular como en el trofoblasto (Tabla 8, Figura 14).

TABLA 7

LOCALIZACION DE LOS ANTIGENOS RECONOCIDOS POR LOS ANTICUERPOS MONOCLONALES  
 MEDIANTE INMUNOFLORESCENCIA INDIRECTA EN EL GRUPO IV

HIBRIDOMA	TC-F9/PATRON	GANETOS Dvo.	CLIVAJE		IMPLANTES		OTROS			OBS.
			2-cél.	B-cél.	MCI	T/patrón	Esp.	Linf.	GR.	
TC-1C4	+/c	+	+	+	-	-	-	-	-	ND No reclin
TC-1G4	+/c	+	ND	-	-	-	ND	ND	ND	- No reclin
TC-4A11	+/c	+/-	-	-	-	-	-	-	-	+/- No reclin
TC-H32H12	+/d	+/-	ND	-	-	-	-	-	-	ND Reclin +

+ : inmunofluorescencia positiva intensa      do : inmunofluorescencia difusa homogénea  
 +/- : inmunofluorescencia tenue              de : inmunofluorescencia difusa heterogénea  
 - : inmunofluorescencia negativa            tc : inmunofluorescencia contorno celular trofoblásticas  
 c : inmunofluorescencia en contorno celular    tcp : inmunofluorescencia en contorno células  
 ■ : inmunofluorescencia en manchas            periféricas trofoblásticas  
 d : inmunofluorescencia difusa.

TABLA 8

LOCALIZACION DE LOS ANTIGENOS RECONOCIDOS POR LOS ANTICUERPOS MONOCLONALES  
MEDIANTE INMUNOFLORESCENCIA INDIRECTA EN EL GRUPO V

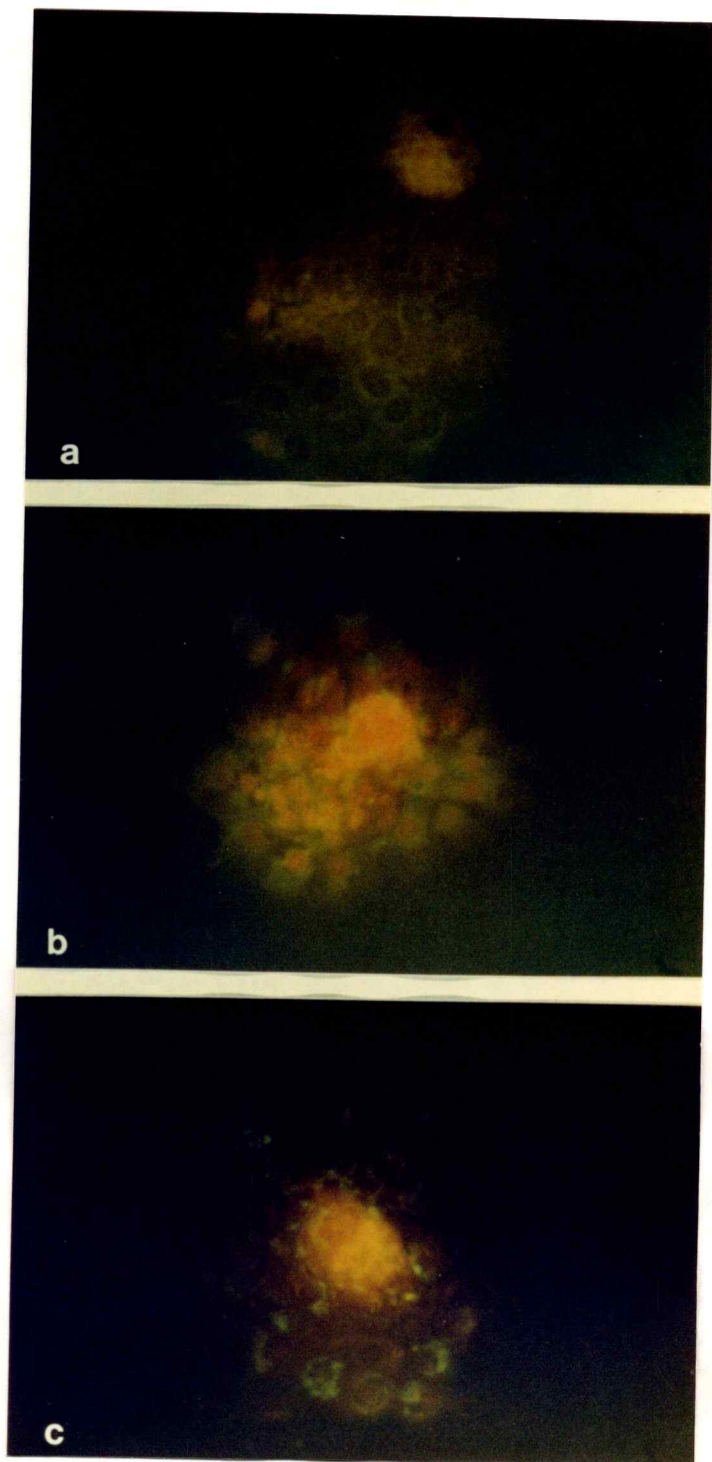
HIBRIDOMA	TC-F9/PATRON	GAMETOS Ovo.	CLIVAJE		IMPLANTES		OTROS			OBS.
			2-cél.	8-cél.	MCI	T/patrón	Esp	Linf.	GR.	
TC-3F12	+/c	-	ND	+-	+	-+/d	-	-	-	ND No reclin
TC-2B4	+/c	-	ND	ND	+	+/do	ND	ND	-	ND No reclin
TC-4C8	+-/c	-	-	-	+-	+/de	-	-	-	ND No reclin
TC-5C7	+/■	-	+	+	+	+/■	-	-	-	- No reclin

+ : inmunofluorescencia positiva intensa      do : inmunofluorescencia difusa homogénea  
 +- : inmunofluorescencia tenue                      de : inmunofluorescencia difusa heterogénea  
 - : inmunofluorescencia negativa                      tc : inmunofluorescencia contorno celular trofoblásticas  
 c : inmunofluorescencia en contorno celular      tcp: inmunofluorescencia en contorno células  
 ■ : inmunofluorescencia en manchas                      periféricas trofoblásticas  
 d : inmunofluorescencia difusa.

**FIGURA 14**

DIFERENTES PATRONES DE LOCALIZACION DE ANTIGENOS RECONOCIDOS POR ANTICUERPOS MONOCLONALES DEL GRUPO V EN BLASTOCISTOS IMPLANTADOS *IN VITRO*, OBSERVADOS MEDIANTE INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA.

- a) Localización del antígeno reconocido por el anticuerpo TC-4C8 en dos blastocistos implantados. Fluorescencia tenue en la superficie de las células de la masa interna y en la superficie de las células del trofoblasto. Aumento 100 X
- b) Localización del antígeno reconocido por el anticuerpo TC-2B4. Intensa fluorescencia en la superficie de las células de la masa interna y del trofoblasto. Aumento 100 X.
- c) Localización del antígeno reconocido por el anticuerpo monoclonal TC-5C7. Nótese el patrón de localización de manchas en la superficie de algunas células trofoblásticas. Tinción de contraste con Azul Evans. Aumento 100 X.



El estudio de la localización de estos antígenos en espermatozoides, células foliculares, linfocitos y glóbulos rojos, mostró que ninguno de ellos se expresa en estos tipos celulares.

En este grupo tiene especial interés el antígeno reconocido por el anticuerpo TC-5C7, que en células de teratocarcinoma mostró localización de manchas, lo cual también se observó en el trofoblasto de blastocistos implantados *in vitro* (Figura 14). En este tejido, el antígeno se localizó en algunas células en una región de la superficie celular que está sobre vesículas. Esta localización también se observó en endoderma parietal y tejido nervioso obtenido desde células de teratocarcinoma diferenciadas (Figura 15). Sin embargo, en los embriones preimplantacionales, este antígeno se distribuyó homogéneamente sobre toda la superficie de los blastómeros.

#### GRUPO VI

Comprende 14 anticuerpos monoclonales, cuyos antígenos aparecen en el clivaje y que luego durante la implantación, se expresan en la masa celular y no en el trofoblasto (Tabla 9).

Ninguno de los antígenos reconocidos por los anticuerpos de este Grupo, se observó mediante inmunofluorescencia indirecta en linfocitos, glóbulos rojos y células foliculares;

**FIGURA 15**

LOCALIZACION DEL ANTIGENO RECONOCIDO POR EL ANTICUERPO TC-5C7 EN CELULAS DE TERATOCARCINOMA INDUCIDAS A DIFERENCIARSE, OBSERVADAS MEDIANTE INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA.

- a) Control por omisión del anticuerpo específico.  
Incubación con suero de conejo anti-gamma-globulina de rata. Aumento 350 X.
- b) Células diferenciadas hacia endoderma parietal.  
Nótese manchas fluorescentes en la superficie celular. Aumento 350 X.
- c) y d) Células diferenciadas hacia tejido nervioso.  
Se observa el mismo patrón. Aumento 350 X.

20 200 4000

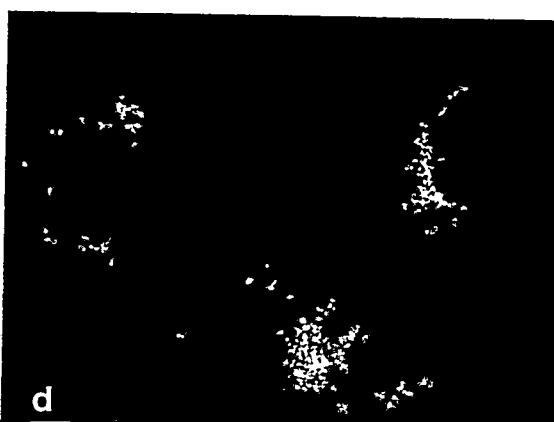
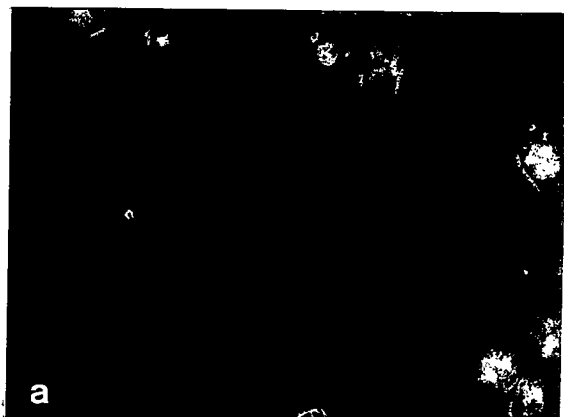




TABLA 9

LOCALIZACION DE LOS ANTIGENOS RECONOCIDOS POR LOS ANTICUERPOS MONOCLONALES  
 MEDIANTE INMUNOFLORESCENCIA INDIRECTA EN EL GRUPO VI

HIBRIDOMA	TC-F9/PATRON	GAMETOS Ovo.	CLIVAJE		IMPLANTES		OTROS			OBS. C.Fol.	
			2-cél.	8-cél.	MCI	T/patrón	Esp	Linf.	GR.		
TC-3H5	+/c	-	-	-	+ -	-	-	-	-	ND	No reclin
TC-5H10	+/c	-	-	+ -	+ -	-	-	-	-	ND	No reclin
TC-HB6F4	+-/c	-	-	+ -	+ -	-	-	-	-	-	Reclin +
TC-1613D4	+/c	-	-	+	+ -	-	-	-	-	-	Reclin +
TC-E74B7	+/c	-	-	+	+ -	-	-	-	-	-	Reclin +
TC-D78B4	+/c	-	ND	+ -	+ -	-	-	-	-	-	Reclin +
TC-7H7	+/c	-	-	-	+ -	-	-	-	-	ND	No reclin
TC-1D4	+/c	-	-	-	+ -	-	-	-	-	ND	No reclin
TC-1A9	+/c	-	-	-	+ -	-	-	-	-	ND	No reclin
TC-6F5	+/c	-	ND	ND	+ -	-	ND	ND	ND	ND	No reclin
TC-4F4	+-/c	-	+ -	+ -	+ -	-	-	-	-	-	No reclin
TC-1E3	+-/c	-	+	+ -	+ -	-	ND	ND	ND	ND	Reclin -
TC-3D11	+-/c	-	ND	-	+ -	-	ND	ND	ND	ND	Reclin -
TC-3C1	+-/c	-	-	-	+ -	+	-	-	-	-	

+ : inmunofluorescencia positiva intensa      do : inmunofluorescencia difusa homogénea  
 +- : inmunofluorescencia tenue                  de : inmunofluorescencia difusa heterogénea  
 - : inmunofluorescencia negativa                tc : inmunofluorescencia contorno celular trofoblásticas  
 c : inmunofluorescencia en contorno celular    tcp: inmunofluorescencia en contorno células  
 o : inmunofluorescencia en manchas            periféricas trofoblásticas  
 d : inmunofluorescencia difusa.

en espermatozoides, con excepción del antígeno reconocido por el anticuerpo TC-3C1, todos fueron negativos. Al estudiar su distribución en diferentes estados de desarrollo preimplantacional, se observó que sólo dos de ellos, TC-4F4 y TC-1E3, se expresan en el estado de dos células; otros se observan desde el estado de 8 células, como es el caso de los antígenos correspondientes a los anticuerpos TC-1G143D4 y TC-E74B7 (Figura 16).

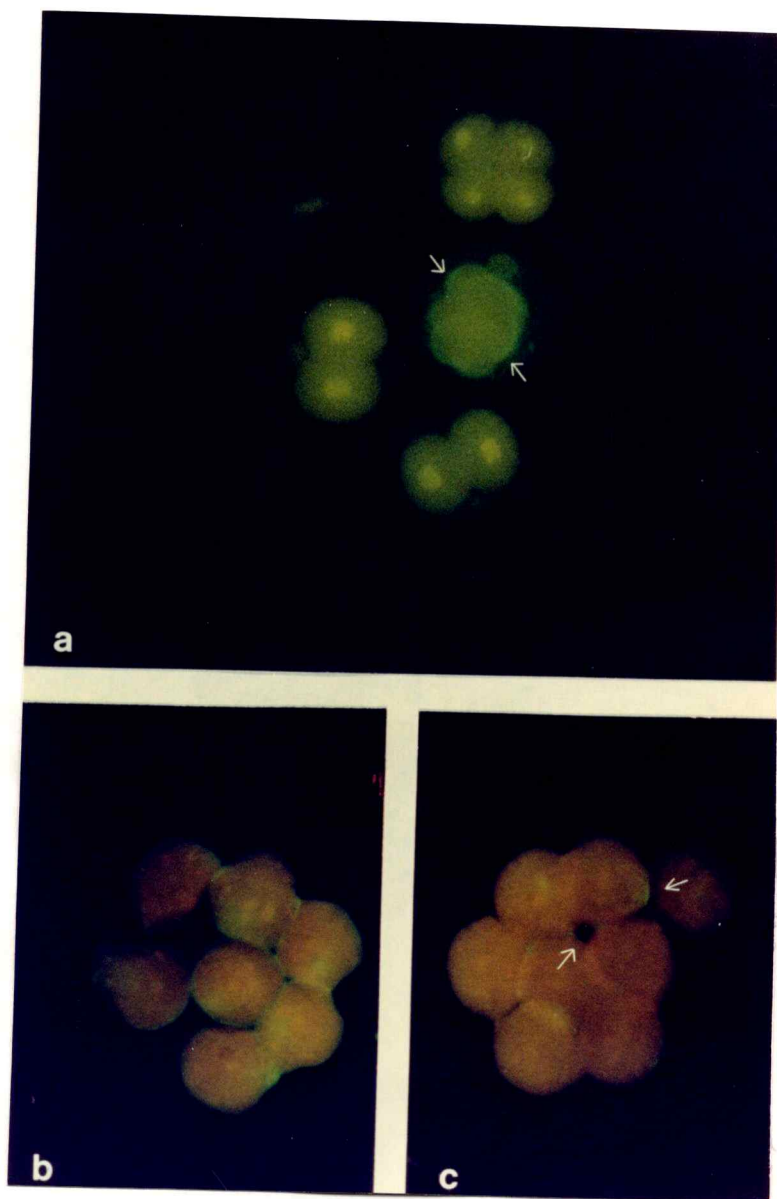
Algunos de los antígenos reconocidos por los anticuerpos de este grupo no se detectan en estados de desarrollo previos a la implantación, sin embargo, esto podría ser un artefacto porque en el caso del antígeno reconocido por el anticuerpo TC-1G13D4, a pesar que hemos observado una intensa fluorescencia, en toda la superficie de los blastómeros en mórulas no compactadas presionadas entre porta y cubreobjeto, las mórulas compactadas presionadas en igual forma sólo presentan fluorescencia en las áreas de contacto entre los blastómeros (Figura 16). Estos resultados sugieren que los antígenos no detectados en el estado de 8 células, podrían estar segregados al interior del embrión, en las áreas de contacto interblastoméricas, lo cual sería consistente con su localización en la masa celular de los blastocistos implantados *in vitro*.

En blastocistos implantados *in vitro*, como es característico de este grupo, sólo reaccionan células de la masa celular. Se observó que algunos antígenos mostraron una señal

## FIGURA 16

LOCALIZACION DE ANTIGENOS RECONOCIDOS POR ANTICUERPOS MONOCLONALES DEL GRUPO VI EN EMBRIONES DE RATON EN DIFERENTE ESTADO DE DESARROLLO, OBSERVADOS MEDIANTE INMUNOFUORESCENCIA INDIRECTA.

- a) Localización del antígeno reconocido por el anticuerpo TC-E74B7 en estados de 2 células, 4 células y en mórulas. Se observa una fluorescencia tenue en la superficie de la mórula (flechas). Aumento 170 X. No se usó tinción de contraste.
- b) y c) Mórula de 8 células no compactada y compactada, respectivamente. En la primera, se distingue una tenue fluorescencia en toda la superficie de los blastómeros, en cambio en la segunda, la reactividad está restringida a algunas zonas de contacto entre los blastómeros (flechas). Aumento 300 X. Los embriones se contrastaron con Azul Evans.



fluorescente tenue, como la de los reconocidos por los anticuerpos TC-3H5, TC-1E3 y TC-3D11; e intensa el resto (Figura 17).

Los resultados del estudio de la expresión de estos antígenos en otros tipos celulares, están resumidos en Tabla 10. Todos los monoclonales ensayados reaccionaron con el endoderma parietal de las células de teratocarcinoma inducidas a diferenciarse, sin embargo, ninguno reaccionó con células de tipo nervioso derivadas de células TC-F9. En tejidos fetales de ratón de 14 días de gestación, tres anticuerpos reaccionaron con el mesénquima condensado facial (TC-3H5, TC-H86F4 y TC-4F4) y en la placenta, siete anticuerpos (TC-5H10, TC-1G13D4, TC-D78B4, TC-1D4, TC-4F4, TC-1E3 y TC-3C1) mostraron mayor o menor intensidad de fluorescencia en la región de la decidua, sobre las células de trofoblasto gigante. Ninguno se unió a las vellosidades coriónicas de placentas humanas de término y tampoco reaccionaron con tejido renal y hepático.

#### GRUPO VII

Conforme a lo ya indicado, no disponemos de anticuerpos que reaccionen con antígenos que aparecen durante la segmentación y luego se expresen en el trofoblasto pero no se expresan en la masa celular.

FIGURA 17

LOCALIZACION DE ANTIGENOS RECONOCIDOS POR ANTICUERPOS MONOCLONALES DEL GRUPO VI EN BLASTOCISTOS DE RATON IMPLANTADOS *IN VITRO*, OBSERVADOS MEDIANTE INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA.

- a) Control por omisión del anticuerpos específico. Incubación con suero de conejo anti-gamma-globulina de rata. Tinción de contraste con Azul Evans. 120 X.
- b) y c) Localización de los antígenos reconocidos por los anticuerpos TC-5H10 y TC-6F5, respectivamente. Nótese intensa fluorescencia en la superficie de las células externas de la masa interna y la falta de reactividad en la superficie de las células del tallo (flecha) y en el trofoblasto. Aumento 120 X.

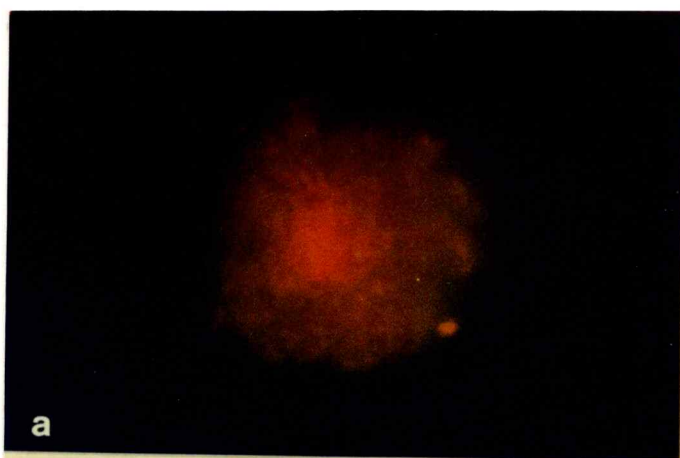


TABLA 10

LOCALIZACION DE LOS ANTIGENOS RECONOCIDOS POR LOS ANTICUERPOS MONOCLONALES  
DEL GRUPO VI EN ALGUNOS TEJIDOS EMBRIONARIOS Y ADULTOS, MEDIANTE INMUNOFLORESCENCIA INDIRECTA

Hibridoma	TEJIDOS EMBRIONARIOS					TEJIDOS ADULTOS	
	Endo P.	T. Nerv.	Embr. 14 días	Pla. raton 14 días	Pla. hum termino	Riñon	Higado
TC-3H5	+	-	+ / mc, fv	ND	ND	ND	ND
TC-5H10	+	-	ND	+ / mf	-	-	-
TC-HB6F4	+	ND	+ / mc	-	-	-	-
TC-1613D4	+	-	-	+ / mf	-	ND	ND
TC-E74E7	+	-	ND	-	-	-	ND
TC-D78B4	+	-	ND	+ / mf	-	-	-
TC-7H7	+	-	-	ND	-	ND	ND
TC-1D4	+	ND	ND	+ / mf	-	ND	ND
TC-4F4	ND	ND	+ / mc	+ - / mf	-	ND	-
TC-1E3	ND	ND	-	+ - / mf	-	ND	-
TC-3D11	ND	ND	ND	-	-	ND	-
TC-3C1	+	-	ND	+ - / mf	-	-	-

Endo P: endodermo parietal

T nerv: tejido nervioso

Pla : placenta

ooc : oocito

epit : células epiteliales

dec : células deciduales

mb : membrana basal

mf : material fibrilar

mc : mesenquima cara

fv : centros formación vértebras

ND : no determinado



## GRUPO VIII

Comprende 13 AMCs, que corresponden a antígenos que se expresan sólo en células de TC-F9, y en los embriones no se observan por inmunofluorescencia en las etapas de desarrollo embrionario analizadas, como se muestra en la Tabla 11. Además, estos antígenos no se expresan en linfocitos periféricos, en glóbulos rojos, ni en células foliculares. En espermatozoides sólo dos de ellos, TC-169 y TC-7A3, dan reacción positiva por inmunofluorescencia; el primero en la pieza media y la cola, y el segundo sólo en la cola.

## EFFECTO MORFOGENETICO DE LOS ANTICUERPOS

### EFFECTO DE LOS ANTICUERPOS MONOCLONALES SOBRE EL DESARROLLO INICIAL DEL RATON

La participación de los antígenos reconocidos por los anticuerpos monoclonales en el desarrollo inicial del ratón, se investigó mediante el efecto inhibitorio de los anticuerpos en las etapas de compactación, blastulación e implantación. Con este propósito, entre 3 y 5 embriones en estado de 2 ó 4 células y mórulas no compactadas se cultivaron durante 48 horas, en presencia de cada sobrenadante de hibridoma. El sobrenadante fue diluido a la mitad con medio Biggers porque en medio Dulbecco -en que crecen los hibridomas- no hay desarrollo embrionario. En estas condiciones, ninguno de los anticuerpos mostró efecto

TABLA 11

LOCALIZACION DE LOS ANTIGENOS RECONOCIDOS POR LOS ANTICUERPOS MONOCLONALES  
MEDIANTE INMUNOFLORESCENCIA INDIRECTA EN EL GRUPO VIII

HIBRIDOMA	TC-F9/PATRON	GAMETOS Ovo.	CLIVAJE		IMPLANTES		OTROS			OBS.	
			2-cél.	B-cél.	MCI	T/patrón	Esp	Linf.	GR.		C.Fol.
TC-1E16C11	+/c	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Reclon +
TC-2C10	+/c	-	-	-	-	-	-	-	-	-	No reclon
TC-4B8	+/c	-	-	-	-	-	-	-	-	-	ND No reclon
TC-7C9	+/c	-	-	-	-	-	-	-	-	-	No reclon
TC-2H2	+/c	-	-	-	-	-	-	-	-	-	No reclon
TC-1B9	+/c	-	-	-	-	-	+	-	-	-	No reclon
TC-4C1	+/c	-	-	-	-	-	-	-	-	-	ND No reclon
TC-4C9	+-/c	-	-	-	-	-	-	-	-	-	ND No reclon
TC-7A3	+-/c	-	ND	ND	-	-	+	-	-	-	No reclon
TC-2B5	+-/c	-	-	-	-	-	-	ND	ND	ND	No reclon
TC-5A4	+-/c	-	-	-	-	-	-	-	-	-	ND No reclon
TC-2F11	+-/c	-	-	ND	-	-	-	ND	ND	ND	No reclon
TC-3B8	+-/c	-	-	-	-	-	-	-	-	-	ND No reclon

+ : inmunofluorescencia positiva intensa

+- : inmunofluorescencia tenue

- : inmunofluorescencia negativa

c : inmunofluorescencia en contorno celular

m : inmunofluorescencia en manchas

d : inmunofluorescencia difusa.

do : inmunofluorescencia difusa homogénea

de : inmunofluorescencia difusa heterogénea

tc : inmunofluorescencia contorno celular trofoblásticas

tcp : inmunofluorescencia en contorno células

periféricas trofoblásticas

sobre la compactación ni sobre la blastulación. Tampoco hubo efecto de estos mismos anticuerpos, diluidos a la mitad con medio NCTC/135, sobre la implantación de blastocistos *in vitro*.

#### EFFECTO DE LOS ANTICUERPOS MONOCLONALES SOBRE LA ADHESIVIDAD DE CELULAS DE TERATOCARCINOMA

Se estudió el efecto de todos los anticuerpos obtenidos, individualmente o en mezclas que contenían igual volumen, de cada sobrenadante sobre la adhesividad de células de teratocarcinoma. El efecto se evaluó en células recién sembradas después de cosecharlas con Tripsina/EDTA y también sobre cultivos subconfluentes. En ambos casos el efecto de los anticuerpos se evaluó a las 24 horas de incubación.

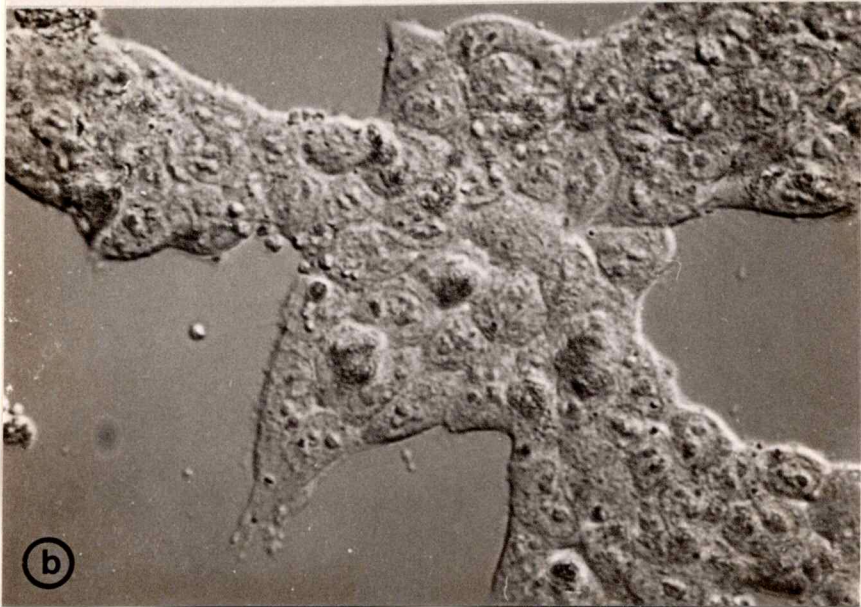
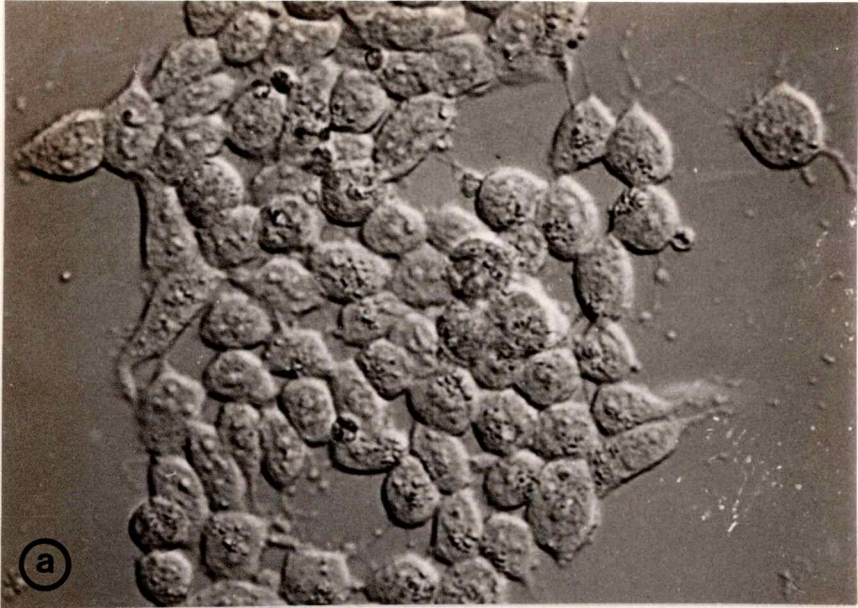
Ninguno de los anticuerpos por sí solo tuvo efecto sobre la adhesividad al sustrato o entre las células cuando se agregaron al momento de sembrar o seis horas después de la siembra. Sin embargo, se encontró un efecto que se muestra en la Figura 18 de algunas mezclas de anticuerpos. Se observó que las células se adhieren al sustrato pero forman masas redondeadas, en que no se manifiesta la extensión de las células en el sustrato, extensión que se observa claramente en las células controles, sin anticuerpo, o con anticuerpos del mismo isotipo que no tienen efecto (véase Tabla 15).

En la Tabla 12 se presentan en una matriz las mezclas de

**FIGURA 18**

EFECTO DE ANTICUERPOS MONOCLONALES SOBRE LA ADHESIVIDAD DE CELULAS DE TERATOCARCINOMA *IN VITRO*.

- a) Células en un cultivo control subconfluente. Se observa la forma poligonal de las células y el amplio espacio intercelular entre ellas. Optica de Nomarski. Aumento 800 X.
- b) Células incubadas durante 24 horas, desde el momento de sembrar, con la mezcla de anticuerpos TC-E74B7 y TC-1G13D4. Ha desaparecido el espacio intercelular y las células forman una masa continua, semejando una aglutinación. Aumento 800 X.



anticuerpos. Se observó que las células se adhieren al sustrato pero forman masas redondeadas, en que no se manifiesta la extensión de las células en el sustrato y que se observa claramente en las células controles, sin anticuerpo, o con anticuerpos del mismo isotipo que no tienen efecto (véase Tabla 15).

En la Tabla 12 se presentan en una matriz las mezclas de anticuerpos que mostraron el fenómeno descrito. Se observa que las mezclas del anticuerpo TC-4C3 con TC-4B6 o TC-8B4 o TC-4B7 producen una inhibición de la confluencia de las células, ya sea agregadas al momento de sembrar o seis horas después de la siembra. Cuando estas mismas mezclas se agregan a cultivos subconfluentes se observa que la mezcla de TC-4C3 más TC-4B6 no tiene efecto; TC-4C3 más TC-8B4 tiene un efecto parcial, es decir, se observan sólo algunos grupos celulares en que ha desaparecido el espacio intercelular, en cambio, en presencia de la mezcla de TC-4C3 más TC-4B7, todas las células han adoptado esta morfología (Figura 18). Llama la atención que la mezcla TC-8B4 más TC-4B7 que no tenía efecto agregada al momento de sembrar o seis horas después de la siembra en cultivos subconfluentes afecta parcialmente la morfología celular. En estas mismas condiciones algunos anticuerpos solos producen un efecto parcial como es el caso de TC-8B4, TC-4B7 y un efecto total como es el caso de TC-3D4.

TABLA 12

INHIBICION DE LA CONFLUENCIA DE CELULAS DE  
TERATOCARCINOMA *IN VITRO* POR AMC O MEZCLAS DE AMC

1. AMC agregados al momento de sembrar	Grupo	Hibridoma					
		4C3	4B6	8B4	4B7	3D4	
	III	4C3	-	+	+	+	ND
	III	4B6		-	-	-	ND
	VI	8B4			-	-	ND
	VI	4B7				-	ND
	VI	3D4					-
2. AMC agregados 6 horas después de la siembra		4C3	-	+	+	+	ND
		4B6		-	-	-	ND
		8B4			-	-	ND
		4B7				-	ND
		3D4					ND
3. AMC agregados 24 horas después de la siembra (cultivo subconfluyente)		4C3	-	-	+/-	+	+
		4B6		-	-	-	ND
		8B4			+/-	+	ND
		4B7				+/-	+/-
		3D4					+

NOTA: En la tabla, los resultados corresponden a los observados después de incubar 24 h con los AMC.

+: Significa efecto sobre la morfología celular, no hay extensión de las células en el sustrato.

ND: No determinado.

## CARACTERIZACION INMUNOQUIMICA DE LOS ANTIGENOS RECONOCIDOS POR LOS ANTICUERPOS MONOCLONALES

### ANTICUERPOS MONOCLONALES QUE SE UNEN A FOSFATASA ALCALINA

No se intentó producir anticuerpos contra fosfatasa alcalina porque la enzima disponible comercialmente es de origen bovino y su purificación desde embriones o de células de teratocarcinoma presentaba dificultades técnicas. Para obviar estos problemas, se investigó la presencia de anticuerpos anti-fosfatasa alcalina en el repertorio de anticuerpos monoclonales contra células de teratocarcinoma F9. Con este propósito se desarrolló un ensayo ELISA en que los anticuerpos monoclonales se emplearon como elemento de captura, para retener la actividad de FAL presente en un extracto de células de teratocarcinoma, como se muestra en el esquema de la Figura 19. El ensayo consistió básicamente en: activar una placa de PVC con suero de conejo anti-inmunoglobulina de rata y luego incubarla con los anticuerpos monoclonales de rata (sobrenadante de medio de cultivo o anticuerpo purificado). Luego se incubó con extracto de células TC-F9 tratadas con Tritón X-100 y finalmente se reveló la actividad de FAL retenida por los anticuerpos usando como sustrato específico el fosfato de paranitrofenilo, a pH 10,4. Los pocillos con anticuerpos que retuvieran en forma directa o indirecta FAL, se reconocieron por la hidrólisis del sustrato, que da color



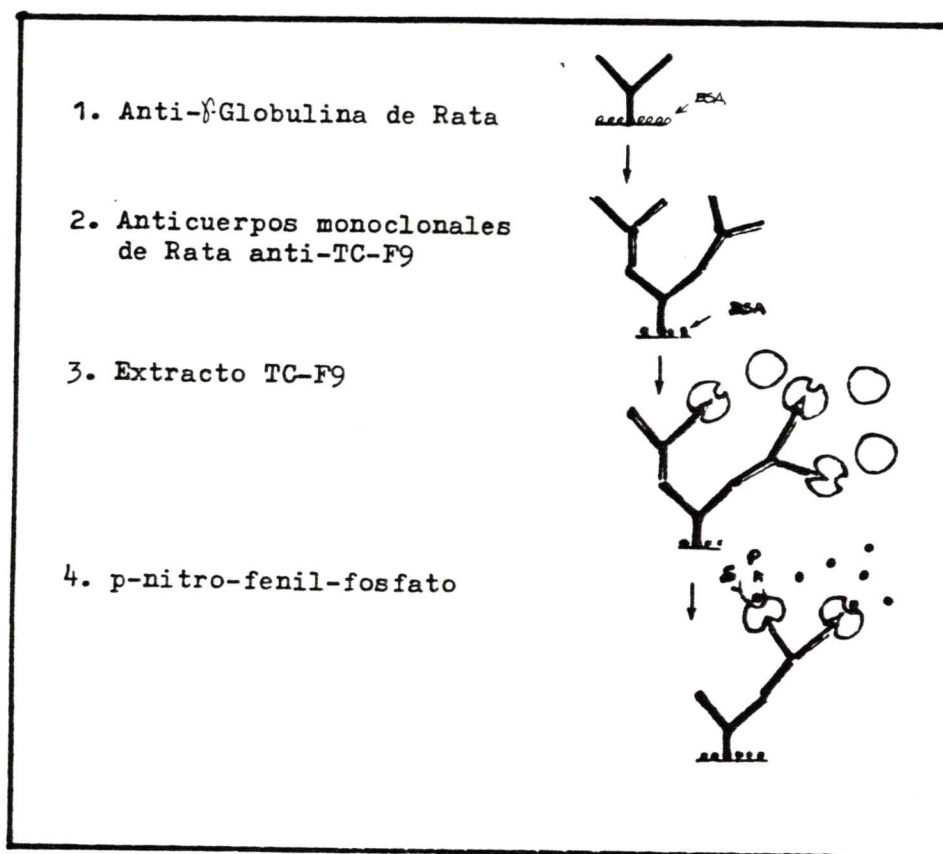


FIGURA 19

ESQUEMA DEL ELISA USADO PARA DETERMINAR ANTICUERPOS QUE SE UNEN A FAL

amarillo. Hay que considerar en este ensayo que los pocillos con anticuerpos que se unen a FAL pero que inhiben totalmente la actividad de la enzima no desarrollarían color y por lo tanto aparecen como negativos. Para determinar ese tipo de anticuerpo por ELISA convencional se requeriría de ensayos con enzima purificada o investigar el efecto inhibitorio directo de los anticuerpos sobre preparaciones de la enzima.

Como FAL es una enzima integral de la membrana plasmática, los tratamientos para obtenerla, descritos en publicaciones, generalmente usan solventes orgánicos o detergentes (Fishman, 1974). Para obtener un extracto de células de teratocarcinoma con actividad de fosfatasa alcalina estudiamos el efecto a distintos tiempos de tres detergentes no iónicos: Tritón X-100, Nonidet P-40 y Tween-20, sobre una suspensión de aproximadamente  $1 \times 10^7$  células por ml, cosechadas con Tripsina/EDTA. Los resultados se muestran en la Figura 20, que relaciona el rendimiento de la extracción, expresado en unidades totales de actividad enzimática con los diferentes tiempos de acción de los detergentes (entre 2 y 10 min), manteniendo constante la concentración de los detergentes al 1 %. Del análisis de este gráfico se puede concluir que el Tween-20, es el menos efectivo para extraer la enzima, y que en tiempos de extracción cortos, el Tritón X-100, es el más eficiente. Por esta razón, fue elegido para la preparación de extractos con actividad de FAL.

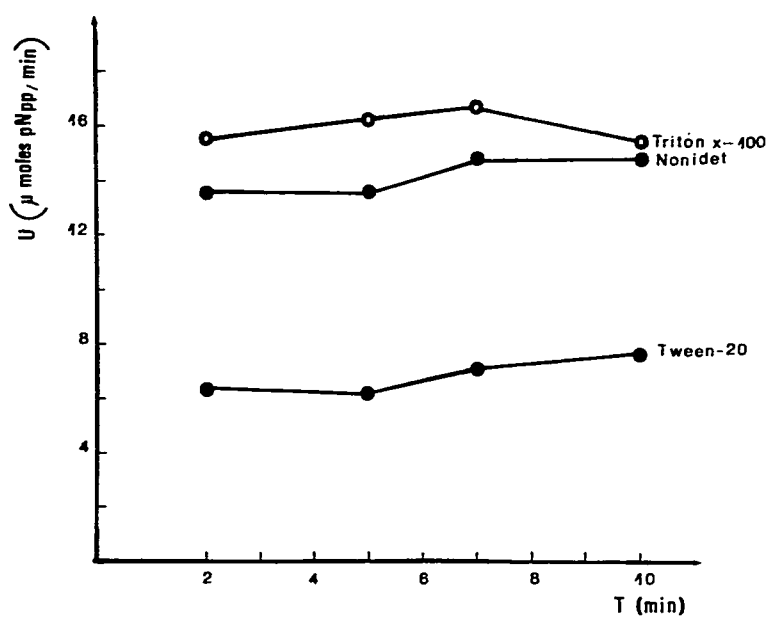


FIGURA 20

EFFECTO DE DIFERENTES DETERGENTES NO-IONICOS SOBRE LA ACTIVIDAD DE FOSFATASA ALCALINA DE UN EXTRACTO DE CELULAS DE TERATOCARCINOMA.

Una unidad de actividad enzimática (U) se define como la cantidad de enzima que hidroliza 1  $\mu$  mol de p-nitrofenil fosfato por minuto a 37 ° a pH 10,4.

Además se estudió el efecto de diferentes concentraciones de Tritón X-100, sobre células cosechadas con Tripsina/EDTA. Los resultados se muestran en la Figura 21, en que se relaciona el rendimiento de la extracción, expresado en unidades totales de actividad enzimática, con las diferentes concentraciones de detergente, durante 5 min. Se observa que en concentraciones superiores al 1 % de Tritón X-100, hay un rápido decaimiento de la actividad enzimática, probablemente por un efecto inactivante del Tritón X-100.

Como el medio utilizado para cosechar las células contiene tripsina, que es una proteasa que modifica la superficie celular, se comparó el efecto sobre FAL de dicho método de extracción con el método de cosechar con GKN -el cual no tiene actividad proteolítica- sin encontrar diferencias significativas, por lo tanto se prefirió el método con tripsina que es más rápido y eficiente para soltar las células del sustrato.

Se investigó la capacidad de 52 anticuerpos para retener la actividad de FAL por el ensayo ELISA descrito anteriormente; 16 de estos dieron reacción positiva. En la Tabla 13 se muestra las características de los anticuerpos que se unen a FAL y el grupo al cual pertenece el anticuerpo. La intensidad de la reacción medida por ELISA se expresó en forma arbitraria con cruces, que indican la intensidad del color amarillo al ojo del observador; también se indica el valor de absorbancia a 407 nm de un experimento tipo. Se

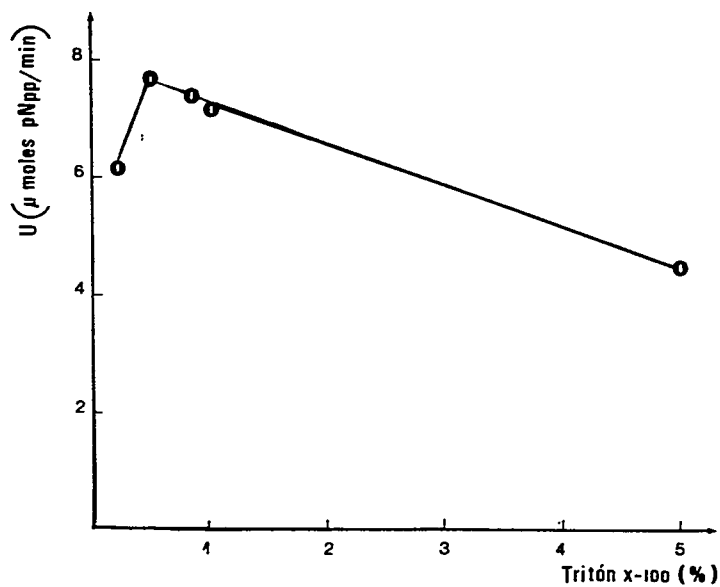


FIGURA 21

EFEECTO DE LA CONCENTRACION DE TRITON X-100 SOBRE LA ACTIVIDAD DE FOSFATASA ALCALINA DE UN EXTRACTO DE CELULAS DE TERATOCARCINOMA.

TABLA 13

DETERMINACION DE ANTICUERPOS MONOCLONALES QUE SE UNEN DIRECTA O INDIRECTAMENTE A FAL EXTRAIDA DE CELULAS DE TERATOCARCINOMA, MEDIANTE ELISA

Grupo	Hibridoma	ELISA*	
I	TC-5D1	++	(0,798)
	TC-1C3	+	(0,434)
III	TC-A34F5	++	(0,726)
VI	TC-5H10	++	(0,864)
	TC-H86F4	++	(0,758)
	TC-D78B4	++	(0,820)
	TC-4F4	++	(0,774)
	TC-1E3	++	(0,736)
	TC-3D11	+	(0,594)
	TC-3C1	+	(0,460)
VIII	TC-1E16C11	+	(0,326)
	TC-4D8	+	(0,482)
	TC-7C9	+	(0,464)
	TC-2H2	+	(0,494)
	TC-1G9		(0,272)
	TC-5A4	+	(0,534)

Nota: La intensidad del color amarillo al observador se indica mediante signos: ++ intensamente positivo; + positivo; +- positivo tenue; - negativo.

Se indica entre paréntesis la absorbancia a 407nm. Corresponde a la lectura de un experimento. Hidrólisis espontánea pNpp 0,020.

expresa el resultado de una sola serie experimental, porque los distintos ensayos de ELISA muestran diferencias en la lectura de fondo, lo cual impide promediarlos. Es importante destacar que los anticuerpos que se consideraron positivos, lo son en todas las series.

El análisis de la Tabla 13 sugiere que existirían 2 anticuerpos que corresponden al Grupo I (TC-5D1 y TC-1C3) que captura una forma de FAL que se encontraría presente en el oocito y la masa celular y el trofoblasto del embrión implantado. De los dos, TC-5D1 es el que mostró mayor intensidad en la reacción. Otro anticuerpo que pertenece al grupo III (TC-A34F5) reconocería una forma de FAL que se observa en el oocito y luego se segrega al trofoblasto. Se encontraron además 7 anticuerpos del grupo VI que reaccionan con una forma de FAL que surgiría durante la segmentación. De ellos, TC-5H10, TC-H86F4, TC-D78B4, TC-4F4 y TC-1E3 fueron intensamente positivos, mientras que TC-3D11 y TC-3C1 mostraron una reactividad tenue. Estos anticuerpos, como es característico de este Grupo, no se unen a moléculas presentes en la superficie del oocito y durante la implantación se asociarían a una forma de FAL que se expresa en la masa celular. Además, se encontraron 6 anticuerpos del Grupo VIII que reconocerían una forma de FAL que sólo se encontraría en las células de teratocarcinoma.

Debido a que los anticuerpos que reconocen FAL en el ELISA, pertenecen a 4 Grupos diferentes se trataría de enzimas

distintas, por lo que consideramos pertinente estudiar a cuáles de las isoenzimas de FAL descritas en la literatura corresponden. Con este propósito, se realizó un ELISA similar al utilizado anteriormente, sólo que en esta oportunidad se reemplazó el extracto de células de teratocarcinoma por diferentes extractos de tejidos de ratón adulto, obtenidos de manera similar. Se ensayó hígado, riñón e intestino.

Los resultados del ELISA con extractos de tejidos de animales adultos se muestran en la Tabla 14. Se observa que ninguno de los anticuerpos reacciona con la forma de FAL que se expresa en el hígado. En cambio, con el extracto de riñón los dos anticuerpos del Grupo I son positivos, TC-5D1 reacciona en forma intensa y TC-1C3 en forma tenue. Un anticuerpo del Grupo III, TC-A34F5, también fue positivo con la isoforma renal de FAL. Del Grupo VI, 4 de los 7 anticuerpos que reconocen FAL en un extracto de teratocarcinoma, TC-5H10, TC-4F4, TC-1E3 y TC-3C1, fueron débilmente positivos, mientras que TC-D78B4 fue intensamente positivo con la isoforma renal de FAL. Del Grupo VIII se probó un sólo anticuerpo, TC-1E16C11, el cual reaccionó débilmente con la isoforma intestinal y renal de FAL.



TABLA 14

DETERMINACION DE ANTICUERPOS MONOCLONALES QUE SE UNEN  
DIRECTA O INDIRECTAMENTE A FAL EXTRAIDA DE TEJIDOS  
DIFERENCIADOS DE RATON, MEDIANTE ELISA

Grupo	Hibridoma	Higado	Intestino	Riñon
I	TC-5D1	- (0,028)	- (0,084)	++ (1,141)
	TC-1C3	- (0,076)	- (0,066)	+ (0,497)
III	TC-A34F5	- (0,010)	- (0,042)	+ (0,749)
VI	TC-5H10	- (0,002)	+ (0,113)	+ (0,134)
	TC-H86F4	- (0,037)	- (0,028)	- (0,074)
	TC-D78B4	- (0,002)	+ (0,151)	++ (0,837)
	TC-4F4	- (0,007)	- (0,010)	+ (0,156)
	TC-1E3	- (0,036)	- (0,042)	+ (0,129)
	TC-3D11	- (0,007)	- (0,030)	- (0,083)
	TC-3C1	- (0,018)	- (0,080)	+ (0,128)
VIII	TC-1E16C11	- (0,003)	+ (0,115)	+ (0,122)

Nota: La intensidad del color amarillo al observador, se indica mediante signos: ++ intensamente positivo; + positivo; +- positivo tenue; - negativo.

Se indica entre paréntesis la absorbancia a 407nm. Corresponde a la lectura de un experimento. Hidrólisis espontánea del pNpp: 0,020.

## DETERMINACION DEL PESO MOLECULAR DE LOS ANTIGENOS RECONOCIDOS POR LOS ANTICUERPOS MONOCLONALES

### TRANSFERENCIA A NITROCELULOSA E INMUNOREVELADO

Para determinar el peso molecular de algunos antígenos reconocidos por los anticuerpos monoclonales de interés se realizó una transferencia a nitrocelulosa con extractos de células de teratocarcinoma. Sin embargo, con ninguno de los anticuerpos ensayados se obtuvieron bandas específicas. Esta técnica no se continuó usando porque se sabe que muy pocos anticuerpos monoclonales son reactivos mediante este procedimiento (véase Feizi, 1985).

### INMUNOPRECIPITACION

Este método para determinar el peso molecular de un antígeno tiene la ventaja que la estructura de los epítomos se mantiene mejor preservada que en la transferencia a nitrocelulosa. Hemos aplicado esta técnica con algunos anticuerpos que han sido reclonados y purificados mediante caprilato (Tabla 15). Sin embargo, aún no tenemos buenos resultados debido a problemas de inespecificidad producidos por el suero de conejo anti-rata. El antisuero precipita en forma inespecífica componentes del extracto, por lo cual es necesario adsorberlo previamente con el extracto de TC-F9. Este segundo anticuerpo no puede ser reemplazado, porque la proteína A no se une a los anticuerpos de rata (Bazin et al., 1986).

## DETERMINACION DE LA SUBCLASE DE LOS ANTICUERPOS MONOCLONALES DE RATA

En la Tabla 15 se muestra el resultado de la tipificación de algunos de los anticuerpos monoclonales. Es llamativo que la mayoría corresponde al isotipo IgM.

TABLA 15

CARACTERISTICAS DE ALGUNOS ANTICUERPOS MONOCLONALES  
DIRIGIDOS CONTRA ANTIGENOS DE SUPERFICIE DE CELULAS  
EMBRIONARIAS

Grupo	Anticuerpo	Subclase
I	Mor-F2A6	IgG2b
	Mor-1H6B2	IgG2b
	Mor-G6D2	IgG2b
	TC-5D1	IgM
III	TC-2D10	IgG2b
	TC-4E5	IgG2b
	TC-4B6	IgM
VI	TC-3H5	IgM
	TC-H86F4	IgM
	TC-1G13D4	IgM
	TC-B74B7	IgM
	TC-D78B4	IgM
	TC-1D4	IgM
	TC-3C1	IgM
VIII	TC-1E16C11	IgM

## DISCUSION

El objetivo general de este trabajo ha sido investigar la participación de algunos antígenos de la superficie celular del embrión inicial del ratón en el desarrollo preimplantacional, habiéndose postulado que durante este periodo se expresan moléculas de superficie que están funcionalmente comprometidas en la diferenciación celular manifestada en el blastocisto.

En su búsqueda se utilizaron como herramienta los anticuerpos monoclonales, porque permiten analizar los componentes individuales de una mezcla de antígenos sin necesidad de aislarlos. En los primeros trabajos realizados para identificar antígenos de diferenciación, se usaron sueros policlonales dirigidos contra embriones iniciales o células de teratocarcinoma. Sin embargo, el uso de este tipo de reactivos complica la interpretación de los resultados por las reacciones cruzadas que persisten, aunque se realicen adsorciones para aumentar la especificidad. En numerosas oportunidades nos referiremos a ellos en esta discusión aunque su validez para identificar antígenos de diferenciación puede ser objetada.

## INMUNIZACION Y PRODUCCION DE HIBRIDOMAS

El uso de embriones preimplantacionales como material inmunogénico para producir antisueros y anticuerpos monoclonales ha sido limitado debido a su pequeño tamaño y a la dificultad de obtenerlos en cantidad suficiente, puesto que para inmunizar los animales y desarrollar los ensayos de especificidad y selección se requieren al menos microgramos de antígeno. Esta limitación se supera en parte utilizando como inmunógeno células de teratocarcinoma en vez de los embriones. Sin embargo, con esta aproximación experimental no se pueden estudiar moléculas que sean exclusivas de los embriones.

Al comenzar esta investigación se empleó un protocolo de inmunización isogénico inoculando ratones Balb/c y Swiss Rockefeller con mórulas de la cepa respectiva, suponiendo que solo serían inmunogénicos los antígenos de diferenciación expresados por los embriones; probablemente se habría requerido una dosis mayor de antígeno y el uso de coadyuvantes para alcanzar un nivel adecuado de inmunización. No se ha informado sobre ningún protocolo con estas características, en cambio, se han desarrollado protocolos de inmunización singénicos inoculando ratones con células de teratocarcinoma de la línea F9 para producir anti-sueros policlonales (Artz et al., 1973; Gachelin, 1978).

El protocolo más usado para producir anticuerpos mono-

clonales contra antígenos embrionarios ha sido el alogénico, inmunizando ratones con células de teratocarcinoma de ratón (Solter y Knowles, 1978; Randle, 1982). Nilesen et al. (1986) y Svalander et al. (1987) han utilizado un protocolo de inmunización alogénico con embriones, inyectando intraesplénicamente machos de la cepa DBA/2 con un total de 40 blastocistos de la cepa C57BL/6, para producir anticuerpos monoclonales contra moléculas comprometidas en la adhesión del blastocisto al sustrato durante la implantación. Así obtuvieron dos anticuerpos monoclonales de isotipo IgM, que son reactivos con el trofoblasto, usando cantidades de inmunógeno en el orden de los nanogramos. Pensamos desarrollar en el futuro este protocolo de inmunización, pero en condiciones isogénicas para evitar el polimorfismo.

En el presente trabajo se empleó un protocolo de inmunización xenogénico, inoculándose ratas Sprague-Dawley con un total de 900 mórulas de ratón de 8 células. De la fusión somática realizada con el bazo de esta rata se obtuvieron 3 anticuerpos monoclonales (Tabla 1). Estos fueron seleccionados con células de teratocarcinoma y no con embriones, lo cual permite reconocer solamente los antígenos que son comunes a ambos tipos celulares. Esta limitación debimos aceptarla porque una selección realizada exclusivamente con embriones era lenta y debía decidirse rápidamente cuáles hibridomas secretaban anticuerpos de interés para

expandirlos de inmediato a un mayor volumen de medio y asegurar su crecimiento.

En los primeros trabajos en que se emplearon protocolos de inmunización xenogénicos, se inocularon oocitos o embriones preimplantacionales completos, en dosis superiores a las utilizadas en este trabajo. Por ejemplo, Moskalewski y Koprowski (1972) inyectaron aproximadamente  $2 \times 10^8$  oocitos, Wiley y Calarco (1975) produjeron un suero anti-blastocisto inoculando un total de  $1,6 \times 10^8$  blastocistos y Shevinsky et al. (1982) inmunizaron una rata con aproximadamente  $4,5 \times 10^8$  mórulas de 4-8 células de ratón, solubilizadas con detergente para producir anticuerpos monoclonales. Estos últimos autores seleccionaron los hibridomas con mórulas, mediante inmunofluorescencia indirecta y radioinmunoensayo. De 220 hibridomas que probaron obtuvieron sólo uno que secreta un anticuerpo monoclonal que reconoce un antígeno embrionario. Este anticuerpo es de isotipo IgM, lo que es característico de la respuesta inmune primaria. Por comparación con ese trabajo se puede concluir que nuestro protocolo de inmunización xenogénico fue más eficiente en cuanto a número y calidad de los anticuerpos obtenidos, puesto que inoculamos 5 veces menos material y los tres hibridomas reclonados (Mor-F2A6, Mor-H6B2 y Mor-G6D2) tienen isotipo IgG2b (Tabla 15), lo cual es característico de una respuesta inmune secundaria.

Finalmente desarrollamos otro protocolo de inmunización



xenogénico inyectando ratas con células TC-F9 por vía endovenosa. Supusimos que de esta manera las modificaciones de los antígenos serían mínimas puesto que el uso de adyuvantes, cuando se inoculan células enteras, puede causar lisis celular y degradación de algunas moléculas por efecto de las proteasas presentes en la preparación. Un protocolo semejante ha sido el más utilizado para inmunizar con antígenos embrionarios, tanto para producir antisueros policlonales (Edidin y Gooding, 1975; Gachelin, 1978; Calarco y Banca, 1979; Ducibella, 1980; Yoshida y Takeichi, 1982; Vestweber y Kemler, 1984), como anticuerpos monoclonales (Goodfellow et al., 1979; Yoshida Noro et al., 1984; Hamasima et al., 1985; Gaunt, 1985). Al revisar estos trabajos se comprueba que no hay uniformidad en cuanto a las dosis de antígeno y la vía de inoculación; por otra parte, en la mayoría de las publicaciones citadas no se menciona el título de anticuerpos séricos alcanzado por los animales, lo cual es necesario para estimar el rendimiento de estos protocolos en cuanto a calidad y cantidad de los anticuerpos monoclonales obtenidos.

Las ratas inoculadas de acuerdo con nuestro protocolo alcanzaron alrededor de 1000 diluciones de título después de la segunda inyección de antígeno, medido por inmunofluorescencia indirecta, lo que es adecuado para producir anticuerpos monoclonales. Se hizo una fusión con linfocitos esplénicos de una rata en que la inyección de

refuerzo fue la segunda inyección de antígeno y por lo tanto, los hibridomas obtenidos corresponden a una respuesta secundaria en el animal. De esta fusión se obtuvieron 43 hibridomas que secretan anticuerpos monoclonales que reaccionan con los embriones en alguna de las etapas de desarrollo analizadas. La mayoría de las inmunoglobulinas que han sido tipificadas corresponden a la subclase IgM (Tabla 15) sugiriendo que no se alcanzó una respuesta secundaria vigorosa. En todo caso, en ningún trabajo publicado hasta ahora se ha obtenido un número tan alto de hibridomas que secreten anticuerpos con las características descritas en la sección resultados de esta Tesis.

Después de analizar los trabajos en que se han buscado antígenos específicos de la etapa inicial del desarrollo del ratón mediante anticuerpos monoclonales, puede apreciarse que esta metodología no ha sido la más eficaz para identificar dichos antígenos; probablemente por el desconocimiento de las condiciones óptimas de inmunización con embriones como podría ser su inyección intraesplénica, para que la respuesta del huésped sea dirigida mayoritariamente contra antígenos de diferenciación.

## CLASIFICACION DE LOS ANTICUERPOS MONOCLONALES SEGUN LA LOCALIZACION DE LOS ANTIGENOS

El uso de la técnica de inmunofluorescencia indirecta para estudiar la localización histológica y celular de un antígeno al microscopio de luz es el método mas sensible para reconocer su unión con el anticuerpo. Es preferible al ensayo de citotoxicidad porque éste depende del isotipo del anticuerpo y los anticuerpos que no fijan complemento aparecen como falsos negativos. Sin embargo, el ensayo de citotoxicidad es complementario de la inmunofluorescencia en cuanto permite asegurar, cuando es positivo, que el antígeno en cuestión se encuentra sobre la membrana celular. En este trabajo hemos empleado de preferencia el ensayo de inmunofluorescencia para localizar los antígenos reconocidos por los anticuerpos monoclonales, complementándolo en algunos casos con el ensayo de citotoxicidad (véase Tabla 4).

En la primera etapa de este trabajo se estudió la localización de los antígenos reconocidos por los anticuerpos monoclonales en oocitos obtenidos de ovario y en los tejidos del blastocisto implantado. Así fue posible clasificar los anticuerpos según la presencia o ausencia del antígeno en oocitos y en blastocistos implantados *in vitro*, ya sea en su masa celular o en el trofoblasto o en ambos tejidos (Tabla 2).

El Grupo I lo componen 17 anticuerpos que reconocen

antígenos que se expresan en el oocito y luego en el blastocisto implantado se reconocen en la masa celular y en el trofoblasto. Su localización en los estados de dos y de ocho células, reveló que estos antígenos están presentes en mayor o menor grado durante todo este período del desarrollo. Por esta razón, se trata de moléculas que no sirven para definir precisamente un antígeno de estado, ni tampoco para estudiar linajes celulares en el embrión preimplantacional; sin embargo, no se puede descartar que correspondan a moléculas cuya expresión ocurre solamente en etapas embrionarias y sería importante completar los estudios de localización en diversos tejidos fetales y adultos. Un ejemplo de esto, aunque no sea un antígeno de superficie, es la molécula de hemoglobina, que presenta una forma fetal y una adulta.

La Tabla 16 resume algunos trabajos publicados por otros autores donde se describen antígenos cuya localización permite incluirlos en este grupo. En su mayoría han sido caracterizados con sueros policlonales producidos contra oocitos de ratón (Moskalewski y Koprowski, 1972), células de teratocarcinoma embrionario de ratón (Calarco y Banca, 1979; Banca y Calarco, 1986), cono ectoplacental (Searle y Jenkinson, 1975) y placenta de ratón (Wiley y Calarco, 1975). Utilizando anticuerpos monoclonales sólo se ha descrito un antígeno con las características de este grupo (Hamasima et al., 1985). Sin embargo, su inclusión es

TABLA 16

LOCALIZACION DURANTE EL DESARROLLO INICIAL DE MAMIFEROS DE ALGUNOS ANTIGENOS CARACTERISTICOS DE CELULAS EMBRIONARIAS, MEDIANTE SUEROS POLICLONALES O ANTICUERPOS MONOCLONALES DESCRITOS EN LA LITERATURA: GRUPOS I, II Y III

GRUPO	ANIMAL DE EXPER	INMUNO	ANTICUERPO	LOCALIZACION EN ESTADOS INICIALES DE DESARROLLO						OTRAS LOCALIZ	CARACTERISTICAS DEL ANTIGENO	EFECTO DESARR PREIMP	REF.
				OOE	1 CEL	4 CEL	8 CEL	BLAST MCI T	BLAST IMP MCI T				
I	Cobayo	Hvos raton	Suero	+	ND	+	+	+/- +	ND	ND	ND	ND	124
	Conejo	Mulli-SCC1	Suero A-W1	+	+	+	+	+ +	ND	Cel germ masc (-)	Glicoprot 67 KD	Inhibe 7	22
	Rata	TC-F9 o PCCA aza 1	AMC-F2	ND	+	+	+	+ +	ND	ND	ND	ND	64
II	Conejo	TC-402 AX	Suero	+	ND	+	+	ND +/-	+ -	TC	TC	ND	40
	Conejo	TC	Suero	+/-	ND	-	-	ND +	+ -	ND	ND	ND	39
	Rata	4-8 cel raton	AMC-SSEA3	+	+	+	+	+ +	+ -	TC raton(-) TC hua (+) Riñon Erit hua	Glicoprot 72, 45 KD	ND	47
III	Conejo	Placenta de ratón	Suero APL	+	+	+	+	+ +	- +	Sincitiot	Glicoprot	ND	187
	Raton	TC-PC13	AMC-2C5	+	+	+	+	- +	ND	Ducto Utero	ND	ND	140

ND: No determinado.

provisoria porque los autores no informan si el antígeno reconocido por el AMC-F2 está presente en oocitos, aunque también lo observan en el estado de una célula. Se omitieron en la Tabla 16 los trabajos en que se usaron antisueros dirigidos contra células esplénicas y del cerebelo de ratón (Solter y Schachner, 1976) porque si bien reaccionan con antígenos que están presentes en el oocito y estados preimplantacionales, su distribución sugiere que corresponden a moléculas constitutivas que tienen una función general. Por la misma razón se han omitido otras moléculas, como los aloantígenos o los antígenos de histocompatibilidad, que también se expresan en esta etapa (Johnson y Calarco, 1980b; Jenkinson, 1981).

Es posible que los antígenos del Grupo I, cumplan alguna función en el reconocimiento inmunológico de la madre por el feto durante la implantación, como ha sido propuesto por Wiley y Calarco (1975). Para responder esta interrogante tendría que estudiarse la expresión de dichos antígenos *in vivo* y analizar la correlación entre su expresión y la preñez.

En el grupo II de nuestra clasificación deberíamos incluir los antígenos que se expresan en el oocito y luego se reconocen sólo en la masa celular de blastocisto implantado, pero no hemos observado ningún hibridoma secretor de anticuerpos con estas características. Otros autores han descrito antígenos que corresponderían a este grupo,

mediante sueros policlonales dirigidos contra células de teratocarcinoma (Edidin y Gooding, 1975) y también mediante anticuerpos monoclonales producidos contra embriones de 4 a 8 células de ratón (Shevinsky et al., 1982), véase Tabla 16. Este último antígeno, denominado SSEA-3, ha sido utilizado para estudiar el linaje del tejido endodérmico del embrión, pero a nuestro parecer no define propiamente un antígeno de diferenciación de esta etapa inicial del desarrollo porque reacciona con otros tejidos embrionarios y adultos, localizándose en algunas células de los túbulos renales del riñón de ratón (Fox et al., 1981), en eritrocitos y en células de teratocarcinoma humano (Damjanov et al., 1982).

Se clasificaron en el Grupo III a los anticuerpos monoclonales que reconocen antígenos que se expresan en el oocito y que en blastocisto implantado *in vitro* se encuentran exclusivamente en el trofoblasto.

Otros investigadores han descrito antígenos con esta localización mediante antisueros convencionales producidos contra placenta de ratón (Wiley y Calarco, 1975) y mediante anticuerpos monoclonales contra teratocarcinoma (Randle, 1982) (véase Tabla 16). El antígeno caracterizado por Randle (1982) se reconoce en el citoplasma del huevo no fertilizado y en la superficie celular de los primeros estados de segmentación. Cuando se disocian los blastómeros de la mórula avanzada, mediante inmunofluorescencia indirecta, se observa que el antígeno se expresa en las

células de mayor tamaño y que en las células pequeñas su expresión es reducida o ausente. El mismo autor, en estudios de reagregación de blastómeros, ha demostrado que los blastómeros de menor tamaño contribuyen significativamente a formar la masa celular, mientras los grandes se encuentran sólo en el trofoblasto. Los resultados sugieren que el antígeno descrito por Randle y todos los antígenos de este grupo descritos en nuestro trabajo, son valiosos para estudiar el linaje de las células trofoblásticas del embrión inicial de mamíferos. Debe tenerse en cuenta que los estudios morfológicos y bioquímicos revelan notables diferencias entre la masa celular y el trofoblasto, pero no se han descrito diferencias categóricas entre masa celular y trofoblasto presuntivos. Por otra parte, los antígenos del Grupo III, al igual que los del Grupo I, podrían estar participando en los mecanismos de reconocimiento maternofetal, como lo sugiere el hecho que algunos antígenos también se encuentran en el epitelio del oviducto y el útero (Randle, 1982).

En el Grupo IV se clasificaron 4 anticuerpos que reconocen antígenos que sólo están presentes en el oocito. Es posible, sin embargo, que correspondan a antígenos de diferenciación que se expresan durante la oogénesis y que luego desaparecen durante el desarrollo.

En el Grupo V se clasificaron 4 anticuerpos que reaccionan con antígenos cuya expresión se inicia durante la



segmentación del embrión y que más tarde, en el blastocisto implantado, se encuentran tanto en la masa celular como en el trofoblasto. Se han descrito numerosos antígenos que se localizan en forma similar a los del grupo V. Estos fueron caracterizados mediante antisueros convencionales dirigidos contra blastocistos (Wiley y Calarco, 1975; Johnson y Calarco, 1980a) y células de teratocarcinoma (Artz et al., 1973; Ducibella, 1980) o mediante anticuerpos monoclonales de rata (Kemler et al., 1977; Hamasima et al., 1985) y de ratón (Fenderson et al., 1983) véase Tabla 17. El antígeno detectado por el suero singénico anti-células de TC-F9 (Artz et al., 1973) fue propuesto como un antígeno exclusivamente embrionario que participaría en los mecanismos de adhesión celular, puesto que es posible inhibir el desarrollo mediante fragmentos Fab de las IgG del suero (Kemler et al., 1979). Por otra parte, estudios con anticuerpos monoclonales de rata producidos contra estas mismas células (ECMA2 y ECMA3) han permitido definir un antígeno que se expresaría exclusivamente en las etapas iniciales del desarrollo del embrión de ratón. Los determinantes antigénicos reconocidos por estos dos anticuerpos monoclonales tienen una naturaleza oligosacárida, que está presente en el embrioglicán (Muramatsu et al., 1979; Muramatsu et al., 1983). Aún no está claro que la molécula reconocida con dichos anticuerpos monoclonales corresponda a la especificidad reconocida por el suero singénico anti-células TC-F9.

Fenderson et al. (1983) han descrito dos antígenos que también corresponden al Grupo V, cuyos determinantes antigénicos son reconocidos por los anticuerpos monoclonales C6 y C5 sólo después de tratar los embriones preimplantacionales con neuraminidasa, sin embargo, este tratamiento no se requiere para revelar la presencia de estos epítomos en embriones post-implantacionales. Estos resultados sugieren que los epítomos reactivos con estos anticuerpos están enmascarados por residuos siálicos terminales y muestran que durante la embriogénesis hay modificaciones de los carbohidratos expuestos en la superficie celular.

En el Grupo VI, se clasificaron 14 anticuerpos que reconocen antígenos cuya expresión surge durante la segmentación y luego en la implantación se reconocen sólo en la masa celular del embrión.

Al estudiar la localización de algunos antígenos del grupo VI en células de teratocarcinoma inducidas a diferenciarse, se observó que todos se expresan en el endoderma parietal y ninguno en el tejido nervioso. Esto es consistente con la localización de la mayoría de los antígenos de este grupo en blastocistos implantados, puesto que fluoresce el entorno de la masa celular interna, que es la región que corresponde al endoderma presuntivo, en cambio no fluoresce el tallo, región que corresponde al ectoderma presuntivo (véase Fig. 17). Los resultados indican, por lo tanto, que disponemos de anticuerpos útiles para estudiar la diferenciación y el

TABLA 17

LOCALIZACION DURANTE EL DESARROLLO INICIAL DE MAMIFEROS DE ALGUNOS ANTIGENOS CARACTERISTICOS DE CELULAS EMBRIONARIAS MEDIANTE SUEROS POLICLONALES O ANTICUERPOS MONOCLONALES DESCRITOS EN LA LITERATURA: GRUPO V

ANIMAL DE EXPER	INMUNOG	ANTICUERPO	LOCALIZACION EN ESTADOS INICIALES DE DESARROLLO							OTRAS LOCALIZ	CARACTERISTICAS DEL ANTIGENO	EFECTO DESARR PREIMP	REF.
			ODC	1 CEL	4 CEL	8 CEL	BLAST MCI T	BLAST IMP MCI T					
Raton	TC-F9	Suero-anti F9	ND	+	+	+	+/-	+/-	ND	CE	Glicoprot 44, 22 KD	Fab Inhibe	3
Conejo	Blast. raton	Suero A-B1	-	+/-	+	+	+/-	+/-	- -	Ovario Placenta	ND	Inhibe	187
Conejo	Blast raton	Suero A B12	-	-	-	-	+/-	+/-	ND	TC-F9	2 Glicoprot 65, 70 KD	Inhibe	89
Conejo	TC-F9	Suero AF9-2	ND	ND	+	+	+/-	+/-	ND	ND	ND	Inhibe	33
Rata	TC-F9	ECMA 2 y ECMA 3	-	+	+	+	+	+		TC	Glicoprot (embrioglican)	No	126
Raton	EC-SCCI	AMC-A5 y AMC-A6	ND	ND	ND	+	ND	+	+	Ectoder Endoder Decidua	Glicoprot	ND	43
Rata	TC-F9 o PCC4	AMC-P2	ND	-	-	-	+/-	+/-	ND	ND	ND	ND	64

ND: No determinado

linaje de las células de la masa interna del embrión. Actualmente estamos completando los estudios de la localización en otros tejidos para determinar si alguno de los anticuerpos de este grupo reconoce un antígeno que se exprese exclusivamente en embriones preimplantacionales.

Otros autores han descrito antígenos que tienen una localización semejante a los del grupo VI, mediante anticuerpos monoclonales de rata contra células de teratocarcinoma PC13 (Gaunt, 1985) o anticuerpos monoclonales de ratón dirigidos contra células TC-F9 (Solter y Knowles, 1978) y contra bazo de ratón (Stern et al., 1978). En estos dos últimos trabajos se describen antígenos que aunque se encuentran en etapas iniciales del desarrollo no definen antígenos específicos de estado puesto que también se expresan en algunos tejidos diferenciados. El antígeno de Forssman (Stern et al., 1978; Willison y Stern, 1978) se localiza en cerebro y tejido linfoide, y el antígeno SSEA-1 (Solter y Knowles, 1978) se reconoce en el epitelio del oviducto, útero y epidídimo y además en cerebro y túbulos renales.

Al Grupo VII, corresponderían los anticuerpos que reconocen antígenos cuya expresión se inicia durante la segmentación y luego, durante la implantación, sólo se expresan en el trofoblasto. No encontramos ningún antígeno con estas características. Su ausencia podría no ser azarosa sino indicar que la determinación del trofoblasto, el primer

tejido en diferenciarse del embrión, ocurre durante la maduración del oocito antes de la segmentación. Esta hipótesis es apoyada por los resultados de nuestro trabajo y también por trabajos de otros investigadores que han observado antígenos en el oocito los cuales durante la segmentación segregan al trofoblasto: Grupo III (Tabla 16). Si esta proposición es correcta, las moléculas reconocidas por estos anticuerpos se encontrarían localizadas en las células periféricas de la mórula, generando la especificación regional que está involucrada en la diferenciación del trofoblasto (véase Figura 22). Complementando este raciocinio, los monoclonales del Grupo VI segregarían hacia células internas de la mórula. La existencia de antígenos trofoblásticos especificados regionalmente desde la oogénesis no está en contradicción con los modelos propuestos para explicar el desarrollo de mamíferos y podría ofrecernos una herramienta para estudiar como se expresa y regula la información espacial del huevo durante la segmentación. Por otra parte, la segregación de antígenos en huevos de mamífero podría ser homóloga a la distribución de localizaciones citoplasmáticas observadas en los huevos de algunos invertebrados (véase Davidson, 1976).

Se han publicado trabajos en que se describen mediante el uso de anticuerpos policlonales, antígenos que podrían quizás incluirse en el Grupo VII. Es el caso de un antígeno que fue reconocido por un suero anti-gonadotrofina coriónica

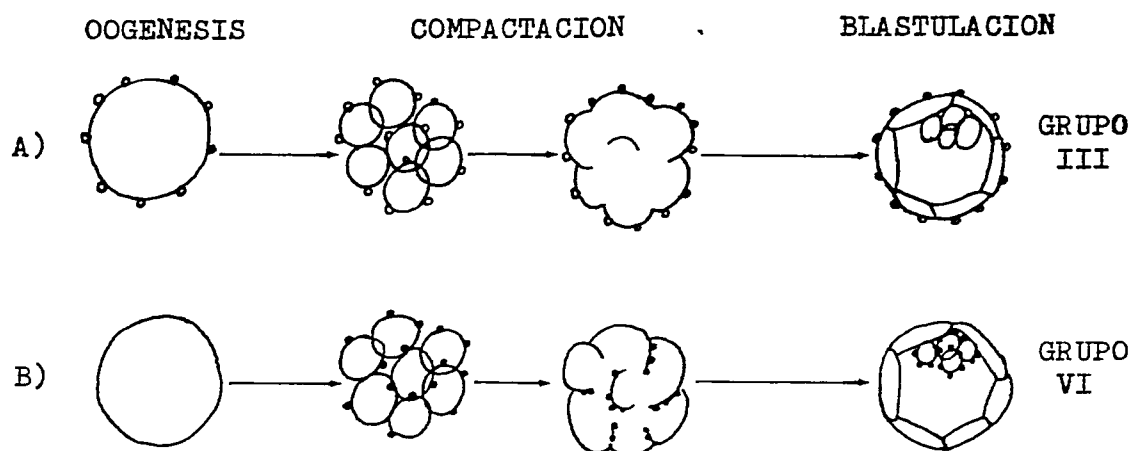


FIGURA 22

SEGREGACION DE ANTIGENOS DE SUPERFICIE DURANTE LA SEGMENTACION DEL EMBRION PREIMPLANTACIONAL DE MAMIFEROS.

A. Moléculas reconocidas por anticuerpos del Grupo III. Antígenos de superficie cuya expresión se inicia durante la oogenesis. Su segregación hacia las células periféricas de la mórula determinaría la diferenciación de estas células hacia el trofoblasto.

B. Moléculas reconocidas por anticuerpos del Grupo VI. Antígenos de superficie cuya expresión se inicia durante la segmentación. Su localización en las células interiores de la mórula, determinaría la diferenciación de estas células hacia masa interna.

(Wiley, 1974). Sin embargo, una hormona no puede considerarse un antígeno de diferenciación, aunque pudiera serlo su receptor y por esta razón, no lo hemos incluido en la Tabla 18. En otros dos artículos se describen antígenos que aparecen durante la segmentación y luego en el trofoblasto, pero no se estudió su presencia en la masa celular interna; en uno se había inmunizado contra placenta de ratón (Kometani *et al*, 1973) y en el otro contra cerebelo de la misma especie (Zimmerman *et al*, 1976).

Diversos autores han preparado antisueros contra membranas de trofoblasto humano e identificado algunos antígenos de superficie que se expresarían preferentemente en este tejido. Es el caso del antígeno denominado TA<sub>1</sub> que se expresa en el trofoblasto y en ciertas líneas humanas transformadas y TA<sub>2</sub>, que se expresa en el trofoblasto y en linfocitos (Faulk y Hsi, 1983). Estudios en los cuales se investigó mediante citotoxicidad la presencia del antígeno TA<sub>2</sub> en placentas de diferentes dadoras han demostrado que el antisuero TA<sub>2</sub> es citotóxico sólo para los linfocitos de algunas placentas sugiriendo que se trata de un antígeno polimórfico. Observaciones de este tipo han permitido caracterizar un grupo importante de antígenos, denominados TLX (Faulk y Hsi, 1983) que reaccionan en forma cruzada con linfocitos. Otro antisuero preparado de manera similar, ha permitido describir un antígeno, denominado TrPM, que sólo se expresa en la superficie celular del sinciciotrofoblasto

TABLA 18

LOCALIZACION DURANTE EL DESARROLLO INICIAL DE MAMIFEROS, DE ALGUNOS ANTIGENOS CARACTERISTICOS DE CELULAS EMBRIONARIAS MEDIANTE SUEROS POLICLONALES O ANTICUERPOS MONOCLONALES DESCRITOS EN LA LITERATURA: GRUPO VI

ANIMAL DE EXPER	INMUNO	ANTICUERPO	LOCALIZACION EN ESTADOS INICIALES DE DESARROLLO							OTRAS LOCALIZ	CARACTERISTICAS DEL ANTIGENO	EFECTO	REF
			ODC	1 CEL	4 CEL	8 CEL	BLAST MCI T	BLAST IMP MCI T					
Conejo	TC-PCC4	Antisuero	ND	ND	-	-	+	-	ND	Espermat CE	ND	ND	51
Rata	Bazo de	ANC-NA/22.25	ND	-	-	+/-	+	+	+ -	Espermat Riñon Cerebro Tej linf	Glicoprot (Forssman)	No	168, 188
Raton	TC-F9	ANC-SSEA1	-	ND	-	+	+	+	+ -	Ectoder Endoder Cel germ Oviducto Utero	Glicoprot	No	48, 61, 131 144, 165
Rata	TC-PC13	ANC-2B5	-	+	+	+	+	+	+ -	Oviducto Utero Espermat	Glicoprot	No	54
Rata	TC-F9	ECCD-1	-	+	+	+	+	+	+ -	Cel epit	Glicoprot (uvomorulina)	Inhibe	192

ND: No determinado.



y no se reconoce en otras regiones del trofoblasto o mesénquima (White y Locke, 1979).

Estos trabajos han tenido como objetivo fundamental analizar la interfase materno-fetal desde un punto de vista propiamente inmunológico y por lo tanto no se ha estudiado la expresión de estos antígenos durante el desarrollo inicial, lo cual habría planteado problemas éticos por tratarse de embriones humanos; sin embargo, en el caso de tener reacción cruzada con embriones murinos podría analizarse cuándo y dónde se inicia su expresión.

No se discutirán aquí otros anticuerpos monoclonales preparados contra trofoblasto humano obtenidos de placentas de diferentes tiempos de gestación (Johnson et al., 1981b; Webb et al., 1986). Además, es importante destacar que en nuestro laboratorio se estudiaron 46 anticuerpos monoclonales de ratón y de rata que eran en su mayoría reactivos con trofoblasto humano. Estos anticuerpos fueron enviados por la Organización Mundial de la Salud (OMS) para analizar los resultados de diferentes grupos de investigación en un taller sobre antígenos de trofoblasto humano que se realizó en Toronto (Anderson et al., 1987). Ninguno de ellos reaccionó por inmunofluorescencia indirecta con oocitos ni blastocistos de ratón implantados *in vitro*.

Finalmente en el Grupo VIII hemos clasificado los 15 anticuerpos que reconocen antígenos en células de

teratocarcinomas y no en oocitos o embriones preimplantacionales. La única razón para mencionarlos aquí es que algunos de ellos se unen a fosfatasa alcalina, como se discutirá más adelante.

#### EFFECTO MORFOGENETICO DE LOS ANTICUERPOS MONOCLONALES

Se estudió el efecto que tiene la neutralización de los antígenos por los anticuerpos del Grupo I, III, IV, V y VI, sobre la compactación, blastulación e implantación. En las condiciones empleadas en este trabajo - diluyendo el medio de cultivo de hibridoma con medio de cultivo de embriones, en iguales volúmenes - no se observó ningún efecto inhibitorio de los anticuerpos en el desarrollo. Sin embargo, para poder asegurarlo habría sido necesario realizar estudios con fragmentos monovalentes (Fab) de los anticuerpos monoclonales. De hecho, Kemler et al. (1980) y Hyafil et al. (1980) observaron que los fragmentos Fab de las IgG de un suero policlonal de conejo dirigido contra células TC-F9, producían una inhibición del desarrollo, mientras que la molécula entera no tenía efecto. Estamos interesados en realizar experimentos con fragmentos de aquellos anticuerpos que por su localización sean de interés, pero es necesario que su isotipo corresponda a IgG porque no están descritas las condiciones para generar fragmentos similares al Fab con IgM de rata (Rousseaux et al., 1986).

Hasta hoy, no se ha caracterizado ningún antígeno de diferenciación que se exprese en las etapas iniciales del desarrollo embrionario, cuya neutralización mediante anticuerpos monoclonales inhiba el desarrollo. Sin embargo, con anticuerpos policlonales dirigidos contra blastocistos (Wiley y Calarco, 1975) y contra células de teratocarcinoma Kemler et al., 1977, Hyafil et al., 1980 y Ducibella, 1980, se ha observado inhibición de la compactación y la blastulación. Es posible que una fracción de los anticuerpos de estos sueros esté dirigida contra moléculas implicadas en adhesión celular, puesto que no hay evidencia que su efecto se deba a la neutralización de antígenos de diferenciación, como se ha demostrado en cambio, mediante anticuerpos monoclonales con los cuales ha sido posible identificar uno de los antígenos reconocidos por el antisuero contra células-F9 (Yoshida-Noro y Takeichi, 1984). El anticuerpo ECCD-1 tiene como ligando una glicoproteína denominada uvomorulina o cadherina (véase introducción) que participa en los mecanismos de adhesión celular dependientes de  $Ca^{+2}$ . Otros estudios, mediante antisueros preparados contra el material que se libera al cultivar un tumor mamario humano en un medio libre de suero, muestran que probablemente esta misma molécula o moléculas muy semejantes están presentes en numerosos tejidos epiteliales embrionarios y adultos, cumpliendo probablemente el mismo papel en la adhesión celular (Damsky et al., 1983). Sobre la base de estas observaciones se ha propuesto que la uvo-

morulina podría tener una función análoga a las moléculas de adhesión celular (CAM) descritas para otros sistemas en desarrollo, especialmente en la formación del sistema nervioso (Edelman, 1983; Damjanov, 1986a; Izquierdo, 1986). Como ya fue planteado en la introducción, la amplia distribución biológica de uvomorulina, la descarta como antígeno de diferenciación exclusivo del desarrollo inicial de mamíferos y obliga a reconsiderar la existencia de antígenos de diferenciación que operen durante este periodo.

Hemos estudiado el efecto de todos los anticuerpos monoclonales, agregados solos o en mezclas, sobre la adhesividad de las células de teratocarcinoma al momento de sembrar y en cultivos ya establecidos que eran subconfluentes. Se observó que las mezclas del anticuerpo TC-4C3 con TC-4B6 ó TC-8B4 ó TC-4B7, cuando se agregan al momento de sembrar, inhiben la extensión de las células; es decir, aunque estas se adhieran al sustrato permanecen formando acúmulos redondeados, como células aglutinadas, en que no se distinguen los límites celulares. Este resultado no se observó con ningún anticuerpo por sí solo. El anticuerpo TC-4C3, que produce este efecto en combinación con los antes mencionados, se localiza en el oocito pero durante la implantación segrega al trofoblasto. En las condiciones experimentales ensayadas por nosotros no inhibe la extensión de este tejido.

Aunque ningún anticuerpo tenga efecto por sí solo sobre la adhesividad de las células recién sembradas, algunos (TC-8B4, TC-4B7 y TC-3D4) afectan la adhesividad de células en cultivos ya establecidas que son subconfluentes. Es posible que la tripsina utilizada para cosechar células haya digerido los correspondientes antígenos y éstos regeneren en cultivos establecidos. Sin embargo, el fenómeno de adhesión podría ser dependiente del estado de las células en cultivo porque la mezcla TC-4C3 más TC-4B6, que inhibe la adhesividad de células recién sembradas no tiene efecto en cultivos subconfluentes.

Ozawa et al. (1985) han descrito en células de teratocarcinoma un efecto similar sobre la adhesión, producido por un antisuero policlonal dirigido contra una glicoproteína aislada del teratocarcinoma OTT6050, mediante una columna de afinidad preparada con una lectina (aglutinina de *Ricinus Communis*). Este antisuero también inhibe la adhesión y extensión del trofoblasto de blastocistos implantados *in vitro*. La caracterización del antígeno o de los antígenos comprometidos en este efecto, ha mostrado que la molécula involucrada es una glicoproteína con un peso molecular de 125 kD (Knudsen et al (1985). Utilizando anticuerpos monoclonales producidos contra células de embriones de pollo, han encontrado un antígeno que por electroforesis en geles de poliacrilamida se resuelve en tres componentes de peso molecular 160 kD, 135

kD y 110 kD, cuya neutralización afecta la adhesión de las células de teratocarcinoma al sustrato. No hay pruebas de que las moléculas descritas por ambos grupos de investigadores sean las mismas, aunque es sugerente que ambas sean glicoproteínas que participan en una función semejante y con un peso molecular similar.

### CARACTERIZACION DE LOS ANTIGENOS

Como algunas propiedades de fosfatasa alcalina sugieren que podría definir un antígeno de diferenciación, nos interesó estudiar la unión de nuestros anticuerpos monoclonales a la fosfata alcalina presente en un extracto de células de teratocarcinoma solubilizadas con Tritón X-100. Se utilizó un ensayo de ELISA indirecto, en que los anticuerpos monoclonales se emplearon como elemento de captura de la enzima. La placa de CPV no se activó directamente con los anticuerpos monoclonales, sino que previamente se puso un suero de conejo anti-inmunoglobulina de rata (Fig. 20), para realizar un ensayo en que el sitio de combinación de los anticuerpos estuviera totalmente expuesto.

Los resultados del ELISA mostraron que de 52 anticuerpos monoclonales ensayados, 16 se unen a FAL directa o indirectamente y retienen su actividad. No es posible afirmar que se trata de un reconocimiento directo de la molécula de FAL porque en los extractos obtenidos con detergentes generalmente se forman miscelas. Por esta razón

es posible que en ellas FAL esté asociada a una o varias proteínas que podrían ser los verdaderos blanco de estos anticuerpos. Los anticuerpos que capturan actividad de FAL pertenecen a diferentes grupos: TC-5D1 y TC-1C3 pertenecen al Grupo I; TC-4F5 pertenece al Grupo III; TC-5H10, TC-H86F4, TC-D78B4, TC-4F4, TC-1E3, TC-3D11 y TC-3C1 pertenecen al Grupo VI y TC-1E16C11, TC-4D8, TC-7C9, TC-2H2, TC-1G9 y TC-5A4 pertenecen al Grupo VIII. Una manera de comprobar la unión de estos anticuerpos a FAL es el ensayo de transferencia a nitrocelulosa e inmunorrevelado o también la inmunoprecipitación. Estos experimentos se están realizando y aún no se tienen resultados concluyentes. Otra posibilidad, es disponer de FAL purificada desde las células F9 y realizar un ensayo de ELISA convencional, con el antígeno pegado directamente a la placa de PVC.

Nuestros resultados sugieren que en el embrión se expresarian al menos dos formas de FAL: una que estaría presente desde el oocito y otra desde la segmentación del embrión. En segundo lugar, los resultados indican que las células de teratocarcinoma expresarian más de una isoenzima de FAL, lo cual confirma observaciones de algunos investigadores en otros tipos celulares tumorales (Herz, 1985).

La actividad de FAL se reconoce en embriones - por métodos citoquímicos o bioquímicos - solamente desde el estado tardío de 4 células (Ishiyama e Izquierdo, 1977; Izquierdo

et al, 1980; Izquierdo y Marticorena, 1975). Sin embargo, los resultados muestran que algunos anticuerpos monoclonales - de los grupos I y III - reconocerían la enzima desde el estado de oocito. Esta discrepancia podría explicarse suponiendo que FAL está presente, pero inactiva, desde antes del estado de 4-células o, menos probablemente, que su concentración está por debajo de la sensibilidad del método bioquímico y de los métodos citoquímicos empleados. Resultados recientes de nuestro laboratorio muestran que cuando se cultivan durante una hora quimeras formadas de embriones en estado de 2-células, las regiones de contacto interblastomérico revelan actividad de FAL, con el mismo método citoquímico que solo la revela en el estado de 4-células avanzado de embriones normales (Sepúlveda e Izquierdo, observaciones no publicadas). Estos resultados sugieren que podría tratarse de la activación de una molécula pre-existente.

No obstante lo anterior, pensamos que aún es prematuro comparar los resultados obtenidos con métodos citoquímicos y los resultados obtenidos por inmunofluorescencia y por ELISA, porque no hemos observado un patrón de inmunofluorescencia que sea semejante al citoquímico. Con este último método se reconoce actividad de fosfatasa alcalina exclusivamente en los contactos celulares desde el estado de 4 células tardío y no en la superficie celular libre (Izquierdo et al., 1980). La discrepancia entre nuestras



observaciones con el método de ELISA y observaciones anteriores con métodos citoquímicos no podrá resolverse hasta que tengamos seguridad de que el ELISA identifica la propia enzima y no otras proteínas unidas a ésta, las cuales podrían ser distintas entre los primeros estados de desarrollo y los estados más avanzados.

El hecho que los anticuerpos monoclonales que se unen a FAL se encuentren distribuidos en diferentes grupos según la localización del antígeno, nos indujo a comparar las isoenzimas descritas en distintos tejidos con las expresadas por los embriones. Con este propósito se estudió, mediante inmunofluorescencia indirecta, la unión de estos anticuerpos a diferentes tejidos diferenciados de ratón que expresan las isoenzimas de FAL y también, se estudió su unión a FAL obtenida de extractos de tejidos diferenciados tratados con Tritón X-100.

Los resultados preliminares de estos ensayos mostraron que ninguno de los anticuerpos reconoce la isoenzima de FAL que se expresa en el hígado, ni en el intestino, en cambio algunos reaccionarían con epítopos que se encuentran en la forma renal, que corresponde a la forma no específica de tejidos (Tabla 14). Es interesante mencionar el caso de los anticuerpos TC-H86F4 y TC-3D11 que no fueron reactivos con ninguna de estas isoenzimas, sugiriendo, o bien que el epítipo que reconocen no es accesible en estos tejidos o bien que se trata de epítopos que se expresan sólo en el

embrión preimplantacional y células F9 y que por lo tanto reconocen una forma de FAL que podría definir un antígeno de diferenciación. Este problema requiere un estudio más profundo, en el cual se purifique FAL, por ejemplo, mediante columnas de afinidad preparadas con estos anticuerpos y luego se caracterice la enzima retenida en cuanto a algunas propiedades fisicoquímicas como peso molecular, contenido y tipo de carbohidratos y también efecto de inhibidores específicos de cada una de las formas descritas de FAL. Esta aproximación experimental ha sido usada para estudiar las isoenzimas de FAL que se expresan en tejidos óseo y hepático (Baillyes et al., 1987).

Aunque una interpretación sea prematura, conviene destacar que todos los anticuerpos que se unen a FAL en cortes de tejidos, observados por inmunofluorescencia indirecta, presentan una localización muy marcada en una zona vecina de las células gigantes de trofoblasto que al parecer corresponde a material fibrilar de la decidua. Sin embargo, con la misma técnica no hemos encontrado reacción positiva con ninguno de los anticuerpos en tejido renal, resultados que están en desacuerdo con el ensayo de ELISA. Una explicación posible es que en cortes de tejido renal los epítomos no sean accesibles al anticuerpo, en cambio queden expuestos en los extractos por efecto de la solubilización con Tritón X-100.

Nuestro principal interés en el futuro se centrará en detectar anticuerpos que inhiban la actividad de FAL para estudiar su función en el desarrollo preimplantacional. Es conveniente destacar que uno de los anticuerpos que se une a FAL (TC-E78B4) está comprometido en el efecto morfogénico observado sobre células de teratocarcinoma.

Como comentario final sobre la caracterización de los antígenos reconocidos por los anticuerpos monoclonales obtenidos en este trabajo, quisiera aclarar que no es posible precisar el número total de antígenos reconocidos por el repertorio de anticuerpos. A priori podría decirse que hay 6 moléculas, una por cada uno de los grupos establecidos, excepto el II y el VII. Sin embargo, el análisis de la localización sugiere que en todos los grupos hay más de una molécula blanco de los anticuerpos. Para precisar este análisis es necesario, además de determinar la localización histológica en embriones y en diferentes tejidos, conocer ya sea la composición polipeptídica de los antígenos por inmunoprecipitación o el peso molecular de los polipéptidos inmunorreactivos mediante transferencia a nitrocelulosa. Estos experimentos han sido difíciles de realizar por los problemas que presentan los anticuerpos monoclonales cuando se estudian por estas técnicas (véase Feizi, 1985).

## CONCLUSIONES

1. Hemos producido 61 anticuerpos monoclonales, 48 de los cuales reconocen, mediante inmunofluorescencia indirecta, antígenos de superficie celular comunes a embriones preimplantacionales y a células de teratocarcinoma.
2. Estos anticuerpos monoclonales se han agrupado en 8 clases, de acuerdo a la localización del antígeno en oocitos, en los tejidos del blastocisto de ratón implantado *in vitro* y en teratocarcinoma. De las 8 clases, 2 representan categorías posibles pero no hemos observado anticuerpos que tengan esas propiedades. La agrupación de los anticuerpos en las restantes 6 clases sugiere que hemos detectado por lo menos 6 antígenos diferentes.
3. La distribución espacial y temporal de los antígenos reconocidos por los anticuerpos monoclonales en embriones y tejidos diferenciados sugieren que 9 anticuerpos podrían servir como marcadores del linaje de las células trofoblásticas (Grupo III) y que 14 de ellos podrían servir como marcadores del linaje de las células de la masa celular interna (Grupo VI).

4. La ausencia de anticuerpos monoclonales que reconozcan antígenos que aparezcan durante la segmentación y que luego durante la implantación se expresen en el trofoblasto, tanto en nuestro trabajo como en los de otros autores, y por otra parte, la presencia de 9 anticuerpos que reconocen antígenos expresados en el oocito y que luego segregan al trofoblasto, sugiere que la determinación del trofoblasto se inicia durante la oogénesis y procede por segregación de componentes hacia la periferia del embrión.
5. Ninguno de los anticuerpos monoclonales interfiere con el desarrollo hasta el estado de blastocisto implantado, pero mezclas de estos afectan la agregación de células de teratocarcinoma *in vitro* cuando se agregan al momento de sembrar y también algunos anticuerpos producen este efecto individualmente cuando se agregan a cultivos subconfluentes de teratocarcinoma.
6. De los anticuerpos monoclonales, 10 se unen directa o indirectamente *in vitro* a fosfatasa alcalina y asociando esta propiedad con la clasificación en grupos se propone que hay al menos 2 isoenzimas de FAL activa o inactiva, en embriones preimplantacionales.

## REFERENCIAS

1. ANDERSON, D.J., JOHNSON, F.M., ALEXANDER, N.J., JONES, W.R., GRIFFIN, P.D. (1987). Monoclonal antibodies to human trophoblast and sperm antigens: Report of two WHO-sponsored workshops. *J. Reprod. Immunol.* 10: 231-257.
2. ARMANT, D.R., KAPLAN, H.A., LENNARZ, W.J. (1986). N-Linked glycoprotein biosynthesis in the developing mouse embryo. *Dev. Biol.* 113: 228-237.
3. ARTZ, K., DUBOIS, P., BENNETT, D., CONDAMINE, H., BABINET, C., JACOB, F. (1973). Surface antigens common to mouse cleavage embryos and primitive teratocarcinoma cells in culture. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 70: 2988-2992.
4. ATIENZA-SAMOLS, S.B., PINE, P.R., SHERMAN, M.I. (1980). Effects of tunicamycin upon glycoprotein synthesis and development of early mouse embryos. *Dev. Biol.* 79: 19-32.
5. BABINET, C., CONDAMINE, H. (1980). Antibodies as tools to interfere with developmental processes. In: *Development in Mammals* (ed: M. H. Johnson). Elsevier/North-Holland, Amsterdam. 4: 267-305.

6. BAILYES, E.M., SEABROOK, N., CALVIN, J., MAGUIRE, G.A., PRICE, C.H., SIDDLE, K., LUZIO, J.P. (1987). The preparation of monoclonal antibodies to human bone and liver alkaline phosphatase and their use in immunoaffinity purification and in studying these enzymes when present in serum. *Biochem. J.* **244**: 725-733.
7. BANCA, C.L., CALARCO, P.D. (1986). A new embryonic antigen, p67, present during mouse preimplantation development. *Gamete Res.* **13**: 19-27.
8. BAZIN, H., CORMONT, F., DE CLERO, L. (1986). Purification of rat monoclonal antibodies. *Methods in Enzymology* **121**: 638-652.
9. BEUG, H., GERISH, G., KEMPF, S., RIEDEL, V., CREEMER, G. (1970). Specific inhibition of cell-contact formation in *Dictyostelium* by univalent antibodies. *Expl. Cell. Res.* **63**: 147-158.
10. BEUG, H., KATZ, F.E., STEIN, A., GERISCH, G. (1973a). Quantitation of antigenic membrane sites relating to cell aggregating *Dictyostelium* cells by use of tritiated univalent antibody. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **70**: 3150-3154.

11. BENHAM, F.J., ANDREW, P.W., KNOWLES, B. B., BRONSON, D. L., HARRIS, H. (1981). Alkaline phosphatase isozymes as possible markers of differentiation in human testicular teratocarcinoma cell lines. *Dev. Biol.* **88**: 279-287.
12. BENNET, D. (1975). The T-locus of the mouse. *Cell* **6**: 441-454.
13. BENS, D.J., BIGGERS, J.D. (1981). Blastocyst fluid formation. En: Fertilization and embryogenic development *in vitro* (ed. L. Mastroianni, Biggers, D.). Plenum Publ. Corp., pp. 283-297.
14. BERNSTINE, E.G., HOOPER, M.L., GRANDCHAMP, S., EPHRUSSI, B. (1973). Alkaline phosphatase activity in mouse teratoma. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* **70**: 3899-3903.
15. BESSEY, A., LOWRY, H., BRUCK, M. J. (1946). A method for the rapid determination of alkaline phosphatase with five cubic millimeters of serum. *J. Biol. Chem.* **164**: 321-329.
16. BIGGERS, J.A., WHITTEN, W.K., WHITTINGHAM, A.G. (1971). The culture of mouse embryos *in vitro*. En: *Methods in Mammalian Embryology* (ed. J.A. Daniel, W.H. Freeman) San Francisco, pp. 86-115.



17. BOLLER, K., VESTWEBER, D., KEMLER, R. (1985). Cell-adhesion molecule uvomorulin is localized in the intermediate junctions of adult intestinal epithelial cells. *J. Cell Biol.* **100**: 327-332.
18. BRAUDE, P.R. (1979). Time-dependent effects of -amanitin on blastocyst formation in the mouse. *J. Embryol. exp. Morph.* **52**: 193-202.
19. BRINSTER, R.L. (1974). The effect of cells transferred into mouse blastocyst on subsequent development. *J. Exp. Med.* **140**: 1049-1056.
20. BROWN, D.B. (1984). The role of stable complexes that repress and activate eucaryotic genes. *Cell* **37**: 359-365.
21. BURSTONE, M.S. (1962). Phosphatases. En: *Enzyme Histochemistry*. (ed. M.S. Burstone). Academic Press Inc., pp. 160-280.
22. CALARCO, P.G., BANCA, C.L. (1986). Cell surface antigens of preimplantation mouse embryos detected by an antiserum to an embryonal carcinoma cell line. *Biol. Reprod.* **20**: 699-704.
23. CASCIO, S.M., WASSARMAN, P.M. (1982). Program of early development in the mammal: Post-transcriptional control of a class of proteins synthesised by mouse oocytes and early embryos. *Dev. Biol.* **89**: 397-408.

24. CHENG, C.C., BENNETT, D. (1980). Nature of the antigenic determinants of T Locus antigens. *Cell* **19**: 537-543.
25. CLEGG, K.B., PIKO, L. (1983). Poly (A) length, cytoplasmic adenylation and synthesis of poly (A)<sup>+</sup> RNA in early mouse embryos. *Dev. Biol.* **95**: 331-341.
26. CROWTER, J. R., ABU-ELZEIN, E. M. E. (1980). Detection of antibodies against Foot-and-Mouth-disease virus using purified Staphylococcus-A protein conjugated with alkaline phosphatase. *J. Immunol. Meth.* **34**: 261-267.
27. DAMJANOV, I., FOX, N., KNOWLES, B.B., SOLTER, D., LANGE, P.J., FRALEY, E.E. (1982). Immunohistochemical localization of murine stage-specific embryonic antigens in human testicular germ cell tumors. *Amer. J. Pathol.* **108**: 225-230.
28. DAMJANOV, I., DAMJANOV, A., DAMSKY, C.H. (1986a). Developmentally regulated expression of the cell-cell adhesion glycoprotein cell-CAM 120/80 in peri-implantation mouse embryos and extraembryonic membranes. *Dev. Biol.* **116**: 194-202.
29. DAMJANOV, I., DAMJANOV, A., LEHTO, V.P., VIRTANEN, I. (1986b). Spectrin in mouse gametogenesis and embryogenesis. *Dev. Biol.* **114**: 132-140.

30. DAMSKY, C.H., RICHA, J., SOLTER, D., KNUDSEN, K., BUCK, C.A. (1983). Identification and purification of a cell surface glycoprotein mediating intercellular adhesion in embryonic and adult tissue. *Cell* **34**: 455-466.
31. DAVIDSON, E.H. (1976). Gene activity in early development. Academic Press, New York.
32. DAWID, I.B., SARGENT, T.D. (1986). Molecular embryology in amphibians: New approaches to old questions. *TIG* **2**: 47-50.
33. DUCIBELLA, T. (1980). Divalent antibodies to mouse embryonal carcinoma cells inhibit compaction in the mouse embryos. *Dev. Biol.* **79**: 356-366.
34. 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.
35. 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.

36. DZIAKED, M., TIMPL, R. (1985). Expression of nidogen and laminin in basement membranes during mouse embryogenesis and in teratocarcinoma cells. *Dev. Biol.* 111: 372-382.
37. DZIAKED, M., FUJIWARA, S., PAULSSON, M., TIMPL, R. (1985). Immunological characterization of basement membrane types of heparan sulfate proteoglycan. *Dev. Biol.* 100: 318-327.
38. EDELMAN, G.M. (1983). Cell adhesion molecules. *Science* 219: 450-458.
39. EDIDIN, M., GOODING, L.R. (1975). Teratoma-defined and transplantation antigens in early mouse embryos. En: *Teratomas and Differentiation* (eds. Sherman, M.I., Solter, D.) Academic Press, New York, pp. 109.
40. EDIDIN, M., PATTEHEY, H.L., MCGUIRE, E.J., SHEFFIELD, W.D. (1971). An antiserum to "embryoid body" tumor cells that reacts with normal mouse embryos. En: *Conference and Workshop on Embryonic and Fetal antigens in Cancer.* (Ed: N.G. Anderson y J.H. Coggin) NT is conf71. Springfield, pp 239.
41. FAULK, W.P., HSI, B.L. (1983). Immunobiology of human trophoblast membrane antigens. En: *Biology of Trophoblast* (Eds. Loke, Y.W., Whyte, A.) Elsevier, pp. 535-570.

42. FEIZI, T. (1985). Demonstration by monoclonal antibodies that carbohydrate structures of glycoproteins and glycolipids are onco-developmental antigens. *Nature* 314: 53-57.
43. FENDERSON, B.A., HANNEL, A.C., EDDY, E.M. (1983). Immunohistochemical localization of two monoclonal antibody-defined carbohydrate antigens during early murine embryogenesis. *Dev. Biol.* 100: 318-327.
44. FERNANDEZ, M.S., IZQUIERDO, L. (1980). Blastocoel formation in half and double embryos. *Anat. Embryol.* 160: 77-81.
45. FERNANDEZ, M.S., IZQUIERDO, L. (1983). Effect of LiCl on differentiation of mouse embryos beyond the blastocyst stage. *Arch. Biol. Med. Exp.* 16: 51-54.
46. FISHMAN, W. H. (1974) Perspectives on Alkaline Phosphatase isoenzymes. *The American J. Medicine* 56: 617-650.
47. FOX, N.W., DAMJANDOV, I., KNOWLES, B.B., SOLTER, D. (1984). Stage specific embryonic antigen SSEA-3 as a marker of visceral extraembryonic endoderm. *Dev. Biol.* 103: 263-266.

48. FOX, N.W., DAMJANOV, I., MARTINEZ-HERNANDEZ, A., KNOWLES, B.B., SOLTER, A. (1981). Immunohistochemical localization of early embryonic antigen (SSEA-1) in post implantation mouse embryos and fetal and adult tissues. *Dev. Biol.* **83**: 391-398.
49. GACHELIN, G. (1978). The cell surface antigens of mouse embryonal carcinoma cells. *Biochem. Biophys. Acta* **516**: 27-60.
50. GACHELIN, G., FELLOUS, M., GUENET, L., JACOB, F. (1976). Developmental expression of an early embryonic antigen common to mouse spermatozoa and cleavage embryos, and to human spermatozoa: Its expression during spermatogenesis. *Dev. Biol.* **50**: 310-320.
51. GACHELIN, G., KEMLER, R., KELLEY, F., JACOB, F. (1977). PCC4 a new cell surface antigen common to multipotential embryonal carcinoma cells, spermatozoa and mouse early embryos. *Dev. Biol.* **57**: 199-209.
52. GARDNER, R.L. (1972). An investigation of inner cell mass and trophoblast tissues following their isolation from the mouse blastocyst. *J. Embryol. exp. Morphol.* **28**: 279-312.

53. GATES, A.H. (1971). Maximizing yield and developmental uniformity of eggs. En: Methods in Mammalian Embryology (ed. J.A. Daniel, W.H. Freeman) San Francisco, pp 64-76.
54. GAUNT, S.J. (1985). *In vivo* and *in vitro* cultured mouse preimplantation embryos differ in their display of a teratocarcinoma cell surface antigen: Possible binding of an oviduct factor. J. Embryol. exp. Morphol. 88: 55-69.
55. GIELBELHAUS, D.H., HEIKKILA, J.J., SCHULTZ, G.A. (1983). Changes in the quantity of histone and actin mRNA during the development of pre-implantation mouse embryos. Dev. Biol. 98: 148-154.
56. GIUDICE, G. (1962). Restitution of whole larvae from disaggregated cells of sea urchin embryos. Dev. Biol. 12: 233-247.
57. GLASS, R.H., AGGELER, J., SPINALE, A., PEDERSON, R.A., WERB, Z. (1983). Degradation of extracellular matrix by mouse trophoblast out-growths: A model for implantation. J. Cell. Biol. 96: 1108-1116.
58. GOLDSCHNEIDER, I., MOSCONA, A.A. (1972). Tissue-specific cell-surface antigens in embryonic cells. J. Cell Biol. 53: 435-449.

59. GOODALL, H., JOHNSON, M.H. (1984). The nature of intercellular coupling within the preimplantation mouse embryo. *J. Embryol. exper. Morphol.* **79**: 53-76.
60. GOODFELLOW, P.N., LEVINSON, J.R., WILLIAMS, V.E., MCDEVITT, H.O. (1979). Monoclonal antibodies reacting with murine teratocarcinoma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**: 377-380.
61. GOOI, H.O., TEIZI, T., KAPADIA, A., KNOWLES, B.B., SOLTER, D., EVANS, J. (1981). Stage-specific embryonic antigen involves 1-3 fucosylated type 2 blood group chains. *Nature* **292**: 156-158.
62. GRAHAM, C.F. (1977). Teratocarcinoma cells and normal mouse embryogenesis. In: *Concepts in Mammalian Embryogenesis*. (ed: M. I. Sherman). MIT Press, England, pp. 315-394.
63. GRAHAM, C.F., DEUSSEN, Z.A. (1978). Features of cell lineage in preimplantation mouse embryos. *J. Embryol. exper. Morphol.* **48**: 53-72.
64. HAMASIMA, N., SETO, M., MOMOI, T., TAKAHASHI, T. (1985). Serological analysis of early mouse embryo with rat monoclonal antibodies produced against mouse teratocarcinoma cells. *Differentiation* **28**: 260-267.



65. HAMILTON, T.A., TIN, A.W., SUSSMAN, H. (1979). Regulation of alkaline phosphatase expression in human choriocarcinoma cell lines. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**: 323-327.
66. HANDYSIDE, A.H. (1980). Distribution of antibody and lectin-binding sites on dissociated blastomeres from mouse morulae: evidence for polarization at compaction. *J. Embryol. exp. Morph.* **60**: 99-116.
67. HANDYSIDE, A.H., EDIDIN, M., WOLF, D. (1987). Polarized distribution of membrane components on two-cell mouse embryos. *Roux's Arch. Dev. Biol.* **196**: 273-278.
68. HANAOKA, K., KONDO, S., HAYASAKA (1985). Internatization of embryonal carcinoma cells when aggregated with normal mouse embryos. *Develop. Growth and Differ.* **29**: 307-315.
69. HASS, P., GARRETT, W., HERMAN, M.M., SUSSMAN, H. (1979). Alkaline phosphatase of mouse teratoma stem cells: Immunochemical and structural evidence for its identity as a somatic gene product. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **76**: 1164-1168.
70. HERTZ, F. (1985). Alkaline phosphatase isoenzyme in cultured human cancer cells. *Experientia* **41**: 1357-1490.

71. HILLMAN, N., HILLMAN, R., WILEMAN, G. (1970). Ultra-structural studies of cleavage stage t12/t 12 mouse embryos. *Am. J. Anat.* **128**: 311-339.
72. HOGAN, B.L.M., TILLY, R. (1978). *In vitro* development of inner cell masses isolated immunosurgically from mouse blastocyst. II. Inner cell masses from 3.5-4.0 days p.c. blastocyst. *J. Embryol. exp. Morphol.* **45**: 107-121.
73. HOGAN, B., COSTANTINI, F., LACY, E. (1986). Developmental Genetics and Embryology of the mouse: Past, present and future. En: *Manipulating the mouse embryo. A laboratory manual* (eds: Hogan, B., Costantini, F., Lacy, E.). Cold Spring Harbor Laboratory, USA, pp. 1-15.
74. HOWLETT, S.K., BOLTON, V.N. (1985). Sequence and regulation of morphological and molecular events during the first cell cycle of mouse embryogenesis. *J. Embryol. exp. Morph.* **87**: 175-206.
75. HYAFIL, F., BABINET, D., JACOB, F. (1981). Cell-cell interactions in early embryogenesis: A molecular approach to the role of calcium. *Cell* **26**: 447-454.

76. HYAFIL, F., MORELLO, D., BABINET, C., JACOB, F. (1980). A cell surface glycoprotein involved in the compaction of embryonal carcinoma cells and cleavage stage embryos. *Cell* 21: 927-934.
77. ILGREN, E.B. (1981). Homotypic cellular interactions in mouse trophoblast development. *J. Embryol. exp. Morphol.* 62:183-202
78. ISHIYAMA, V., IZQUIERDO, L. (1977). The onset of phosphatase activity in early mammalian embryos. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 42: 304-308.
79. IZQUIERDO, L. (1977). Cleavage and differentiation. En: *Development in mammals.* (M. H. Johnson, ed.). North Holland, Amsterdam. 2: 99-118.
80. IZQUIERDO, L. (1986). Desde la especificación regional a la diferenciación celular en el desarrollo preimplantacional de mamíferos. *Arch. Biol. Med. Exp.* 19: 279-300.
81. IZQUIERDO, L., BECKER, M.I. (1982). Effect of  $Li^+$  on preimplantation mouse embryos. *J. Embryol. exp. Morph.* 67: 51-58.
82. IZQUIERDO, L., EBENSPERGER, C. (1982). Cell membrane regionalization in early mouse embryos as demonstrated by 5'-nucleotidase activity. *J. Embryol. Exp. Morph.* 59: 98-102.

83. IZQUIERDO, L., MARTICORENA, P. (1975). Alkaline phosphatase in preimplantation mouse embryos. *Exp. Cell. Res.* **92**: 399-402.
84. IZQUIERDO, L., FERNANDEZ, M.S., LOPEZ, T. (1976). Cell membrane and cell junction in differentiation of preimplantation mouse embryos. *Arch. Biol. Med. Exp.* **10**: 130-134.
85. IZQUIERDO, L., LOPEZ, T., MARTICORENA, P. (1980). Cell membrane regions in preimplantation mouse embryos. *J. Embryos. exp. Morph.* **59**: 89-102.
86. IZQUIERDO, L., LOPEZ, T., PANUNCIO, A. (1984). Plasma membrane regionalization and compaction of mouse cleaving embryos: effect of microtubule and microfilament inhibitors. *Arch. Biol. Med. Exp.* **17**: 29-39.
87. JACKSON, B.W., GRUND, C., WINTER, W., FRANKE, W. ILLMENSEE, C. (1981). Formation of cytoskeletal elements during mouse embryogenesis. I. Intermediate filaments of the cytokeratin type and desmosomes in preimplantation embryos. *Differentiation* **17**: 161-179.
88. JENKINSON, E.J. (1981). Antigens and embryos. *Immunol. Today* **2**: 21-22.

89. JOHNSON, L.V., CALARCO, P.G. (1980a). Immunological characterization of embryonic cell surface antigens recognized by anti-blastocyst serum. *Anat. Record* **196**: 201-219.
90. JOHNSON, L.V., CALARCO, P. (1980b). Mammalian pre-implantation development: The cell surface. *Anat. Record* **196**: 201-219.
91. JOHNSON, M.H., PRATT, H.P.M., HANDYSIDE, A.H. (1981a). The generation and recognition of positional information in the preimplantation mouse embryo. In: Cellular and Molecular aspects of implantation (ed. S.P. Glasser y D.W. Bullock). Plenum Publishing Corporation pp. 55-74.
92. JOHNSON, P.M., CHENG, H.M., MOLLOY, C.M., STERN, C.M.M., SLADE, M.B. (1981b). Human trophoblast-specific surface antigens identified using monoclonal antibodies. *Amer. J. Reprod. Immunol.* **1**: 246-254.
93. JOHNSON, M.H., MARO, B. (1984). The distribution of cytoplasmic actin in mouse 8-cell blastomeres. *J. Embryol. exp. Morph.* **82**: 97-117.

94. JOHNSON, M.H., CHISHOLM, J.C., FLEMING, T.P., HOULISTON, E. (1986). A role for cytoplasmic determinands in the development of the mouse early embryo. *J. Embryol. exp. Morphol.* **97**: Supplement 97-121.
95. KEMLER, R., BABINET, C., EISEN, H., JACOB, F. (1977). Surface antigen in early differentiation. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **74**: 4449-4452.
96. KEMLER, R., MORELLO, D., JACOB, F. (1979). Properties of some monoclonal antibodies raised against mouse embryonal carcinoma cells. In: *Cell Lineage, Stem cell and cell Differentiation* (ed. N.L. Douarin) Intern Symp. N° 10 Amsterdam: Elsevier-North-Holland Biomedical Press, pp 101-113.
97. KEMLER, R., BABINET, C., CONDAMINE, H., GACHELIN, G., GUENET, J.L., JACOB, F. (1976). Embryonal carcinoma and the T/t locus of the mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **73**: 4080-4084.
98. KESSLER, S. W. (1985). Rapid isolation of antigens from cells with a Staphylococcal protein A-antibody absorbent: Parameters of the interaction of antibody-antigen complexes with protein A. *J. Immunol.* **115**: 1617-1625.

99. KNUDSEN, K.A., RAO, P.E., DAMSKY, C.H., BUCK, C. (1985). Membrane glycoproteins involved in cell-substratum adhesion. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **78**: 6071-6075.
100. KOHLER, G., MILSTEIN, C. (1975) Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature (Lond)* **256**: 495-497.
101. KOMETANI, K., PAINE, D., COSSMAN, J., BEHRMAN, S.J. (1973). Detection of antigens similar to placental antigens in mouse fertilized eggs by immunofluorescence. *Am. J. Obst. Gynecol.* **116**: 351-357.
102. KUFF, E.L., FEWELL, J.W. (1980). Induction of neural like cells in cultures of F9 teratocarcinoma treated with retinoic acid and dibutiryl cyclic adenosine monophosphate. *Dev. Biol.* **77**: 103-115.
103. LAEMLI, V. K., FAVRE, M. (1983). Maturation of the head of bacteriophage T4. *J. Mol. Biol.* **80**: 575-599.
104. LEE, S., GILULA, N.B., WARNER, A.E. (1987). Gap junctional communication and compaction during preimplantation stages of mouse development. *Cell* **51**: 851-860.

105. LEHTONEN, E., BADLEY, R.A. (1980). Localization of cytoskeletal proteins in preimplantation mouse embryos. *J. Embryol. exp. Morph.* **55**: 211-225.
106. LEIVO, I. (1983). Structure and composition of early basement membranes: studies with early embryos and teratocarcinoma cells. *Med. Biol.* **61**: 1-30.
107. LEIVO, I., VAHERI, A., TIMPL, R., WARTIOVAARA, J., (1980). Appearance and distribution of collagens and laminin in the early mouse embryo. *Dev. Biol.* **76**: 100-114.
108. LO, C.W., GILULA, N.B. (1979). Gap junctional communication in the preimplantation mouse embryo. *Cell* **18**: 399-409.
109. LOIS, P., IZQUIERDO, L. (1984). Cell membrane regionalization and cytoplasm polarization in the rat early embryo. *Roux's Arch. Dev. Biol.* **193**: 205-210.
110. LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, A.L., FARR, A.L., RANDALL, R.L. (1951). Protein measurement with the FOLIN-phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**: 265-275.
111. MAGNUSON, T. (1983). Genetic abnormalities and early mammalian development. In: *Development in Mammals* (ed: M.H. Johnson). Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam **5**: 209-249.



112. MAGNUSON, T., STACKPOLE, C.W. (1978). Lectin-mediated agglutination of preimplantation mouse embryos. *Exp. Cell. Res.* **116**: 466-469.
113. MAGNUSON, T. (1983). Genetic abnormalities and early mammalian development. En: *Development in Mammals* (ed: M.H. Johnson). Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam **5**: 209-249.
114. MARTICORENA, P., ARTZT, K., BENNET, D. (1978). Relationship of F9 antigen and genes of the T/t complex. *Immunogenetics* **7**: 337-347.
115. MARTIN, G. R. (1980). Teratocarcinomas and mammalian embryogenesis. *Science* **209**: 768-776.
116. MCKENNA, M.J., HAMILTON, T.A., SUSSMAN, H.H. (1979). Comparison of human alkaline phosphatase isoenzymes: Structural evidence for three protein classes. *Biochem. J.* **181**: 67-73.
117. MCKLAY, D.R., CHAMBERS, A.F. (1978). Identification of ectoderm and endoderm from sea urchin *Pluteus* Larvae and demonstration of germ layer specific antigens. *Dev. Biol.* **71**: 289-296.

118. McLACHLIN, J. R., CAVENEY, S. & KIDDER, G. (1983). Control of gap junction formation in early mouse embryos. *Dev. Biol.* **98**: 155-164.
119. McLAUGHLIN, P. J., JOHNSON, P. M. (1984). A search for human placental type alkaline phosphatases using monoclonal antibodies. In: *Human Alkaline Phosphatases*. (ed: T. Stigbrand, P. M. Johnson). Alan R. Liss Inc., New York. Págs. 67-68.
120. McLAUGHLIN, P.J., CHENG, M.H., SLADE, M.B., JOHNSON, P.M. (1982). Expression on cultured human tumour cells of placental trophoblast membrane antigens and placental alkaline phosphatase defined by monoclonal antibodies. *Int. J. Cancer* **30**: 21-26.
121. MINTZ, B. (1964). Formation of genetically mosaic mouse embryos and early development of "lethal (t 12/t 12)-normal" mosaics. *J. Exp. Zool.* **157**: 273-292.
122. MONOD, J., JACOB, F. (1961). Teleonomic mechanisms in cellular metabolism, growth and differentiation. *Cold Spring Harbor Symposium XXVI*: 389-401.
123. MOSCONA, A.A. (1968). Cell aggregation: Properties of specific cell-ligands and their role in the formation of multicellular systems. *Dev. Biol.* **18**: 250.

124. MOSKALEWSKI, S., KOPROWSKY, H. (1972). Presence of egg antigen in immature oocytes and preimplantation embryos. *Nature* 237: 167-168.
125. MURAMATSU, H., MURAMATSU, T. (1982). Decreased synthesis of large fucosyl glycopeptides during differentiation of embryonal carcinoma cells induced by retinoic acid and dibutyryl cyclic AMP. *Dev. Biol.* 90: 441-444.
126. MURAMATSU, T., GACHELIN., G., DAMONNEVILLE, M., DELABRE, A., JACOB, F. (1979). Cell surface carbohydrates of embryonal carcinoma cells: polysaccharide chains of F9 antigens and of receptors to two lectins, FBP and PNA. *Cell* 18: 183-191.
127. MURAMATSU, H., ISHIHARA, H., MIYAUCHI, T., GACHELIN, G., FUJISAKI, T., TEJIMA, S., MURAMATSU, T. (1983). Glycoprotein-bound large carbohydrates of early embryonic cells: Structural characteristic of the glycan isolated from F9 embryonal carcinoma cells. *J. Biochem.* 94: 799-810.
128. NILSSON, B.O., SVALANDER, P.C., ANDERSON, J., GRONVIK, K.O., LARSSON, A. (1986). Methods for production and detection of monoclonal antibodies against surface components of adhesive implanting mouse blastocysts. *Uppsala J. Med. Sci.* 91: 317-322.

129. OSTRAND-ROSENBERG, S. (1980). Cell-mediated immune responses to mouse embryonic cells: Detection and characterization of embryonic antigens. In: Current Topics in Development Biology (ed: A.A. Moscona, A. Monroy). Academic Press, N.Y. 14: 147-168.
130. OZAWA, M., FUJIYAMA, J., FURUKAWA, K., SATO, T., NOGUCHI, T., MURAMATSU, T. (1981). Glycoprotein from teratocarcinomas of adult mice: Analysis of affinity chromatography on lectin-conjugated agarose. Dev. Growth Differ. 23: 515-522.
131. OZAWA, M., MURAMATSU, T., SOLTER, D. (1985a). SSEA-1, a stage specific embryonic antigen of the mouse, is carried by the glycoprotein-bound large carbohydrate in embryonal carcinoma cells. Cell Differentiation 16: 169-173.
132. OZAWA, M., SATO, M., MURAMATSU, H., HAMAD, A., MURAMATSU, T. (1985b). A membrane glycoprotein involved in teratocarcinoma cell adhesion to substratum. Exp. Cell. Res. 158: 127-143.
133. PAPAIOANNOU, V.E., MCBURNEY, M.W., GARDNER, R.L. (1975). Fate of teratocarcinoma cells injected into early mouse embryos. Nature 258: 70-72.

134. PAPAIDANNOU, V.E., GARDNER, R.L., MCBURNEY, M.W., BABINET, C., EVANS, M.J. (1978). Participation of cultured teratocarcinoma cells in mouse embryogenesis. *J. Embryol. exp. Morphol.* **44**: 93-104.
135. PERONA, R.M., WASSARMAN, P.M. (1986). Mouse blastocysts hatch *in vitro* by using a trypsin-like proteinase associated with cells of mural trophectoderm **114**: 42-52.
136. PEYRIERA, S.N., HYAFIL, F., LOUVARD, D., PLOEGH, H. JACOB, F. (1983). Uvomorulin: A non integral membrane protein of early mouse embryo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **80**: 6274-6277.
137. PINSKER, M.C., MINTZ, B. (1973). Change in cell-surface glycoproteins of mouse embryos before implantation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **70**: 1645-1648.
138. PRATT, H.P.M., CHACRABORTY, J., SURANI, M.A.H. (1981). Molecular and morphological differentiation of the mouse blastocyst after manipulation of compaction using cytochalasin D. *Cell* **26**: 279-292.
139. PRATT, H.P.M., ZIOMEK, C.A., REEVE, W.J.R., JOHNSON, M.N. (1982). Compaction of the mouse embryo: An analysis of its components. *J. Embryol. exp. Morph.* **70**: 113-132.

140. RANDLE, S. (1982). Cosegregation of monoclonal antibody reactivity and cell behaviour in the mouse preimplantation embryo. *J. Embryol. exp. Morph.* 70: 261-278.
141. RECTOR, J.T., GRANHOLM, N.H. (1978). Differential concanavalin-A induced agglutination of eight-cell preimplantation mouse embryos before and after compaction. *J. Exp. Zool.* 203: 497-502.
142. RICHARDS, J., PINK, C., ZIEGLER, A. (1979). Radio-labelling and immunoprecipitation of cell-surface macromolecules. In: *Immunological Methods* (ed: I. Lefkovits, B. Pernis). Academic Press, N.Y. pp. 169-195.
143. REINHERZ, E., KAMP, F.F.C., GOLDSTEIN, G., SCHLOSSMAN, S.F. (1979). Separation of functional subsets of human T-cells using monoclonal antibody. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76: 4061-4065.
144. ROSENSTRAUS, M.J. (1983). Isolation and characterization of an embryonal carcinoma cell line lacking SSEA-1 antigen. *Dev. Biol.* 9: 318-323.
145. ROSSANT, J., PAPAIOANNOU, V.E. (1977). The biology embryogenesis. In: *Concepts in mammalian embryogenesis* (M.I. Sherman, ed). MIT Press, England, pp. 1-36.

146. ROSSANT, J., PAPAIOANNOU, V.E. (1984). The relationship between embryonic, embryonal carcinoma and embryo derived stem cells. *Cell Differentiation* **15**: 155-161.
147. ROUSSEAU, R., ROUSSEAU-PREVOST, R., BAZIN, H. (1986). Optimal conditions for the preparation of proteolytic fragments from monoclonal IgG of different rat IgG subclasses. *Meth. Enzymol.* **121**: 663-669.
148. ROWINSKI, J., SOLTER, D., KOPROWSKI, H. (1976). Changes of Concanavalin-A induced agglutinability during preimplantation mouse development. *Exp. Cell. Res.* **100**: 404-408.
149. RUTISHAUSER, U., EDELMAN, G.M. (1978). Transmembrane control and cell surface recognition. In: *Differentiation and Development, Miami Winter Symposia* **15**: 211-233.
150. SEARGENT, L.E., STINSON, R.A. (1979). Evidence that three structural genes code for human alkaline phosphatase. *Nature* **281**: 152-154.
151. SEARLE, R.F., JENKINSON, E.J. (1975). Localization of trophoblast defined surface antigens during early mouse embryogenesis. *J. Embryol. exp. Morph.* **43**: 147-156.

152. SEPULVEDA, M.S., DOGGENWEILER, C., IZQUIERDO, L. (1985). Scanning microscopy of desaggregated and aggregated preimplantation mouse embryos. *Roux's Arch. Dev. Biol.* **194**: 445-452.
153. SHEVINSKY, L.H., KNOWLES, B.B., DAMJANOV, I., SOLTER, D. (1982). Monoclonal antibody to murine embryos defines a stage-specific embryonic antigen expressed on mouse embryos and human teratocarcinoma. *Cell* **30**: 697-705.
154. SHUR, B.D., BENNETT, D. (1979). A specific defect in galactosyltransferase regulation on sperm bearing mutant alleles of the T/t locus. *Dev. Biol.* **71**: 243-259.
155. SILVER, L.M. (1986). Mouse t haplotypes. *Ann. Rev. Genet.* **19**: 179-208.
156. SILVER, L.M., WHITE, M. (1982). A gene product of the mouse t complex with chemical properties of a cell surface-associated component of the extracellular matrix. *Dev. Biol.* **91**: 423-430.
157. SILVER, L.M., UMAN, J., DANSKA, J., GARRELS, J.I. (1983). A diversified set of testicular cell proteins-specified by genes within the mouse t complex. *Cell* **35**: 35-45.



158. SHIRAYOSHI, Y., OKADA, T.S., TAKEICHI, M. (1983). The calcium-dependent cell-cell adhesion system regulates inner cell mass formation and cell surface polarization in early mouse development. *Cell* **35**: 631-638.
159. SLACK, J.M.W. (1983). From egg to embryo. "Developmental and cell biology series" Cambridge, Univ. Press.
160. SMITH, R., MCLAREN, A. (1977). Factors affecting the time of formation of the mouse blastocoel. *J. Embryol. exp. Morphol.* **1**: 79-92.
161. SOBEL, S. (1983a). Localization of myosin in the preimplantation mouse embryo. *Dev. Biol.* **95**: 227-231.
162. SOBEL, S. (1983b). Cell-cell contact modulation of myosin organization in the early mouse embryo. *Dev. Biol.* **100**: 207-213.
163. SOBEL, J.S., ALLIEGRO, M.A. (1985). Changes in the distribution of a spectrin-like protein during development of the preimplantation mouse embryo. *J. Cell Biol.* **100**: 333-336.

164. SOLTER, D., KNOWLES, B. (1975). Immunosurgery of mouse blastocyst. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **72**: 5099-5102.
165. SOLTER, D., KNOWLES, B. (1978). Monoclonal antibody defining a stage-specific mouse embryonic antigen (SSEA-1). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **75**: 5565-5569.
166. SOLTER, D., SCHACHNER, M. (1976). Brain and cell surface antigens of clonal teratocarcinoma cells at various stages of differentiation. *Cell* **6**: 455-465.
167. STEINBUCH, M., AUDRAN, R. (1969). The isolation of IgG from mammalian sera with the aid of caprylic acid. *Arch. Biochem. Biophysics*. **134**: 279-284.
168. STERN, P.L., WILLISON, K.R., LENNOX, E., GALFRE, G., MILSTEIN, C., SECHER, D., ZIEGLER, A. (1978). Monoclonal antibodies as probes for differentiation and tumor-associated antigens: A Forssman specificity on teratocarcinoma stem cells. *Cell* **14**: 775-783.
169. STEVENS, L.C. (1970). The development of transplantable teratocarcinomas from intratesticular grafts of pre- and post-implantation mouse embryos. *Dev. Biol.* **21**: 364-382.
170. STRICKLAND, S., MAHDAVI, V. (1978). The induction of differentiation in teratocarcinoma stem cells by retinoic acid. *Cell* **15**: 393-403.

171. SURANI, M.A.H. (1979). Glycoprotein synthesis and inhibition of glycosylation by tunicamycin in preimplantation mouse embryos: Compaction and Trophoblast Adhesion. *Cell* **18**: 217-227.
172. SURANI, M.A.H., KIMBER, S.J., HANDSYDE, A.H. (1981). Synthesis and role of cell surface glycoproteins in preimplantation mouse development. *Exp. Cell. Res.* **133**: 331-339.
173. SVALANDER, P.C., ANDERSSON, J., NILSSON, B.O. (1987). Intrasplenic immunization for production of monoclonal antibodies against mouse blastocysts. *J. Immunol. Methods* (En prensa).
174. TARKOWSKI, A.K., WRÓBLEWSKA, J. (1967). Development of blastomeres of mouse eggs isolated at the 4- and 8-cells stage. *J. Embryol. exp. Morph.* **18**: 155-180.
175. TERAO, M., MINTZ, B. (1987). Cloning and characterization of a cDNA coding for mouse placental Phosphatase Alkaline. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**: 7051-7055.
176. THIERY, J.P., BRACKENBURY, R., RUTISHAUSER, V., EDELMAN, G.M. (1977). Purification of a cell-adhesion molecule from neural retina. *J. Biol. Chem.* **252**: 6841-6845.

177. TOWBIN, H., STAHELIN, T., GORDON, T. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**: 4350-4354.
178. VAN BLERKOM, J. (1981). The structural relation and post-translational modification of stage-specific proteins synthesized during early preimplantation development in the mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **78**: 7629-7633.
179. VAN BLERKOM, J., MANES, C. (1977). The molecular biology of the preimplantation embryo. En: *Concepts in mammalian embryogenesis*. (M.I. Sherman, ed). MIT Press. England., pp. 37-85.
180. VESTWEBER, D., KEMLER, R. (1984). Rabbit antiserum against a purified surface glycoprotein decompacts mouse preimplantation embryos and reacts with specific adult tissues. *Exp. Cell. Res.* **152**: 169-178.
181. WASSARMAN, P.M., GREVE, J.M., PERONA, R.M., ROLLER, R.J.I., SALZMANN, G.S. (1984). How mouse eggs put on and take off their extracellular coat. En: *Molecular Biology of Development*. (Ed. Davidson, E., Firtel, R.) A.R. Liss, New York, pp. 213-.

182. WEBB, C.A.G. (1983). Glycoproteins on gametes and early embryos. En: Development in Mammals (ed: M.H. Johnson). Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam 5: 155-185.
183. WEBB, C.G., DUKSIN, D. (1981). Involvement of glycoproteins in the development of early mouse embryos: Effect of tunicamycin and , dipyridyl *in vitro*. Differentiation 20: 81-86.
184. WEBB, P.D., MCLAUGHLIN, P.J., RISK, J.M., JOHNSON, P.M. (1986). Isolation of placental type alkaline phosphatase associated with placental syncytiotrophoblast membranes using monoclonal antibodies. Placenta 7: 405-415.
185. WEST, J.D., GREEN, J.F. (1983). The transition from oocyte-coded to embryo-coded glucose phosphate isomerase in the early mouse embryo. J. Embryol. exp. Morph. 78: 127-140.
186. WILEY, L.D. (1974). Presence of gonadotrophin on the surface of preimplanted mouse embryos. Nature 252: 715-716.
187. WILEY, L.M., CALARCO, P.G. (1975). The effects of anti-embryo sera and their localization on the cell surface during mouse preimplantation development. Dev. Biol. 47: 407-418.

188. WILLISON, K.R., STERN, P.L. (1978). Expression of a Forssman antigenic specificity in the preimplantation mouse embryo. *Cell* **14**: 785-793.
189. WU, T.C., WAN, Y-J., CHUNG, A.E., DAMJANOV, I. (1983). Immunohistochemical localization of entactin and laminin in mouse embryos and fetuses. *Dev. Biol.* **100**: 496-505.
190. YANAGIMACHI, R., NICOLSON, G.L. (1975). Lectin-binding properties of hamster egg zona pellucida and plasma membrane during maturation and preimplantation development. *Exp. Cell. Res.* **100**: 249-257.
191. YOSHIDA, C., TAKEICHI, M. (1982). Teratocarcinoma cell adhesion: Identification of a cell-surface protein involved in calcium-dependent cell aggregation. *Cell* **28**: 217-224.
192. YOSHIDA-NORO, C., SUZUKI, N., TAKEICHI, M. (1984). Molecular nature of the calcium dependent cell-cell adhesion system in mouse teratocarcinoma and embryonic cells studied with a monoclonal antibody. *Dev. Biol.* **101**:

193. ZIMMERMAN, A.M., SCHACHNER, M., PRESS, J.L. (1976).  
Central nervous system antigen (NS-5) and its presence  
during murine ontogenesis. J. Supramol. Struct. 5:  
417-429.