

CH-FC
OC-B
287

ESTUDIO DE LOS MECANISMOS INVOLUCRADOS
EN EL PROCESO DE ESPECIFICACION REGIONAL
DURANTE EL DESARROLLO INICIAL DE MAMIFEROS

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

por

ARIEL OCTAVIO AHUMADA ALVAREZ

ABRIL DE 1995

Directores de Tesis:

Dr. Luis Izquierdo F. (Q.E.P.D.)

Dr. Juan Fernández H.



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 el candidato

ARIEL OCTAVIO AHUMADA ALVAREZ

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 Mayo de 1995.

Directores de Tesis

Dr. Luis Izquierdo (Q.E.P.D.)

Dr. Juan Fernández

Comisión Informante de Tesis

Dr. Claudio Barros

por

Dr. Horacio Croxatto

Dr. Marco Tulio Núñez

Dr. Luis Valladares

Esta Tesis fue realizada en el laboratorio de Biología del Desarrollo de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile, bajo la dirección de los Drs. Luis Izquierdo (Q.E.P.D.) y Juan Fernández.

Al Dr. Luis Izquierdo (Q.E.P.D.)
a quien debo mi formación.

El desarrollo del Programa de Doctorado de Ariel Ahumada A., se realizó gracias a una beca de postgrado de CONICYT, a un proyecto para Tesis de Postgrado FONDECYT y a 2 proyectos del depto. de Postgrado y Postítulo de la Universidad de Chile.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Luis Izquierdo (Q.E.P.D.), por la constante orientación, ayuda y dedicación, que me brindó durante todos los años que tuve la suerte de compartir con él.

Al Dr. Juan Fernández, por su generosidad y disposición a aceptar la dirección de esta Tesis, por su impecable trabajo de edición y finalmente por su gran estímulo y apoyo, los cuales me permitieron concluir este trabajo de Tesis.

Al Dr. Tulio Núñez, por su importante colaboración en todos los momentos requeridos.

A todos mis amigos del laboratorio de Biología del Desarrollo: M. Soledad Fernández, Teresa López, Roberto Mayor, Roxana Pey, Nancy Olea, Alejandra Mancilla, Carolina Capote, Juan Silva, Luis Baiza, Víctor Vargas y Víctor Monasterio, por su desinteresada ayuda y por hacer mas grata mi estadía en el programa.

A Florencio Espinoza por su constante y desinteresada colaboración y amistad.

Al laboratorio de Bioquímica de la Facultad de Ciencias, en especial al Dr. Octavio Monasterio y a Patricio Rodríguez, quienes colaboraron y facilitaron los experimentos con el espectrofluorímetro.

A María Inés Becker, quien no sólo me facilitó los anticuerpos monoclonales utilizados en esta Tesis, sino que siempre estuvo dispuesta a discutir cada una de las series experimentales.

A Clarisa Vial, por su afecto y amistad.

A la generosa ayuda de CONICYT y de la Universidad de Chile, quienes permitieron mis estudios de Doctorado.

A mis padres por su constante estímulo a través de los largos años de estudio.

Por último, a SOLE por su decisiva participación en todas las etapas de la Tesis y cuya excepcional inteligencia e intuición contribuyeron a culminar este trabajo.

ABREVIATURAS

5'-AMP	5'-adenosin-mono-fosfato
BAME	Benzil-amino-metil-eter
BSA	Albúmina de suero bovino
CCB	Citochalcasina B
CHX	Cicloheximida
Con A	Concanavalina A
DABCO	1,4-diazo-biciclo-2,2,2-octano
DMSO	Dimetilsulfóxido
FAL	Fosfatasa alcalina
FDP	Difosfato de fluoresceína
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
hCG	Gonadotrofina coriónica humana
Km	Constante de Michaelis
NP-40	Nonidet P-40
5NUC	5'-nucleotidasa
OAG	1-oleoil-2-acetil-glicerol
PBS	Tampón fosfato salino
Pi	Fosfato inorgánico
PI-PLC	Fosfolipasa C, fosfatidil-inositol específica
PKC	Proteína quinasa C
PMS	Gonadotrofina de suero de yegua preñada

PMSF	Fenil-metil-sulfonil-fluoruro
pNPP	Fosfato de p-nitro-fenilo
Tris	Hidroximetilaminoetano
UI	Unidades internacionales
W7	N-(6-aminohexil)-5-cloro-1-naftalensulfonamida
WGA	Aglutinina de germen de trigo

INDICE

RESUMEN	1
SUMMARY	4
INTRODUCCION	7
Desarrollo preimplantacional del ratón	8
Especificación regional al comienzo del desarrollo	12
5'-nucleotidasa y fosfatasa alcalina como marcadores de la regionalización de la membrana plasmática	15
Papel de los contactos celulares en el establecimiento de especificación regional	16
Objetivo general	21
Objetivos específicos	21
MATERIALES Y METODOS	23
1. Obtención de embriones	23
2. Cultivo de embriones	24
3. Técnicas citoquímicas	25
4. Técnicas bioquímicas para medir la actividad de las enzimas marcadoras	28
5. Cultivo en presencia de lectinas.....	35
6. Localización de residuos carbohidratos de superficie celular utilizando lectinas conjugadas con FITC	36
7. Inhibición de la síntesis de proteínas en embriones de 2 células incubados con la lectina Concanavalina A	38
8. Cultivo con inhibidores de la polimerización de componentes del citoesqueleto: citochalasina B para microfilamentos y nocodazole para microtúbulos	38
9. Cultivo de embriones con fosfolipasa C	39
10. Inmunofluorescencia indirecta	40
11. Cultivo en presencia de un análogo del segundo mensajero	

diacilglicerol	42
12. Cultivo en presencia de un inhibidor de calmodulina	44
RESULTADOS	46
1. Detección citoquímica y bioquímica de la actividad enzimática de FAL durante el desarrollo preimplantacional	46
2. Efecto del tiempo y de la concentración de lectinas sobre el número de embriones regionalizados	48
3. Determinación de actividad de FAL en embriones de 2 células tratados con lectinas	52
4. Microensayo enzimático de alta sensibilidad para cuantificar la actividad de FAL	58
5. Aplicación del ensayo enzimático por fluorimetría para medir la actividad de FAL en embriones de 2 células regionalizados por efecto de lectinas	63
6. Localización subcelular de la actividad de FAL en embriones preimplantacionales	66
7. Efecto del detergente Nonidet P-40 sobre la actividad de FAL de embriones	69
8. Efecto de cicloheximida sobre la actividad de FAL en estados de 2 células cultivados con Con A	70
9. Distribución de receptores sacáridos comprometidos en la regionalización inducida por lectinas	75
10. Distribución de antígenos de superficie en embriones de 2 células	77
11. Fosfatasa alcalina se asocia con la membrana plasmática a través de un fosfolípido del tipo glicosilfosfatidilinositol (GPI)	82
12. Efecto de inhibidores del citoesqueleto sobre la regionalización normal	93
13. La regionalización inducida experimentalmente anticipa otros procesos morfogénicos	95
DISCUSION	100
1. La fosfatasa alcalina se expresa antes que se pueda detectar en el contacto celular	100
2. La cinética de expresión de FAL sugiere una localización de la enzima restringida a las superficies de contacto celular....	103
3. La regionalización promovida por lectinas no modifica los niveles de actividad de FAL presentes en el embrión de 2	

células, sugiriendo un mecanismo de relocalización de enzima preexistente cuyo destino es el contacto celular	107
4. ¿Por qué la regionalización no es evidente desde el momento en que se establece el primer contacto celular ?	110
5. La llegada de FAL al contacto celular se produce por movimiento de la enzima en el plano de la membrana y no por movilización desde un compartimento intracelular a la superficie de contacto	112
6. La actividad registrada a través de los ensayos enzimáticos parece corresponder solo a FAL	114
7. Función del citoesqueleto en el establecimiento y mantención de la regionalización	119
8. La dinámica de concentración de algunos antígenos de superficie suministra evidencia en favor de un mecanismo de redistribución de FAL dirigido al contacto celular	124
9. Mecanismos que podrían explicar la persistencia de la regionalización durante el desarrollo inicial	128
10. El proceso de regionalización de FAL sería análogo al del receptor de acetilcolina durante el desarrollo de la	

RESUMEN

Una señal temprana de especificación regional, o regionalización, en el embrión de mamíferos es la acumulación del producto de reacción de las enzimas fosfatasa alcalina (FAL) o 5'-nucleotidasa (5NUC) en regiones de contacto celular. En condiciones normales este proceso se detecta por primera vez en el embrión de 4 células. Sin embargo, la regionalización puede ser provocada anticipadamente en embriones de 2 células cultivados en parejas adyacentes o en presencia de lectinas como WGA o Con A. Los mecanismos comprometidos en este fenómeno no son aún claros, pero hay evidencia que residuos sacáridos participarían en la recepción del estímulo de contacto y que el sistema del fosfatidil-inositol iniciaría la transmisión intracelular de la señal.

El objetivo general de esta Tesis fue estudiar los mecanismos involucrados en el inicio de la regionalización al comienzo del desarrollo de los mamíferos. Para esto se desarrolló un ensayo enzimático fluorométrico cuya sensibilidad permitiera detectar cantidades de FAL tan pequeñas como las presentes en embriones tempranos de ratón. Así, fue posible demostrar actividad de FAL

antes que ésta pudiese ser reconocida citoquímicamente en las zonas de contacto celular, aumentando su cantidad en forma exponencial a partir del embrión de 2 células. Cuando se induce la regionalización por medio de lectinas, o se incuba el embrión en presencia de inhibidores de síntesis de proteínas, los niveles de actividad de FAL no varían. Estos resultados sugieren que la regionalización se debe a un proceso de relocalización de enzima preexistente y no involucra síntesis o activación de FAL.

La regionalización parece ocurrir en dos etapas: a) desplazamiento de FAL en el plano de la membrana y, b) agregación de la enzima en la zona de contacto celular. Los efectos de drogas que alteran los microfilamentos y los microtúbulos sugieren que éstos fenómenos podrían estar basados en la actividad del citoesqueleto. Este podría ser el agente involucrado en el desplazamiento de la enzima y/o anclaje de ésta en el contacto celular. Sin embargo, para realizar estas funciones se requeriría de otra proteína asociada al citoesqueleto que actuaría como nexo entre éste y la enzima, puesto que FAL esta anclada a la membrana a través de un fosfolípido. El efecto de drogas citostáticas, sin embargo, no es concluyente por lo que no se puede descartar que un

mecanismo de difusión simple a través de la membrana plasmática o un flujo de vesículas, puedan estar operando en la movilización de la enzima hacia la zona de contacto celular.

Ensayos de inmunofluorescencia indirecta, utilizando anticuerpos monoclonales dirigidos contra antígenos de la superficie de células embrionarias, también muestran un desplazamiento de algunos antígenos hacia la zona de contacto celular. Estos experimentos apoyan el modelo de relocalización de la enzima propuesto en esta tesis para explicar la regionalización de FAL.

Finalmente, la confirmación que fenómenos morfogénicos como la compactación son también provocados y anticipados por los agentes que causan la regionalización sugiere una relación causal entre ambos procesos. Esto explicaría la importancia de la especificación regional en la cascada de eventos que llevan a la diferenciación celular.

SUMMARY

Cytochemical demonstration of alkaline phosphatase (FAL) or 5'-nucleotidase (5NUC) at the contact cell surface of mammalian embryos constitutes an early sign of regional specification. Under normal conditions this process is first detected in the 4-cell stage embryo. However, regionalization can be prematurely induced in 2-cell embryos cultured in couples or in presence of lectins such as WGA or Con A. The mechanisms involved in this phenomenon have not yet been well established, but there is evidence that sacharide residues may act as contact receptors, while a phosphatidyl inositol system would initiate an intracellular transmission signal.

The main objective of this Thesis was the study of the mechanisms involved in the initiation of regionalization in the early mammalian embryo. For this purpose, a sensitive fluorometric enzymatic assay was developed to detect small amounts of FAL in early mouse embryos. In this manner, it was possible to demonstrate FAL activity at cell contact areas before it was possible to detect it by cytochemical methods. The enzyme activity increased exponentially

from the 2-cell stage embryo onwards. When regionalization was induced by lectins, or in the presence of protein synthesis inhibitors, the levels of FAL activity did not vary. These findings suggest that regionalization occurs as result of enzyme re-localization and would not involve FAL synthesis or activation.

Regionalization seems to occur in two steps: a) FAL diffuses in the plane of the plasma membrane and b) aggregation of the enzyme in the cell contact area. The effect of drugs which alter microfilaments and microtubules indicate that these phenomena may be a cytoskeleton-based processes. The cytoskeleton may be the agent involved in the enzyme displacement and/or in its anchorage in the cell contact area. However, because the enzyme is anchored to a plasma membrane phospholipid, another protein acting as a bridge between the cytoskeleton and FAL would be required. Since the effect of cytostatic drugs is not conclusive, there is a possibility that membrane vesicle flow or a simple diffusion mechanism, may be operating in the movilization of enzyme towards the cell contact area.

Indirect immunofluorecence studies using monoclonal antibodies

against surface antigens of embryonic cells, also showed movement of these antigens towards the contact areas. These experiments support the relocalization model proposed in this Thesis to explain FAL regionalization.

Finally, confirmation that morphogenetic phenomena such as compaction are also induced by agents which trigger regionalization suggests a causal relationship between the two processes. This would explain the importance of regional specification in the cascade of events leading to cell differentiation.

INTRODUCCION

El desarrollo inicial de los mamíferos se extiende desde la fecundación del ovocito en el oviducto hasta la implantación del embrión en el endometrio del útero. El desarrollo inicial toma aproximadamente 5 días y culmina con la formación del blastocisto, en el cual se distinguen por primera vez dos tipos celulares: la masa celular interna y el trofoblasto.

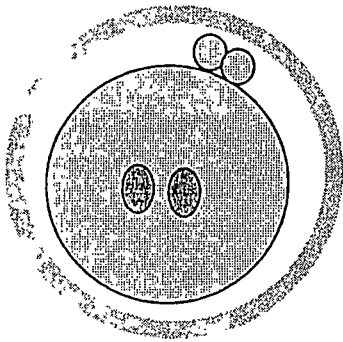
Hasta hoy día es difícil explicar la diferenciación del blastocisto a partir del huevo, en el que no se distinguen regiones citoplasmáticas diferentes y cuya segmentación genera células constituidas por citoplasmas semejantes que rodean núcleos equivalentes. Se ha sugerido que la diferenciación celular estaría en parte regulada por factores extrínsecos, tales como las diferencias generadas durante la segmentación por los contactos celulares (Izquierdo, 1986; Sepúlveda & Izquierdo, 1990).

DESARROLLO PREIMPLANTACIONAL DEL RATON

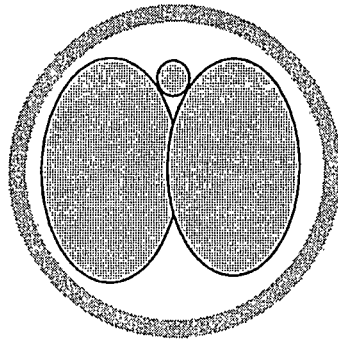
La fecundación del ovocito del ratón ocurre en el primer tercio del oviducto y desde allí el embrión es transportado hacia el útero. Durante este tránsito ocurren las primeras divisiones de clivaje, manteniéndose el tamaño inicial del huevo que es de aproximadamente 70 μm de diámetro (**FIGURA 1**). La primera división se produce 24-27 horas después de la fecundación y las siguientes divisiones ocurren aproximadamente cada 10 a 12 horas (Luthard & Donahue, 1975). Sin embargo, las divisiones no son sincrónicas y por lo tanto es posible encontrar embriones cuyo número de células no es necesariamente una potencia de dos (Graham & Deussen, 1978).

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

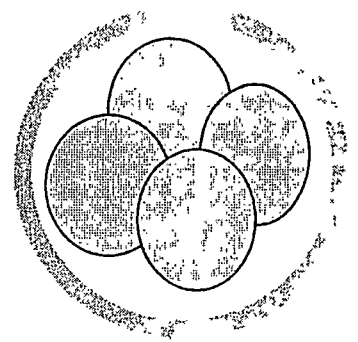
DESARROLLO INICIAL DEL RATON



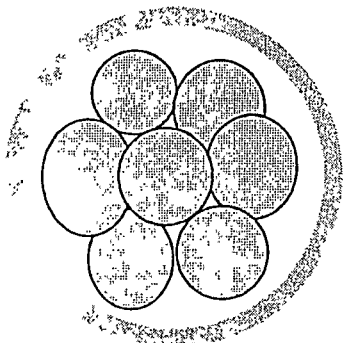
CIGOTO



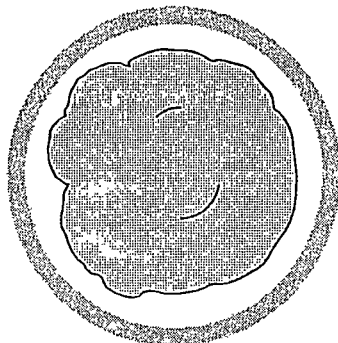
2 CELULAS



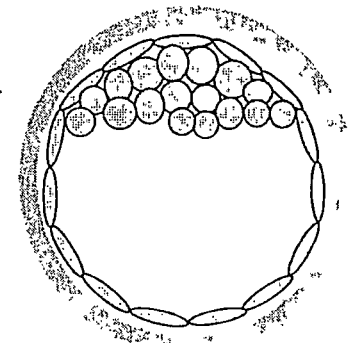
4 CELULAS



8 CELULAS



MORULA



BLASTOCISTO

Figura 1

intercelular (FIGURA 1).

Durante la compactación se produce un aumento en la adhesividad de los blastómeros, proceso que está asociado a la síntesis de la glicoproteína uvomorulina. La función adhesiva de uvomorulina depende de la presencia de Ca^{2+} en el medio (Hyafil *et al.*, 1981; Shirayoshi *et al.*, 1983; Ringwald *et al.*, 1987). En esta etapa no se reconoce una matriz extracelular estructurada, pero si la presencia de laminina, heparán-sulfato y nidógeno (Wu *et al.*, 1983; Dziadek & Timpl, 1985; Dziadek *et al.*, 1985).

Los cambios que acompañan a la compactación son dependientes del citoesqueleto, puesto que los agentes que alteran la estabilidad de microtúbulos y microfilamentos interfieren con la compactación (Ducibella, 1980; Pratt *et al.*, 1982).

El proceso de compactación está acompañado, además, por el establecimiento de los primeros contactos especializados entre las células. En las regiones de contacto entre los blastómeros aparecen puntos de fusión de membranas que corresponden a uniones estrechas

o *tight junctions* (Izquierdo et al., 1976). Además, aparecen uniones del tipo hendidas o *gap junctions*, responsables del acoplamiento iónico entre los blastómeros del embrión de 8 ó más células (Ducibella & Anderson, 1975; Lo & Gilula, 1979; McLachlin *et al.*, 1983; Goodall & Johnson, 1984; Lee *et al.*, 1987).

Al finalizar el paso por el oviducto, el embrión de ratón es una mórula compuesta de aproximadamente 24 células (Fernández & Izquierdo, 1980). Las células periféricas establecen uniones estrechas que sellan el interticio y constituirán más tarde el trofoblasto. El sellamiento impide la difusión del material intercelular hacia el espacio extraembrionario, formándose así la cavidad blastocélica.

La mórula, compuesta de un sólo tipo de células, se transforma en el blastocisto, en el cual puede reconocerse la diferenciación de dos poblaciones celulares. Los blastómeros periféricos constituyen un epitelio aplanado de células estrechamente unidas entre sí, denominado trofoblasto o trofoectoderma, mientras que los blastómeros centrales, alrededor de un tercio del total, constituyen la masa celular interna que queda desplazada hacia un polo. La masa celular interna, o brote

embrionario, dará origen al embrión propiamente tal y el trofoectoderma a la mayor parte de los anexos embrionarios.

ESPECIFICACION REGIONAL AL COMIENZO DEL DESARROLLO

El proceso de regionalización o de especificación regional se reconoce cuando los componentes celulares que tenían una distribución aparentemente homogénea se redistribuyen de una manera particular. La regionalización es una etapa decisiva del desarrollo inicial por cuanto implica la ruptura de la simetría esférica del embrión, y el comienzo de proceso morfogénico que lleva a la diferenciación del trofoblasto.

La utilización de técnicas de inmunofluorescencia en embriones tempranos ha permitido detectar signos de regionalización de algunos componentes citoesqueléticos. Así, en el embrión de 2 células la miosina cortical se concentra en las regiones alejadas del contacto celular (Sobel, 1983b), mientras que la espectrina y fodrina aparecen en las regiones de contacto celular (Sobel & Alliegro, 1985; Reima & Lehtonen, 1985; Schatten *et al.*, 1986). En el estado de 8 células los microfilamentos y los microtúbulos corticales, que son detectados en

todos los estados del desarrollo preimplantacional (Lehtonen & Badley, 1980), se concentran en las regiones alejadas de los contactos celulares (Lehtonen & Badley, 1980; Johnson & Maro, 1984; Houliston *et al.*, 1987).

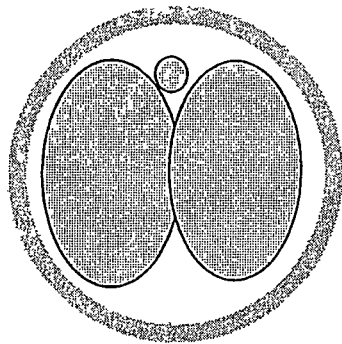
Un signo de especificación regional reconocido tempranamente en el desarrollo de los mamíferos es la regionalización de la superficie celular, reconocida por la detección citoquímica de los productos de la actividad de fosfatasa alcalina (FAL) o 5'-nucleotidasa (5NUC). Como se muestra en la **FIGURA 2**, los productos de reacción de estas dos enzimas de membrana marcan exclusivamente las zonas de contacto celular a partir del estado de 4 células (Izquierdo, 1977; Izquierdo *et al.*, 1980; Izquierdo & Ebensperger, 1982; Lois & Izquierdo, 1984).

Figura 2

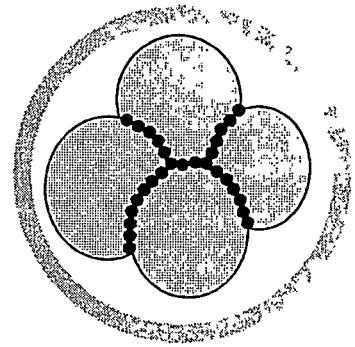
Regionalización durante el desarrollo inicial del ratón.

Esquema que ilustra la distribución regionalizada de la actividad de FAL y 5NUC (círculos negros), en las regiones de contacto celular, a partir del estado de 4 células.

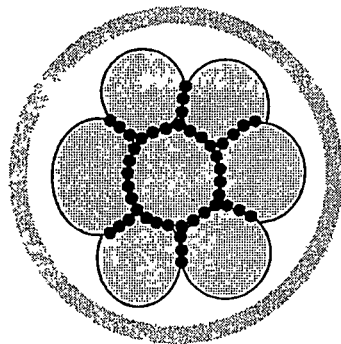
LOCALIZACION DE LA ACTIVIDAD REGIONALIZADA DE LAS ENZIMAS MARCADORAS



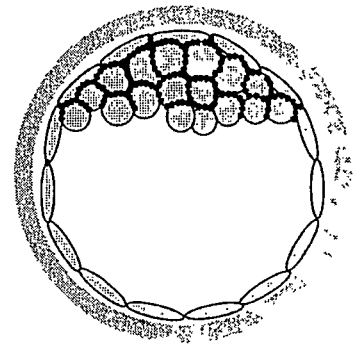
2 CELULAS



4 CELULAS



8 CELULAS



BLASTOCISTO

Figura 2

5'-NUCLEOTIDASA Y FOSFATASA ALCALINA COMO MARCADORES DE LA REGIONALIZACION DE LA MEMBRANA PLASMATICA

5NUC y FAL son ectoenzimas que están unidas covalentemente a fosfatidilinositol glicosilado por el lado externo de la membrana (Low, 1987).

La fosfatasa alcalina (EC 3.1.3.1) es una familia de isoenzimas con propiedades catalíticas similares que hidrolizan una variedad de fosfomonoésteres en un rango de pH alcalino. La mayoría son proteínas diméricas en que el peso molecular de cada subunidad varía entre 64.000 y 72.000 d. Se caracterizan, además, por ser altamente glicosiladas conteniendo ácido siálico como carbohidrato terminal (Fishman, 1974) y por contener en su forma nativa cuatro átomos de zinc. Dos de estos últimos están asociados a la actividad catalítica y dos contribuyen a la integridad estructural de la molécula. Otras funciones de FAL, ajenas a la catalítica, son en general desconocidas. Así, se ha sugerido que FAL está asociada a la formación de proteínas fibrilares y también al control del transporte de metabolitos a través de la membrana celular (Burstone, 1962; Fishman, 1974; Hertz, 1985).

La 5'-nucleotidasa (EC 3.1.3.5) se encuentra en diversos tipos celulares (Stanley *et al.*, 1980) y se le ha asignado un papel en la degradación de nucleótidos y producción de adenosina (Baron *et al.*, 1986). Esta enzima es ampliamente usada como marcador de membrana plasmática y se encuentra concentrada en ciertas regiones de células epiteliales polarizadas tales como hepatocitos (Wisher & Evans, 1975) y células del epitelio intestinal (Baron *et al.*, 1986). La 5NUC existe principalmente como un homodímero de subunidades α de un peso molecular aproximado de 70.000 d (Bailyes *et al.*, 1984).

PAPEL DE LOS CONTACTOS CELULARES EN EL ESTABLECIMIENTO DE ESPECIFICACION REGIONAL

Experimentos de agregación y desagregación de embriones sugieren que los contactos celulares estarían involucrados en la regionalización y eventualmente en la diferenciación celular. Poniendo en contacto embriones tempranos de ratón se ha observado: a) redistribución de proteínas citoesqueléticas corticales tales como miosina y espectrina, b) formación de uniones hendidas y c) desaparición de microvellosidades en las zonas de contacto celular. Además, estos procesos de reorganización ovular se revierten al separar los

blastómeros, indicando que los contactos celulares son esenciales para mantener la regionalización (Sobel, 1983 a, b; McLachlin *et al.*, 1983; Sobel & Alliegro, 1985; Sepúlveda *et al.*, 1985).

Sepúlveda e Izquierdo (1990) han propuesto que el contacto celular provocaría la regionalización de la membrana plasmática, generando tal vez la primera asimetría que ocurre durante el desarrollo inicial de los mamíferos y que sería un requisito para la progresión de la diferenciación celular y morfogénesis. Es decir, la regionalización durante el desarrollo de mamíferos comenzaría al aparecer el primer contacto celular, después de la primera división de clivaje.

Los embriones de 2 células no muestran actividad enzimática de 5NUC o FAL por métodos citoquímicos. Sin embargo, ésta puede ser provocada al poner en contacto dos embriones de 2 células o al incubarlos con algunas lectinas que reconocen residuos sacáridos de superficie (**FIGURA 3**). Bajo estas condiciones es posible reconocer regionalización aproximadamente 12 h antes que en el desarrollo normal (estado avanzado de 4 células) (Sepúlveda, 1990).

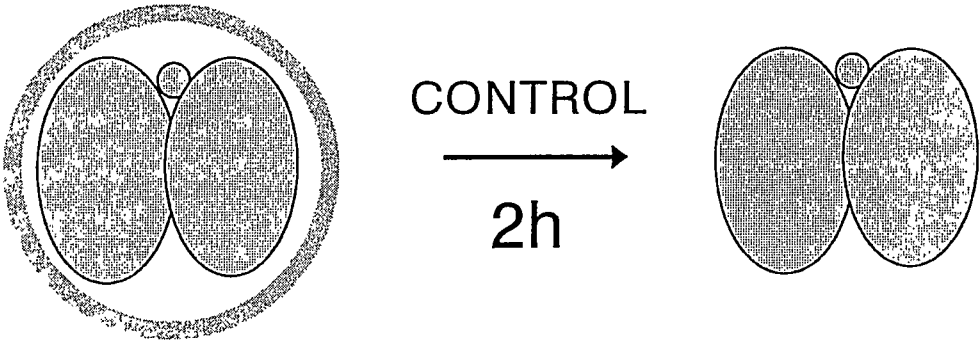
Figura 3

Provocación de la regionalización por contacto celular y lectinas en embriones de 2 células.

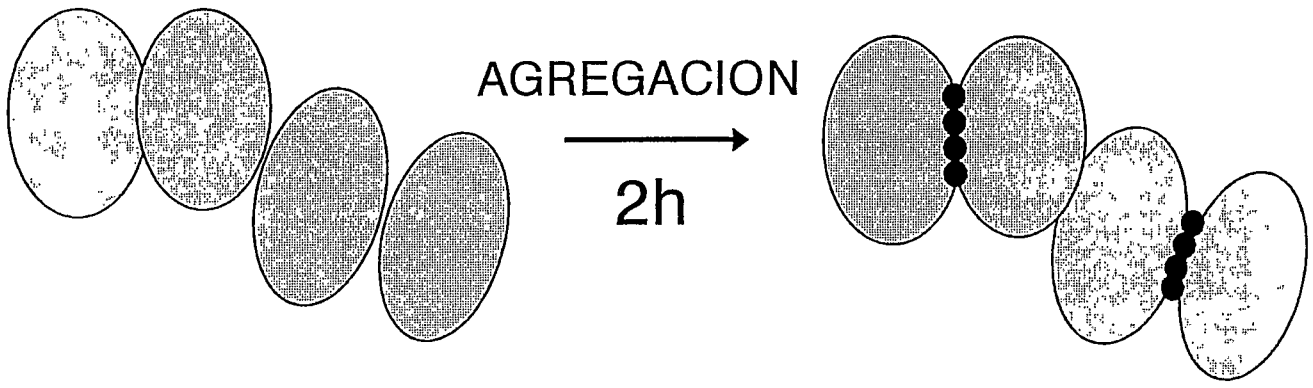
- A. Embrión control de 2 células cultivado *in vitro* durante 2 horas. Nótese la ausencia de actividad enzimática.
- B. Dos embriones de 2 células sin zona pelúcida cultivados en contacto durante 2 horas. Obsérvese la aparición de actividad enzimática (círculos negros) en la región de contacto entre los blastómeros de cada embrión.
- C. Embrión de 2 células cultivado durante 2 horas en una solución de la lectina WGA ó Con A. Obsérvese la aparición de actividad enzimática en la zona de contacto interblastomérico.

REGIONALIZACION INDUCIDA EN EMBRIONES DE 2 CELULAS

A.



B.



C.

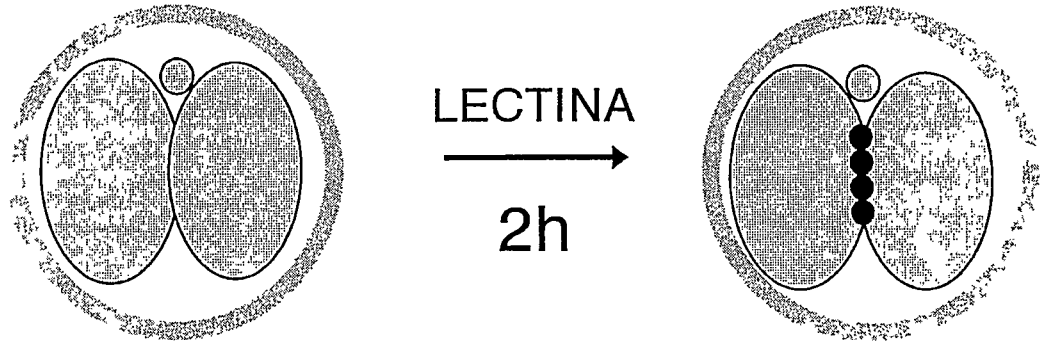


Figura 3

Cuando pares de embriones de 2 células son cultivados en contacto para provocar su agregación, la actividad de las enzimas marcadoras se detecta antes en el contacto natural que en el artificial generado por la agregación, sugiriendo que el contacto artificial produce una señal que se transmite a los contactos naturales y causa la regionalización (Sepúlveda, 1990). Los mecanismos involucrados en esta regionalización inducida experimentalmente de la membrana plasmática no son aún claros, pero hay evidencias de la participación de residuos sacáridos en la recepción del estímulo de contacto y del sistema del fosfatidil-inositol en la transmisión de la señal de contacto (Sepúlveda, 1990).

La aparición prematura de la actividad de FAL y 5NUC, provocada por un aumento de la superficie de contacto, podría explicarse por síntesis *de novo* de la enzima, por activación de la enzima inactiva o por redistribución de enzima pre-existente. Como los métodos citoquímicos sólo permiten conocer la proporción de embriones regionalizados en la unidad de tiempo, es necesario contar con un método bioquímico que permita cuantificar la actividad enzimática. De esta manera se podría estudiar los mecanismos involucrados en el

establecimiento de la especificación regional al comienzo del desarrollo, que constituye un objetivo importante de esta Tesis.

La hipótesis es que al establecerse un nuevo contacto celular éste provocaría primero una redistribución de la enzima y después su atrapamiento en la región de contacto, por lo que se haría visible el producto de reacción. En un mecanismo de esta naturaleza podría estar involucrado el citoesqueleto cuya localización, es también dependiente de las interacciones celulares. Sin embargo, el involucrar al citoesqueleto supone la existencia de otra proteína que medie la interacción entre éste y las enzimas marcadoras, puesto que 5NUC y FAL son ectoproteínas unidas a la membrana por un tallo fosfolipídico, sin una asociación directa a elementos del citoesqueleto.

OBJETIVO GENERAL

Estudiar los mecanismos involucrados en el gatillamiento de la regionalización al comienzo del desarrollo de los mamíferos.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

1. Desarrollar un método bioquímico lo suficientemente sensible como para detectar la actividad de FAL en embriones preimplantacionales de ratón.
2. Establecer la magnitud del estímulo requerido para provocar regionalización en embriones de 2 células incubados con lectinas.
3. Analizar los posibles mecanismos involucrados en el transporte y atrapamiento de ectoenzimas en la región de contacto celular.
4. Estudiar el papel del citoesqueleto en la aparición y mantención de la regionalización.
5. Estudiar la participación de la síntesis de proteínas en la actividad de FAL en embriones regionalizados por efecto de lectinas.
6. Estudiar la importancia de la regionalización en el contexto de procesos morfogénicos posteriores.

Los resultados de esta Tesis han sido parcialmente publicados en:

COMUNICACIONES A CONGRESOS

Ahumada, A. (1991). "Efecto de lectinas en la regionalización del embrión de ratón". Arch. Biol. Med. Exp. 24: R-149.

Ahumada, A.; Vial, C. & Izquierdo, L. (1992). "Distribución espacial de residuos sacáridos en embriones preimplantacionales de ratón". Libro de Resúmenes, XXXV Reunión Anual de la Sociedad de Biología de Chile. R-51.

Ahumada, A.; Rodríguez, P. & Pey, R. (1993). "Actividad de fosfatasa alcalina en embriones preimplantacionales de ratón: ensayo fluorimétrico". Libro de Resúmenes, XXXVI Reunión Anual de la Sociedad de Biología de Chile. R-102.

TRABAJO "IN EXTENSO"

Ahumada, A. & Izquierdo, L. (1994). "A new microassay for the determination of alkaline phosphatase activity in early mouse concepti". Biol. Res. 27: 241-246.

MATERIALES Y METODOS

1. OBTENCION DE EMBRIONES

Se utilizaron embriones preimplantacionales de ratón obtenidos del cruce de hembras superovuladas de la cepa Swiss-Rockefeller con machos de la misma cepa.

Para provocar la superovulación las hembras fueron primero inyectadas con 5 unidades internacionales (UI) de suero de yegua preñada (PMS, Intervet) y 44-48 horas más tarde con 5 UI de gonadotrofina coriónica humana (hCG, Intervet).

La cópula se reconoció por la presencia del tapón vaginal y se presumió que ésta ocurrió 12 horas después de la inyección de hCG. Las hembras fecundadas se sacrificaron por dislocación cervical, se extrajeron los oviductos y los embriones se rescataron por perfusión con el medio descrito por Biggers (Biggers, Whitten & Whittingham, 1971), ajustando la concentración de seroalbúmina de bovino (BSA, Sigma) a 4 mg/ml. La edad de los embriones se expresó en horas post inyección de hCG.

Se consideró como embrión de 2 células temprano a aquel que tenía 42 h post hCG y como tardío al que tenía 48 post hCG.

2. CULTIVO DE EMBRIONES

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

En otras series experimentales en las cuales las sustancias utilizadas eran solubles en aceite mineral, los cultivos fueron realizados en cápsulas para cultivo de órganos (Falcon 3037), cuyo volúmen era de 500 μ l, depositados sobre otra cápsula voluminosa que contenía también medio de cultivo. De esta manera se evitaba la evaporación del medio de cultivo interior.

2.1 Control de la viabilidad de los embriones.

La viabilidad de los embriones cultivados fué determinada mediante la colorabilidad con eosina amarillenta (Merck) al 0.5 % en medio Biggers. Los embriones que se tiñeron estaban dañados y fueron

descartados.

Como criterio para evaluar la toxicidad de diferentes drogas se efectuaron pruebas de reversibilidad. Para esto los embriones tratados fueron lavados y transferidos a medio Biggers conteniendo 0.4 % de BSA.

3. TECNICAS CITOQUIMICAS

Al describir los resultados nos referiremos a embriones regionalizados y no regionalizados. En los primeros, la actividad de 5NUC ó FAL es detectada por métodos citoquímicos en los contactos celulares mientras que en los embriones no regionalizados la actividad enzimática no es detectada. Como ya se explicó, la regionalización aparece por primera vez en embriones de 4 células.

3.1 Detección de la actividad de 5'-nucleotidasa.

Para la demostración de la actividad de 5NUC los embriones se procesaron según el procedimiento de Uusitalo y Karnovsky (1977) modificado por Izquierdo & Ebensperger (1982). Los embriones se

fijaron en una solución de glutaraldehído al 1 % en amortiguador Tris-maleato 0.1 M a pH 6.0 durante 1 h a temperatura ambiente. Luego se lavaron 3 veces en amortiguador Tris-maleato 0.1 M a pH 7.2 y se incubaron durante 50 min a 37 °C en una solución que contenía: 5'-adenosin-mono-fosfato (5'-AMP) 1.5 mM, Tris-maleato 0.1 M, nitrato de plomo 1.5 mM, sulfato de magnesio 10 mM y 5 % de glucosa a pH 7.2.

Luego de la incubación los embriones fueron lavados en amortiguador Tris-maleato y en agua destilada. El producto de la reacción se reveló exponiendo los embriones por un par de minutos a una solución de sulfuro de amonio al 0.1 %. Finalmente, los embriones fueron lavados en agua destilada, montados enteros en glicerol al 50 % y observados al microscopio de luz. Los controles fueron incubados en medio sin sustrato.

3.2 Detección de la actividad de fosfatasa alcalina (FAL).

Para la demostración citoquímica de la actividad de FAL los embriones se procesaron según el método utilizado por Izquierdo *et al.* (1980). Las muestras se fijaron durante 1 h a temperatura ambiente en

una solución de glutaraldehído al 3 % en amortiguador cacodilato 0.1 M a pH 7.4. Luego se lavaron 3 veces en el mismo amortiguador y se incubaron durante 90 min a temperatura ambiente en un medio conteniendo β -glicerofosfato 32 mM, Tris 160 mM, citrato de plomo 3 mM, sulfato de magnesio 6 mM y 5 % glucosa a pH 9.5. Luego de la incubación los embriones se lavaron en amortiguador cacodilato 0.1 M pH 7.4 y agua. El producto de la reacción se reveló exponiendo los embriones, por un par de minutos, a una solución de sulfuro de amonio al 0.1 %. Después de un breve lavado en agua destilada, los embriones completos fueron montados en glicerol al 50 % y observados al microscopio de luz. Los controles fueron incubados en un medio sin sustrato.

4. TECNICAS BIOQUIMICAS PARA MEDIR LA ACTIVIDAD DE LAS ENZIMAS MARCADORAS.

4.1 Microensayo enzimático por espectrofotometría para medir la actividad de fosfatasa alcalina.

Este ensayo está basado en el método descrito por Bessey et al. (1973) con algunas modificaciones introducidas por Cachicas (1989). Se utilizó el sustrato cromogénico fosfato de p-nitrofenilo (pNPP), cuya hidrólisis por la enzima libera un fosfato y lo transforma en p-nitrofenol de color amarillo que absorbe en los 405 nm.

Para los ensayos con estados de mórula o blastocisto se requirió alrededor de 60 embriones, mientras que para embriones de 2-4 células se requirió sobre 150 embriones.

4.1.1 Preparación de extracto de embriones para microensayo espectrofotométrico.

Los embriones se recibieron en 10 μ l de tampón fosfato salino (PBS) y se almacenaron a -20 °C hasta el momento del ensayo. Se descongelaron a temperatura ambiente y se resuspendieron en 40 μ l de

una mezcla 1:1 de tampón de Bessey (Bessey *et al.*, 1973) y tampón de Hass (Hass *et al.*, 1979). En estas condiciones los embriones fueron sometidos a 8 ciclos de congelación-descongelación para liberar la enzima (Izquierdo & Marticorena, 1975). En este extracto de embriones se pudo detectar actividad de FAL en distintos estados del desarrollo y bajo diferentes condiciones experimentales.

4.1.2 Determinación de la actividad de FAL en extractos de embriones por el método espectrofotométrico.

La reacción fue iniciada por la adición del sustrato a una solución que contenía: 50 μ l de pNPP 500 μ M en tampón NaHCO₃ 0.05M y Na₂CO₃ 0.05 M pH 9.6 con MgCl₂ 1 mM. La mezcla de reacción se incubó a 37 °C durante 20 h en la oscuridad y luego se midió la absorbancia a 405 nm. La hidrólisis espontánea del sustrato fue sustraída de la absorbancia total medida en cada experimento.

Empleando p-nitrofenol (Merck) se pudo confeccionar una curva de calibración que indicaba la magnitud de la absorbancia de concentraciones crecientes de p-nitrofenol: 1-200 μ M. Puesto que la

hidrólisis de cada molécula de sustrato genera una molécula de Pi y una molécula de p-nitrofenol, la actividad enzimática de fosfatasa alcalina se pudo expresar en términos de la cantidad de Pi generado por embrión durante 20 h.

4.2 Microensayo para medir la actividad de fosfatasa alcalina por espectrofluorometría de curso temporal.

Se desarrolló un nuevo método para medir la actividad de FAL utilizando como sustrato 3,6-difosfato de fluoresceína (FDP, Molecular Probes Inc.), cuya hidrólisis genera un producto fluorescente, la fluoresceína y dos fosfatos inorgánicos. La fluoresceína es excitada a 485 nm y emite alrededor de los 530 nm.

En los ensayos con estados de mórula o blastocisto se requirió alrededor de 20 embriones. Para estados tempranos de 2 a 4 células se requirió de aproximadamente 100 embriones.

4.2.1 Preparación de extracto de embriones para el microensayo espectrofluorométrico

Para determinar la actividad de FAL fué necesario disponer de la enzima en forma soluble. Para esto, los embriones fueron recibidos en 30 μ l de la solución tampón indicada en 4.2.3, a la que se agregó el detergente Nonidet P-40 (NP-40, Sigma) al 0.1 %. En este medio los embriones se mantuvieron por un lapso de 10 min a 37 °C y luego se centrifugaron a 10.000 x g por 5 min. A continuación se recuperó el sobrenadante y el sedimento fue resuspendido en 30 μ l de la solución indicada en 4.2.3, con o sin NP-40. Finalmente ambas fracciones se almacenaron a -30 °C hasta el momento del ensayo. Alternativamente, los embriones se recibieron en el medio indicado en 4.2.3 pero se maceraron en forma manual en un micro-homogeneizador de vidrio con capacidad para 0.2 ml (Wheaton). Luego, los embriones macerados se incubaron durante 1 h a 37 °C en presencia de 20 U/ml de fosfolipasa C. El ensayo se realizó en presencia o ausencia de NP-40 al 0.1 % durante 10 min a 37 °C. Posteriormente se centrifugó a 10.000 x g por 5 min y se recuperó los sobrenadantes. Finalmente, estos extractos se almacenaron a -30 °C hasta el momento del ensayo. Este tiempo nunca

superó las 3 semanas, no encontrándose diferencias en los resultados del ensayo.

4.2.2 Determinación de la actividad de FAL en extractos de embriones por el método espectrofluorométrico.

Las extractos de embriones se descongelaron a temperatura ambiente y se resuspendieron en 500 μ l de una solución tampón (Huang *et al.*, 1992). Previamente, esta solución tampón se equilibró a 30 °C en presencia del sustrato FDP, el cual se usó a una concentración final de 20 μ M (véase determinación de K_m para FAL en 4.2.4) y se preparó a partir de una solución stock 200 μ M en tampón Tris 10 mM, pH 7.5 con 150 mM de NaCl. La reacción se inició inmediatamente después de agregar el contenido del extracto a la solución tampón con el sustrato. La mezcla de reacción se incubó a 30 °C durante 20 min. Para obtener registros temporales y procesar los datos se empleó el programa Perkin-Elmer FL Data Manager (FLDM) acoplado al espectrofluorómetro Perkin-Elmer LS 50. Previamente, se seleccionó el tiempo de registro y las longitudes de onda de excitación ($\lambda_{exc.} = 485$ nm) y emisión ($\lambda_{em.} = 530$ nm). A partir de los registros

obtenidos, y empleando el mismo programa, se calculó la pendiente de cada curva. La actividad enzimática se expresó en unidades arbitrarias de fluorescencia por segundo y por embrión. En cada caso, se descontó la hidrólisis espontánea del sustrato.

4.2.3 Tampón de almacenamiento.

Se preparó tampón Hepes 20 mM pH 7.5 conteniendo NaCl 100 mM, MgCl₂ 1 mM, ZnCl₂ 1 mM, sacarosa 250 mM y 0.02 % de Azida de Na. Además, se agregó los siguientes inhibidores de proteasas: benzamidina 5 mM, fluoruro de fenil-metil-sulfato (PMSF) 1 mM, pepstatina 1 µg/ml, aprotinina 10 µg/m y benzil-amino-metil-eter (BAME) 1 µg/ml.

4.2.4 Determinación de la Constante de Michaelis (Km) para FAL de embriones.

Aproximadamente 200 blastocistos se recibieron en 130 µl del medio indicado en 4.2.3 con 0.1 % de NP-40 y se micro-homogeneizaron como se indica en 4.2.1, luego el extracto se incubó

por 5 min a 37 °C y se centrifugó a 10.000 x g durante 5 min, recuperándose el sobrenadante. El sobrenadante se dividió en 4 alícuotas de 30 μ l cada una y se probaron concentraciones de FDP entre 0.1-20 μ M. Las determinaciones de actividad de FAL se realizaron como se indica en 4.2.2, pero empleando las concentraciones de sustrato recién señaladas. La velocidad inicial en las diferentes concentraciones de sustrato se calculó a partir de las pendientes de cada registro obtenido. Con estos datos se confeccionó las gráficas Michaeliana y doble-recíproca, de donde se obtuvo el valor para la K_m de FAL de embriones. La K_m para la FAL de embriones se estimó entre 1-2 μ M por lo que se fijó la concentración de FDP en los ensayos con este sustrato en 20 μ M.

4.2.5 Efecto del detergente NP-40 sobre la actividad de FAL extraída de embriones con Fosfolipasa C.

El ensayo de actividad de FAL descrito en 4.2 requiere que la enzima se encuentre en forma soluble, lo que se podría conseguir extrayendo los embriones con NP-40. Para esto era preciso determinar si el detergente NP-40 tenía algún efecto sobre la actividad de FAL.

Para ello se homogeneizaron aproximadamente 100 blastocistos como se indica en 4.2.1 y se incubaron con Fosfolipasa C-fosfatidilinositol específica (PI-PLC) 20 U/ml durante 1 h a 37 °C. PI-PLC fue gentilmente donada por el Dr. Martin Low de la Universidad de Columbia, Nueva York. A continuación, como se indica en 4.2.1, se recuperó el sobrenadante y se dividió en partes iguales; una se ensayó con NP-40 0.1 % y la otra sin detergente.

5. CULTIVO EN PRESENCIA DE LECTINAS

5.1 Cultivo con lectinas en solución

Embriones de 2 células fueron cultivados entre 1 y 6 horas en una solución de Biggers que contenía Con A o WGA.

Las lectinas utilizadas tienen afinidad por diferentes residuos sacáridos, como se indica en 5.1.1, y las concentraciones utilizadas variaron entre 25 y 800 $\mu\text{g/ml}$ (Wartiovaara et al., 1978; Kimber & Bird, 1985; Zuzack & Tasca, 1985; Dealtry et al., 1987). Luego de la incubación los embriones fueron procesados para la detección

citoquímica de 5NUC ó FAL, como se indica en 3, o utilizados en microensayos de actividad enzimática para FAL, como se indica en 4.1 y 4.2.

5.1.1 Lectinas utilizadas

LECTINA	SACARIDO RECONOCIDO	CONCENTRACION UTILIZADA
Concanavalina A (Con A) Canavalina ensiformes	glucosa, manosa	25 - 800 $\mu\text{g/ml}$
Aglutinina del germen de trigo (WGA) Triticum vulgaris	N-acetil-glucosamina ácido siálico	25 - 100 $\mu\text{g/ml}$

6. LOCALIZACION DE RESIDUOS DE CARBOHIDRATOS DE SUPERFICIE CELULAR UTILIZANDO LECTINAS CONJUGADAS CON FITC

En estos experimentos se utilizó las lectinas Con A y WGA, ambas conjugadas con FITC. Se probaron diferentes concentraciones de las lectinas marcadas y se estableció una concentración de trabajo de 200 $\mu\text{g/ml}$ para Con A-FITC y de 40 $\mu\text{g/ml}$ para WGA-FITC. Estas se prepararon en una solución de BSA al 1 % (p/v) en PBS a partir de una

solución stock de 1 mg/ml en PBS.

Los embriones se fijaron por 30 min a temperatura ambiente en una solución de paraformaldehído al 3.7 % (v/v) en PBS pH 7.5. Posteriormente, se lavaron en una solución de PBS conteniendo BSA al 1 % y se bloquero los grupos reactivos presentes después de la fijación, manteniendo los embriones en una solución de BSA al 3 % en PBS por 1 h a temperatura ambiente. A continuación, se realizaron varios lavados en PBS y los embriones se incubaron durante 1 h en las soluciones de lectinas marcadas con FITC. Luego se lavó varias veces en una solución de BSA al 1 % en PBS.

Finalmente los embriones fueron montados en medio DABCO y observados en un microscopio Zeiss equipado con contraste de fase y epifluorescencia.

La especificidad de la marca se controló preincubando las lectinas con los azúcares por los cuales tienen afinidad. Para Con A se utilizó una solución 200 mM de α -D-manopiranososa y para WGA una solución de 400 μ g/ml de N-N'-N'' acetilchitotriosa o de 200 mM de

chitina (Poli-N-acetilglucosamina). Estas concentraciones de azúcares desplazan completamente la marca generada por las lectinas.

7. INHIBICION DE LA SINTESIS DE PROTEINAS EN EMBRIONES DE 2 CELULAS INCUBADOS CON LA LECTINA CONCAVALINA A.

Embriones de 2 células fueron preincubados durante 1 h en la solución de Biggers conteniendo 50 $\mu\text{g/ml}$ de cicloheximida (CHX) (Sepúlveda, 1990) y, luego fueron transferidos a una solución con CHX en presencia de 700 $\mu\text{g/ml}$ de Concanavalina A por 3 h. Paralelamente se realizaron controles utilizando embriones no tratados ó embriones cultivados sólo en presencia de Con A. Luego, los embriones fueron utilizados en el microensayo enzimático por fluorometría para medir la actividad de FAL.

8. CULTIVO CON INHIBIDORES DE LA POLIMERIZACION DE COMPONENTES DEL CITOESQUELETO: CITOCHALASINA B PARA MICROFILAMENTOS Y NOCODAZOLE PARA MICROTUBULOS

Para inhibir la polimerización de los microfilamentos de actina

se utilizó citochalasin B (CCB, Sigma) 5 $\mu\text{g/ml}$, preparada en medio Biggers a partir de una solución stock de 1 mg/ml en DMSO (Izquierdo et al., 1984). Para inhibir la polimerización de los microtúbulos, se utilizó nocodazole 5 $\mu\text{g/ml}$, preparado en medio Biggers a partir de una solución stock de 1 mg/ml en DMSO.

Los cultivos se realizaron como se indica en 3. Se cultivó embriones de 2 células durante 23 h con el inhibidor escogido y luego los embriones fueron fijados y procesados para el reconocimiento citoquímico de 5NUC.

9. CULTIVO DE EMBRIONES CON FOSFOLIPASA C

Embriones de 2-4 células fueron incubados por 15 h en una solución de fosfolipasa C-fosfatidil inositol específica (PI-PLC) 10-20 U/ml en medio Biggers. Paralelamente se realizaron cultivos de embriones omitiendo PI-PLC en el medio de incubación. Posteriormente, los embriones vivos fueron observados al microscopio de luz o fijados y procesados para el reconocimiento citoquímico de 5NUC.

10. INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA

10.1 Anticuerpos contra antígenos embrionarios de superficie

Para estos ensayos se utilizó un grupo de anticuerpos monoclonales producidos y facilitados gentilmente por la Dra. María Inés Becker, P. Universidad Católica de Chile. Los anticuerpos ensayados provienen de los sobrenadantes de los hibridomas denominados Mor-F2A6, Mor-H6B2, Mor-6F4/H1, TC-1G1, TC-6F2 y TC-2D10. No se ha identificado los antígenos embrionarios contra los cuales están dirigidos estos anticuerpos (Becker, 1988).

Para estudiar la localización de antígenos de superficie en embriones preimplantacionales de ratón se utilizó una modificación del método de inmunofluorescencia indirecta descrito por Cuello (1984).

Los embriones se fijaron en una solución de paraformaldehído al 3.7 % (v/v) en PBS pH 7.5 por 30 min a temperatura ambiente y luego se lavaron 3 veces por 5 min con PBS. Para bloquear los grupos

reactivos generados por la fijación con formaldehído se incubó durante 1 h con una solución de PBS-Glicina 0.2 M a temperatura ambiente. Luego se lavó 4 veces por 5 min con PBS.

El material se incubó 1 h a 37 °C en ambiente húmedo con aproximadamente 200 μ l del primer anticuerpo, que en este caso corresponde al sobrenadante del cultivo de los diferentes hibridomas. Luego se lavó 4 veces por 5 min con PBS.

Posteriormente se incubó por 30 min a 37 °C en el segundo anticuerpo, que correspondía a un suero de conejo anti-IgG de rata conjugado con isotiocianato de fluoresceína (FITC), diluido 1:40 con PBS-BSA al 1 %. Para eliminar los anticuerpos adheridos en forma inespecífica se lavó 3 veces por 5 min con PBS y una vez por 2 min con PBS-Tween 20 al 0.05 % (v/v)

Para prolongar la fluorescencia, los embriones se montaron con una solución que contenía azida de sodio al 0.5 %, glicerol al 90 % y 1,4-Diazobiciclo 2,2,2 octano (DABCO), pH 8.6 en PBS.

Finalmente, las preparaciones fueron observadas en un fotomicroscopio Universal Zeiss III equipado con epifluorescencia o en un microscopio confocal Zeiss, modelo LSM 410.

Para verificar la especificidad de la reacción inmunofluorescente se realizó los siguientes controles: a) material solamente fijado, sin anticuerpos y b) omisión del primer anticuerpo.

11. CULTIVO EN PRESENCIA DE UN ANALOGO DEL SEGUNDO MENSAJERO DIACILGLICEROL

Embriones de 2 células fueron cultivados por 2 h en una solución de oleoil-acetil-glicerol (OAG) 60 $\mu\text{g/ml}$ en medio Biggers normal (Rink et al., 1983) o sin Ca^{2+} (Ducibella, 1980), pero con EGTA 0.5 mM. Se utilizó cápsulas Falcon 3037. Luego, los embriones de la primera condición fueron transferidos a medio Biggers sin Ca^{2+} con EGTA 0.5 mM por un tiempo adicional de 1 h. Finalmente, los embriones fueron estudiados al microscopio de luz y procesados por la técnica de inmunofluorescencia indirecta para el reconocimiento de uvomorulina como se indica en 11.1.

La solución de OAG se preparó a partir de una solución stock del reactivo que contenía 10-20 mg/ml en dimetilsulfósido (DMSO). Esta última se mantenía a - 20 °C en una atmósfera de nitrógeno (Sepúlveda, 1990).

Se controló el efecto del DMSO sobre el desarrollo *in vitro* de los embriones, mediante cultivos paralelos en concentraciones finales del solvente similares a las empleadas para disolver el OAG (entre 0.3-0.6 %). No se observaron efectos sobre el desarrollo.

11.1 Anticuerpos anti-Uvomorulina

Embriones incubados en las condiciones señaladas en el punto **11**, fueron procesados para la detección de uvomorulina por la técnica de inmunofluorescencia indirecta, utilizando un anticuerpo policlonal anti-uvomorulina que fue gentilmente donado por el Dr. G. Schatten, de la Universidad de Wisconsin.

Las muestras para inmunofluorescencia indirecta fueron preparadas siguiendo el esquema descrito en **10.1**, cambiando sólo el

anticuerpo y las diluciones empleadas. Como primer anticuerpo se utilizó un antisuero monoclonal contra uvomorulina de ratón preparado en rata (DECMA-1, Sigma) diluido 1:100 con PBS-BSA 1 %, donde se incubó durante 1 h a 37°C. Como segundo anticuerpo se utilizó suero de cabra contra IgG de rata conjugado con Biotina (Sigma) diluido 1:40 con PBS-BSA 1 %, donde se incubó durante 1 h a 37 °C. Finalmente, se incubó durante 1 h a 37 °C en el complejo Estravidina-FITC diluido 1:40 con PBS-BSA 1 %. Luego de cada incubación, las muestras se lavaron reiteradamente en PBS. Finalmente, los embriones fueron montados y observados como se indica en **10.1**.

12. CULTIVO EN PRESENCIA DE UN INHIBIDOR DE CALMODULINA

Embriones de 2 células fueron cultivados durante 1 h (ver 3), en cápsulas Falcon 3037 que contenían una solución de N-(6-aminohexil)-5-cloro-1-naftalensulfonamida (W7, Sigma) 50 μ M en medio Biggers (Eckberg et al., 1987; Yakamura & Spindle, 1988). Luego los embriones fueron transferidos a una solución con la sustancia ensayada (60 μ g/ml de OAG) además de W7 y cultivados por 3 h adicionales. Los embriones fueron observados al microscopio de luz.

La droga se preparó a partir de una solución stock 10 mM
disuelta en agua.

RESULTADOS

1. **Detección citoquímica y bioquímica de la actividad enzimática de FAL durante el desarrollo preimplantacional.**

Embriones de diferentes estados del desarrollo inicial se fijaron y procesaron para la demostración citoquímica de 5NUC o FAL. Se encontró que sólo a partir del estado de 4 células tardío (54-58 h post hCG) era posible reconocer la actividad de ambas enzimas en las zonas de contacto intercelular (**FIGURA 2**). Estos resultados confirmaron observaciones previas de nuestro laboratorio (Izquierdo et al., 1980; Izquierdo & Ebensperger, 1982). Sin embargo, el método citoquímico, es capaz de revelar la actividad de esta enzima localizada pero no permite estimar la magnitud de esta actividad.

Para determinar cuando aparece la actividad de la enzima y su cinética durante el desarrollo, se midió la actividad de FAL empleando el microensayo enzimático por fotometría. Los resultados muestran actividad de FAL desde el estado de 2 células, cantidad que aumenta en forma exponencial hasta el estado de blastocisto (**FIGURA 4**). Los estados de 2 células tempranos y tardíos muestran los mismos niveles de

Figura 4

Actividad de FAL durante el desarrollo preimplantacional del ratón. La actividad es expresada en nmoles de Pi, por embrión. Estado de 2 células (47 h post hCG), estado de 4 células (55 h post hCG), mórula (70 h post hCG) y blastocisto (90 h post hCG). Cada barra representa el promedio de 7 experimentos indicándose la desviación estándar.

ACTIVIDAD DE FOSFATASA ALCALINA DURANTE EL DESARROLLO INICIAL DE LOS MAMIFEROS

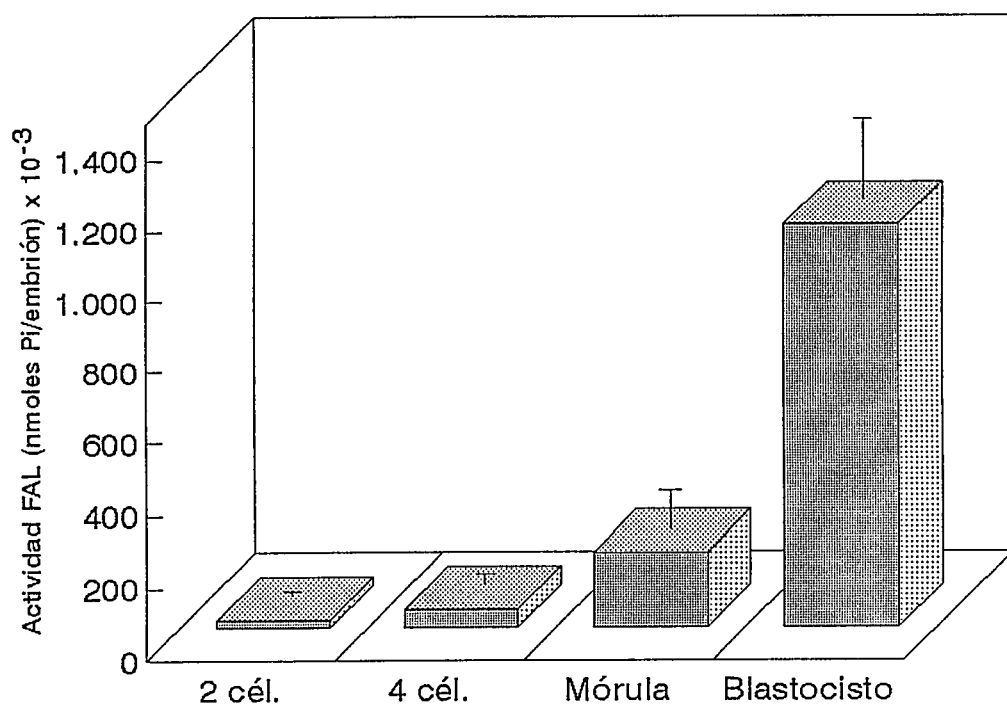


Figura 4

actividad de FAL, en cambio, en embriones más avanzados se encuentran diferencias que dependen de la edad. Como interesa conocer el patrón de expresión de la enzima durante el desarrollo inicial, los resultados no aparecen expresados en una escala temporal sino por estado embrionario. En resumen, los resultados del ensayo bioquímico muestran actividad de FAL antes que ésta pueda ser reconocida citoquímicamente en las zonas de contacto celular. La actividad de la enzima se detecta tan temprano como el establecimiento del primer contacto celular y en adelante ésta incrementa en forma continua y abrupta.

2. Efecto del tiempo y de la concentración de lectinas sobre el número de embriones regionalizados.

La regionalización puede ser inducida en embriones de 2 células al cultivar con ciertas lectinas (Sepúlveda, 1990), pero se desconoce si este fenómeno va acompañado de cambios en la cantidad o actividad de FAL. Para resolver este problema fué preciso comparar la actividad de FAL, entre estados de 2 células normales y regionalizados por efecto de lectinas. Con este propósito se determinó las condiciones de tiempo y concentración de las distintas lectinas, como

para obtener una respuesta máxima en cuanto al número de embriones regionalizados.

Se ensayaron diferentes concentraciones de Con A y WGA y se utilizó aquella capaz de producir una respuesta superior al 50 % en no más de 2 h. Esto ocurrió con una concentración de Con A de 700 $\mu\text{g/ml}$ (FIGURA 5) y de WGA de 50 $\mu\text{g/ml}$. En seguida, se estimó el tiempo necesario para obtener regionalización en el total de la población de embriones. Para esto, embriones de 2 células se incubaron en presencia de Con A por tiempos que variaron entre 0 y 4 h, alcanzándose un 100 % de regionalización a las 3 h (FIGURA 6). WGA, en tanto, requirió de 4 h para producir una respuesta equivalente. En tanto, al incubar estados de 2 células en presencia de la lectina UEA I por los tiempos y concentraciones ensayadas para las otras lectinas, nunca se obtuvo regionalización de los embriones.

Por lo tanto, los efectos de estas lectinas sobre la regionalización son específicos y dependientes del tiempo de incubación y de la dosis empleada.

Los resultados de la citoquímica fueron similares ya sea si los

Figura 5

Efecto de la concentración de Con A sobre el porcentaje de embriones regionalizados. Estados de 2 células fueron cultivados durante 2 horas en presencia de diferentes concentraciones de Con A e inmediatamente procesados para el reconocimiento citoquímico de 5NUC.

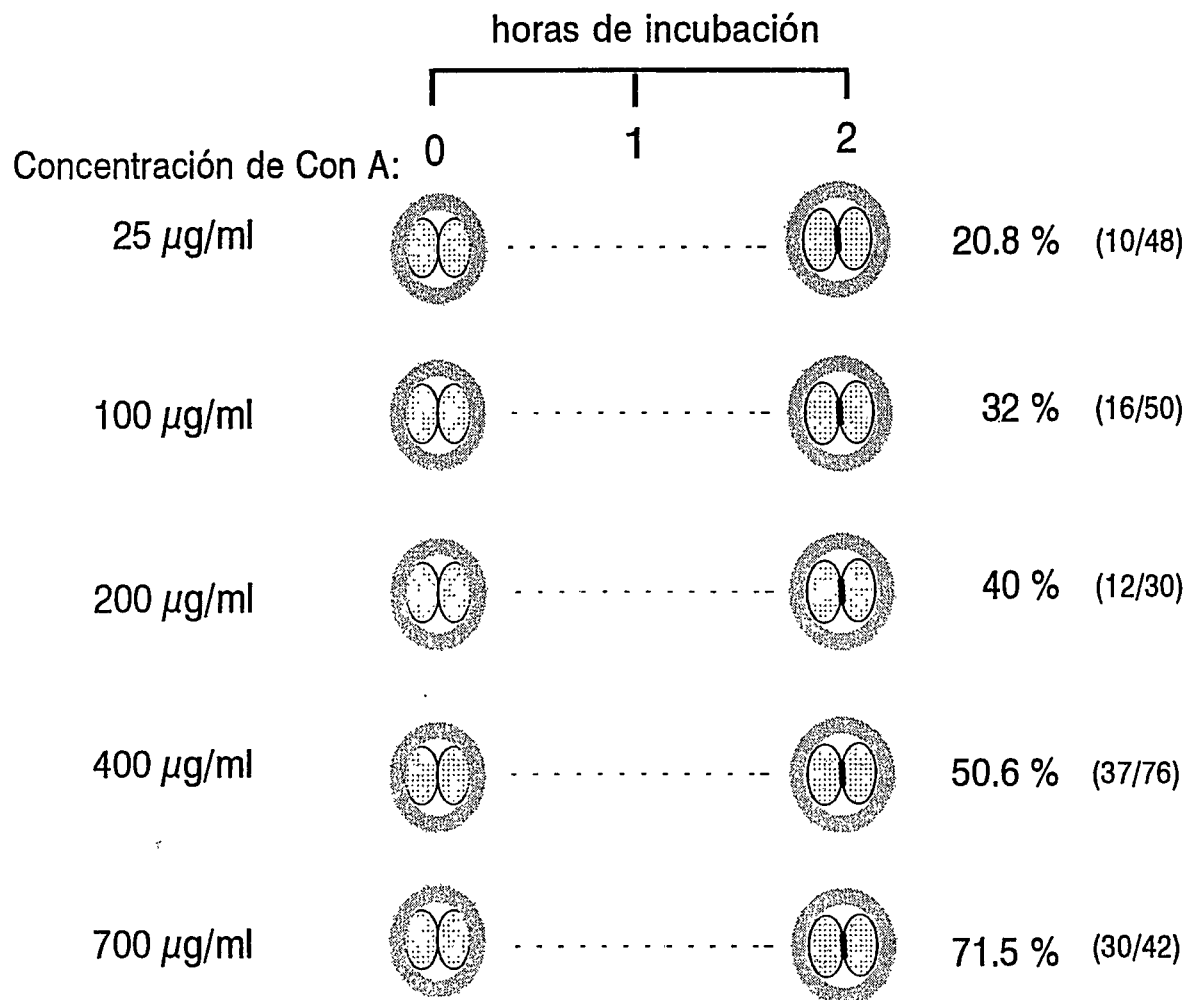


Figura 5

Figura 6

Efecto del tiempo de incubación en Con A sobre el porcentaje de embriones regionalizados. Estados de 2 células fueron cultivados por 0, 1, 2, y 3 horas en presencia de 700 $\mu\text{g/ml}$ de Con A, e inmediatamente procesados para el reconocimiento citoquímico de 5NUC.

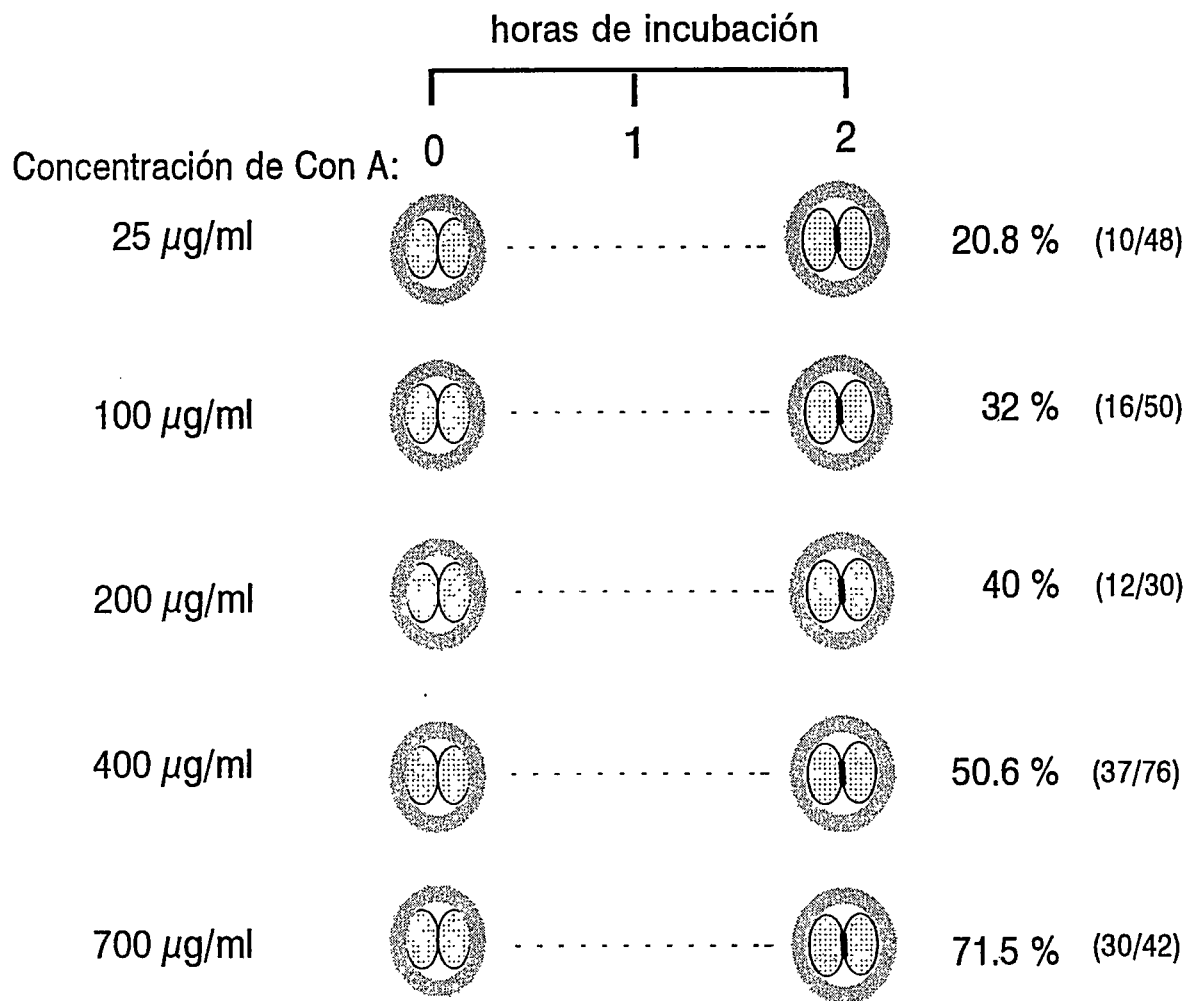


Figura 5

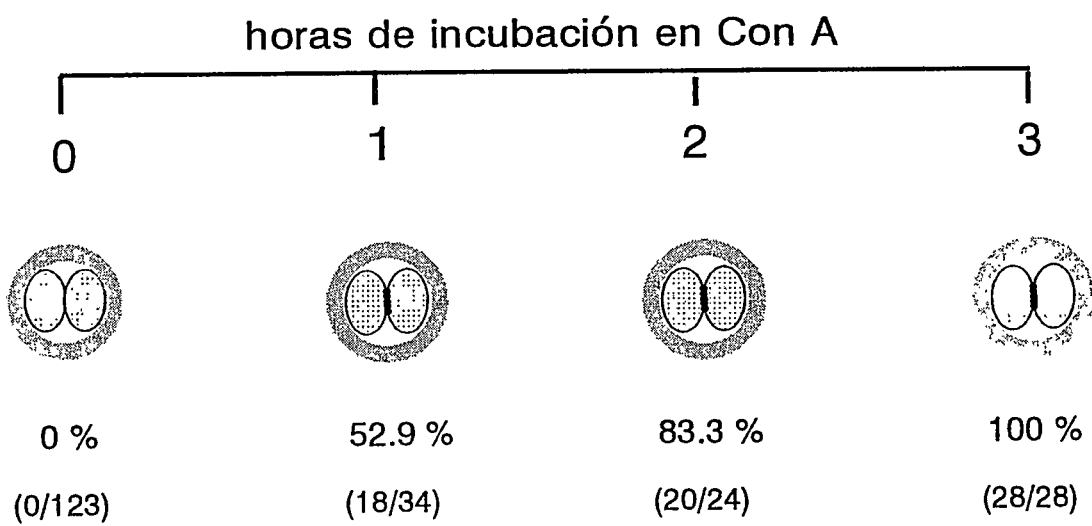


Figura 6

embriones fueron procesados para la detección de 5NUC o FAL. Sin embargo, de preferencia se utilizó la detección de la primera enzima por resultar más reproducible.

3. Determinación de actividad de FAL en embriones de 2 células tratados con lectinas.

Empleando las condiciones señaladas en el punto 2 de esta sección, con las que se obtuvo un 100 % de los embriones regionalizados, se procedió a cuantificar la actividad de FAL a través del microensayo enzimático por fotometría.

Se comparó las actividades de FAL entre embriones de 2 células incubados con lectinas y embriones de 2 células incubados en medio Biggers sin lectinas. No se encontró diferencias en los niveles de actividad enzimática entre ambas condiciones, por lo que el fenómeno de regionalización provocado por Con A (**FIGURA 7**) o WGA (**FIGURA 8**), no aparece asociado a un incremento en la actividad de FAL.

Si la regionalización ocurre como resultado de la activación de

Figura 7

Actividad de FAL en embriones cultivados en presencia de Con A. La actividad es expresada en nmoles de Pi por embrión. Estados de 2 células fueron cultivados durante 3 horas en presencia o ausencia de 700 $\mu\text{g/ml}$ de Con A, e inmediatamente procesados para el ensayo enzimático de FAL. Cada barra representa el promedio de 7 experimentos con su respectiva desviación estándar. Los resultados no muestran diferencias significativas ($p > 0,05$, test de Student).

EFFECTO DE Con A SOBRE LA ACTIVIDAD DE FOSFATASA ALCALINA EN EMBRIONES DE 2 CELULAS

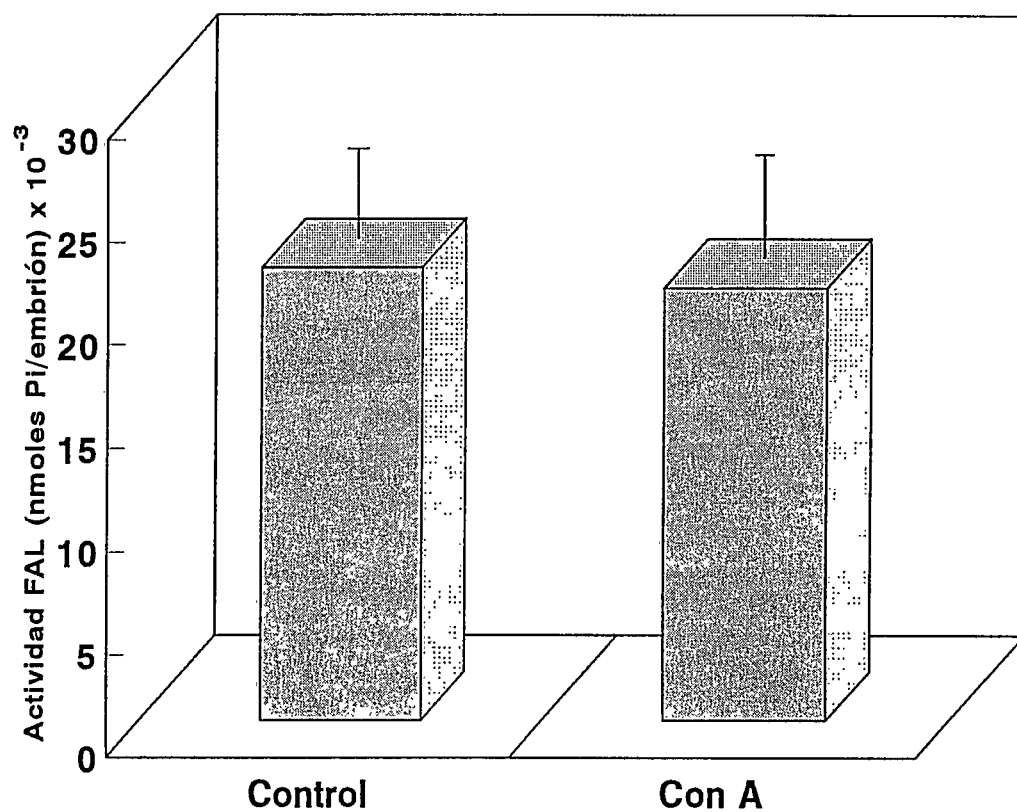


Figura 7

EFFECTO DE WGA SOBRE LA ACTIVIDAD DE FOSFATASA ALCALINA EN EMBRIONES DE 2 CELULAS

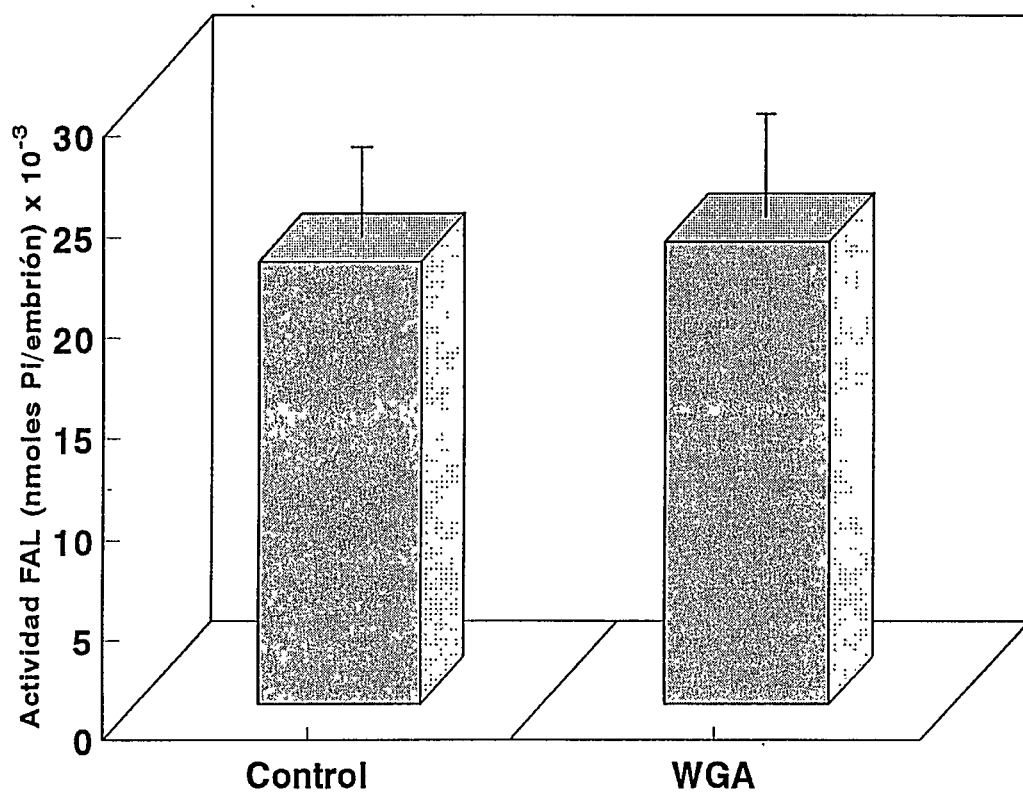


Figura 8

FAL, es preciso descartar un posible efecto inhibitor de las lectinas sobre la actividad de la enzima. Con este propósito se realizó un estudio del tipo dosis-respuesta utilizando embriones de 2 células estimulados con concentraciones crecientes de lectina. Estos embriones se incubaron durante 3 h en presencia de 0, 25, 100, 400 y 800 $\mu\text{g/ml}$ de Con A. Al cuantificar la actividad de FAL por el método enzimático se encontró que ésta permanece constante en las diferentes concentraciones de lectina ensayada y tiene igual magnitud a la registrada en embriones incubados en ausencia de la lectina (FIGURA 9). El mismo resultado se consigue incubando los embriones durante 4 h en presencia de 5, 10, 25 o 50 $\mu\text{g/ml}$ de WGA (FIGURA 10).

Se concluye, por lo tanto, que la regionalización provocada por lectinas y reconocida por los métodos citoquímicos no está asociada a cambios en la actividad de FAL.

Cada una de las determinaciones enzimáticas que se han señalado se repitieron 10 veces, empleando en total sobre 6.000 embriones. El excesivo número de ensayos se debió a lo errático de algunas determinaciones y a la falta de sensibilidad del método enzimático. Por ejemplo, en embriones de 2 células sólo se pudo

Figura 9

Efecto de la concentración de Con A sobre la actividad de FAL en embriones de 2 células. La actividad es expresada en nmoles de Pi por embrión. Estados de 2 células fueron incubados durante 3 horas en diferentes concentraciones de Con A y luego fueron procesados para el ensayo enzimático de FAL. Cada barra representa el promedio de 3 experimentos con su respectiva desviación estándar.

EFFECTO DE LA CONCENTRACION DE Con A SOBRE LA ACTIVIDAD DE FAL

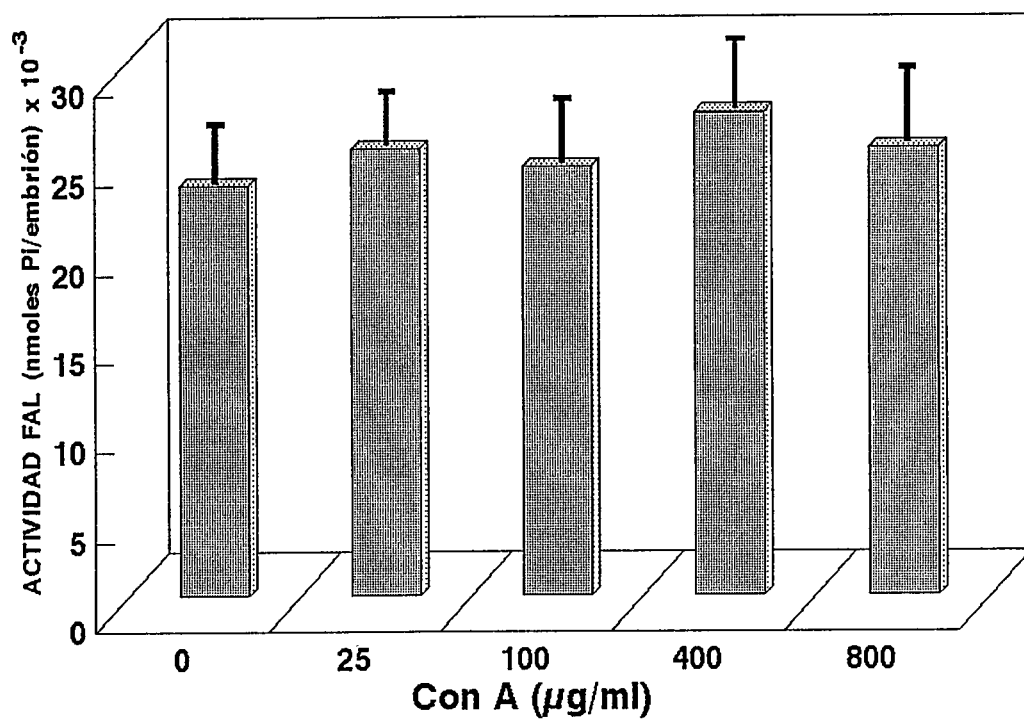


Figura 9

Figura 10

Efecto de la concentración de WGA sobre la actividad de FAL en embriones de 2 células. La actividad es expresada en nmoles de Pi normalizada por *embrión*. Estados de 2 células fueron cultivados durante 4 horas en 0, 10, 25 o 50 $\mu\text{g/ml}$ de WGA y luego procesados para el ensayo enzimático de FAL. Cada barra representa el promedio de 3 experimentos con su respectiva desviación estándar.

EFFECTO DE LA CONCENTRACION DE WGA SOBRE LA ACTIVIDAD DE FAL

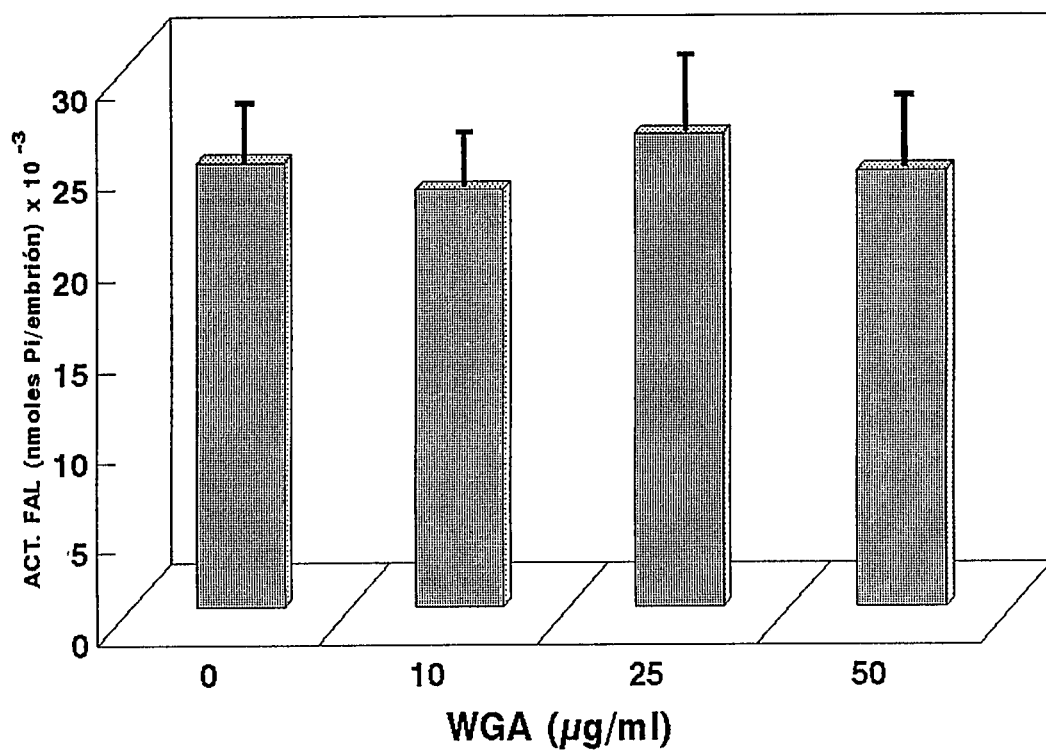


Figura 10

UNITED STATES DEPARTMENT OF JUSTICE
FEDERAL BUREAU OF INVESTIGATION



ASST. DIR.

IDENT. DIV.

registrar la cantidad de producto acumulado después de por lo menos 20 h de reacción, por lo que se desconocía la velocidad de la reacción y la forma como esta progresaba. Esto aconsejó desarrollar un nuevo ensayo enzimático para soslayar estas dificultades y obtener resultados más confiables.

4. **Microensayo enzimático de alta sensibilidad para cuantificar la actividad de FAL.**

Para fijar la concentración de sustrato en este ensayo y asegurar condiciones de trabajo en torno a la velocidad máxima de la enzima se debió determinar la constante de disociación (K_m) de FAL de los embriones. La FAL extraída de los embriones se dividió en 4 fracciones iguales que se utilizaron en las determinaciones de velocidad inicial (v), empleando un rango de concentraciones de sustrato entre 0.1 - 20 μM . La **FIGURA 11 A** muestra una gráfica Michaeliana de los resultados, donde la saturación de la enzima se alcanzó a concentraciones de FDP de 5 μM . A partir de esta representación se confeccionó un gráfico doble recíproco (Lineweaver-Burk), como se muestra en la **FIGURA 11 B**, a partir del cual se estimó una K_m de 1 μM para FAL de embriones. Por problemas de disponibilidad de

Figura 11

Determinación de la K_m para FAL en embriones preimplantacionales usando FDP como sustrato.

- A. Representación michaeliana mostrando el gráfico de saturación para FAL a diferentes concentraciones de sustrato.
- B. Gráfico Lineweaver-Burk que relaciona los valores recíprocos de velocidad y concentración de sustrato a partir del cual se estimó la K_m .

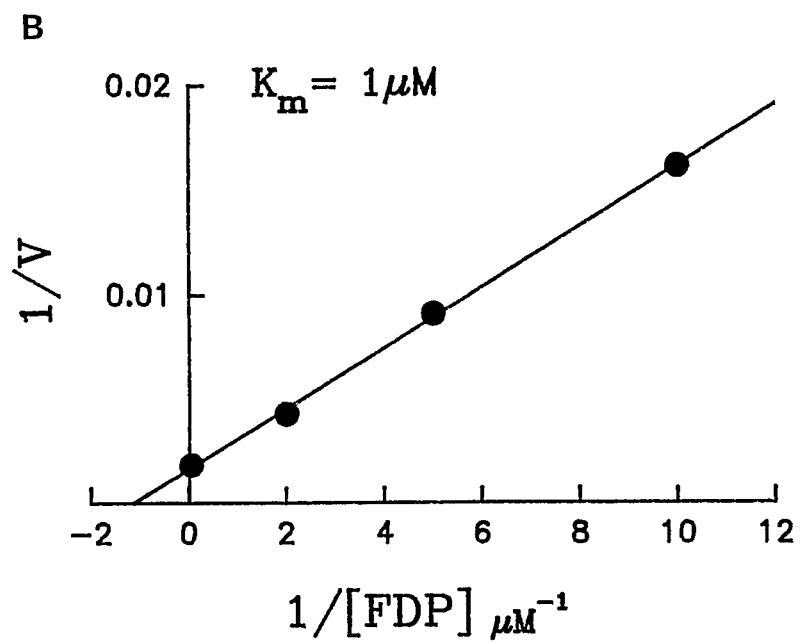
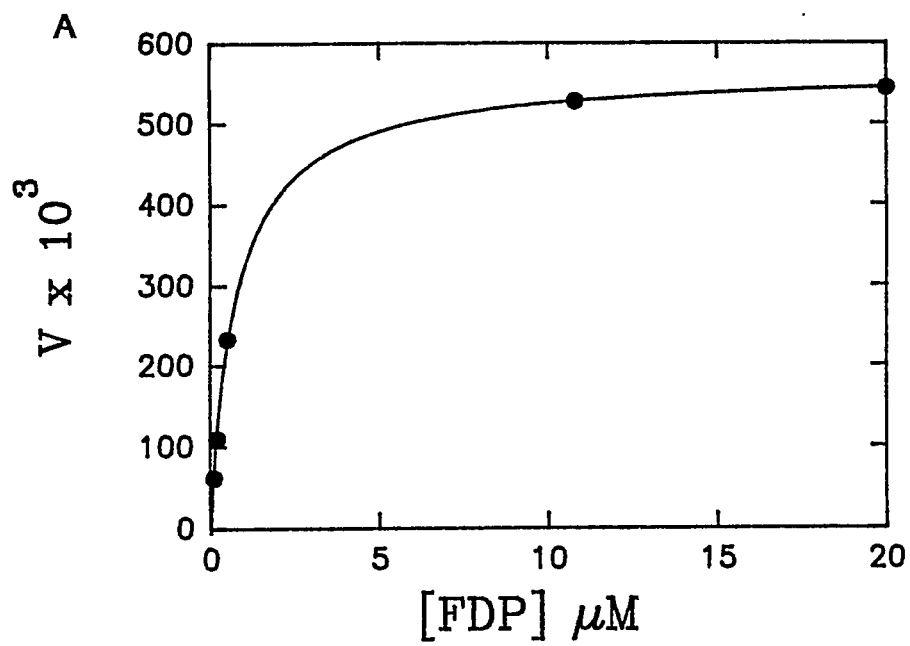
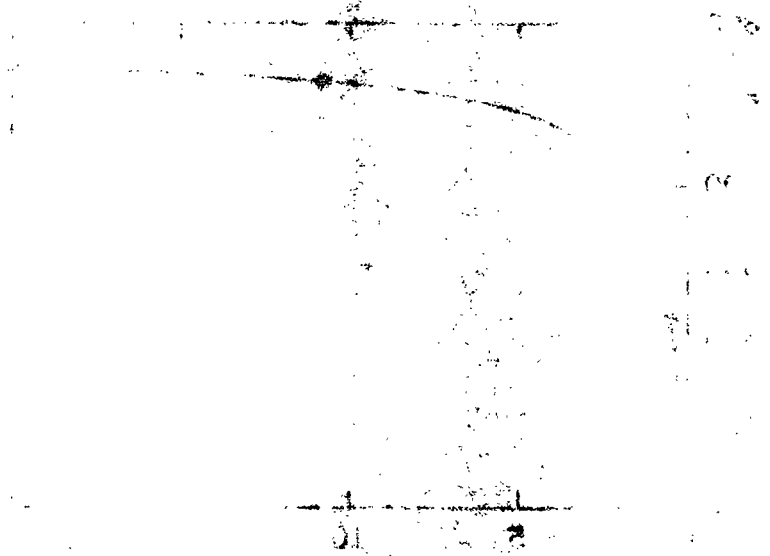
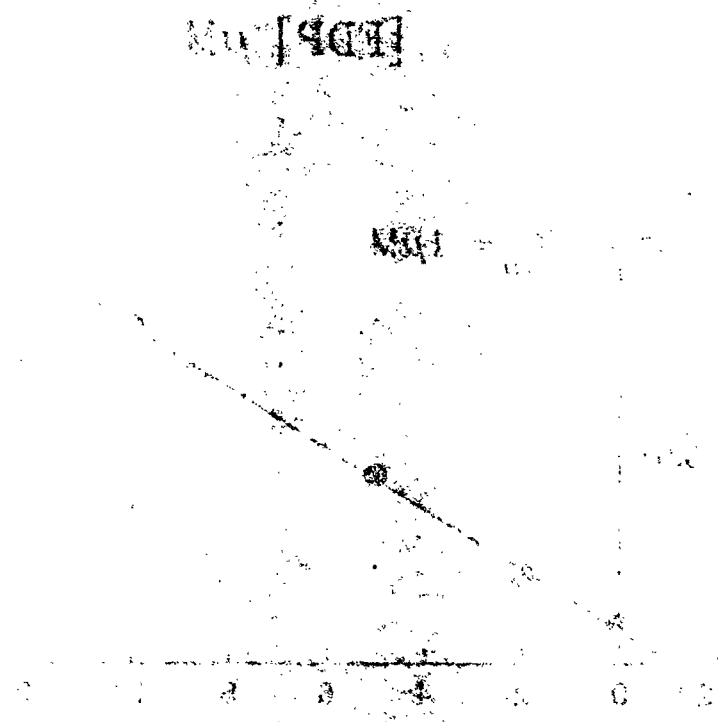


Figura 11



A



B

material no se pudo realizar réplicas de cada punto, sin embargo, se efectuaron al menos tres experimentos independientes que arrojaron una K_m entre 1 - 2 μM . Lo anterior aconsejó fijar la concentración del sustrato en 20 μM .

Aplicando este ensayo enzimático por fluorimetría a embriones de 2 células, que son los que presentan los menores niveles de actividad de FAL, se pudo obtener registros claros de la acumulación de producto en no más de 20 a 40 minutos, como se muestra en la **FIGURA 12**.

Para estudiar lo que ocurre con la actividad de FAL durante el desarrollo inicial, embriones de diferentes estados del desarrollo se extrajeron con el detergente NP-40 y sus sobrenadantes, que contienen la enzima soluble, se emplearon en las determinaciones enzimáticas. Estos ensayos confirmaron las observaciones hechas con el primer método, en cuanto a que la actividad de FAL se detecta desde el estado de 2 células, mostrando un perfil exponencial de aumento en estados más avanzados (**FIGURA 13**). También se verificó un aumento sostenido de la actividad de FAL en función de la edad del embrión de cada estado, con la excepción de los embriones de 2 células, en donde la magnitud de la actividad de FAL no experimentó cambios

Figura 12

Registro temporal del producto generado por la hidrólisis enzimática de FDP por la reacción de FAL en 100 embriones de 2 células. La línea recta representa la regresión lineal del registro.

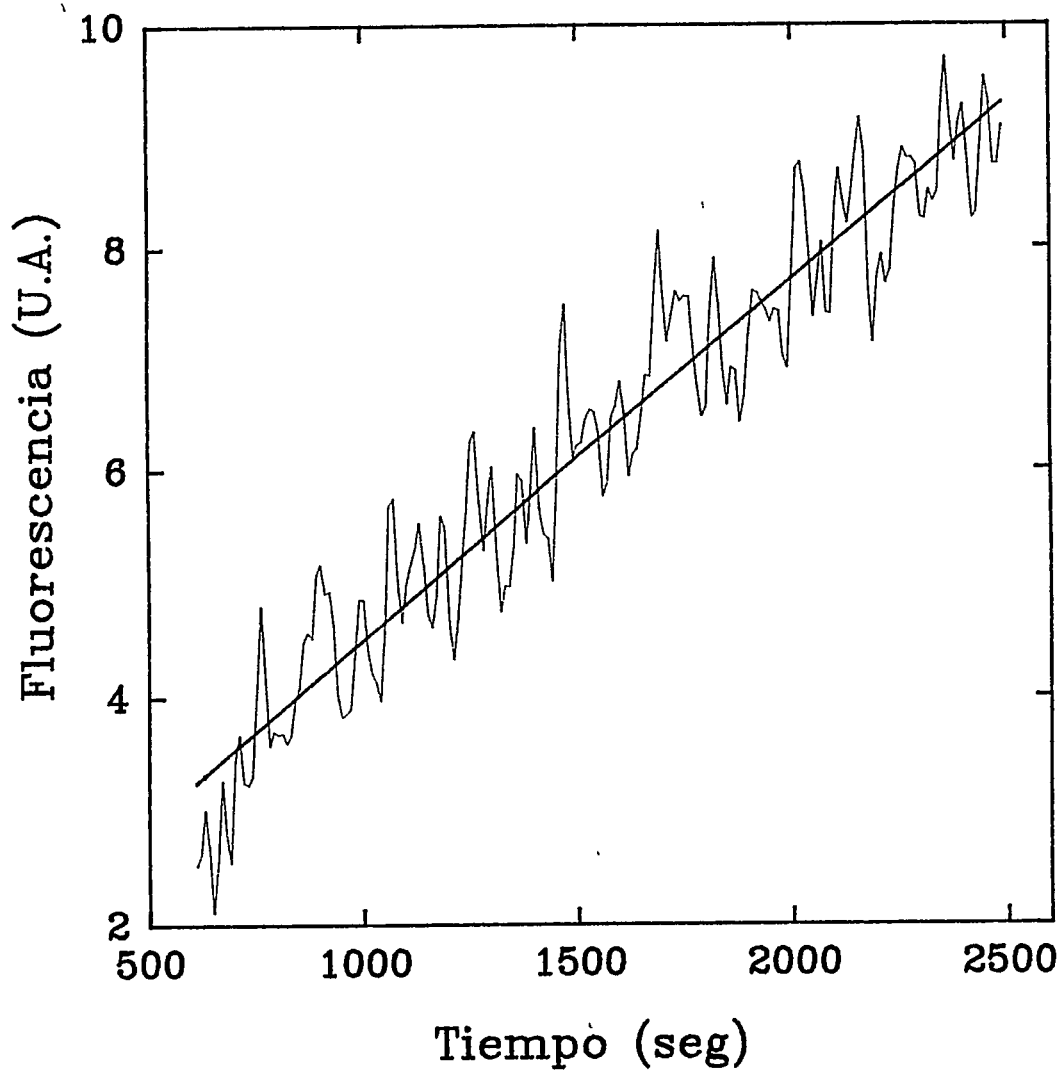


Figura 12

Figura 13

Actividad de FAL durante el desarrollo preimplantacional del ratón. La actividad es expresada en Unidades arbitrarias de Fluorescencia (UF) y normalizada por segundo y por embrión. Estado de 2 células (46 h post hCG), estado de 4 células (53 h post hCG), mórula (72 h post hCG) y blastocisto (96 h post hCG). Cada barra representa el promedio de 3 experimentos con su respectiva desviación estándar. El inserto muestra la actividad amplificada de FAL de los embriones de 2 y 4 células.

ACTIVIDAD DE FAL DURANTE EL DESARROLLO PREIMPLANTACIONAL

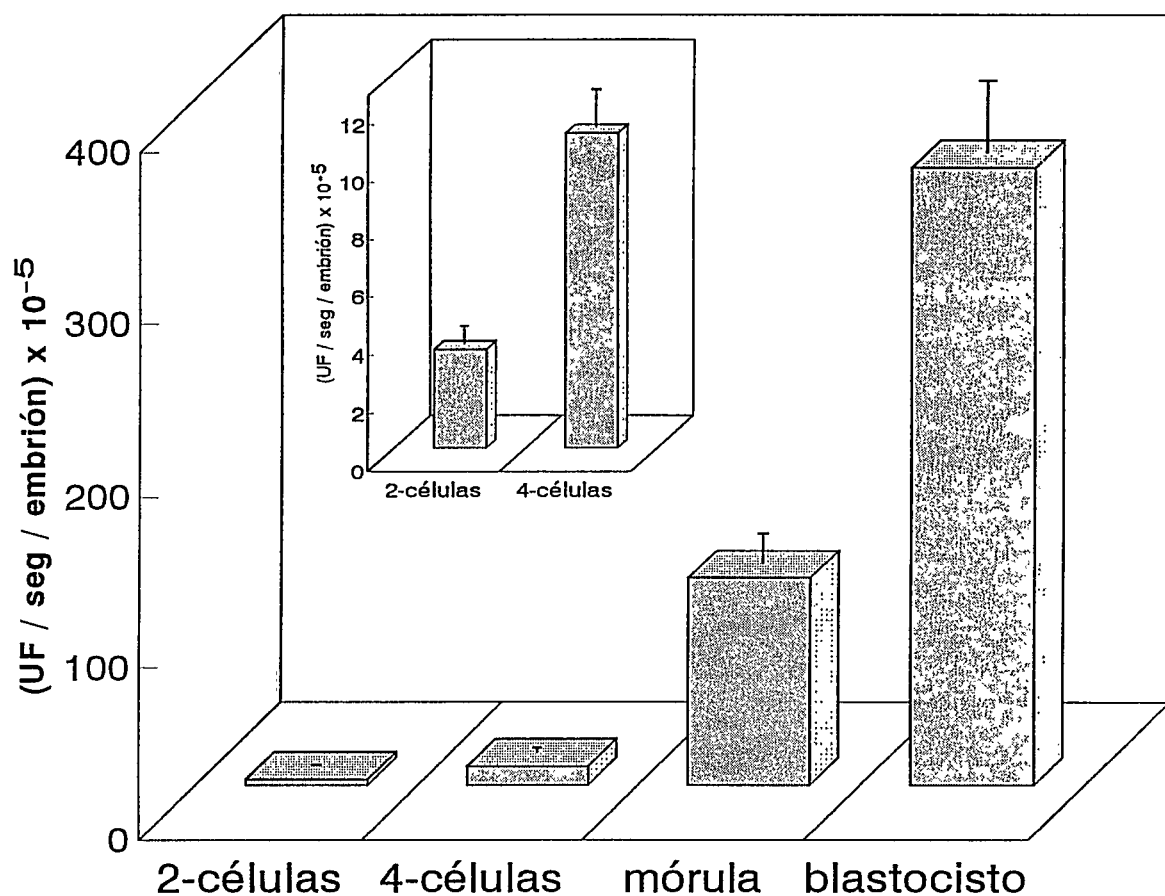
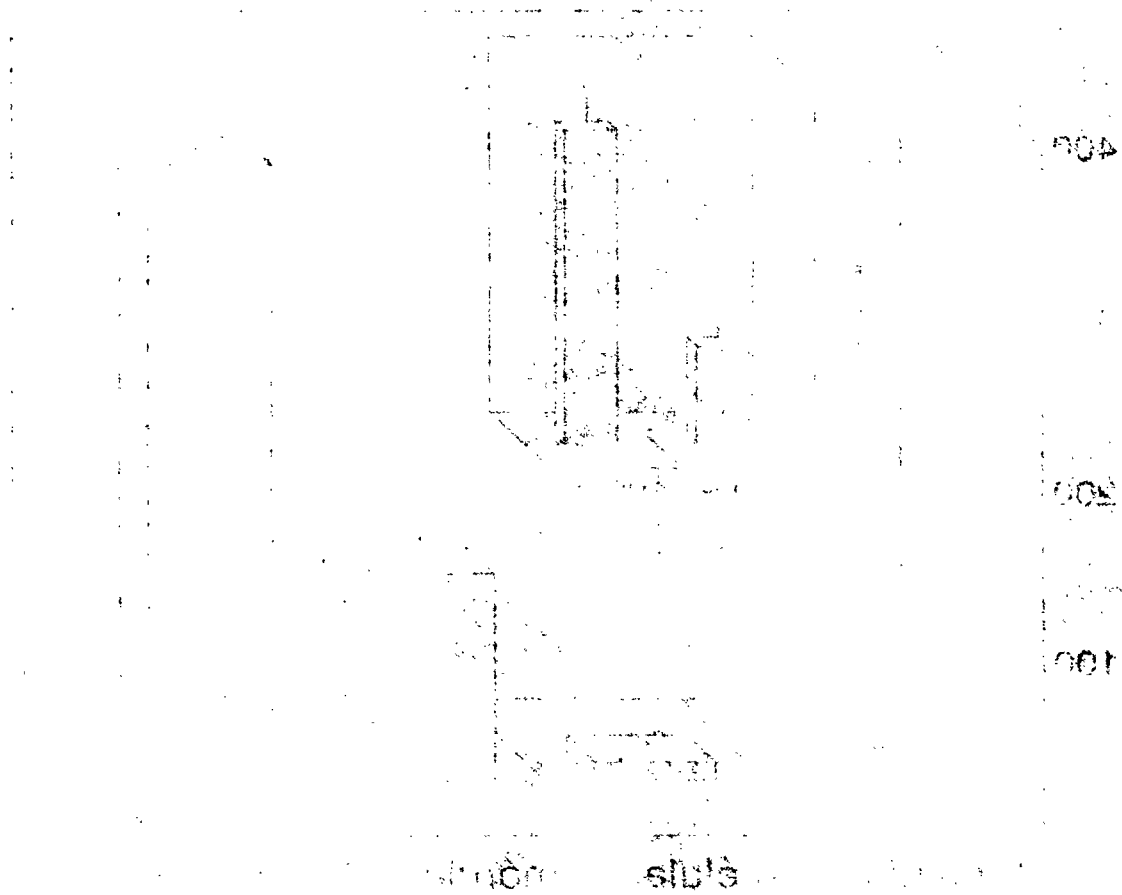


Figura 13

DEPARTMENT OF AGRICULTURE
BUREAU OF PLANT INDUSTRY



100

significativos entre estados tempranos y tardíos.

5. Aplicación del ensayo enzimático por fluorometría para medir la actividad de FAL en embriones de 2 células regionalizados por efecto de lectinas.

El nuevo ensayo enzimático desarrollado para FAL posee las condiciones deseadas de sensibilidad y reproducibilidad (véase discusión) para asegurar determinaciones precisas de la actividad de FAL, más aún tratándose de estados tempranos del desarrollo inicial. Por esto, se consideró indispensable repetir la serie experimental señalada en el punto 3 de esta sección, en donde se compara los niveles de actividad enzimática entre estados de 2 células no regionalizados y regionalizados por efecto de las lectinas.

Se probaron las lectinas Con A y WGA por tiempos y concentraciones que permitían la regionalización del 100 % de los embriones, como se indica en el punto 2 de esta sección. Los resultados confirmaron que los efectos de Con A (FIGURA 14) o WGA (FIGURA 15) sobre el proceso de regionalización no se acompañan de cambios en la magnitud de la actividad de FAL.

Figura 14

Actividad de FAL en embriones de 2 células cultivados en presencia o ausencia de Con A. La actividad es expresada en Unidades arbitrarias de Fluorescencia (UF) por segundo y por embrión. Estados de 2 células fueron cultivados durante 3 horas en presencia o en ausencia de 700 $\mu\text{g/ml}$ de Con A e inmediatamente procesados para el ensayo enzimático de FAL. Cada barra representa el promedio de 3 experimentos con su respectiva desviación estandar. Los resultados no muestran diferencias significativas ($p > 0,05$) con la prueba no paramétrica de Mann-Whitney's.

EFFECTO DE Con A SOBRE LA ACTIVIDAD DE FAL EN EMBRIONES DE 2 CELULAS

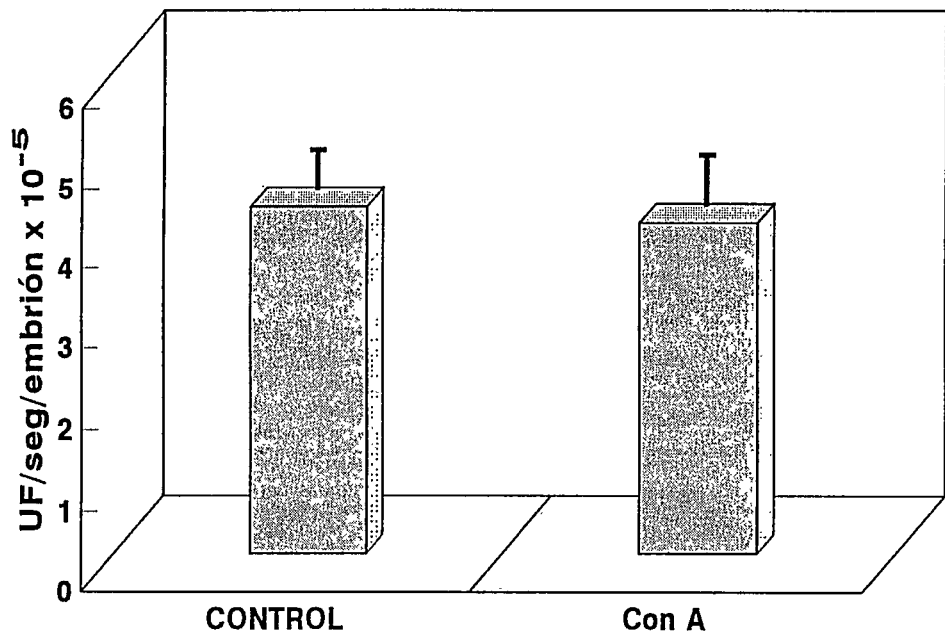


Figura 14

Figura 15

Actividad de FAL en embriones de 2 células cultivados en presencia o ausencia de WGA. La actividad es expresada en Unidades arbitrarias de Fluorescencia (UF) y normalizada por segundo y por embrión. Estados de 2 células fueron cultivados durante 4 horas en presencia o ausencia de 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de WGA e inmediatamente procesados para el ensayo enzimático de FAL. Cada barra representa el promedio de 3 experimentos con su respectiva desviación estándar. Los resultados no muestran diferencias significativas ($p > 0,05$) con la prueba no paramétrica de Mann-Whitney's.

EFECTO DE WGA SOBRE LA ACTIVIDAD DE FAL EN EMBRIONES DE 2 CELULAS

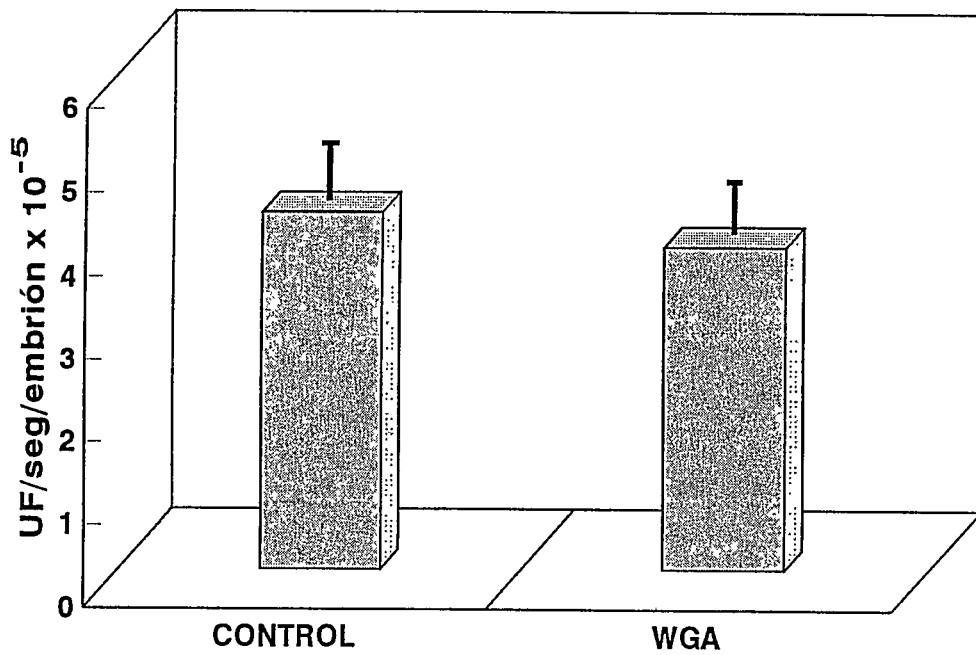
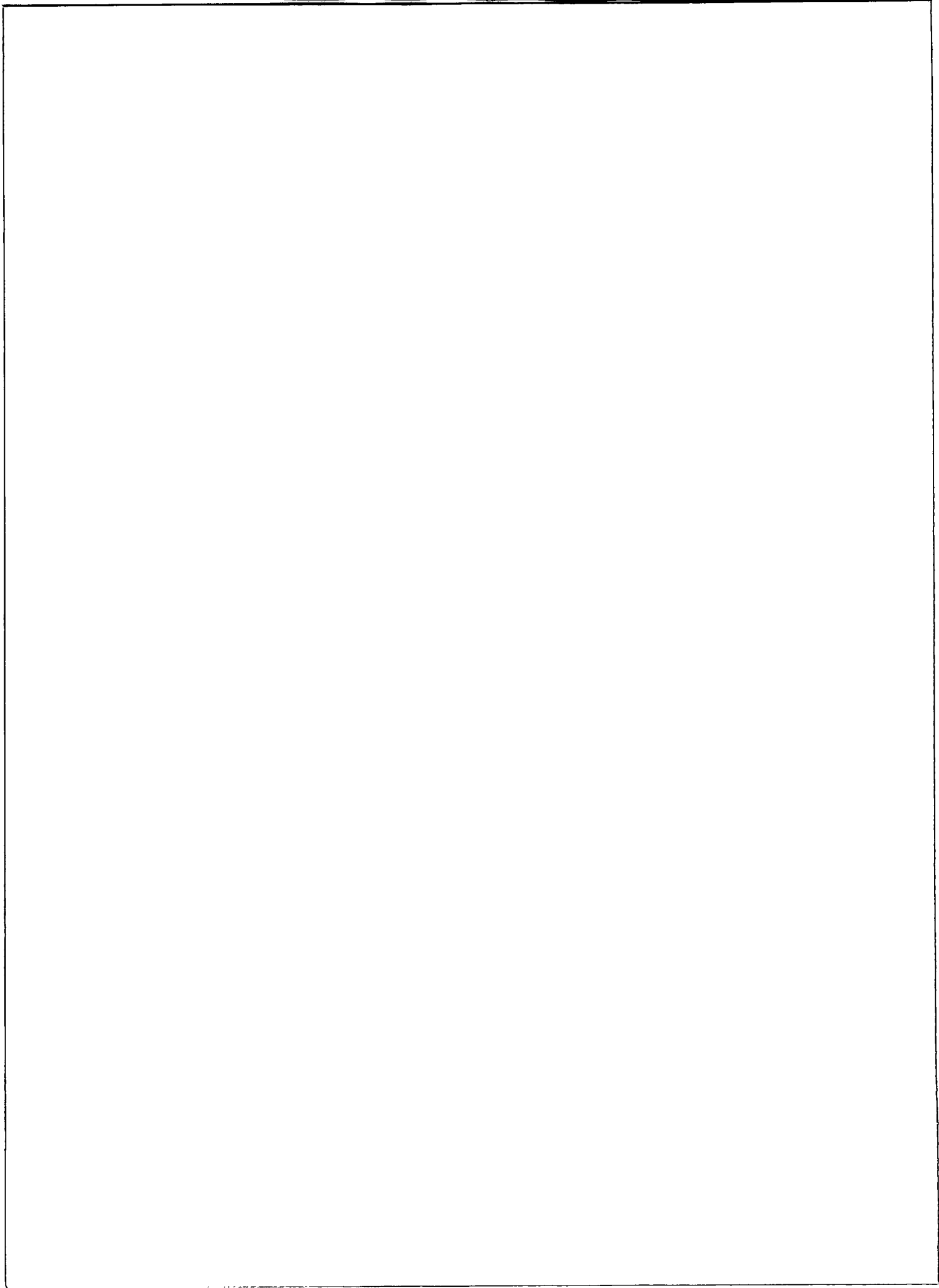


Figura 15

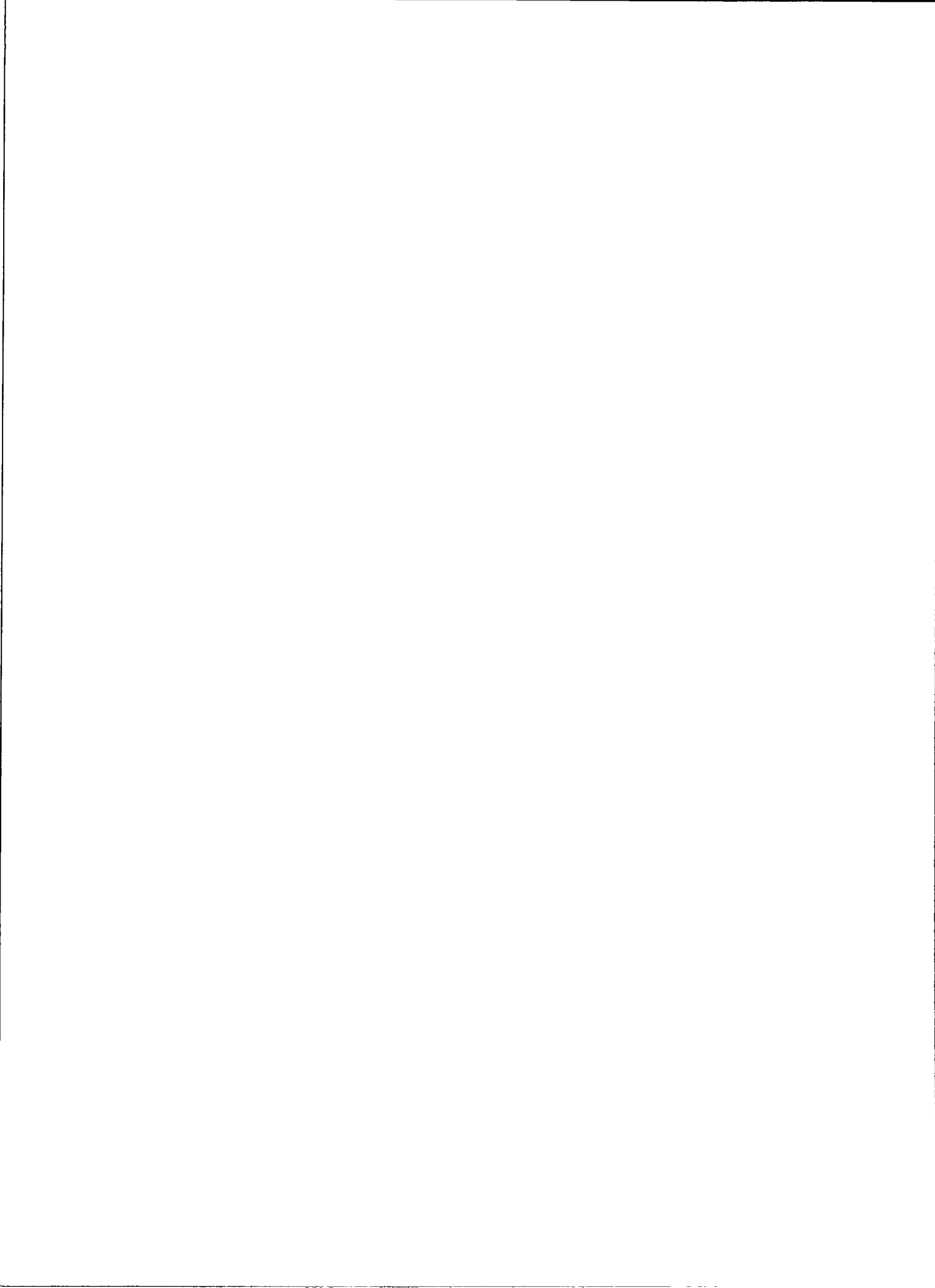


En síntesis, la actividad de FAL en embriones de 2 células permanece constante aún cuando la enzima se detecte por los métodos citoquímicos en las zonas de contacto celular luego de inducir la regionalización con lectinas. En otras palabras, la cantidad de enzima sería la misma ya sea si ésta es difusa o localizada. Se sugiere, por tanto, que el proceso de regionalización se establecería por cambios en la distribución de la enzima y no de su concentración o actividad relativa.

Cada una de las series experimentales realizadas con este nuevo método enzimático se repitieron 3 veces, empleando un total de alrededor de 3.000 embriones.

6. Localización subcelular de la actividad de FAL en embriones preimplantacionales.

En el estado de 2 células el nivel de actividad de FAL no es alterado al provocar regionalización con lectinas, lo cual podría indicar que el fenómeno en cuestión se debería a un cambio en la localización de FAL. Si esto fuese correcto, se podrían plantear dos alternativas para explicar la aparición de actividad de FAL en las zonas de contacto



celular: (1) la enzima se trasladaría directamente desde el citoplasma a la membrana de la zona de contacto y, (2) la enzima se desplazaría en el plano de la membrana para más tarde concentrarse en la región del contacto celular.

Para determinar donde se localiza la enzima, antes que ésta aparezca en las zonas de aposición celular, se midió la actividad de FAL en la fracción citosólica y de membrana de los embriones. Para esto se tomaron grupos de 300 embriones de 2 células que se homogeneizaron y centrifugaron, separando el sobrenadante (fracción citosólica) del sedimento (fracción de membrana). Posteriormente, en ambas fracciones se midió la actividad de FAL empleando el microensayo enzimático por fluorimetría, previa recuperación con detergente del contenido soluble de la fracción de membrana. Como se muestra en la **FIGURA 16** la fracción de membrana concentra cerca del 95 % de la actividad total de FAL presente en embriones de 2 células. En tanto, en la fracción citosólica la actividad de la enzima es despreciable y no varía significativamente al ser tratada con detergente.

En resumen, estos resultados sugieren que la fracción citosólica no contribuiría a la actividad de FAL registrada en embriones de 2 células,

Figura 16

Localización subcelular de la actividad de FAL en embriones. Los embriones fueron homogeneizados y separados en dos fracciones (sedimento y sobrenadante). El sedimento fue tratado con 0.1 % NP-40 y el sobrenadante fue tratado con o sin 0.1 % de NP-40. Como control de la actividad total recuperada se extrajo FAL de una población equivalente de embriones. La actividad fue expresada como porcentaje del total recuperado en embriones tratados con NP-40. Cada barra representa el promedio de 3 experimentos con su respectiva desviación estándar. La actividad de FAL se concentra en la fracción de membranas (sedimento + NP40) y no en la fracción citosólica.

LOCALIZACION SUBCELULAR DE LA ACTIVIDAD DE FOSFATASA ALCALINA

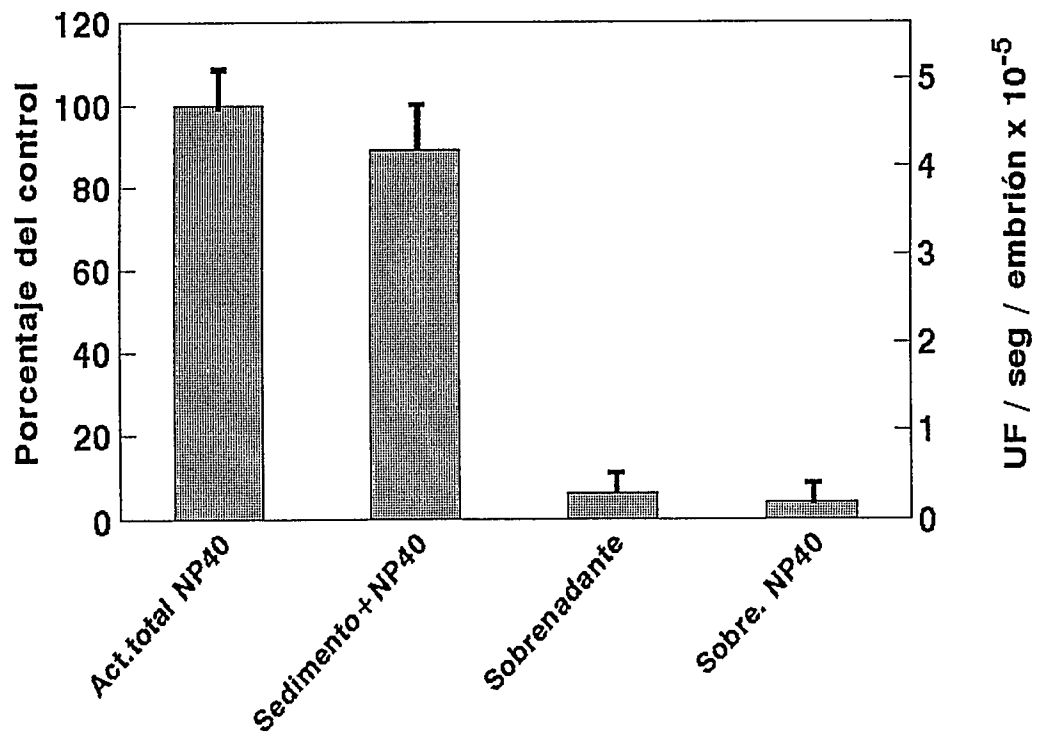
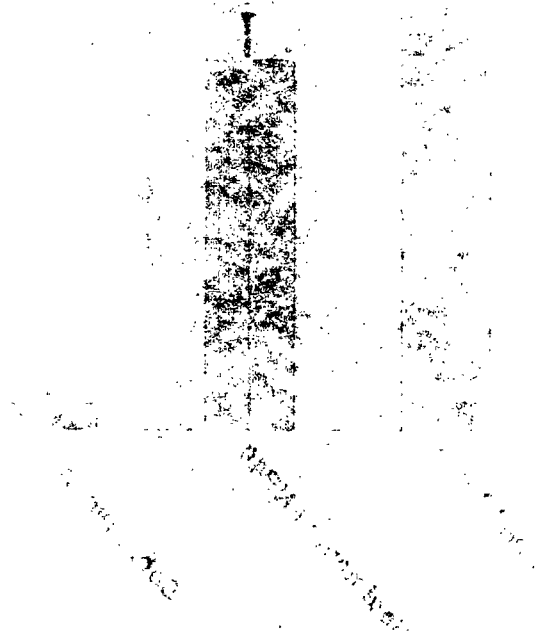


Figura 16

THE UNIVERSITY OF CHICAGO LIBRARY
1207 EAST 58TH STREET, CHICAGO, ILL. 60637

100-100000-100



LIBRARY

siendo la fracción de membranas el asiento de dicha actividad. Tampoco parece probable que el detergente desenmascare actividad enzimática críptica, aunque es necesario demostrar que su acción no afecta la actividad de FAL, ya sea activando o inactivando la enzima.

7. Efecto del detergente Nonidet P-40 sobre la actividad de FAL de embriones.

En un comienzo se intentó determinar la actividad de FAL en embriones completos u homogeneizados en ausencia de agentes de extracción (solubilización). Sin embargo, en estas condiciones no se pudo medir la actividad de FAL pues la acumulación de producto en el tiempo no mostró un registro lineal. Esto se debió a que la enzima estaba contenida en embriones intactos o fragmentos, que por densidad decantaban en el fondo de la cubeta provocando hidrólisis local del sustrato y por consiguiente una distribución no uniforme del producto. Para evitar este problema se resolvió leer la emisión de fluorescencia cada 5 min manteniendo, en los intervalos, un sistema de agitación continua. Sin embargo, aún así persistió la interferencia (ruido en el registro) debido a la circulación de partículas densas provenientes de fragmentos embriónicos. La única forma de evitar estos inconvenientes

... ..
... ..
... ..
... ..

... ..

... ..

... ..

... ..

... ..

... ..

... ..

... ..

... ..

... ..

... ..

... ..

... ..

... ..

fué la obtención de la enzima en forma soluble mediante el detergente NP-40.

Sin embargo, antes de validar el uso del detergente como agente de extracción se debió evaluar su efecto sobre la actividad de la enzima. Para esto FAL se extrajo de embriones empleando la enzima PI-PLC, que ataca específicamente el tallo glicofosfolipídico a través del cual FAL se ancla a la membrana (Low, 1987). Luego del tratamiento con PI-PLC se recuperó la fracción sobrenadante con la FAL solubilizada. Esta fracción se dividió en partes iguales y una de ellas se trató con la misma concentración de detergente que se utilizó para extraer la enzima de los embriones. El ensayo enzimático con y sin detergente no muestra diferencias en los niveles de actividad de FAL (FIGURA 17). Por lo tanto, estos resultados demuestran que el protocolo de extracción que se utilizó para obtener FAL en forma soluble fué el adecuado.

8. Efecto de cicloheximida sobre la actividad de FAL en estados de 2 células cultivados con Con A.

La regionalización promovida por lectinas ocurre sin

Figura 17

Efecto del detergente NP-40 sobre la actividad de FAL. FAL fue solubilizada de los embriones con PI-PLC y la actividad determinada en presencia (+) o en ausencia (-) de NP-40. La actividad es expresada en Unidades arbitrarias de Fluorescencia (UF) por segundo. Cada barra representa el promedio de 3 experimentos con su respectiva desviación estándar. Los resultados no muestran diferencias significativas ($p > 0,05$, Mann-Whitney's).

EFFECTO DE NP-40 SOBRE LA ACTIVIDAD DE FAL SOLUBILIZADA CON FOSFOLIPASA C

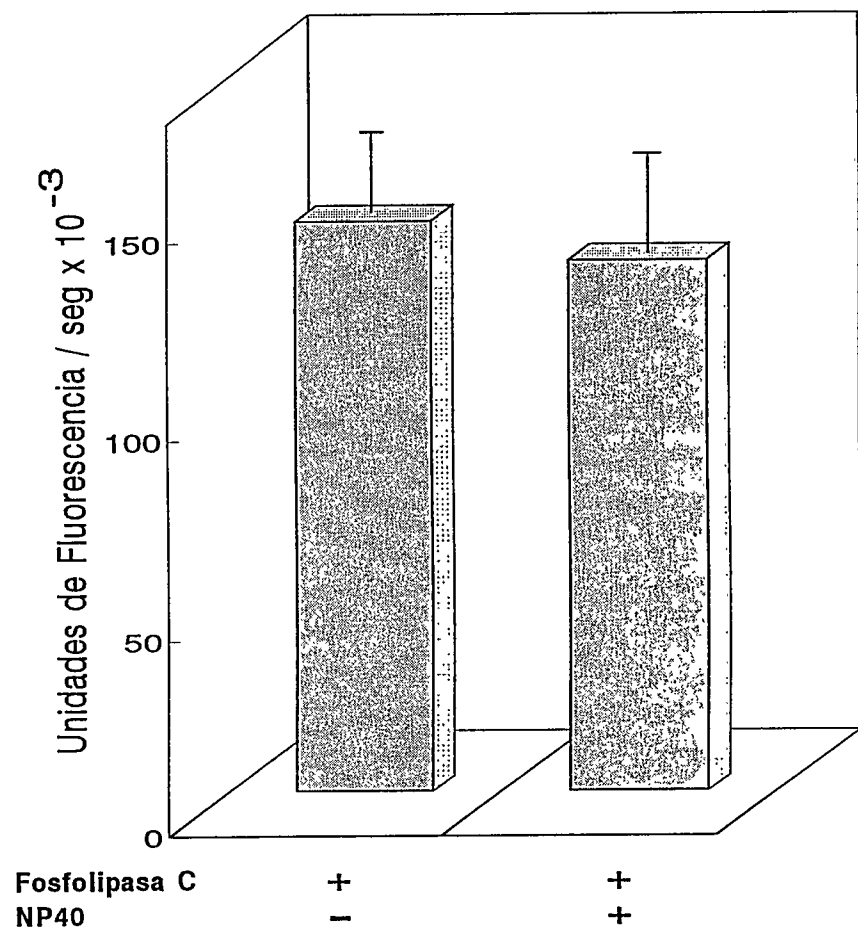
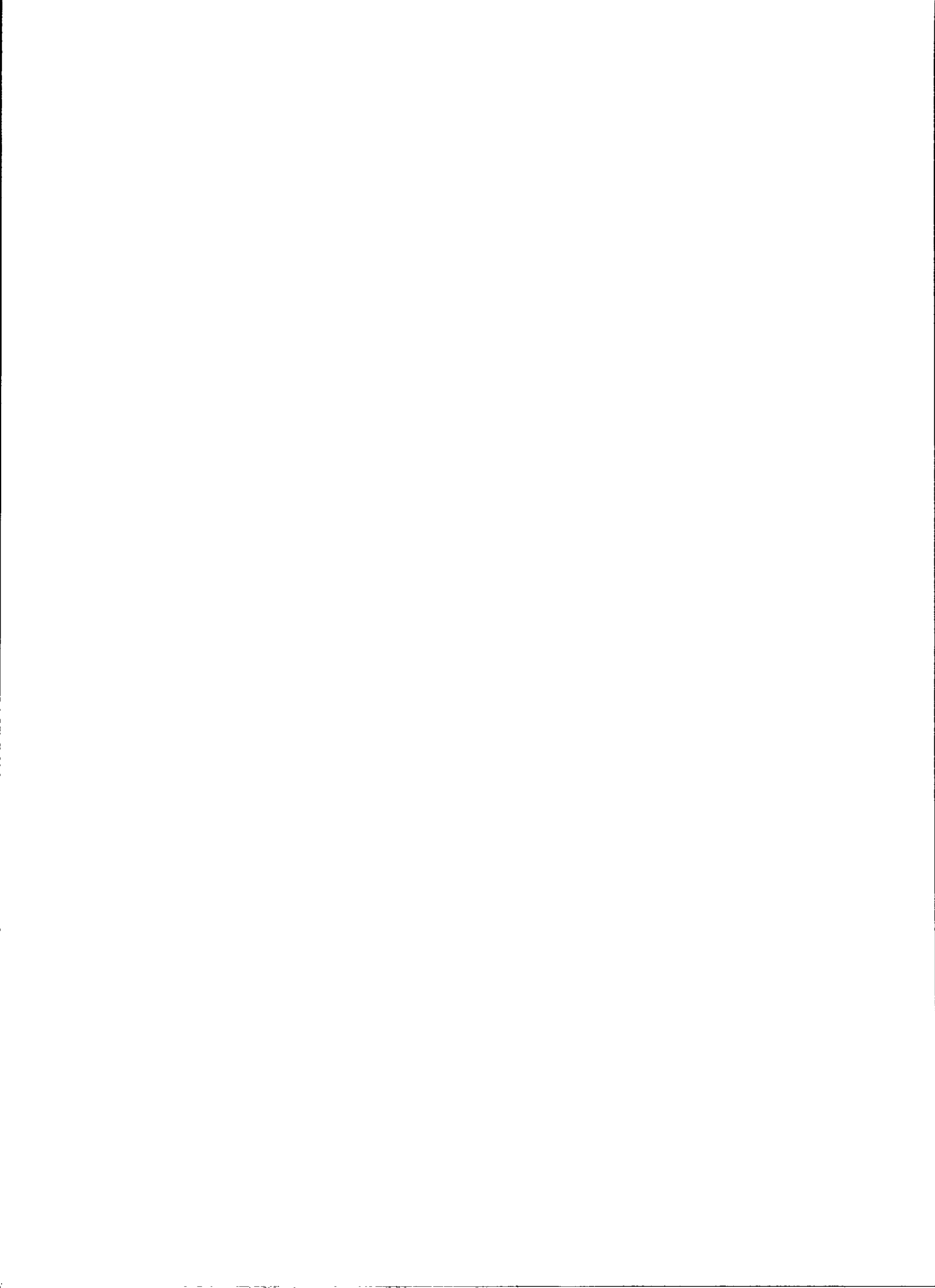


Figura 17



variaciones en la magnitud de la actividad de FAL, sin embargo, esto no excluye la posibilidad que dicho fenómeno sea total o parcialmente dependiente de la síntesis de proteínas. Por tal motivo se estudió el efecto que tiene inhibir la síntesis de proteínas sobre la actividad de FAL cuando la regionalización se induce con lectinas. Para éstos embriones de 2 células se preincubaron con el inhibidor de la síntesis de proteínas cicloheximida y luego se cultivaron por un tiempo adicional en conjunto con la lectina Con A, en las condiciones en que ésta produce un 100 % de regionalización de los embriones. En los controles se omitió Cicloheximida y/o lectinas.

Los embriones cuya síntesis de proteínas se inhibió durante el cultivo con la lectina mostraron los mismos niveles de actividad de FAL que el grupo tratado sólo con la lectina o cultivado en medio Biggers sin cicloheximida y lectina (**FIGURA 18**). Por lo tanto, un proceso de síntesis de proteínas no parece estar operando en el establecimiento o inicio de la regionalización.

Figura 18

Actividad de FAL en embriones de 2 células cultivados en presencia de Con A, en condiciones de inhibición de la síntesis de proteínas. La actividad es expresada en Unidades arbitrarias de Fluorescencia (UF) por segundo y por embrión. Estados de 2 células pre-incubados por 1 hora en presencia o ausencia de CHX (50 $\mu\text{g/ml}$) y posteriormente cultivados durante 3 horas en cicloheximida (CHX) en presencia o ausencia de Con A (700 $\mu\text{g/ml}$). Cada barra representa el promedio de 3 experimentos con su respectiva desviación estándar.

EFFECTO DE CICLOHEXIMIDA (CHX) EN LA REGIONALIZACION DE EMBRIONES INDUCIDA POR LECTINAS

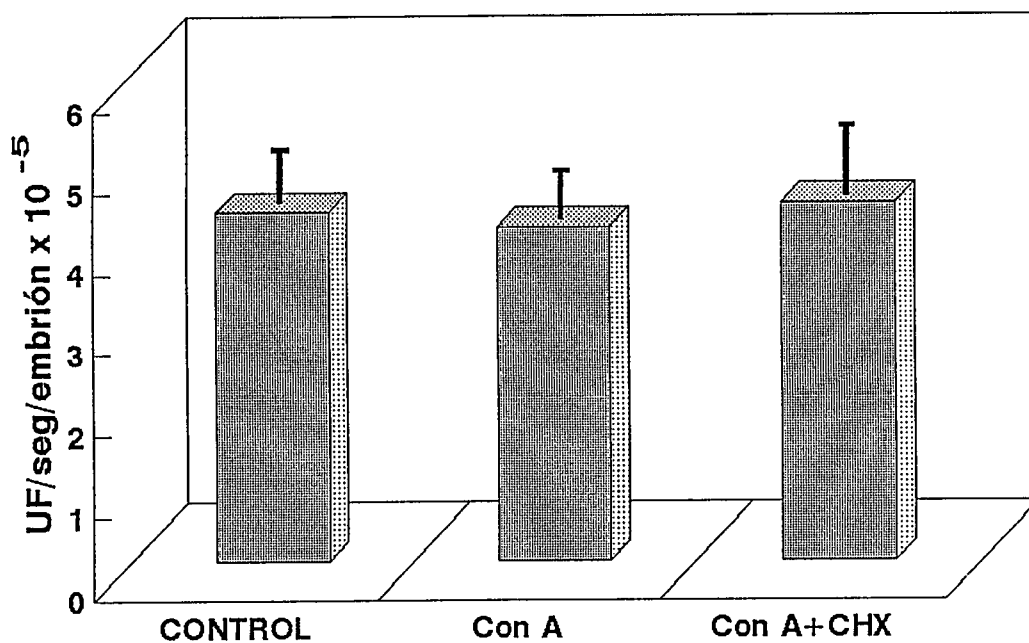


Figura 18

THE UNIVERSITY OF CHICAGO

DEPARTMENT OF CHEMISTRY

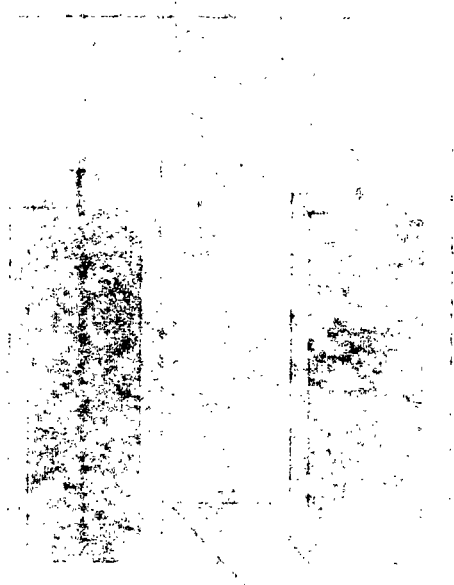


Figure 1

1954

9. **Distribución de receptores sacaridos comprometidos en la regionalización inducida por lectinas**

La naturaleza polivalente de las lectinas podría promover fenómenos de agregación y/o "capping" de las moléculas de superficie. De esta forma se podría explicar por que la enzima dispersa se regionaliza y este proceso ocurre sin cambios en la cantidad o actividad de FAL. En tal caso el fenómeno estudiado sería consecuencia de un artificio y no de una respuesta celular por parte del embrión. Para analizar esta alternativa, se estudió la distribución de los receptores de superficie sacáridos empleando las lectinas Con A y WGA conjugadas a FITC.

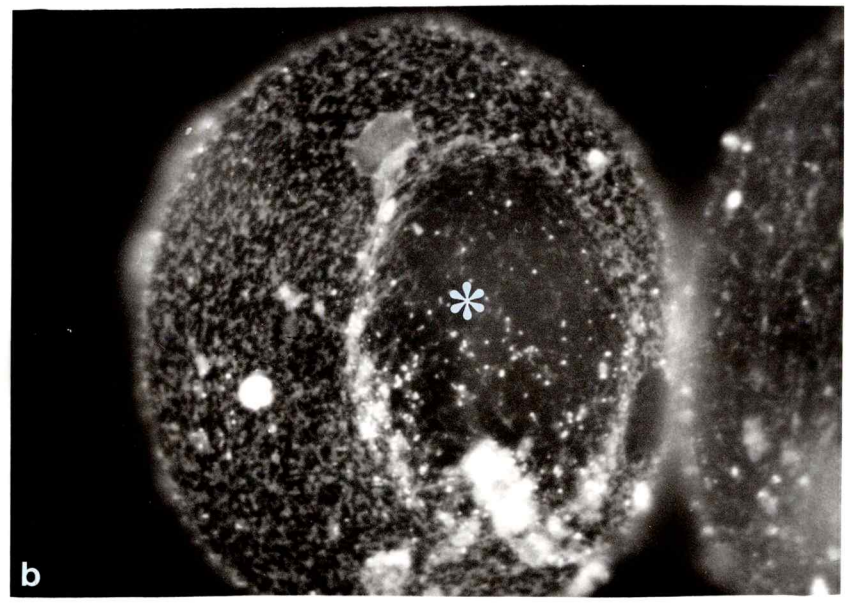
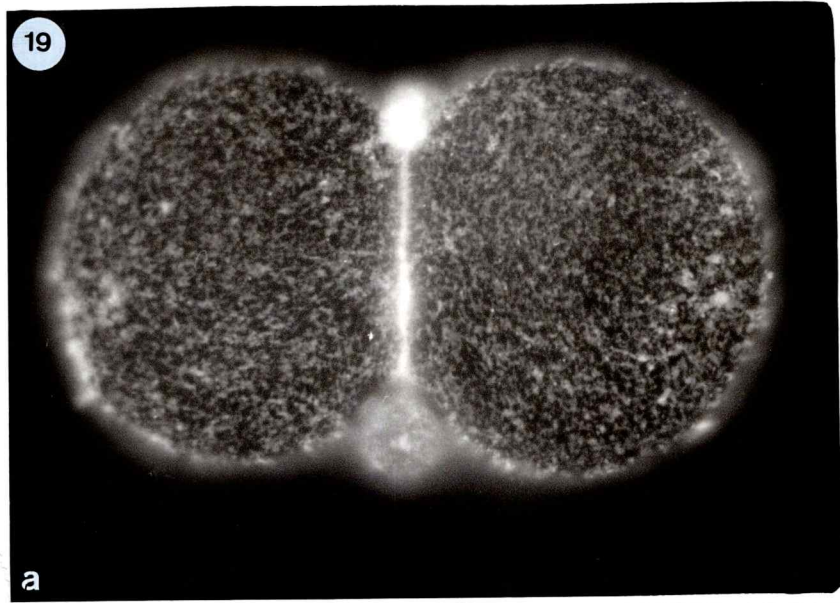
En la **FIGURA 19 a** se muestra la marca fluorescente dejada por la lectina Con A en la superficie de embriones de 2 células. Se aprecia una distribución uniforme de la marca sin señales de aglutinación de los antígenos o receptores sacáridos reconocidos por las lectinas. La mayor intensidad de marca que se observa en la región de unión entre los blastómeros se debe a la superposición de membranas en esta zona, pues al disociar los blastómeros y exponer las superficies de contacto ésta propiedad ya no es evidente (**FIGURA 19 b**). El mismo

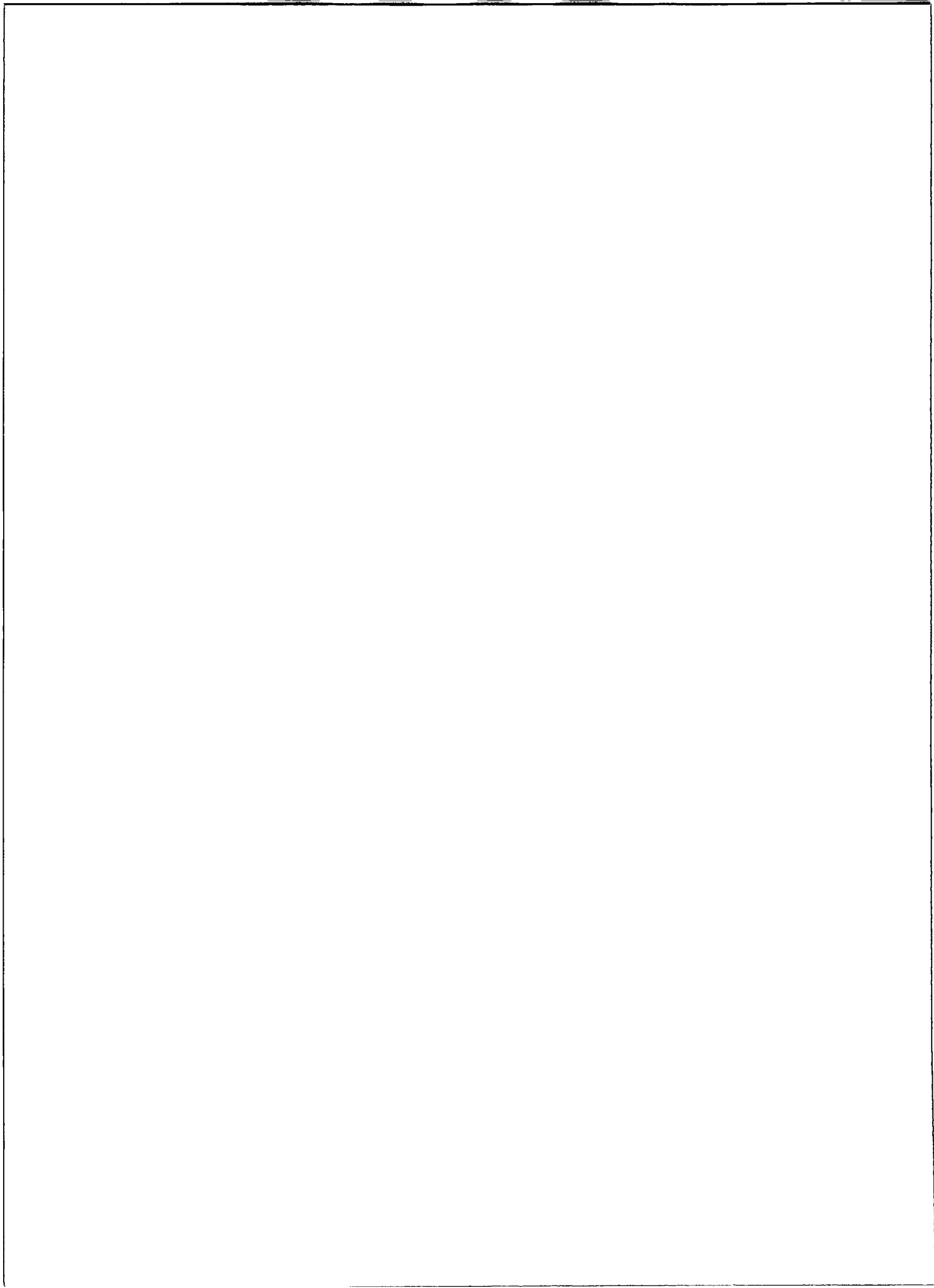
Figura 19

Distribución de residuos sacáridos en la superficie de embriones de 2 células.

a) embrión incubado con 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de Con A-FITC durante 1 hora, luego de fijación con paraformaldehído. 1312 x.

b) blastómero de un embrión que fue desagregado, luego de haber sido fijado e incubado con 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de WGA-FITC durante 1 hora. Obsérvese la zona de contacto con marca fluorescente tenue (asterisco). Además, es posible reconocer el límite de la zona de contacto por la presencia de marca inespecífica retenida. 1875 x.





patrón uniforme de marca se encontró con WGA. El único estado del desarrollo que mostró signos manifiestos de polaridad en la superficie celular fue el de compactación, cuando la marca fluorescente aparece concentrada en las superficies expuestas de las células (FIGURA 20).

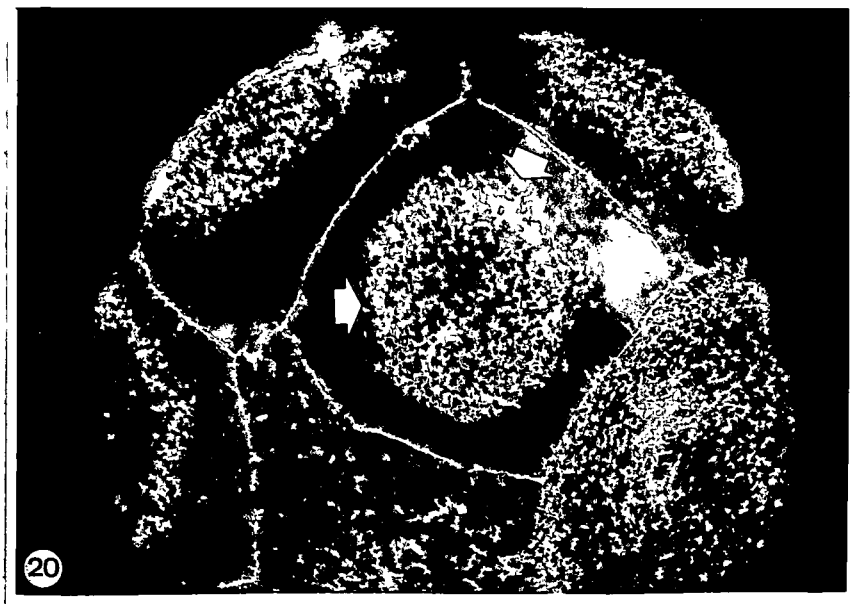
No existe, por tanto, indicios de agrupación o concentración de la marca fluorescente en algún lugar de la superficie del embrión que permitan sospechar que los efectos provocados por las lectinas sean consecuencia de la agregación de proteínas, tales como FAL, en las regiones de contacto celular.

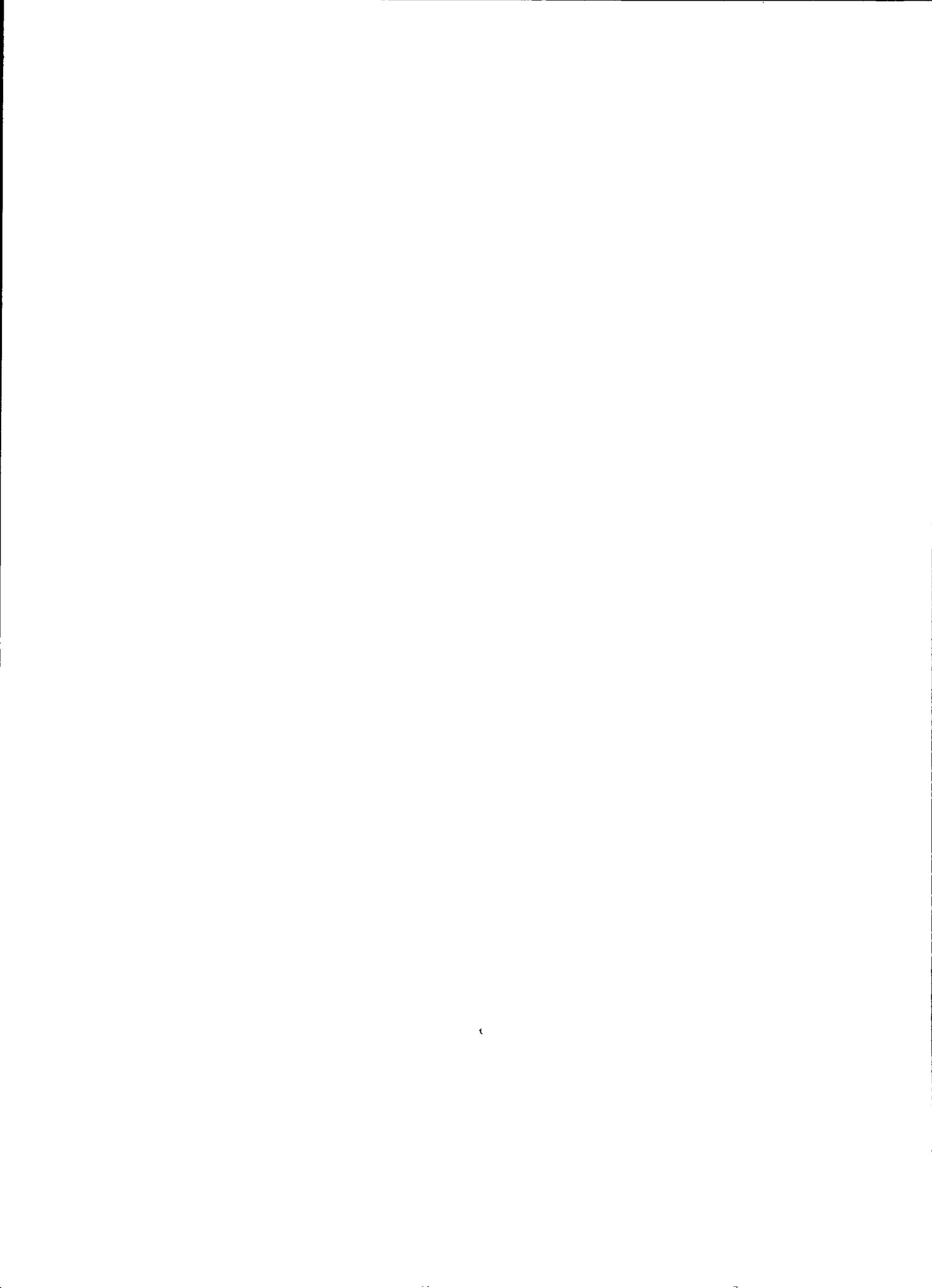
10. Distribución de antígenos de superficie en embriones de 2 células.

Los antecedentes presentados hasta aquí muestran que la regionalización inducida por lectinas en embriones de 2 células no está asociada a cambios en la actividad de FAL ni a aportes de nueva enzima por síntesis, siendo la membrana plasmática el lugar que concentra a la FAL. Estos hechos sugieren que la actividad de la enzima se reconoce en el contacto celular producto de un cambio en la distribución de FAL. Sin embargo, no se han aportado evidencias que permitan concebir un

Figura 20

Distribución de residuos sacáridos en la superficie de embriones de 8 células. Mórula compactada que fue incubada con 200 $\mu\text{g/ml}$ de Con A-FITC durante 1 hora, luego de la fijación con paraformaldehído. Obsérvese concentración de marca fluorescente en la zona libre de contacto de algunos blastómeros (flechas). 1313 x.





mecanismo de esta naturaleza. Con este propósito es que se estudió la localización de antígenos de superficie mediante el uso de anticuerpos monoclonales dirigidos contra antígenos de embriones preimplantacionales de ratón.

Se ensayaron 10 anticuerpos monoclonales que reconocen antígenos de superficie comunes a células de teratocarcinomas de la línea F9 de ratón y a embriones de ratón. Por sus características sólo 6 de los anticuerpos se estudiaron exhaustivamente y provienen de los hibridomas (sobrenadantes) denominados Mor-F2A6, Mor-H6B2, Mor-6F4/H1, TC-1G1, TC-6F2 y TC-2D10. Dos de ellos, Mor-6F4/H1 y TC-1G1, no reconocen antígenos en embriones de 2 células. En tanto, los anticuerpos provenientes de los hibridomas TC-6F2 y TC-2D10 reconocen antígenos de superficie cuya distribución es uniforme, constante e independiente de la edad del estado de 2 células (**FIGURAS 21 - 22**). Finalmente, los anticuerpos provenientes de los hibridomas Mor-F2A6 y Mor-H6B2 reconocen antígenos de superficie cuyo patrón de distribución cambia con la edad del embrión de 2 células. Así, estados de 2 células tempranos (42 h post hCG) muestran un patrón de marca uniforme mientras estados de 2 células tardíos (48 h post hCG) muestran un patrón de marca polarizado en torno al contacto celular.

Figura 21

Distribución del antígeno reconocido por el anticuerpo monoclonal 1G1 en embrión de 2 células. Galería de cortes por microscopía confocal (cada 1.25 μm) mostrando la distribución de la marca fluorescente obtenida con el anticuerpo 1G1. Este patrón corresponde a un antígeno de superficie cuya distribución es uniforme y constante para estados tempranos y tardíos de embriones de 2 células.

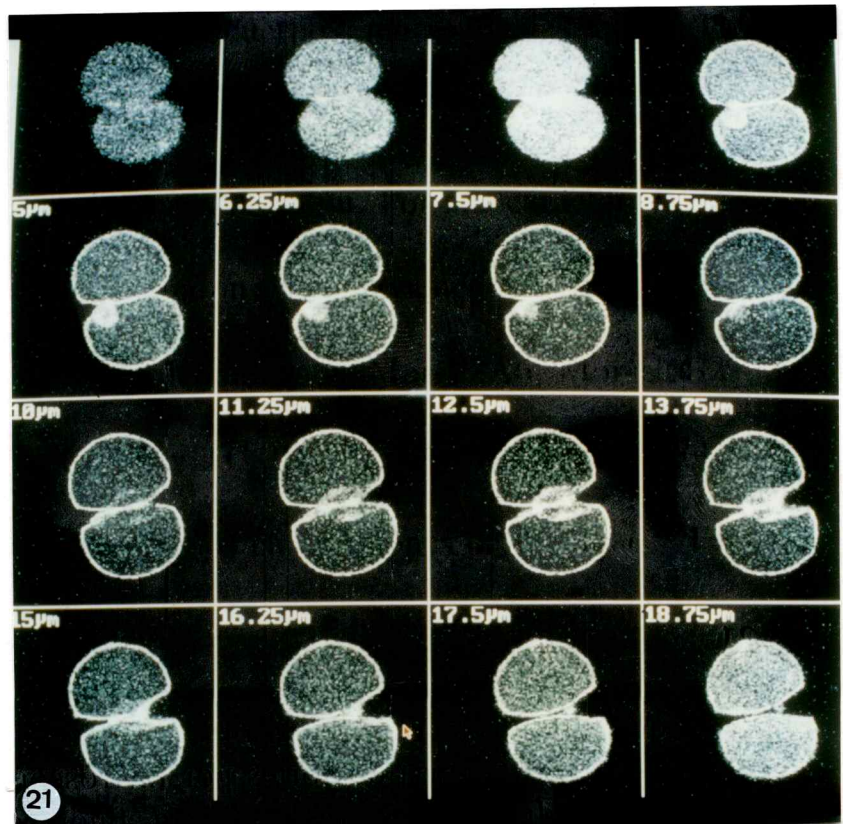
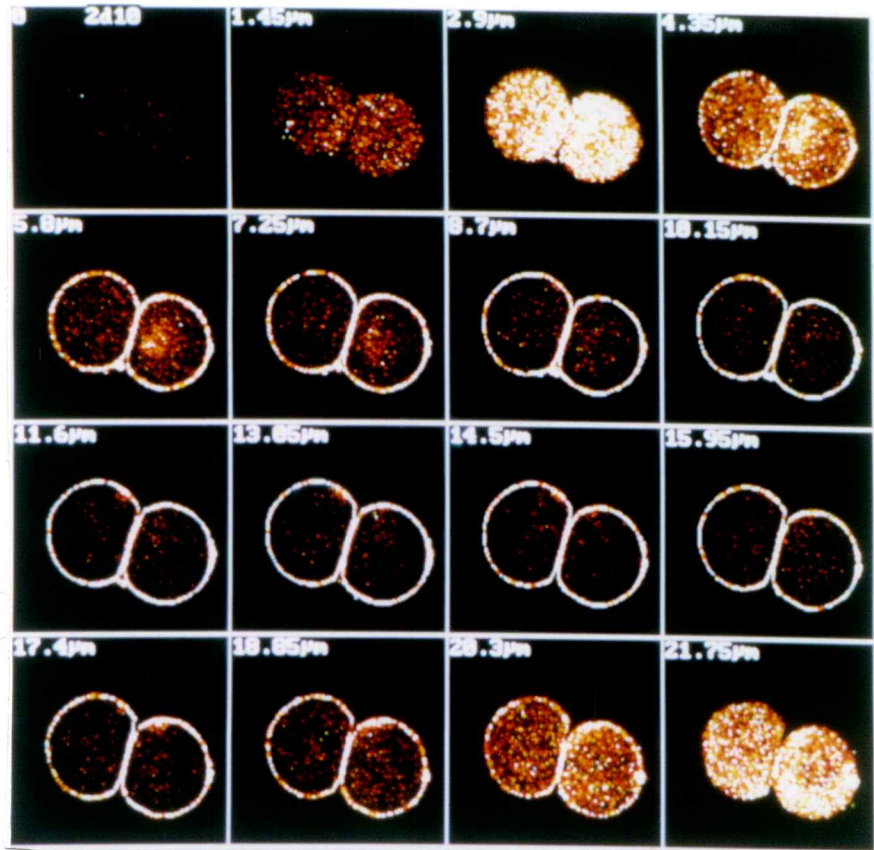


Figura 22

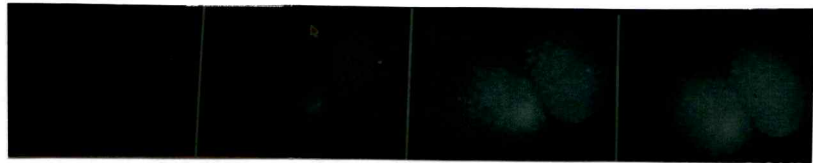
Distribución del antígeno reconocido por el anticuerpo monoclonal 6F4H1 en embrión de 2 células.

a) Galería de cortes por microscopía confocal mostrando la distribución espacial de la marca fluorescente. Este patrón corresponde a un antígeno de superficie cuya distribución es uniforme y constante para estados tempranos y tardíos de embriones de 2 células.

b) Control por omisión del primer anticuerpo.

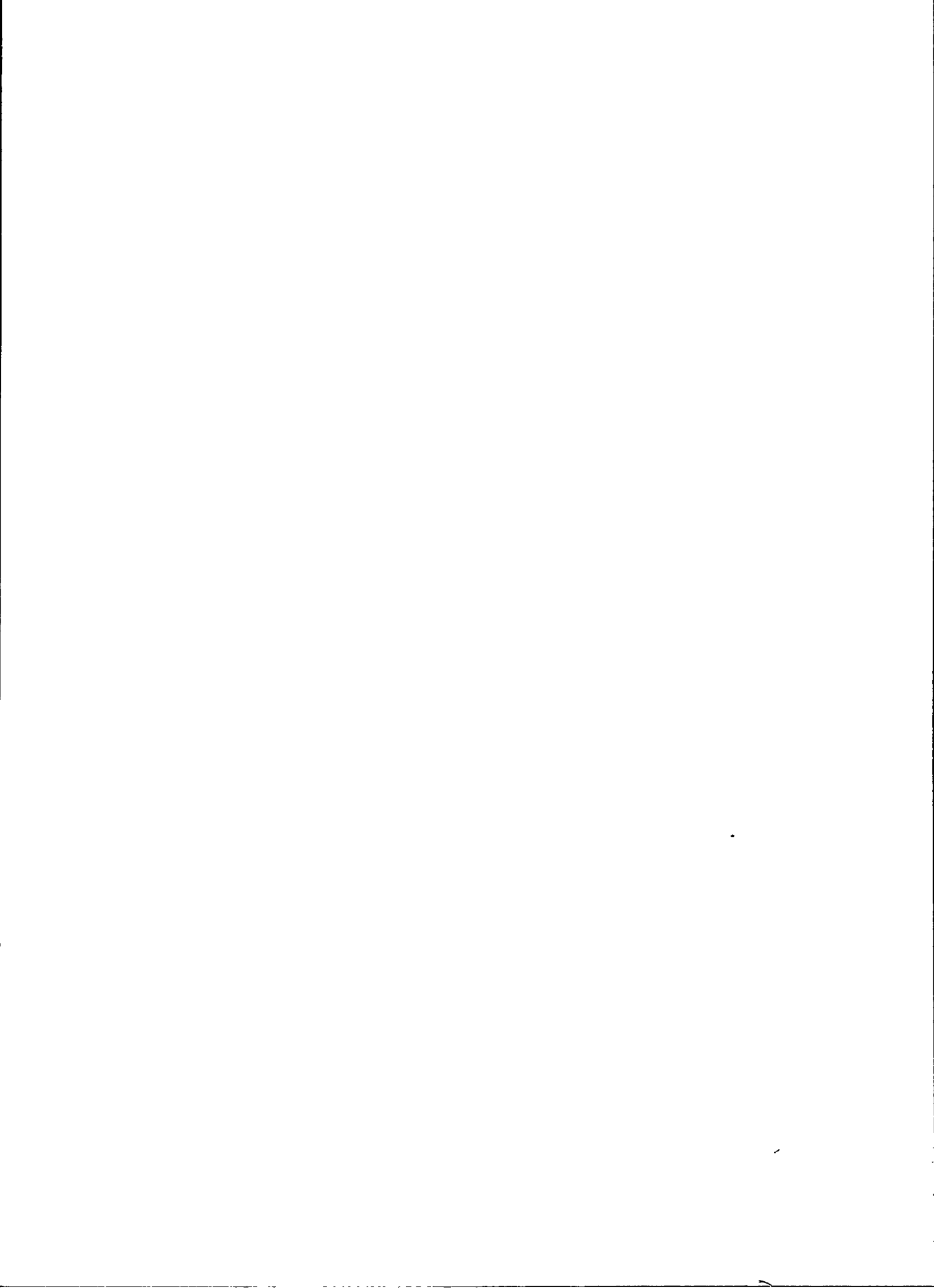


a



b

22



En general, los estados de 2 células intermedios muestran signos de polarización de menor magnitud que el último grupo descrito. Ejemplos de los patrones observados se muestran en las **FIGURAS 23 - 28**.

11. Fosfatasa alcalina se asocia con la membrana plasmática a través de un fosfolípido del tipo glicosilfosfatidilinositol (GPI).

Como se mostró en el punto 7 de esta sección, FAL se puede liberar de la membrana empleando la enzima PI-PLC, sin embargo, se desconoce que porcentaje de la actividad total de FAL se puede recuperar y si esta actividad recuperada, medida a través de los ensayos enzimáticos, corresponde a la observada en los contactos celulares por los métodos citoquímicos.

Para conocer el porcentaje de actividad que se recupera con la PI-PLC, embriones en estado de blastocisto - que contienen gran cantidad de FAL - se homogeneizaron y se dividieron en tres fracciones equivalentes: (a) una fracción se extrajo con detergente que remueve sobre el 95 % de la actividad total de FAL presente en los embriones, (b) otra fracción se incubó con PI-PLC y, (c) la última fracción se mantuvo sin ningún tratamiento. Al término del período de incubación

Figura 23

Inmunofluorescencia indirecta de 3 embriones de 2 células mostrando distintos patrones de marca con el anticuerpo monoclonal F2A6, dirigido contra antígenos embrionarios no identificados.

- a) Embrión 42 horas post-hCG. Marca uniforme en toda la superficie. 925 x
- b) Embrión 46 horas post-hCG. Marca en 2/3 de la superficie (flechas). 1100 x
- c) Embrión 50 horas post-hCG. Marca restringida a la región cercana al contacto (flechas). 1000 x

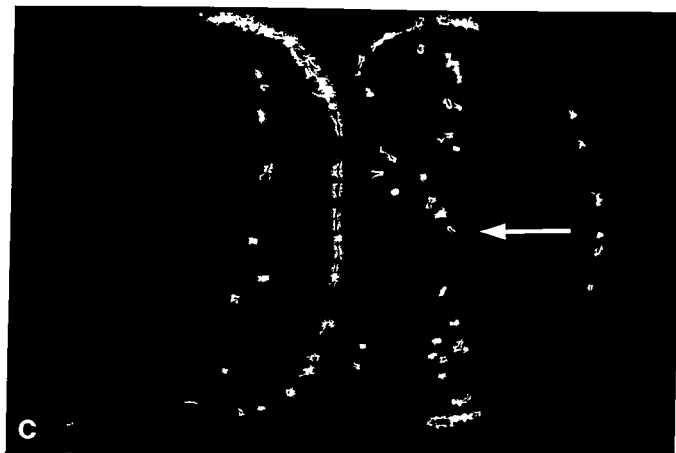
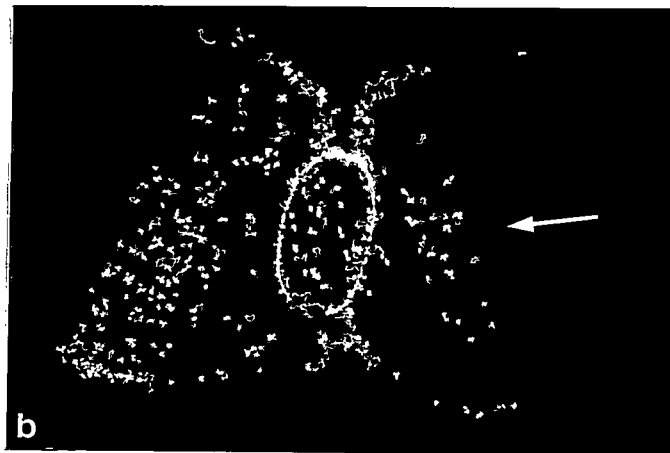
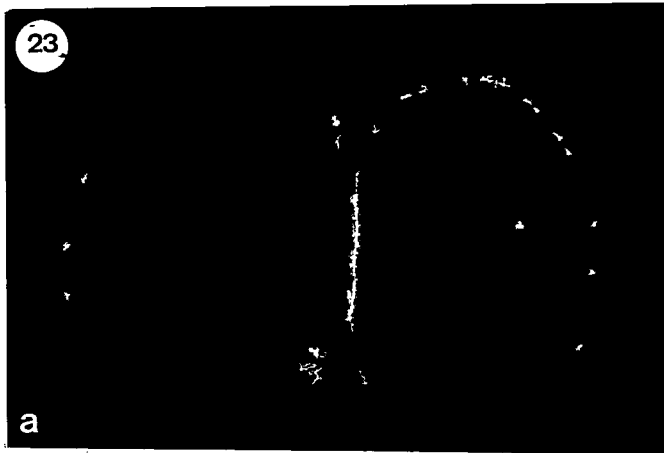


Figura 24

Distribución del antígeno reconocido por el anticuerpo monoclonal F2A6 en embrión de 2 células (44 horas post-hCG).

Galería de cortes por microscopía confocal mostrando la distribución espacial de la marca fluorescente. Este patrón corresponde a una etapa temprana de polarización de un antígeno de superficie cuya localización se modifica durante el estado de 2 células. Obsérvese ausencia de la marca en las regiones opuestas al contacto celular.

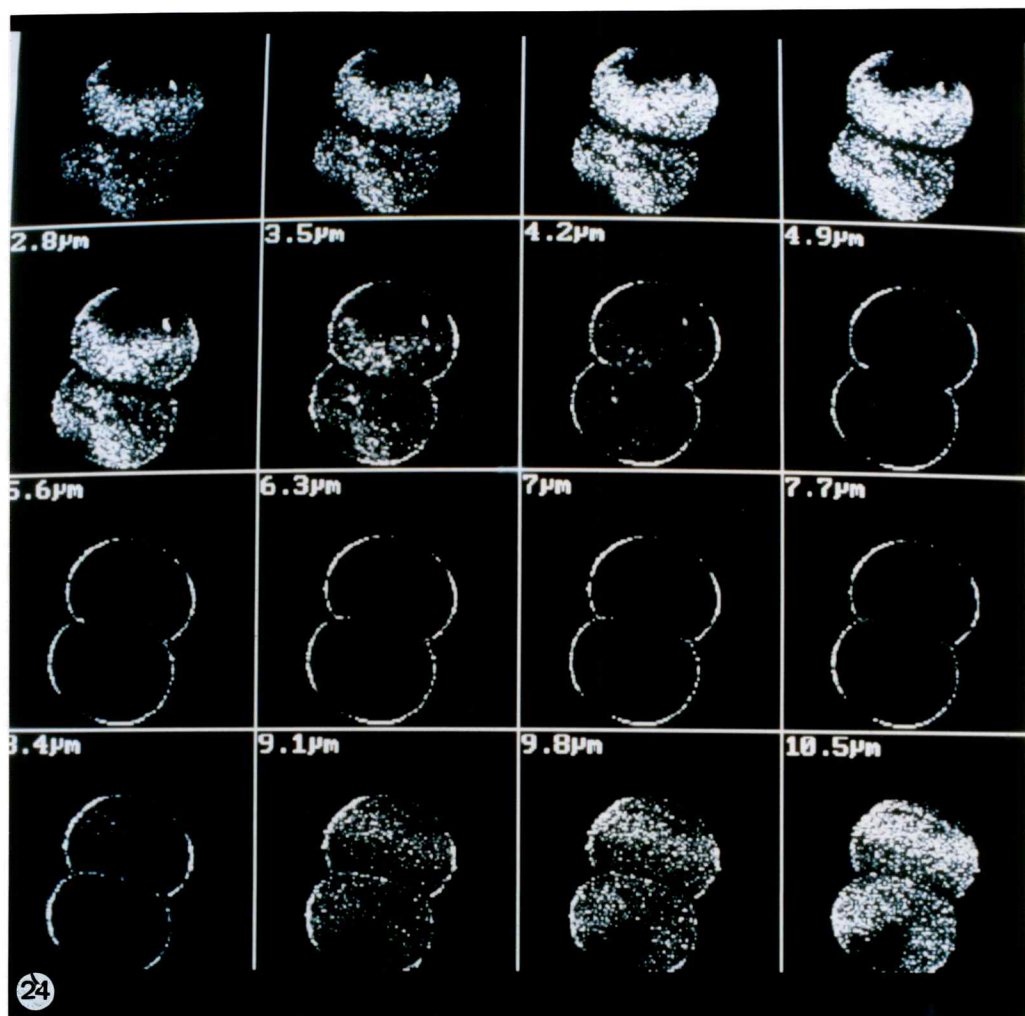
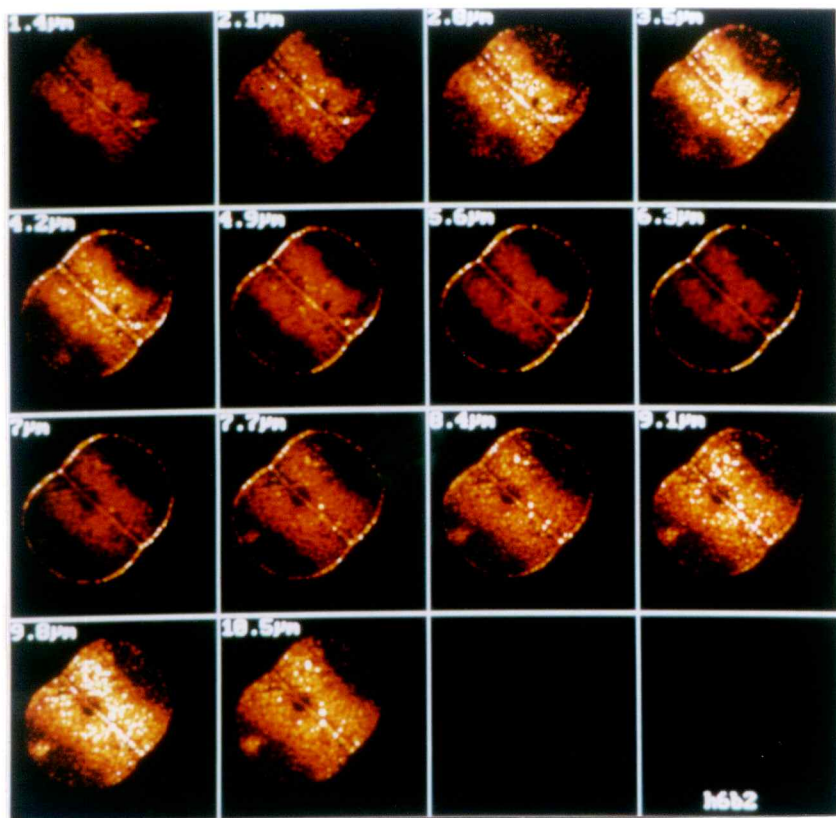


Figura 25

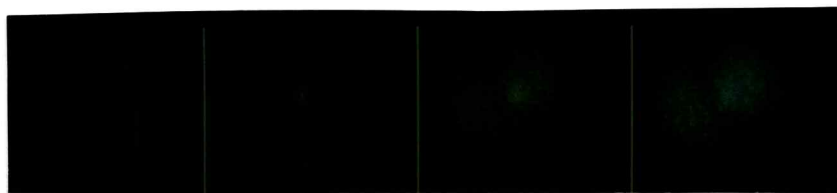
Distribución del antígeno reconocido por el anticuerpo monoclonal H6B2 en embrión de 2 células.

a) Galería de cortes por microscopía confocal mostrando la distribución espacial de la marca fluorescente. Este patrón corresponde a un antígeno de superficie cuya distribución se restringe a la zona cercana al contacto celular durante el paso por el estado de 2 células.

b) Control por omisión del primer anticuerpo.



a



b

25

Figura 26

Microscopía confocal que muestra la distribución del antígeno reconocido por el anticuerpo monoclonal F2A6 en embrión de 2 células (44 horas post-hCG). Corte óptico de superficie (p-s) y corte óptico a través de la mitad del embrión (p-m). Obsérvese que la marca está ausente en las zonas opuestas a la región de contacto.

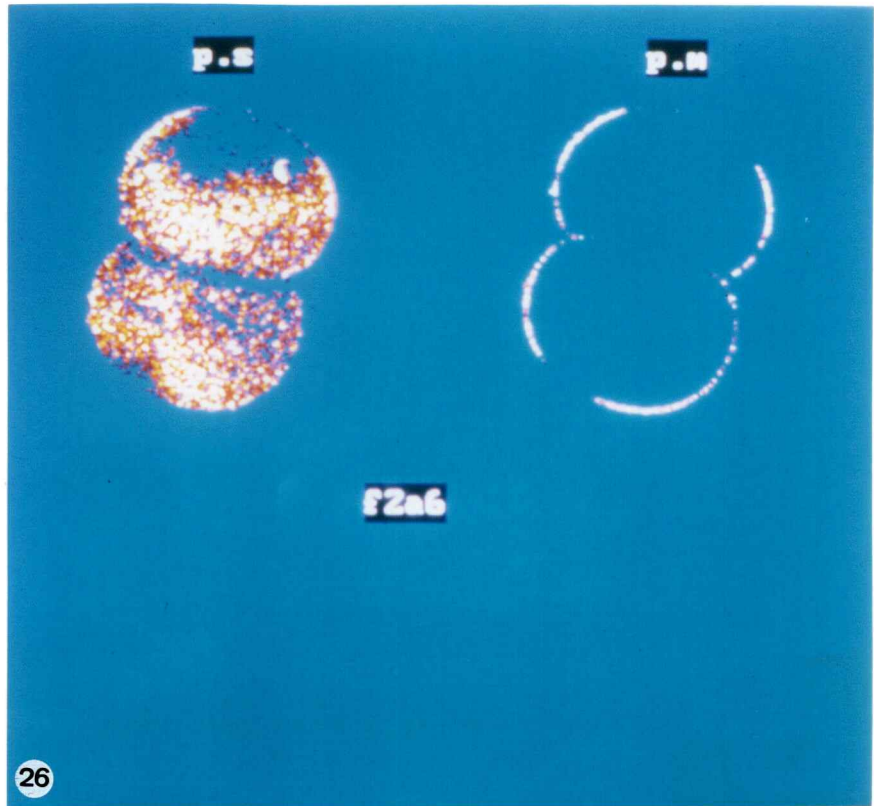


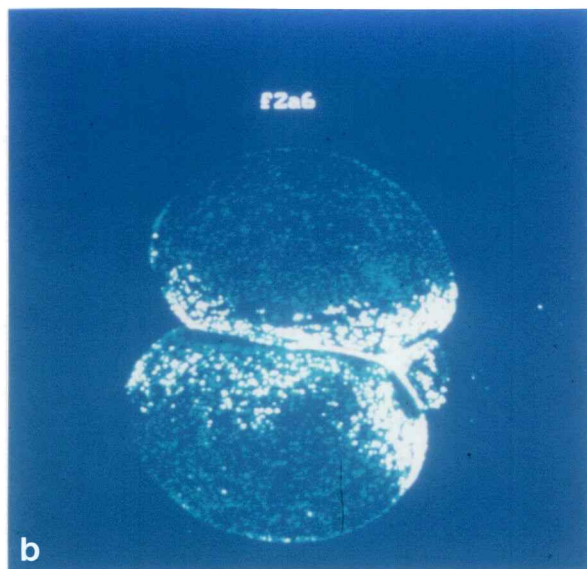
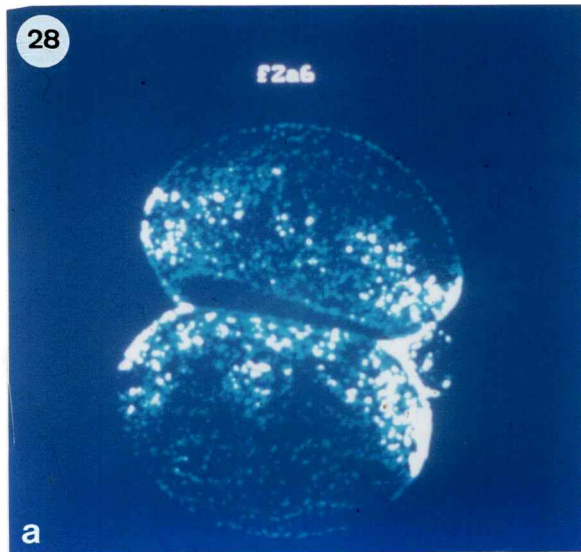
Figura 28

Microscopía confocal que muestra la distribución del antígeno reconocido por el anticuerpo monoclonal F2A6 en un embrión de 2 células (50 horas post-hCG). Vista lateral del embrión.

a) corte óptico de la superficie superior

b) corte óptico de la superficie inferior

Obsérvese la acumulación de la marca en las cercanías del contacto.





en las diferentes condiciones cada fracción se centrifugó y se recuperó el sobrenadante, el que se utilizó en las determinaciones de la actividad de FAL.

Los resultados del ensayo enzimático por fluorometría muestran que la fracción sin tratamiento registra niveles despreciables de actividad de FAL (menores al 5 % del total presente en los embriones), en tanto, la fracción incubada con PI-PLC recupera cerca del 50 % de la actividad total de FAL obtenida de la fracción tratada con el detergente (**FIGURA 29**). En síntesis, estos resultados muestran que la actividad de FAL radica en una fracción particulada de la célula y que, al menos, parte de la enzima se encuentra anclada a la membrana por un tallo del tipo GPI, sensible al corte de la PI-PLC.

En la serie experimental que se indica a continuación se estudió si la enzima liberada por el tratamiento con PI-PLC corresponde a la FAL revelada en los contactos celulares por los métodos citoquímicos. Para ésto se incubó embriones a partir del estado de 2 células, en ausencia o presencia de la enzima PI-PLC, por un lapso de tiempo que permitió a los embriones alcanzar el estado de mórula, cuando la regionalización se manifiesta. Al final del período de incubación en

Figura 29

Actividad de FAL recuperada de embriones tratados con PI-PLC. Los embriones fueron microhomogeneizados y divididos en 2 fracciones que se incubaron durante 2 horas a 37 °C, una con NP-40 y la otra con PI-PLC. La actividad fue expresada como porcentaje del total de la actividad recuperada con el detergente. Cada barra representa el promedio de 3 experimentos con su respectiva desviación estándar. La actividad recuperada con PI-PLC alcanza un 50 % de la obtenida con NP-40.

ACTIVIDAD DE FOSFATASA ALCALINA RECUPERADA CON FOSFOLIPASA C

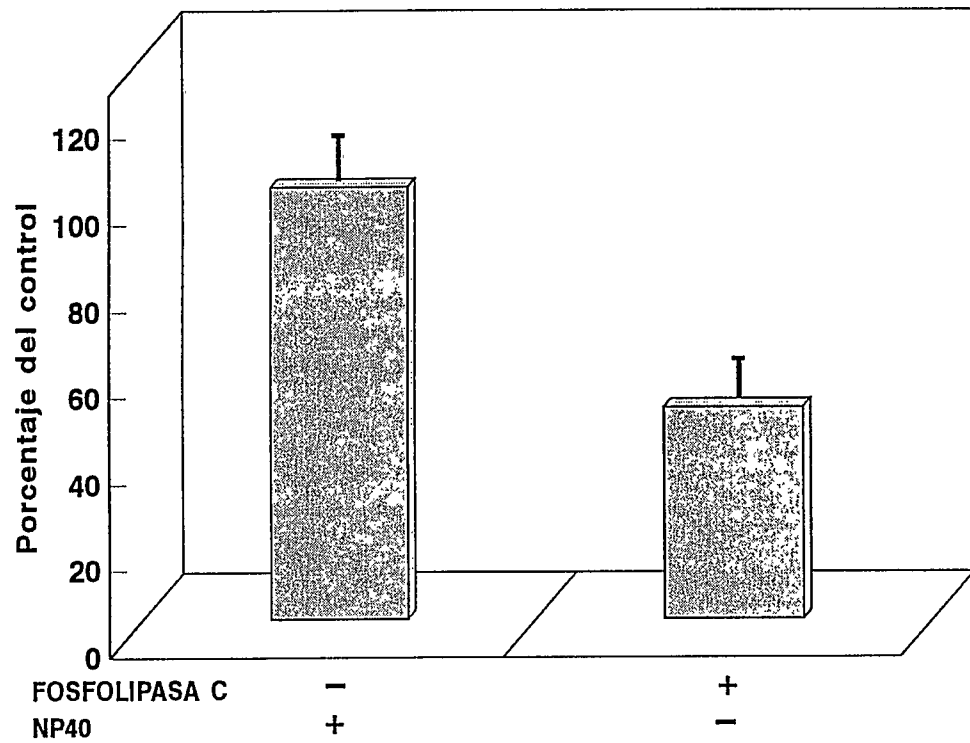
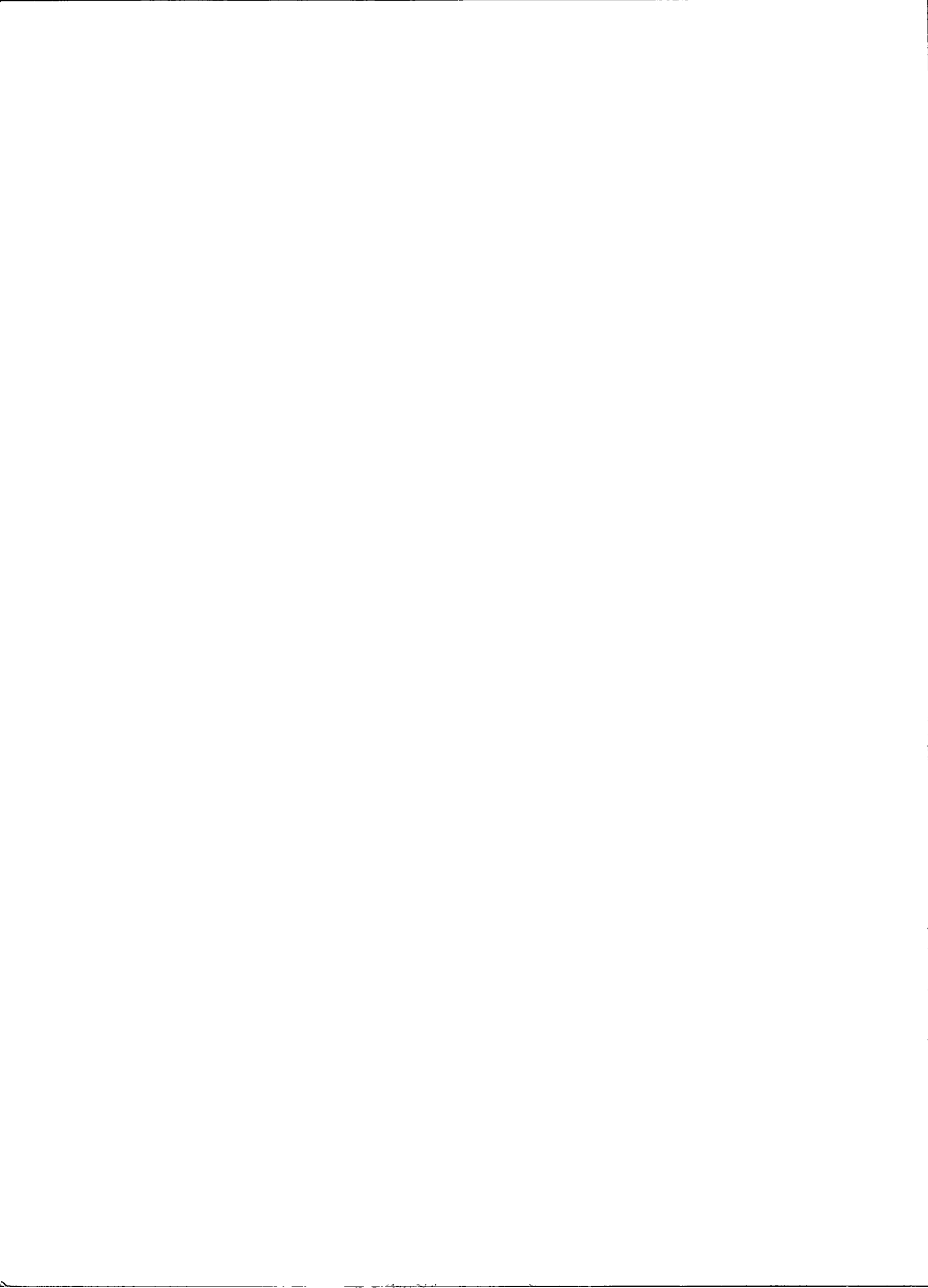


Figura 29



ambas condiciones los embriones se procesaron por el método citoquímico para revelar la actividad de FAL.

Como se muestra en la **FIGURA 30**, aquellos embriones cultivados con PI-PLC no muestran indicios de regionalización, esto es, actividad en las zonas de contacto celular, y como se espera los embriones no tratados con PI-PLC revelan intensos parches de actividad en las regiones de aposición celular. En éste último grupo la totalidad de los embriones llega al estado de compactación mientras que en el grupo tratado con la enzima PI-PLC nunca se obtiene compactación de los embriones, aunque las divisiones celulares continúan en forma normal.

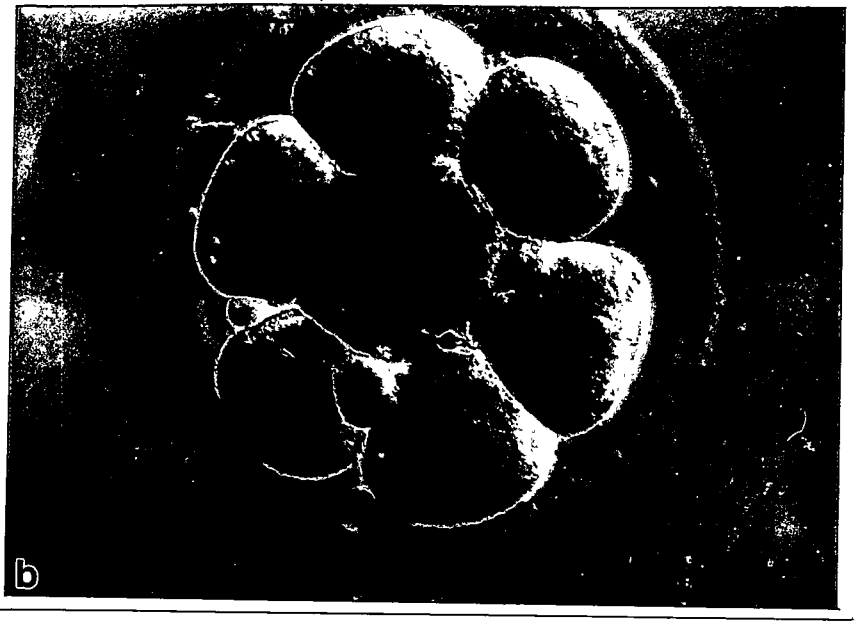
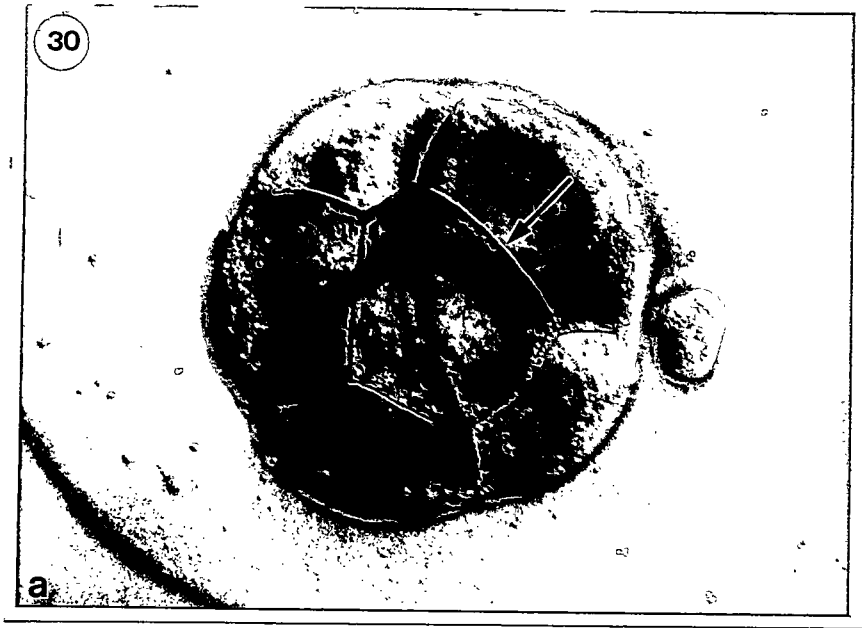
En síntesis, con el ensayo enzimático se muestra que el 50 % de la actividad total presente en los embriones se recupera al tratarlos durante 2 h con la enzima PI-PLC. En cambio, con el método citoquímico se muestra una remoción total de la actividad presente en el contacto celular luego de más de 20 h de incubación en presencia de la enzima PI-PLC. Estos resultados sugieren que la totalidad, o una buena proporción de FAL, está anclada a la membrana a través del tallo GPI y que la actividad medida por el ensayo enzimático pertenece a la

Figura 30

Demostración citoquímica de FAL. Efecto de Fosfolipasa C.

a) mórula control mostrando el producto de reacción en las zonas de contacto interblastomérico (flecha). 875 x

b) mórula tratada con 20 UI/ml de PI-PLC durante 24 h. Obsérvese ausencia total de actividad enzimática. 875 x.



1

enzima que participa en la regionalización.

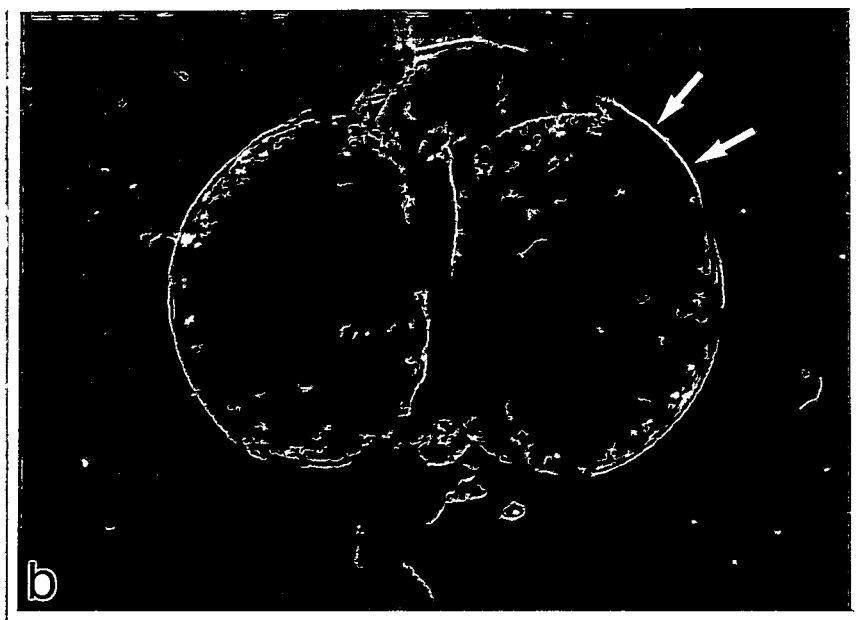
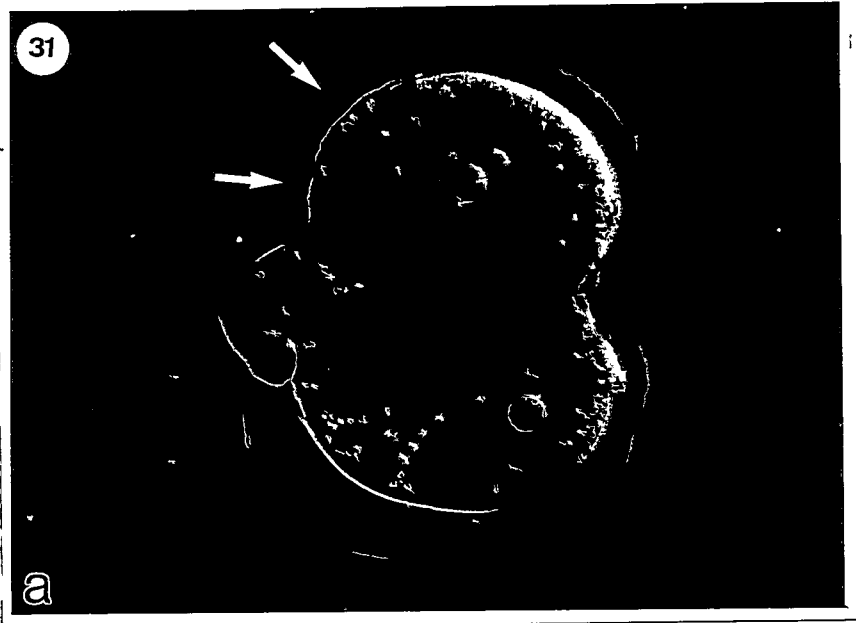
12. Efecto de inhibidores del citoesqueleto sobre la regionalización normal.

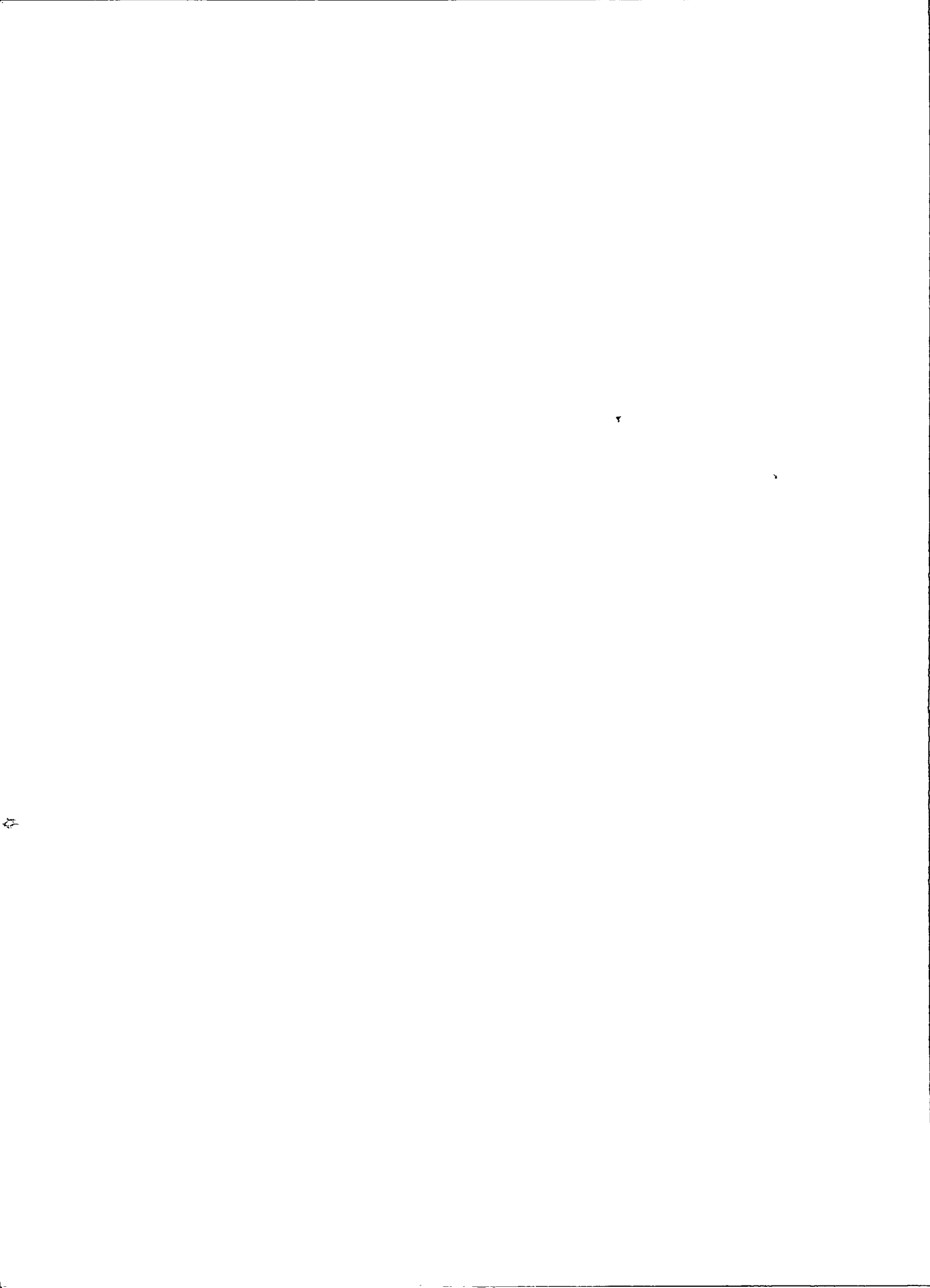
Por el momento la regionalización parece ocurrir en dos etapas; primero, desplazamiento de FAL en el plano de la membrana y, segundo, segregación de la enzima en la zona de contacto celular. Ambos fenómenos podrían estar comandados por el citoesqueleto, por lo que se estudió su función en la regionalización empleando agentes que perturban su estabilidad y dinámica. Con este propósito embriones en estado de 2 células se cultivaron durante 23 h en presencia de citochalasina B o de nocodazole. En estas condiciones los embriones no se dividieron, permaneciendo en estado de 2 células pero alcanzando la edad de una mórula.

Ninguno de los inhibidores impidió la aparición de FAL en las zonas de contacto celular, sin embargo, el patrón de marca estaba alterado. En presencia de citochalasina B se reconoce una apreciable marca de FAL en el contacto celular, además de intensos parches de actividad en las zonas contiguas a esta región (**FIGURA 31**). En

Figura 31

Demostración citoquímica de 5NUC en embriones de 2 células (a,b) incubados durante 24 horas en presencia de citochalasin B. Obsérvese producto de reacción tanto en la zona de contacto como en sitios adyacentes (flechas). a: 875 x, b: 938 x.





presencia de nocodazole se observa una escasa actividad de FAL en la zona de contacto entre las dos células y una no despreciable actividad de la enzima diseminada por toda la superficie celular (**FIGURA 32**).

Estos resultados sugieren que la integridad del citoesqueleto es necesaria para preservar su función como agente motor del desplazamiento de la enzima y como andamio para fijar la posición de FAL en el contacto celular.

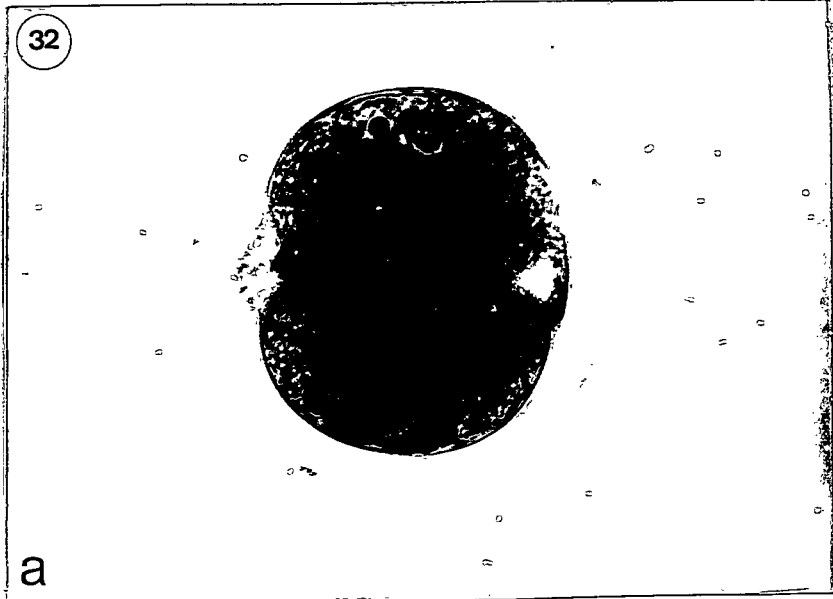
13. La regionalización inducida experimentalmente anticipa otros procesos morfogénéticos.

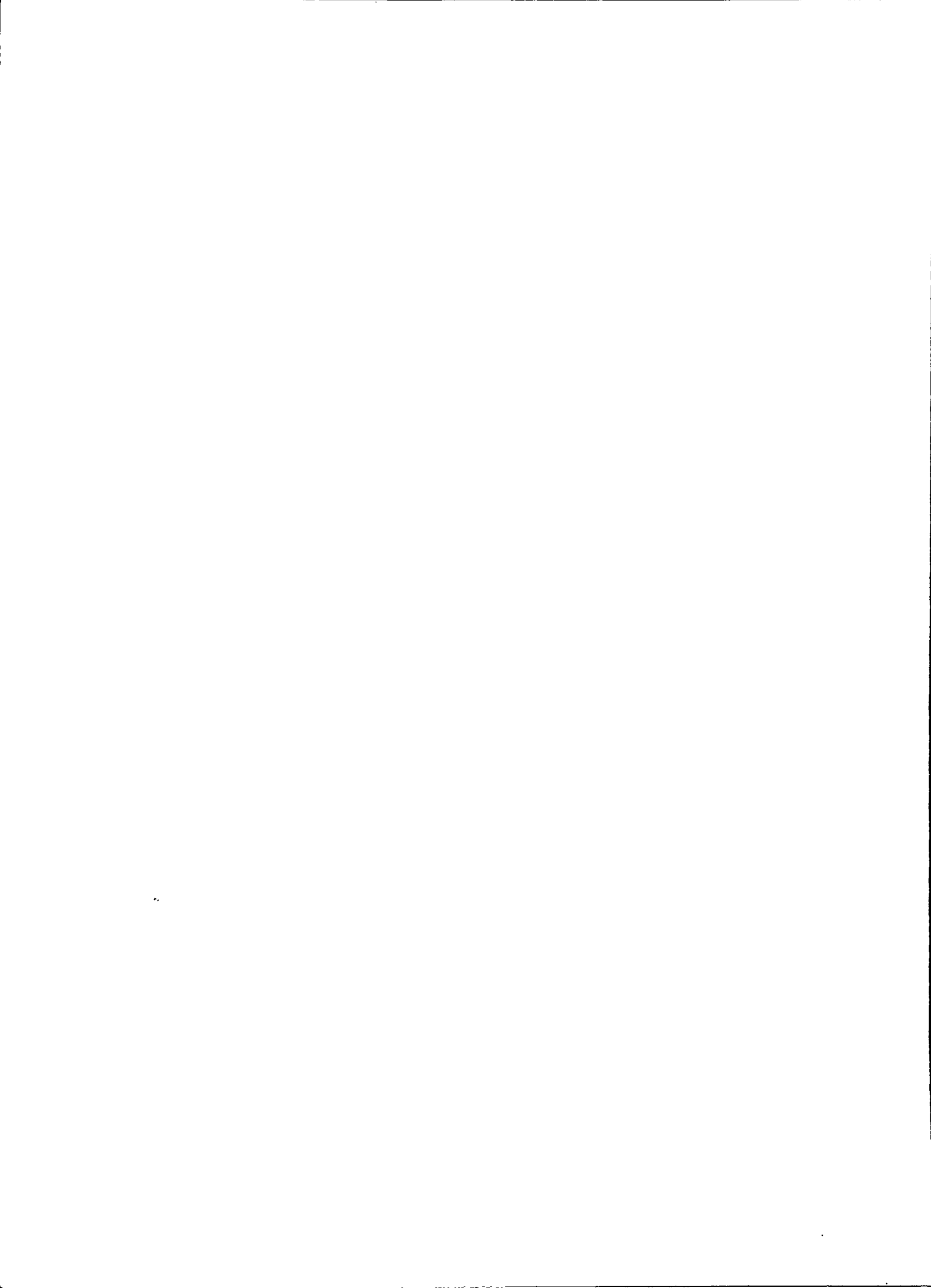
Los mismos agentes que causan regionalización en embriones de 2 células, tales como WGA o el análogo de diacilglicerol OAG, son capaces de evocar fenómenos morfogénéticos posteriores que recuerdan, al menos morfológicamente, la compactación y blastulación. La ocurrencia de estos fenómenos sigue un orden temporal estricto; primero se obtiene regionalización, luego compactación y finalmente blastulación, en donde una célula envuelve totalmente a la otra, delimitando una cavidad interna. Estos fenómenos se producen sin que ocurra clivaje, permaneciendo el embrión en estado de 2 células.

Figura 32

- a) Demostración citoquímica de 5NUC. Montaje completo de un embrión de 2 células que ha sido incubado en nocodazole durante 23 horas.
- b) El mismo embrión con mayor aumento para mostrar la dispersión de la marca en toda la superficie celular (flechas)
- a: 750 x, b: 1900 x.

32





Por la trascendencia que podría tener la regionalización como primer paso en la cascada de fenómenos que culminan con la diferenciación celular, es que fué de interés demostrar que los fenómenos evocados no son sólo remedos morfológicos.

Para demostrar que la compactación obtenida en estados de 2 células corresponde a la anticipación del fenómeno real se estudió tres características singulares del proceso; (1) su dependencia a calcio, (2) la importancia de la calmodulina y, (3) la presencia en las zonas de contacto celular de la proteína uvomorulina.

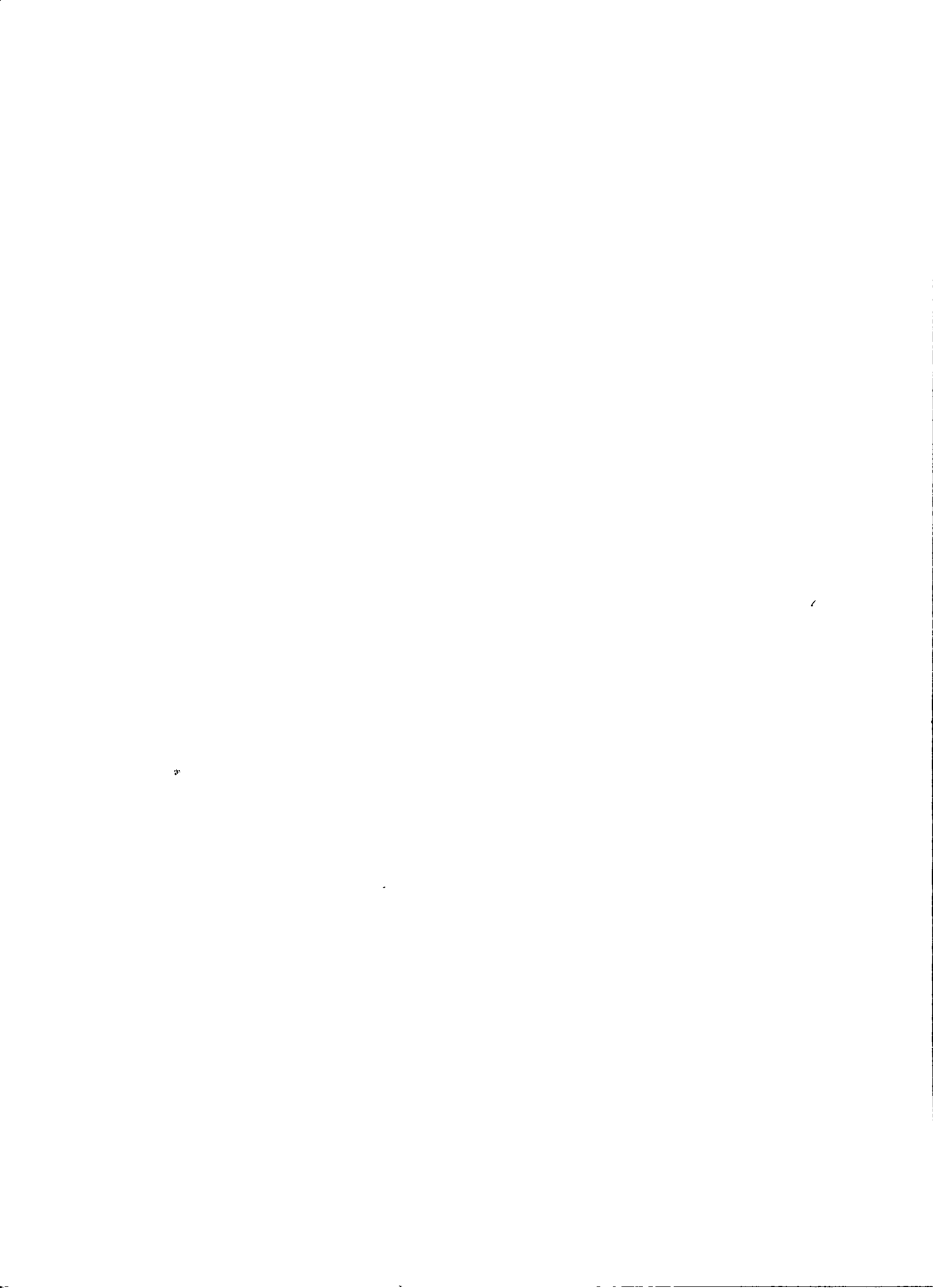
OAG provoca compactación en un 100 % de los embriones de 2 células, pero si al final del cultivo se agrega EGTA (quelante de calcio) o el cultivo se inicia en presencia de EGTA, se produce descompactación o se inhibe en su totalidad el fenómeno, respectivamente. Mas aún, los estados de 2 células compactados muestran uvomorulina en los contactos celulares, en tanto, los embriones no compactados, o a los que se les ha inhibido la compactación, muestran una distribución uniforme de uvomorulina por la superficie (**FIGURA 33**). Al igual que en la compactación normal, el proceso es dependiente de calmodulina. Al incubar embriones de 2

Figura 33

Localización de uvomorulina en embriones inducidos a compactarse con OAG. Inmunofluorescencia indirecta con anticuerpo policlonal anti-uvomorulina.

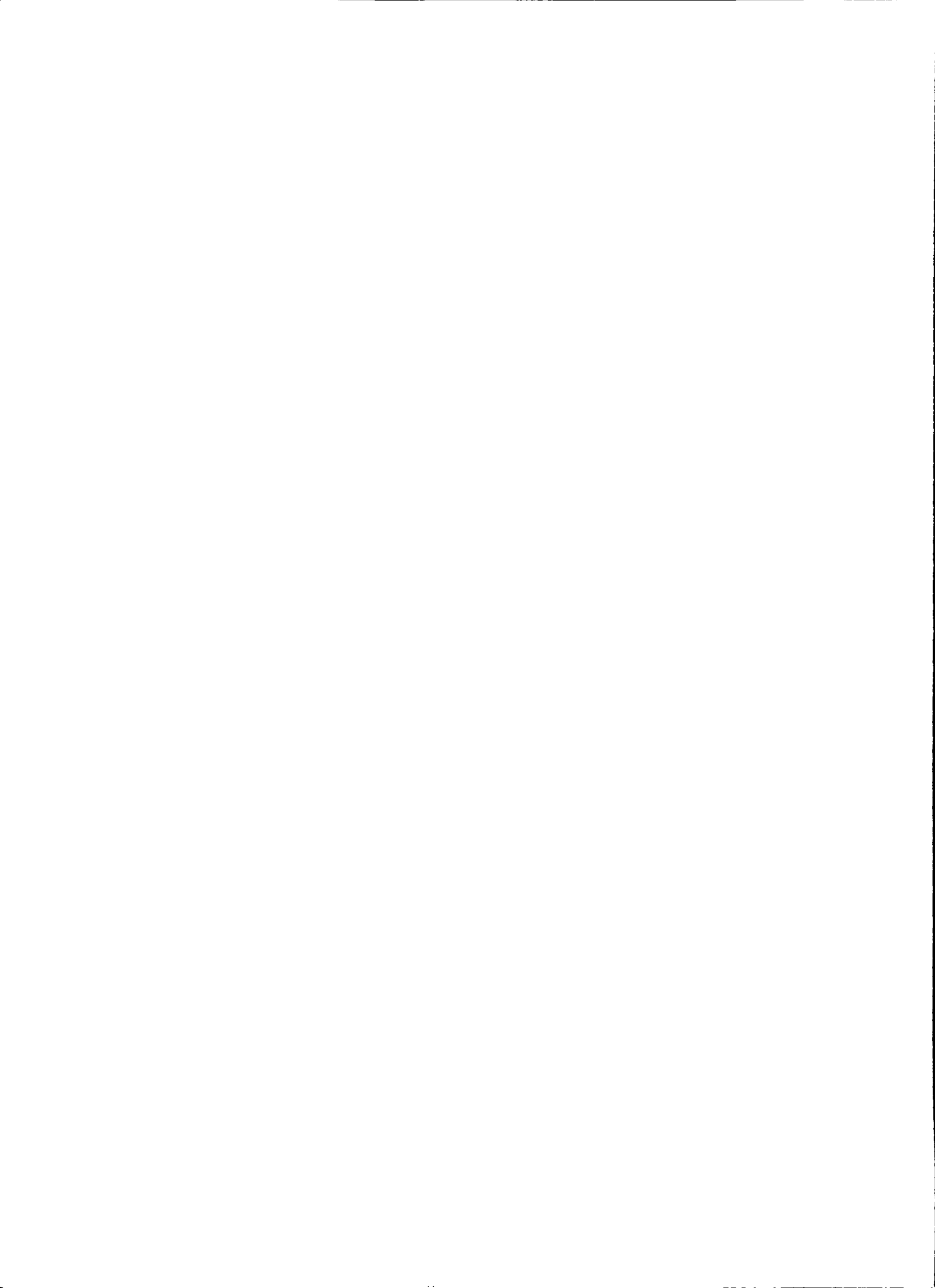
- a) Embrión de 2 células control, no tratado con OAG. Obsérvese la distribución de uvomorulina por toda la superficie celular (flechas). 1500 x
- b) Embrión de 2 células incubado durante 2 horas con OAG. Obsérvese que la uvomorulina está restringida a la zona de contacto celular. 1500 x.





células con OAG en presencia de W7 (un inhibidor de calmodulina) se inhibe la compactación en un 100 %.

Por las características mostradas no cabe duda que la compactación obtenida en embriones de 2 células es una anticipación del proceso normal que ocurrirá dos ciclos celulares más tarde, al estado de 8 células. Esto sugiere que la localización de la enzima en las zonas de contacto celular también sería la anticipación del proceso normal y, por tanto, los antecedentes suministrados por esta tesis aportarían información relevante para entender los fenómenos del desarrollo temprano que culminan con la diferenciación celular que se reconoce en el blastocisto.



DISCUSION

1. LA FOSFATASA ALCALINA SE EXPRESA ANTES QUE SE PUEDA DETECTAR EN EL CONTACTO CELULAR.

En esta tesis se han utilizado dos métodos cuantitativos para estudiar la actividad de FAL durante el desarrollo inicial. Ambos ensayos enzimáticos mostraron niveles detectables de FAL al menos un ciclo celular antes que su presencia pueda ser reconocida en las zonas de contacto celular por los métodos citoquímicos. Estas diferencias son probablemente el producto de la distinta sensibilidad de las técnicas citoquímicas respecto de los ensayos enzimáticos. Las primeras requieren que la enzima se concentre en determinados puntos para hacer visible el producto de reacción, en tanto las últimas están sólo limitadas por la cantidad de enzima presente.

Aunque el ensayo fotométrico muestra actividad de FAL desde el estado de 2 células, sus resultados son difícilmente reproducibles y no coinciden plenamente con los de otros autores. Aplicando este ensayo a embriones preimplantacionales de ratón Cachicas (1989) mostró que la actividad de FAL sólo se detectaba a partir del estado de 4 células.

... ..

... ..

... ..

... ..

... ..

... ..

... ..

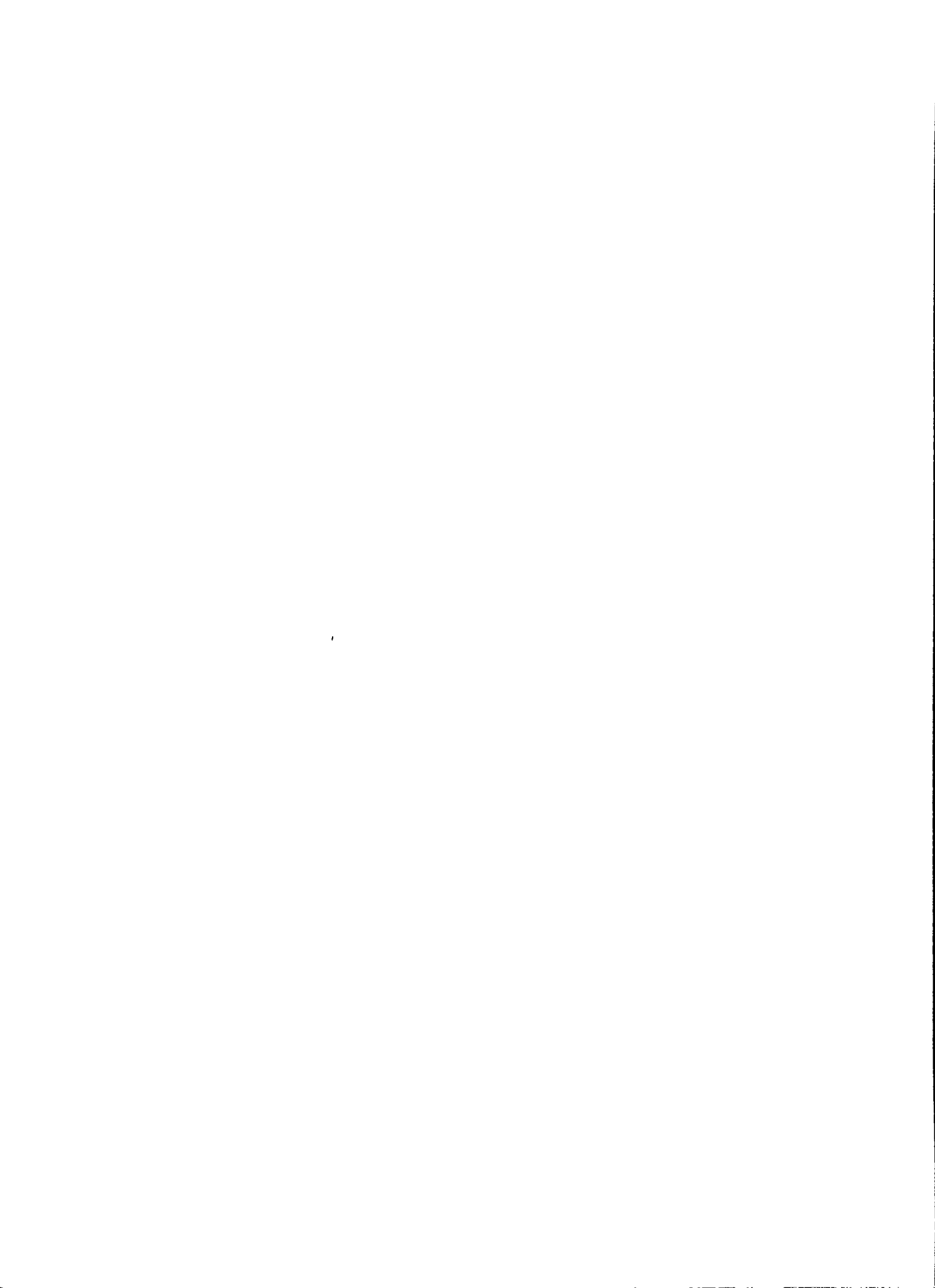
... ..

... ..

... ..

En cambio, con el mismo método, Kim *et al.* (1989) demostraron actividad de FAL a partir del estado de 2 células, pudiendo incluso distinguir diferencias entre embriones de 2 células tempranos y tardíos.

La discrepancia entre los resultados de esta tesis y la de los autores antes señalados se basan probablemente en aspectos metodológicos relacionados con el ensayo enzimático por fotometría que nos parece pertinente comentar. Primero, la preparación del extracto de embriones se realiza mediante ciclos de congelación-descongelación, lo que no garantiza una constancia en la cantidad de enzima solubilizada en cada caso. Segundo, el medio en que se realiza este procedimiento, tampón fosfato salino, no contiene cofactores como Zinc y Magnesio, necesarios para la estabilidad de la forma nativa de la enzima, ni agentes que impidan la acción de proteasas. Tercero, los bajos niveles de actividad de FAL en los embriones, y las propias limitaciones de sensibilidad de la técnica obligan a realizar sólo una determinación luego de un tiempo prolongado de reacción (20 h), durante el cual la estabilidad del sustrato (pNPP) y la enzima son inciertas. Cuarto, las condiciones anteriores impiden seguir temporalmente el curso de la reacción por lo que se desconoce como esta progresa. Finalmente, el sustrato empleado es un



cromógeno que no poseé las características de sensibilidad propias de los sustratos fluorogénicos (Guilbault, 1990). Estas condiciones podrían explicar las causas de la baja reproducibilidad del método.

En definitiva, el ensayo fotométrico no cumplía con las condiciones de rigurosidad y certeza para obtener determinaciones confiables, particularmente en embriones tempranos del desarrollo, por lo cual fue aconsejable desarrollar un nuevo ensayo enzimático para FAL que resolviera estas dificultades. Esto se logró gracias a la aparición de un nuevo sustrato para FAL denominado difosfato de fluoresceína (FDP).

El FDP posee un límite de detección 50 veces más bajo que el sustrato pNPP y es más estable que este último, es decir, es menos propenso a sufrir hidrólisis espontánea (Huang *et al.*, 1992), además, su producto enzimático, fluoresceína, absorbe y fluoresce con mayor eficiencia a pH alcalino, que es la condición óptima en la cual FAL ejerce su acción catalítica (Munkholm *et al.*, 1990). Estas características excepcionales del FDP nos permitieron desarrollar un nuevo método enzimático que resultó ser confiable y de alta sensibilidad para medir la actividad de FAL en embriones tempranos del ratón.

TO THE HONORABLE MEMBERS OF THE HOUSE OF REPRESENTATIVES
OF THE STATE OF TEXAS

IN SENATE, FEBRUARY 15, 1900.

REPORT
OF THE
COMMISSIONERS OF THE
LAND OFFICE,
IN RESPONSE TO A RESOLUTION
PASSED BY THE SENATE
ON FEBRUARY 15, 1899.

THE STATE OF TEXAS,
COUNTY OF _____,
SS. I, _____,
Notary Public in and for
the State of Texas, do hereby
certify that the foregoing
is a true and correct
copy of the report of the
Commissioners of the
Land Office, as the same
appears by the minutes
of the Senate of the State
of Texas, held at Austin,
Texas, on the 15th day
of February, 1899.

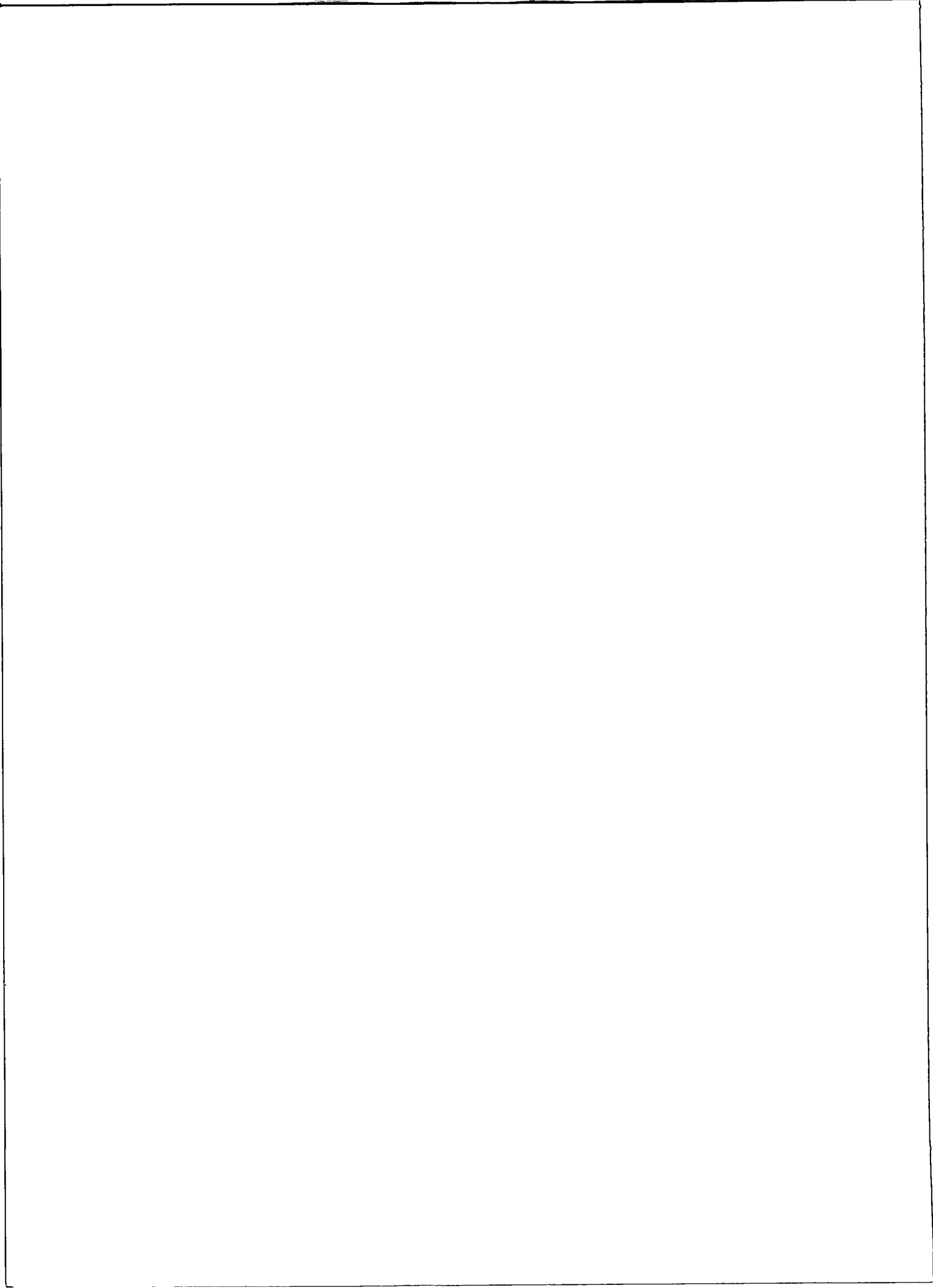
WITNESSED my hand and the seal of my office this _____ day of _____, 1900.

Al aplicar este nuevo ensayo, que llamaremos fluorométrico pues se basa en la determinación de un producto fluorescente, a embriones iniciales de ratón se confirma que la actividad de FAL se inicia a partir del estado de 2 células.

2. LA CINÉTICA DE EXPRESIÓN DE FAL SUGIERE UNA LOCALIZACIÓN DE LA ENZIMA RESTRINGIDA A LAS SUPERFICIES DE CONTACTO CELULAR.

Nuestros ensayos enzimáticos muestran que el incremento de la actividad de FAL durante el desarrollo inicial sigue un curso exponencial, situación que sugiere que un mecanismo de síntesis *de novo* de la enzima está operando en vez de activación de una forma inactiva de FAL. Trabajos de nuestro laboratorio han demostrado que la regionalización provocada por contacto celular depende de la síntesis de proteínas, sin embargo, esta síntesis sería un requisito para sostener el proceso y no para iniciarlo (Sepúlveda & Izquierdo, 1990).

El aumento que experimenta la actividad de FAL no es proporcional al aumento en el número de células a medida que progresa el clivaje durante el desarrollo inicial. Por ejemplo, un estado de 4 células puede



triplicar la actividad detectada en un estado de 2 células, y una mórula de 8 células puede sextuplicar la actividad registrada en un estado de 4 células. En conclusión, mientras el número de células crece en progresión aritmética la actividad de FAL lo puede hacer en progresión geométrica.

En el ratón, durante el curso del clivaje el volumen del embrión se mantiene constante pero su superficie aumenta en forma abrupta. En nuestro laboratorio hemos estimado las variaciones que experimentan la superficie y el volumen celular y la superficie del embrión en desarrollo y se observa sólo que el parámetro superficie total del embrión sigue un incremento equivalente al que sigue la actividad de FAL en el desarrollo (FIGURA 34). Sin embargo, la superficie de contacto es la que mejor representa los cambios de la superficie total, pues la superficie libre permanece constante desde la compactación hasta antes de la implantación. Luego, se entiende que la actividad de FAL aumente en forma correspondiente al aumento de la superficie de contacto, pues la enzima se encuentra albergada en este dominio celular. Más aún, inferimos la necesidad de un aporte continuo de enzima para cubrir la nuevas superficies de contacto generadas por el clivaje. Es interesante

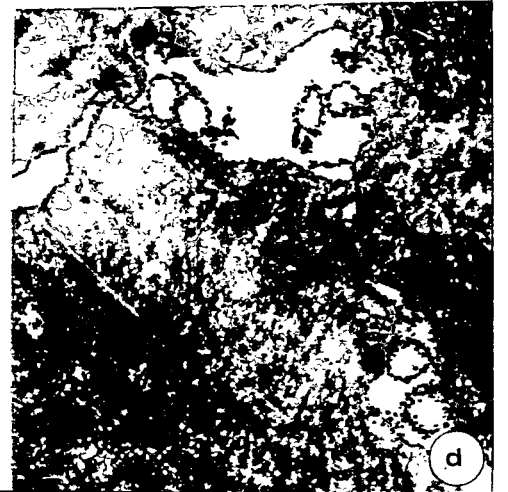
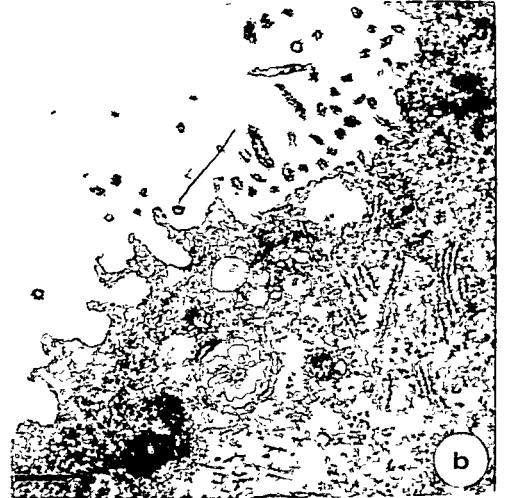
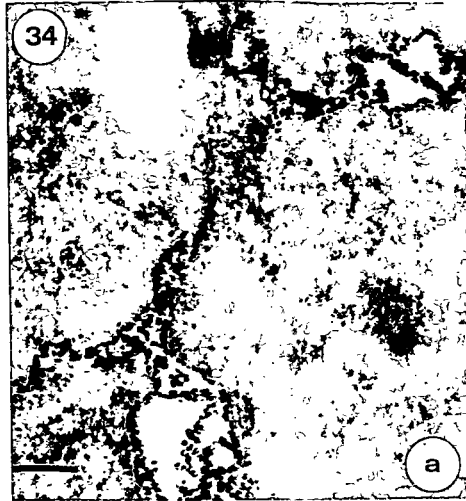
Figura 34

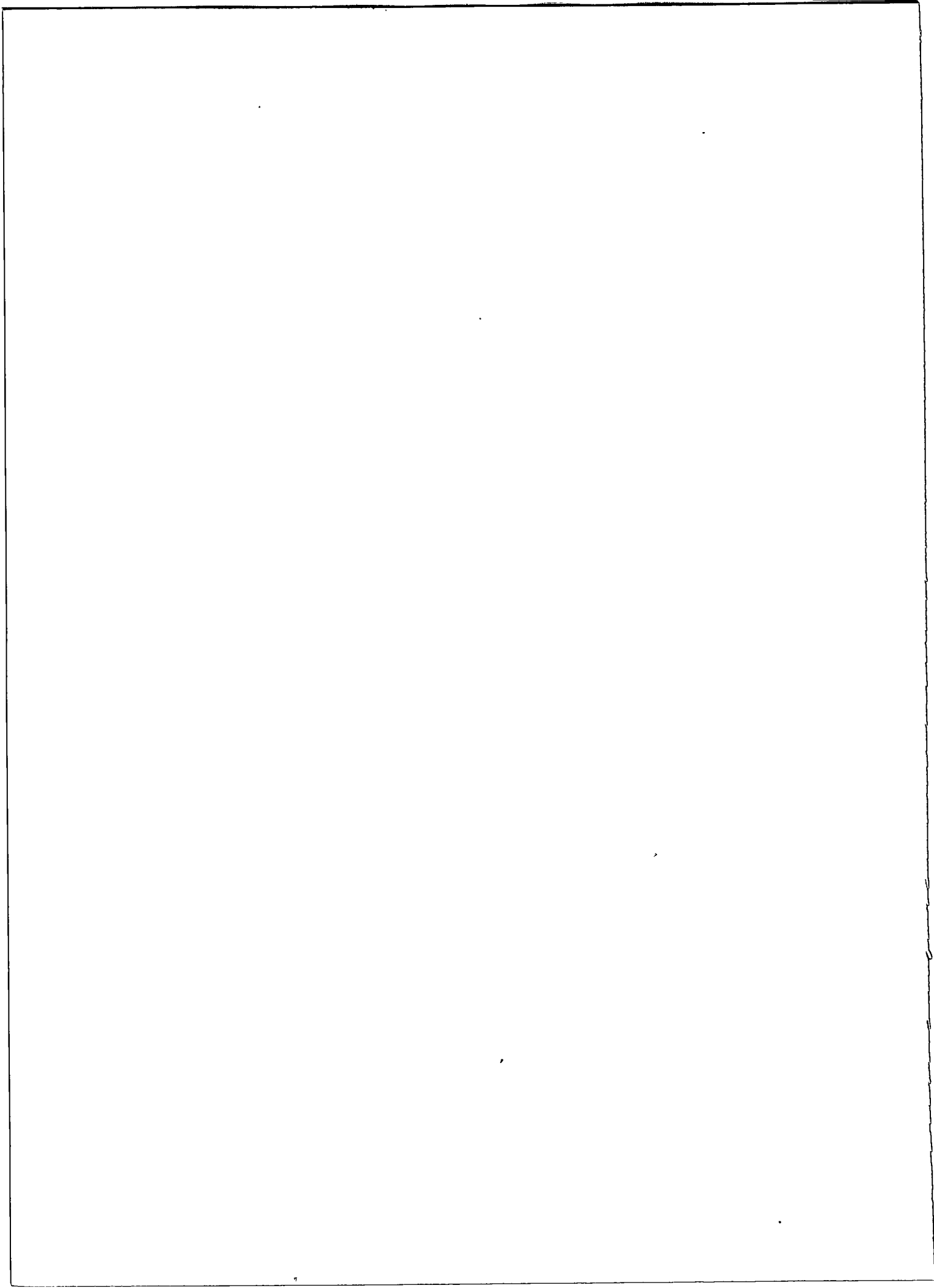
Demostración citoquímica de la actividad de FAL en distintos estados del desarrollo preimplantacional. Microscopía electrónica de transmisión. La barra representa 1 μm .

a) y d) Mórula. Zona de contacto interblastomérica mostrando precipitado de plomo, producto de la actividad de FAL.

b) Mórula. Zona libre de actividad. Obsérvese microvellosidades sin producto de reacción.

c) Embrión de 2 células. Obsérvese ausencia de actividad entre los dos blastómeros.





comprobar como las proposiciones que derivan de este análisis confirman evidencias experimentales anteriores, donde se demuestra que FAL se localiza confinada en los contactos intercelulares (Izquierdo *et al.*, 1980) y que se requiere de su contribución por síntesis para mantener la regionalización (Sepúlveda & Izquierdo, 1990).

Aunque no se puede descartar la expresión de FAL en otros lugares de la célula, si es posible predecir su presencia mayoritaria en las superficies de contacto celular. De hecho, sólo en el estado de mórula, y en forma transitoria, se ha podido detectar alguna actividad de FAL en un lugar distinto al contacto celular. Esta actividad se encuentra en el citoplasma asociada a estructuras denominadas cuerpos cristaloides (Izquierdo *et al.*, 1980). Que se reconozca actividad de FAL en el citosol es prueba que el sustrato tiene libre acceso al interior de la célula, de tal manera que si antes o después del estado de mórula no se detecta actividad en sitios distintos al contacto celular es porque ésta actividad no existe o es tan insignificante que escapa a la sensibilidad de los métodos citoquímicos de detección. Esto explicaría porque existen coincidencias entre la cinética de incremento de la actividad de FAL con los cambios que experimenta la superficie de contacto celular, pues

durante el desarrollo el grueso de la actividad de FAL se concentraría en las zonas de aposición celular.

3. LA REGIONALIZACION PROMOVIDA POR LECTINAS NO MODIFICA LOS NIVELES DE ACTIVIDAD DE FAL PRESENTES EN EL EMBRION DE 2 CELULAS, SUGIRIENDO UN MECANISMO DE RELOCALIZACION DE ENZIMA PREEXISTENTE CUYO DESTINO ES EL CONTACTO CELULAR.

Al cultivar embriones de 2 células en presencia de las lectinas Con A o WGA se observa que el número de embriones con actividad de FAL en el contacto aumenta en proporción al tiempo y dosis de lectina empleada.

Con estos ensayos se pudo determinar, para cada lectina, el tiempo y concentración necesarios para obtener un 100 % de embriones regionalizados. En estas condiciones se encuentra que la actividad de FAL detectada en embriones de 2 células permanece constante aún cuando los embriones hayan sido incubados en presencia de las lectinas que inducen regionalización. Estos resultados son confiables, pues los hemos podido reproducir empleando dos ensayos enzimáticos independientes, uno de los cuales es particularmente sensible.

Como al comparar una población de embriones regionalizada con una no regionalizada no hay variaciones en la actividad de FAL, un mecanismo de relocalización de la enzima dirigido al contacto celular podría explicar que la cantidad de FAL permaneciera constante. Dos embriones de 2 células pueden ser agregados de diversas formas -en línea, en paralelo o en cruz- para producir un número variable de contactos. Bajo estas condiciones se ha demostrado que mientras mayor sea el número de contactos producidos menor es el porcentaje de contactos con actividad de FAL (Sepúlveda & Izquierdo, 1990). Esto demuestra que la cantidad de enzima presente es limitada y por tanto es improbable que un mecanismo de síntesis de proteínas este operando en el inicio del proceso. Si este último fuese el caso esperaríamos que el porcentaje de contactos regionalizados se mantuviese en un 100 % aunque la superficie comprometida aumentara. En otras palabras, si en respuesta al contacto celular se produce un aporte continuo de enzima por síntesis, la regionalización podría extenderse indefinidamente. No obstante, los experimentos de agregación, recién descritos, no descartan que un proceso de activación pueda estar involucrado, pues los resultados podrían atribuirse a la escasez de enzima activable. Sin embargo, lo

que invalida a esta proposición es que la actividad de FAL sea la misma en un embrión de 2 células normal con respecto a uno regionalizado por efecto de las lectinas. Un mecanismo de activación o de síntesis predican mayores niveles de actividad enzimática en el embrión regionalizado a no ser que una combinación de fenómenos este operando. Por ejemplo, la regionalización provocada por contacto o lectinas prodría gatillar la síntesis *de novo* de FAL junto con estimular el recambio o degradación de enzima preexistente. Luego, si existe un equilibrio entre estos procesos podría explicarse porque el nivel de actividad de FAL no cambia al inducir la regionalización. Si lo anterior es verdadero, al inhibir la síntesis de proteínas en un embrión cultivado con lectinas se esperaría una disminución en la magnitud de su actividad al compararlo con un embrión no tratado, pues la enzima degradada no sería reemplazada por nueva enzima. Al realizar este experimento demostramos que el nivel de actividad de FAL es igual en ambas condiciones, por lo que podemos concluir que no hay síntesis de nueva enzima.

En resumen, este conjunto de antecedentes sugiere fuertemente que el mecanismo involucrado en la regionalización no compromete ni síntesis

proteica ni activación enzimática. Por tanto, el proceso de especificación regional sería la consecuencia del reordenamiento de la enzima en la zona de contacto intercelular.

4. ¿POR QUE LA REGIONALIZACION NO ES EVIDENTE DESDE EL MOMENTO EN QUE SE ESTABLECE EL PRIMER CONTACTO CELULAR?

La pregunta formulada tiene dos respuestas posibles: (a) porque se requiere incrementar el área de contacto celular o el tiempo de contacto celular y, (b) porque se requiere de más horas de desarrollo del embrión (edad).

Un incremento del área de contacto celular ocurre normalmente cuando el embrión de 2 células se segmenta a 4 células. Experimentalmente, agregar dos embriones de 2 células también representa un incremento del área de contacto y como se ha demostrado esta operación provoca la regionalización (Sepúlveda, 1990). Pero si el área de contacto se incrementa todavía más porque en vez de ordenar los embriones linealmente se les congrega aumentando los nuevos contactos a dos o tres, el porcentaje de contactos regionalizados

disminuye (Sepúlveda & Izquierdo, 1990). En consecuencia, éste último experimento no demuestra que un aumento del área de contacto cause un aumento de la regionalización. Pero tampoco lo descarta, primero, porque los resultados podrían atribuirse a la escasez de enzima presente y segundo, porque no parece posible precisar cuánto se incrementa el área de contacto celular en los distintos ordenamientos. En cambio, al provocar la regionalización en un embrión de 2 células con lectinas hemos demostrado una correlación positiva entre su concentración y el porcentaje de embriones regionalizados en la unidad de tiempo. Este resultado puede atribuirse a la magnitud de la superficie estimulada sin que haya limitación de la enzima disponible ya que sólo se regionaliza el contacto natural.

Por otra parte, se ha demostrado que no existen diferencias en el número de contactos regionalizados al comparar agregados de 2 células tempranos con tardíos a menos que el tiempo que permanezcan en contacto sea distinto (Sepúlveda & Izquierdo, 1990). Esto demostraría que la edad de los embriones no determina el momento en que ocurre la regionalización sino que el tiempo de contacto.

5. LA LLEGADA DE FAL AL CONTACTO CELULAR SE PRODUCE POR MOVIMIENTO DE LA ENZIMA EN EL PLANO DE LA MEMBRANA Y NO POR MOVILIZACION DESDE UN COMPARTIMIENTO INTRACELULAR A LA SUPERFICIE DE CONTACTO.

Para entender como FAL llega al contacto celular es preciso conocer cual es el compartimiento celular que concentra su actividad. Este podría ser la membrana plasmática, vesículas exocíticas u organelos o encontrarse libre en el citoplasma. Los experimentos de fraccionamiento de embriones, realizados en esta tesis, permitieron demostrar que cerca de un 95 % de la actividad total de FAL en embriones de 2 células se recupera en la fracción precipitable a baja velocidad (10.000 x g). La actividad recuperada en el sobrenadante, alrededor de un 5 %, es despreciable demostrando que la enzima no se encuentra ni libre en el citoplasma ni contenida en vesículas exocíticas o pequeños organelos (Tartakoff & Jamieson, 1974). Tampoco es factible que la enzima este en forma enmascarada, porque al tratar el sobrenadante con detergente no se encuentra más actividad. Además, recordemos que cerca del total de la actividad proviene de la fracción precipitable, que es la que concentra grandes organelos como el núcleo y la membrana plasmática. Sabemos que este último componente esta

presente pues la homogeneización de los embriones genera grandes fragmentos de membrana plasmática que decantan a baja velocidad y pueden detectarse en el pellet mediante microscopía de Nomarski. En el medio donde se homogeneizaron los embriones el ión magnesio está presente por lo que no se descarta que una pequeña fracción de la membrana plasmática esté formando parte del sobrenadante en la forma de pequeñas vesículas (fantasmas), pues está descrito que el sellamiento de fragmentos de membrana puede ocurrir en presencia de iones calcio y/o magnesio (Núñez *et al.*, 1992).

Limitaciones derivadas de la disponibilidad de embriones impidió posteriores fraccionamientos o simplemente la purificación de membrana plasmática.

En síntesis, los experimentos realizados en esta tesis mostraron que la actividad de FAL se concentra en la fracción de membrana plasmática y no en aquella que agrupa pequeños organelos y vesículas. De hecho, estudios de microscopía electrónica revelan que la actividad de FAL, detectada citoquímicamente, sólo se encuentra en las membranas de contacto celular y no asociada a vesículas exocíticas, mitocondrias u

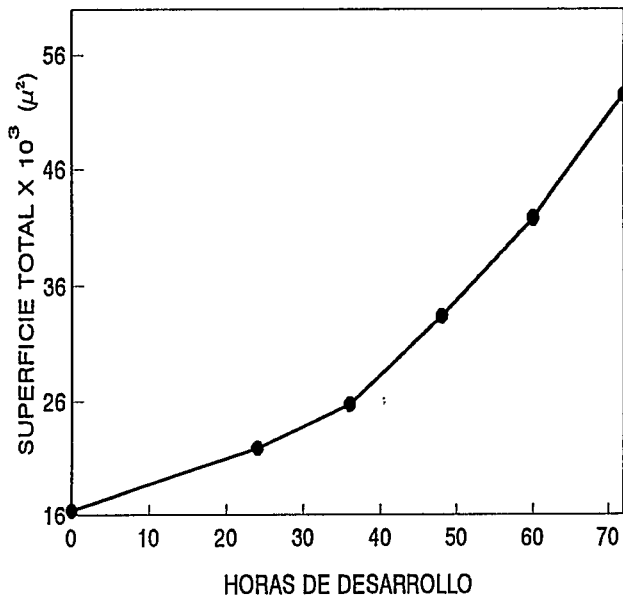
otras estructuras celulares (**FIGURA 35**, cedida por Izquierdo & López, no publicado) con la excepción de los cuerpos cristaloides, como se indico más atrás. Además, por inmunocitoquímica (Ziomek *et al.*, 1986) e inmunofluorescencia indirecta (Becker, 1988), empleando anticuerpos contra FAL, se ha podido demostrar la presencia de la enzima sólo en la superficie celular tanto en ovocitos como en embriones tempranos de ratón.

Es probable, por tanto, que durante el proceso de regionalización la enzima se desplace en el plano de la membrana y no provenga de otros compartimentos celulares.

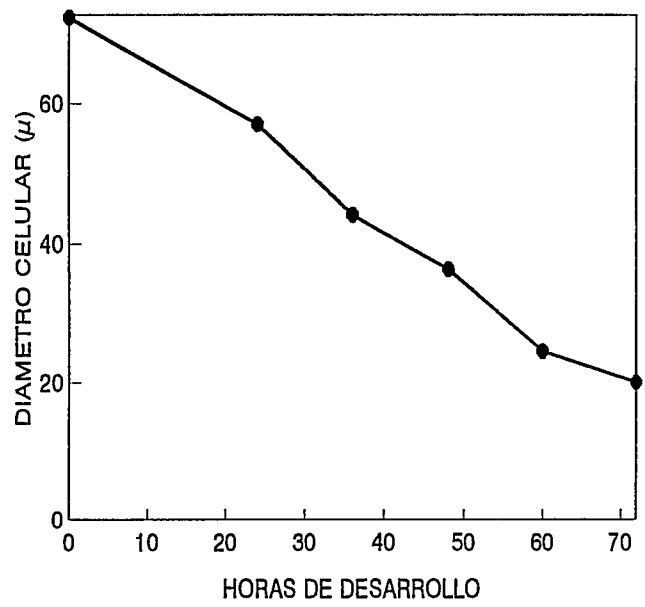
6. LA ACTIVIDAD REGISTRADA A TRAVES DE LOS ENSAYOS ENZIMATICOS PARECE CORRESPONDER SOLO A FAL.

La evidencia disponible hasta el momento sugiere fuertemente que el total de la actividad de FAL radicaría en la superficie celular, y que la nueva enzima aportada por síntesis también tendría este destino. Sin embargo, surge la pregunta ¿Es sólo FAL la enzima que se mide en los ensayos enzimáticos? o dicho de otra forma, ¿Es la actividad registrada

SUPERFICIE TOTAL



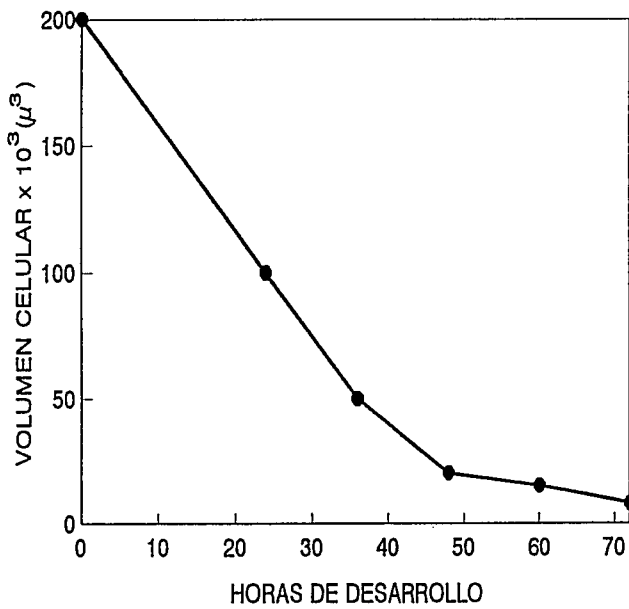
DIAMETRO CELULAR



nº células: 2 4 8 16 32

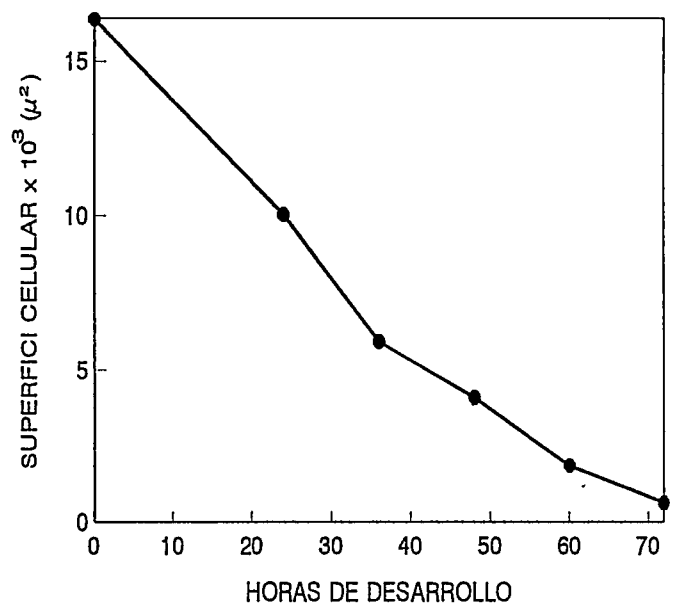
2 4 8 16 32

VOLUMEN CELULAR



nº células: 2 4 8 16 32

SUPERFICIE CELULAR



2 4 8 16 32

Figura 35

producto sólo de la enzima comprometida en la regionalización?. Fué de interés reponder a esta interrogante, pues en los ensayos enzimáticos FAL fue extraída de la membrana con un método no selectivo, empleando como agente de solubilización el detergente NP-40.

Sustituyendo el detergente NP-40 por la enzima PI-PLC, como agente de extracción, se demostró, al igual como lo han hecho otros grupos (Low & Zilvermit, 1980; Low, 1987; Cross, 1987; Hoffmann-Blume *et al.*, 1991), que FAL está anclada a la membrana plasmática a través de un glicofosfolípido denominado glicosil-fosfatidil-inositol (GPI). Esta característica ausente en otras fosfatasas (Ferguson & Williams, 1988; Cohen, 1989) con la excepción de 5NUC (Low & Finean, 1978), representa una forma selectiva para remover a la enzima de la membrana.

El tratamiento con la enzima PI-PLC permitió recuperar alrededor del 50 % del total de actividad detectada en los embriones. Esto no significa que sólo la mitad de la FAL se encuentra anclada por GPI, pues no se realizó un estudio de dosis-respuesta con la enzima PI-PLC como para establecer las condiciones de tiempo y concentración

necesarias para obtener el máximo de extracción. Además, aunque se demostrara que sólo la mitad de la actividad puede ser removida por la enzima PI-PLC, no se podría descartar que la enzima remanente, no liberada, se encuentre también anclada por un tallo del tipo GPI. Un estudio reciente demuestra que parte de la FAL anclada a través de GPI puede ser resistente a la acción de la enzima PI-PLC (Bublitz *et al.*, 1993). Esto supone la existencia de una heterogeneidad en la composición del tallo, en donde algunos de ellos no serían susceptibles a la hidrólisis por parte de la enzima PI-PLC. Esto podría explicar la eficiencia variable, entre 60 % y 100 %, que tiene PI-PLC para liberar a FAL de la membrana (Noda *et al.*, 1987; Hoffmann-Blume *et al.*, 1991; Brunner *et al.*, 1991). Pese a estos antecedentes no se puede descartar que la actividad no recuperada por el tratamiento con la enzima PI-PLC pertenezca a otras fosfatasas. Aunque, realizando cultivos prolongados de embriones, 20 h o más, con la enzima PI-PLC se ha conseguido liberar el total de la actividad de FAL reconocida por los métodos citoquímicos. En los ensayos enzimáticos, en cambio, los cultivos con la enzima PI-PLC no fueron superiores a 2 h, lo que podría explicar por que sólo pudimos remover sólo 50 % de la actividad total presente en los embriones.

Los parámetros cinéticos también puede ser útiles para evaluar la contribución de otras fosfatasas a la actividad registrada, pues un buen criterio para juzgar la pureza de nuestras determinaciones enzimáticas es demostrar que la K_m de la enzima no purificada, presente en los extractos de embriones, es semejante a la de una forma pura.

Aunque no se disponía de FAL purificada de embriones, se contaba con una isoforma comercial, purificada de intestino (Sigma). La K_m de esta enzima resultó ser un orden de magnitud mayor (resultado no mostrado), pero dentro del rango micromolar, con respecto a la obtenida en el extracto de embriones. Pero esta diferencia no es considerada importante pues es de la magnitud esperada para isoformas distintas de la enzima (Fishman & Ghosh, 1967), por tanto, este criterio sugiere cierta especificidad del ensayo enzimático realizado.

También, las condiciones excepcionales de pH ($\text{pH} > 10$) que se requieren para un funcionamiento óptimo de la FAL constituyen una restricción severa a la participación eficiente de otras fosfatasas.

En conjunto, las evidencias presentadas permiten concluir que el

grueso de la actividad medida a través de los ensayos enzimáticos correspondería a FAL.

7. FUNCION DEL CITOESQUELETO EN EL ESTABLECIMIENTO Y MANTENCION DE LA REGIONALIZACION.

La evidencia disponible hasta el momento permite proponer que el fenómeno de regionalización es el resultado de la redistribución de FAL por la superficie celular, proceso que culminaría con el atrapamiento de la enzima en el contacto celular. Un mecanismo de esta naturaleza podría involucrar al citoesqueleto, como lo ha podido demostrar Pey (1992) con respecto a la movilización de uvomorulina a la región de contacto celular durante el proceso de compactación. Por otra parte, estudios sobre regionalización de FAL y 5'NUC empleando drogas inhibidoras de microfilamentos o microtúbulos, muestran que un alto porcentaje de embriones incubados con estos inhibidores fracasan en acumular FAL en las superficies basolaterales de contacto, sugiriendo que ambos componentes citoesqueléticos pueden ser importantes en la regionalización de la membrana plasmática (Izquierdo *et al.*, 1984). Sin embargo, un trabajo posterior de nuestro laboratorio (Sepúlveda, 1990)

ha mostrado que la regionalización provocada por lectinas en embriones de 2 células, no es suprimida en presencia de inhibidores tales como Colchicina y Citochalasina D, que afectan la estabilidad de microtúbulos y actina, respectivamente. Pero en este estudio, a diferencia del anterior, los tiempos de cultivo en presencia de los inhibidores del citoesqueleto fueron cortos, 2 h contra 44 h, y por tanto esta diferencia podría explicar los resultados obtenidos en cada caso. Además, en ambos estudios se utilizó concentraciones de droga que interfieren con el clivaje pero no con la compactación (Izquierdo *et al.*, 1984) por lo que podrían existir umbrales de respuesta con lo cual un pulso prolongado con un inhibidor podría ser equivalente a una mayor dosis en corto tiempo. Por ejemplo, otros estudios han demostrado que distintas concentraciones de citochalasina D afectan de manera diferente procesos del desarrollo (Fernández *et al.*, 1990). Por lo tanto, estas observaciones sugieren la existencia de componentes citoesqueléticos con distinta sensibilidad a la acción de drogas que interfieren con su estabilidad y dinámica.

En síntesis, confirmar la participación del citoesqueleto en un fenómeno particular requiere de estudios más completos, donde se

ensayen diferentes tiempos y dosis de inhibidores, así como también más de un tipo de droga por cada componente de citoesqueleto. En este sentido, resulta útil conocer la efectividad de ciertos inhibidores sobre componentes específicos del citoesqueleto. Por ejemplo, se ha demostrado que los microfilamentos corticales son particularmente sensibles a la citochalasin B, la que afecta fenómenos de distribución de antígenos de superficie (Pierce & Calarco, 1990).

Estos antecedentes hicieron aconsejable reestudiar el papel del citoesqueleto en la regionalización. Utilizando citochalasin B o nocodazol, para inhibir la polimerización de microfilamentos y microtúbulos, respectivamente, se consiguió interferir con la expresión regionalizada de FAL. El resultando fué un patrón alterado en la distribución de la enzima. En presencia de citochalasin B la actividad se concentra en el contacto celular y en porciones de membrana próximas a esta región. Por otro lado, la presencia de nocodazole generó una marca difusa por la superficie con escasa concentración de FAL en el contacto celular. Los resultados sugieren que los microfilamentos serían importantes para la movilización de la enzima por la superficie celular, permitiendo la regionalización. Los

microtúbulos, por otra parte, participarían en el anclaje de FAL en la zona de contacto celular, permitiendo la retención de la enzima en esta región. La función que se propone para ambos componentes del citoesqueleto guarda estrecha relación con su distribución en embriones iniciales de ratón, ya que los microtúbulos se concentran en la corteza o "cortex" de las zonas de contacto celular (Ducibella *et al.*, 1977) mientras los microfilamentos lo hacen en la corteza de las superficies celulares libres (Lethonen & Badley, 1980).

El confinamiento de proteínas de membrana en dominios regionales requiere que la difusión de estos antígenos sea restringida (Wolf, 1983). Por ejemplo, las uniones estrechas o "tight junctions" dispuestas entre los dominios apicales y basolaterales de células polarizadas constituyen barreras a la difusión de componentes de membrana entre estos compartimientos (Dragsten *et al.*, 1981). Por un proceso equivalente se podría explicar como FAL es retenida en el contacto celular. Sin embargo, un mecanismo de este tipo podría comenzar a operar en la compactación, pues sólo a partir de este momento se establecen uniones estrechas en el límite entre las zonas de contacto celular y las superficies celulares expuestas (Ducibella *et al.*, 1975;

Magnuson *et al.*, 1977). Antes que esto ocurra el citoesqueleto podría ser el encargado de restringir el movimiento de proteínas por la superficie celular.

Surge la pregunta ¿Cómo puede el citoesqueleto actuar sobre el movimiento y localización de FAL si la enzima no presenta un dominio citoplasmático?. La respuesta se complica pues como ocurre en otros sistemas (Low *et al.*, 1986) FAL se encuentra anclada a la membrana plasmática de las células embrionarias a través de un glicofosfolípido presente en la mitad externa de la membrana. Esto impediría un contacto directo entre algún componente del citoesqueleto y la enzima. Incluso se podría pensar que proteínas ancladas a través de estos tallos tampoco tendrían la propiedad de actuar como receptores. Sin embargo, se ha demostrado que proteínas ancladas por GPI participan en procesos celulares mediados por segundos mensajeros (Su *et al.*, 1991). Además, se ha propuesto que receptores para factores de crecimiento que se insertan a la membrana a través GPI actuarían a través de proteínas de transmembrana (Nicola & Metcalf, 1991). Por intermedio de estas últimas se podrían transducir señales o establecer contactos con el citoesqueleto. Esto permitiría explicar como el citoesqueleto podría

movilizar a FAL a lo largo de la superficie celular, sin que medie un contacto directo entre ambos.

8. LA DINAMICA DE CONCENTRACION DE ALGUNOS ANTIGENOS DE SUPERFICIE SUMINISTRA EVIDENCIA EN FAVOR DE UN MECANISMO DE REDISTRIBUCION DE FAL DIRIGIDO AL CONTACTO CELULAR.

Al estudiar la distribución de antígenos de superficie en embriones de 2 células se encuentra que los anticuerpos monoclonales F2A6 y H6B2 reconocen antígenos cuya distribución cambia con la edad del embrión. En embriones tempranos de 2 células se observa un patrón uniforme de la marca mientras que en los embriones tardíos la marca se aproxima y concentra en las regiones cercanas al contacto celular. Por último, en embriones de 2 células de edad intermedia la marca es escasa en las regiones opuestas al contacto. Estos cambios en la distribución de los antígenos referidos no son una regla ya que otros anticuerpos monoclonales como 6F2 y 2D10, reconocen epítomos cuya distribución no experimenta cambios con la edad del embrión. Una situación similar se observa en glicoproteínas o glicolípidos de la superficie celular que son reconocidos por las lectinas Con A o WGA, cuya distribución como se ha mostrado es uniforme y constante durante las primeras

etapas del desarrollo.

Los anticuerpos monoclonales F2A6 y H6B2 probablemente reconocen epítomos diferentes de la misma molécula pues su distribución en embriones iniciales, al igual que en tejidos embrionarios y adultos, es idéntica (Becker, 1988). Aunque se desconoce la identidad del antígeno que reconocen estos anticuerpos hay evidencia que sugiere que podría estar dirigidos contra FAL. Primero, porque el anticuerpo F2A6 reconoce un antígeno que se colocaliza con FAL en la superficie del epitelio que reviste al lumen del oviducto (Becker, 1988). Segundo, porque los anticuerpos 5D1 y 1C3 que retienen actividad de FAL en extractos de embriones por medio de ensayos de ELISA, reconocen antígenos de superficie cuya expresión durante el desarrollo coincide temporal y espacialmente con el antígeno que detectan los anticuerpos F2A6 y H6B2 (Becker, 1988). El hecho que estos últimos anticuerpos no capturen actividad de FAL no descarta que ellos reconozcan la referida enzima, pues podrían estar dirigidos contra el sitio activo de la enzima. Otra posibilidad, es que los anticuerpos F2A6 y H6B2 estén reconociendo a la enzima 5NUC que se regionaliza junto con FAL (Izquierdo & Ebensperger, 1982). Tercero, porque los diferentes

anticuerpos monoclonales que se ensayaron en esta tesis se obtuvieron inmunizando ratas con extractos de embriones de ratón en estado de mórula, donde FAL es uno de los antígenos más estables y dominantes. Por esto es posible que varios de los anticuerpos producidos estén dirigidos contra esta enzima.

También, es posible que F2A6 y H6B2 estén reconociendo a la supuesta proteína que postulamos actuaría de nexo entre la enzima y el citoesqueleto. Por último, estos anticuerpos podrían estar dirigidos contra otros antígenos de superficie celular que se regionalizan como FAL. En cualquier caso, la evidencia disponible apoya la idea que el mecanismo que da inicio a la regionalización tiene que ver con la movilización de enzima hacia el sitio de contacto celular.

El reconocimiento de epítomos de superficie cuya distribución cambia en el tiempo sugiere la existencia de antígenos que son movilizados por el citoesqueleto. Los cambios de posición del antígeno tienen vectorialidad, se producen en bloque y concertadamente, tal como se ha demostrado para ciertas glicoproteínas de membrana que son excluidas del contacto celular por acción del citoesqueleto (Pierce &

Calarco, 1990) o para uvomorulina que también es transportada por el citoesqueleto hacia las zonas de contacto celular durante la compactación (Vestweber *et al.*, 1987). Sin embargo, la evidencia presentada no descarta que la llegada de FAL al contacto celular ocurra por un proceso de difusión de la enzima en el plano de la membrana en forma análoga a como se ha demostrado para el receptor de acetilcolina. En un principio éste difunde libremente por la superficie del miotubo y más tarde es retenido y segregado en la superficie donde se establece la unión neuromuscular (Hall & Sanes, 1993).

A partir de los coeficientes de difusión ($D = 0.58-1.77 \times 10^{-9}$ cm²/s) determinados para FAL (Noda *et al.*, 1987) es posible estimar el tiempo que tomaría a la enzima trasladarse por la superficie de uno de los dos primeros blastómeros. Esta superficie es cercana a 2.000 μm² y como los D para FAL están entre 210-637 μm²/h la difusión de la enzima requeriría de 3-9 h. Este tiempo es confirmado por experimentos de fotoblanqueo realizados en embriones iniciales de ratón (Ziomek *et al.*, 1984). En tanto, si FAL fuese una proteína integral de membrana le tomaría a ésta un par de días trasladarse las distancias antes señaladas, pues la movilidad lateral de las proteínas intrínsecas de

membrana es un orden de magnitud menor que la encontrada para la enzima (Gall & Edelman, 1981). Sólo los fosfolípidos de membrana tienen coeficientes de difusión equivalentes a los de FAL (Handyside *et al.*, 1987), que son precisamente los componentes que anclan la enzima a la membrana. Por otra parte, al relacionar nuestras estimaciones con los tiempos que toma la regionalización normal o inducida hay una notable coincidencia. Así, desde que se detecta la actividad de FAL en el embrión de 2 células hasta que se reconoce su localización en el contacto celular del embrión de 4 células transcurre un máximo de 10 h. En cambio, la regionalización inducida con lectinas toma entre 3 y 4 h. En síntesis, es factible que un proceso de difusión simple explique la llegada de FAL al contacto celular.

9. MECANISMOS QUE PODRIAN EXPLICAR LA PERSISTENCIA DE LA REGIONALIZACION DURANTE EL DESARROLLO INICIAL.

Los datos suministrados en esta tesis sugieren dos maneras como explicar el desplazamiento de FAL por la membrana hasta llegar al contacto celular: (a) pasiva o por difusión simple y (b) activa por acción del citoesqueleto. Sin embargo, se desconoce como se podría mantener

en el tiempo una localización regionalizada de la enzima. Al respecto comentaremos algunas alternativas:

(1) Los microtúbulos podrían servir de andamio para fijar la posición de la enzima, ya que éstos se encuentran precisamente localizados en la corteza de las zonas de contacto celular (Ducibella *et al.*, 1977). Sin embargo, esta posibilidad supone la existencia de una proteína que permitiría la interacción entre la enzima y el citoesqueleto, pues FAL se encuentra anclada a la membrana celular a través de un fosfolípido. No tenemos pruebas de la existencia de una proteína con estas propiedades, pero si hemos demostrado que al inhibir la polimerización de los microtúbulos la enzima pierde su regionalización dispersándose por la superficie del embrión. Sin embargo, éste hallazgo no es suficiente para afirmar que FAL estaría en contacto con el citoesqueleto pues se ha demostrado que la integridad de estos componentes es esencial para preservar la organización general de los componentes de superficie, particularmente de aquellos que muestran una distribución no uniforme producto del contacto celular. Por ejemplo, en un embrión temprano las superficies expuestas de los blastómeros son microvellosas pero no las superficies de contacto entre ellos. Sin embargo, al cultivar estos embriones en presencia de

inhibidores de microfilamentos y/o microtúbulos este patrón resulta profundamente alterado (Izquierdo *et al.*, 1984). Por tanto, es posible que el citoesqueleto este cumpliendo una función de organizador y/o estabilizador de dominios de membrana sin que necesariamente medien interacciones con los componentes ahí segregados. Esto permitiría explicar como el citoesqueleto podría afectar la distribución de FAL sin que haya una interacción entre ambos.

(2) El atrapamiento de FAL en el contacto celular podría ocurrir a través de uniones homofílicas (Edelman, 1985) entre moléculas de enzima, tal como se ha demostrado para uvomorulina durante la compactación del embrión de ratón (Peyrieras *et. al*, 1983). Recientemente, se ha propuesto un modelo donde moléculas de FAL que se enfrentan por sus extremos amino terminales gozarían de una tendencia espontánea a formar uniones de tipo homofílico (Bublitz *et al.*, 1993). Un mecanismo similar podría operar en la estabilización topográfica de FAL en la zona de contacto celular. En este caso, el encuentro entre moléculas de FAL presentes en ambas caras de la membrana de la región de contacto permitiría una interacción homofílica entre ellas fijando su posición. Esto explicaría porqué al unir una esfera de agarosa recubierta con lectina con un embrión de 2 células nunca se

observa regionalización en el contacto entre la esfera de agarosa y el embrión pero si en el contacto entre los blastómeros del embrión (Sepúlveda, 1990).

(3) Como una variante del mecanismo recién planteado podríamos postular que el atrapamiento de FAL en el contacto celular se produciría por la unión de la enzima con elementos de la matriz extracelular. La evidencia disponible apoya un modelo de este tipo pues en embriones de 2 células es posible reconocer elementos de matriz extracelular como laminina sobre la superficie celular (Dziadek & Timpl, 1985). Además, en estudios de cultivo celular se ha demostrado que líneas celulares que expresan altos niveles de FAL poseen propiedades adhesivas aumentadas con respecto a líneas celulares que expresan bajos niveles de la enzima (Hui *et al.*, 1993). Mas aún, la enzima 5NUC, que se regionaliza junto con FAL, tiene la capacidad de interactuar específicamente con proteínas de matriz extracelular tales como laminina y fibronectina (Stochaj *et al.*, 1989).

(4) Podemos establecer similitudes entre las células de un embrión y las que constituyen un epitelio; en ambos casos se establece una polaridad en las células pudiendo distinguirse un dominio apical, o región libre de contacto, y otro basolateral, o región de contacto.

Llevando a un extremo esta analogía podríamos postular que los mecanismos que dan cuenta de la polaridad en epitelios son también válidos para entender como surge la polaridad en el embrión en desarrollo. Numerosas evidencias han mostrado que el glicofosfolípido (GPI), el mismo que ancla a FAL a la membrana, serviría como una señal de destino para dirigir a las proteínas que lo contienen al dominio apical de células epiteliales (Lisanti & Rodriguez-Boulan, 1990). Justamente éste dominio es rico en glicoesfingolípidos con los cuales GPI puede interactuar establemente a través de puentes de hidrógeno (Simons & Van Meer, 1988) constituyendo dominios celulares que imponen restricción a la movilidad de las proteínas unidas por estos tallos. Algo similar podría ocurrir con FAL, si en el contacto celular se establece este tipo de dominios fosfolipídicos. La consolidación de estos dominios en estados más avanzados del desarrollo podría depender del establecimiento de uniones estrechas que se localizan precisamente en el límite entre la zona de contacto y la zona libre de contacto entre los blastómeros de la mórula (Izquierdo *et al.*, 1976). En epitelios se ha demostrado que las uniones estrechas constituyen una barrera adicional para la difusión de componentes lipídicos o proteicos (Dragsten *et al.*, 1981) y por lo tanto son indispensables para preservar

dominios celulares e impedir la distribución uniforme de componentes.

No estamos en condiciones de inclinarnos por alguna de las alternativas que planteamos, pero éstas constituyen interesantes hipótesis de trabajo.

10. EL PROCESO DE REGIONALIZACION DE FAL SERIA ANALOGO AL DEL RECEPTOR DE ACETILCOLINA DURANTE EL DESARROLLO DE LA SINAPISIS NEUROMUSCULAR.

Los mecanismos que postulamos para explicar como se establece y mantiene la regionalización de FAL son semejantes a los postulados para explicar la regionalización del receptor de acetilcolina durante la diferenciación de la sinápsis neuromuscular. Antes que se establezca una sinápsis en el miotubo, el receptor de acetilcolina (AChR) se encuentra distribuido uniformemente por la superficie, sin embargo, por su dispersión no es posible reconocerlo por técnicas de inmunofluorescencia indirecta. El receptor sólo es reconocido por estas técnicas cuando se establece la unión neuromuscular y los receptores se agrupan en esta región (Nastuk & Fallon, 1993). Algo semejante ocurre con la distribución de FAL en el embrión temprano de ratón. En este

último es posible demostrar que la enzima esta presente desde el estado de 2 células pero su presencia no se puede verificar por técnicas citoquímicas sino hasta el estado de 4 células, cuando la enzima se concentra en el contacto celular. En ambas formas de regionalización el contacto celular es la causa del fenómeno. Al denervar la célula muscular se produce la dispersión del AChR por la superficie celular (Hall & Sanes, 1993). En forma análoga, la regionalización de FAL se pierde al disociar los blastómeros del embrión (Izquierdo *et al.*, 1980).

Aunque el AChR es una proteína transmembrana su traslación por la superficie del miotubo se realiza por un proceso de difusión (Hall & Sanes, 1993) que culmina cuando el receptor es confinado a la unión neuromuscular. El AChR es retenido en esta región al ser anclado al citoesqueleto a través de complejos proteicos integrados por proteínas de matriz extracelular, de transmembrana y citoplásmicas (Hoch *et al.*, 1994). Más tarde, las nuevas moléculas de AChR aportadas por síntesis serán enviadas a estos dominios celulares por un mecanismo de "sorting" (Rotundo & Gomez, 1990). En forma semejante, nuestros resultados sugieren que FAL podría alcanzar el contacto celular por un proceso de difusión. En este lugar se concentrarían proteínas de matriz

extracelular y elementos del citoesqueleto por lo que un mecanismo similar al que explica la retención de AChR en la unión neuromuscular podría ser válido para explicar la mantención de FAL en las zonas de contacto celular. Las evidencias aportadas por ésta tesis sugieren que la regionalización de FAL sería mantenida gracias a la síntesis de nueva enzima. Esta última podría ser dirigida al contacto celular por un mecanismo de "sorting" pues se ha demostrado que el mismo glicofosfolípido que ancla a FAL a la membrana es una señal de destino en epitelios polarizados (Lisanti & Rodriguez-Boulan, 1990).

En síntesis, los mismos mecanismos que se han propuesto para explicar la segregación de componentes celulares en sistemas en diferenciación podrían estar operando en el inicio y mantención de la regionalización durante el desarrollo.

11. RELACION FUNCIONAL ENTRE EL PROCESO DE REGIONALIZACION Y COMPACTACION.

Se ha considerado a la regionalización de la membrana plasmática como uno de los primeros indicios de un orden espacial en el embrión de mamíferos y por tanto como uno de los eventos más tempranos en la

cascada de procesos que culminan con la diferenciación celular (Izquierdo, 1986). Sin embargo, hasta hoy se desconoce el significado del fenómeno de especificación regional. Por ésto decidimos estudiar la importancia de éste fenómeno en relación a otros procesos del desarrollo que parecen conectarse causalmente con la regionalización.

Por ejemplo, alguno de los agentes que inducen la regionalización, como WGA u OAG, también son capaces de gatillar un fenómeno comparable, morfológicamente, a la compactación (Bloom, 1989; Sepúlveda, 1990). En esta tesis se ha demostrado que ésta semejanza también es funcional porque al igual como la compactación normal, la inducida es: (1) bloqueada o revertida al retirar calcio del medio; (2) se acompaña de la regionalización de uvomorulina en las zonas de contacto celular y; (3) puede ser inhibida al bloquear la proteína calmodulina. Por estas razones la compactación inducida en el embrión de 2 células es similar a la que ocurrirá dos ciclos celulares más tarde en el embrión de 8 células.

Lo interesante es que el fenómeno de compactación se puede anticipar con los mismos agentes que inducen la regionalización de

FAL, lo cual sugiere una relación causal entre ambos procesos. De hecho, al cultivar embriones en presencia de la enzima PI-PLC, que libera a FAL de la membrana, hemos demostrado que la compactación no se produce. A esto se suma que existe una estrecha relación entre la expresión de FAL, la compactación (Hahnel *et al.*, 1990) y fenómenos de adhesión celular discutidos más atrás (Hui *et al.*, 1993). Estudios anteriores de nuestro grupo también han mostrado una relación entre la regionalización y la compactación (Izquierdo *et al.*, 1984). Estos datos sugieren que la regionalización de FAL podría ser un prerrequisito para la compactación. En consecuencia, como la compactación inducida es la anticipación del fenómeno normal, la regionalización inducida tendría el mismo carácter.

REFERENCIAS

- BARON, M.D.; POPE, B. & LUZIO, P. (1986). The membrane topography of ecto-5'-nucleotidase in rat hepatocytes. *Biochem. J.* **236**: 495-502.
- BARRON, D.J.; VALDIMARSSON, G.; PAUL, D.L. & KIDDER, G.M. (1989). Connexin 32, a gap junction protein, is a persistent oogenetic product through preimplantation development of the mouse. *Dev. Genet.* **10**: 318-323.
- BAYLES, E. M.; SOOS, M.; JACKSON, P.; NEWBY, A.C.; SIDDLE, K. & LUZIO, J.P. (1984). The existence and properties of two dimers of rat liver ecto-5'-nucleotidase. *Biochem. J.* **221**: 369-377.
- BECKER, M.I. (1988). Estudio de la superficie celular del embrión inicial de mamíferos mediante anticuerpos monoclonales. Tesis de Doctorado. Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.
- BECKER, M. I. & IZQUIERDO, L. (1982). Electron microscope observation on preimplantation mouse embryos cultured with LiCl. *Anat. Embryol.* **164**: 343-347.
- BERMAN, J.J.; TONG, C. & WILLIAMS, G.M. (1980). 5'-nucleotidase activities in cultured rat liver epithelial and fibroblast cells. *J. Histochem. Cytochem.* **28**: 174-177.

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

BRAUN, J. & UNANUE, E.R. (1983). Surface immunoglobulin and the lymphocyte cytoskeleton. *Feder. Proc.* **42**: 2446-2451.

BRUNNER, G.; GABRILOVE, J.; RIFKIN, D.B. & WILSON, E.L. (1991). Phospholipase C release of basic fibroblast growth factor from human bone marrow cultures as a biologically active complex with a phosphatidylinositol-anchored heparan sulfate proteoglycan. *J. Cell Biol.* **114**: 1275-1283.

BUBLITZ, R.; ARMESTO, J.; HOFFMAN-BLUME, E.; SCHULZE, M.; RHODE, H.; HORN, A.; AULWURM, S.; HANNAPEL, E. & FISCHER, W. (1993). Heterogeneity of glycosylphosphatidylinositol-anchored alkaline phosphatase of calf intestine. *Eur. J. Biochem.* **217**: 199-207.

BURSTONE, M.S. (1962). Phosphatases. En: "Enzyme histochemistry" (Burstone, M.S., ed.). Academic Press Inc., pp. 160-280.

CACHICAS, V. (1989). Estudio de fosfatasa alcalina en el desarrollo inicial del ratón mediante anticuerpos monoclonales de rata dirigidos contra células de teratocarcinoma de la línea F9 de ratón. Tesis para optar al título de bioquímico. Universidad de Concepción.

CACHICAS, V.; IMARAI, M.; DE IOANNES, A.; IZQUIERDO, L. & BECKER, M.I. (1988). Expresión de fosfatasa alcalina en el desarrollo inicial de mamíferos. *Arch.*

Biol. Med. Exp. **21**: R-439.

CALARCO, P. & BROWN, E.H. (1969). An ultrastructural and cytological study of preimplantation development of the mouse. *J. Exp. Zool.* **171**: 253-284.

CARRAWAY, K.L.; DOSS, R.C.; HUGGINS, J.W.; CHESNUT, R.W. & CARRAWAY, C.A. (1979). Effects of cytoskeletal perturbant drugs on ecto 5'-nucleotidase, a concanavalin A receptor. *J. Cell Biol.* **83**: 529-5543.

CARROL, A.G. & ECKBERG, W.R. (1986). Inhibition of germinal vesicle breakdown and activation of cytoplasmic contractility in *Spisula* oocytes by calmodulin antagonists. *Biol. Bull.* **170**: 43-50.

COHEN, P. (1989). The structure and regulation of protein phosphatases. *Ann. Rev. Biochem.* **58**: 453-508.

CROSS, G.A.M. (1987). Eukaryotic protein modification and membrane attachment via phosphatidylinositol. *Cell* **48**: 179-181.

CUELLO, A.C. (1984). *Immunohistochemistry*. John Wiley & Sons.

DEALTRY, G.B.; CURRY, M.R. & SELLENS, M.H. (1987). Fucosylated glycoconjugates appear on mouse embryos during blastocyst formation. *J. Exp. Zool.*

243: 163-169.

DOMON, M.; TAKAHASHI, I. & ONODERA, K. (1986). Modulation in protein phosphorylation during G2 phase of the cell cycle in two-cell mouse embryos. *Exp. Cell Res.* **162**: 169-174.

DRAGSTEN, P.R.; BLUMENTAL, R. & HANDLER, J.S. (1981). Membrane asymmetry in epithelia: is the tight junction a barrier to diffusion in the plasma membrane?. *Nature* **294**: 718-722.

DUCIBELLA, T. (1980). Divalent antibodies to mouse embryonal carcinoma cells inhibit compaction in the mouse embryo. *Dev. Biol.* **79**: 356-366.

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

DZIADEK, M. & TIMPL, R. (1985). Expression of nidogen and laminin in basement membranes during mouse embryogenesis and in teratocarcinoma cells. *Dev. Biol.* **111**: 372-382.

DZIADEK, M.; FUJIWARA, S.; PAULSSON, M. & TIMPL, R. (1985). Immunological characterization of basement membrane types of heparan sulfate proteoglycan.

EMBO J. 4: 905-912.

ECKBERG, W.R.; SZUTS, E.Z. & CARROLL, A.G. (1987). Protein kinase C activity, protein phosphorylation and germinal vesicle breakdown in *Spisula* oocytes. Dev. Biol. 124: 57-64.

EDELMAN, G.M. (1985). Cell adhesion and the molecular processes of morphogenesis. Ann. Rev. Biochem. 54: 145-169.

FERGUSON, M.A.J. & WILLIAMS, A.F. (1988). Cell-surface anchoring of proteins via glycosyl-phosphatidylinositol structure. Ann. Rev. Biochem. 57: 285-320.

FERNANDEZ, J.; OLEA, N.; TELLEZ, V. & MATTE, C. (1990). Structure and development of the egg of the glossiphoniid leech *Theromyzon rude*: reorganization of the fertilized egg during completion of the first meiotic division. Dev. Biol. 137: 142-154.

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

FERNANDEZ, S. & IZQUIERDO, L. (1983). Effect of LiCl on differentiation of mouse embryos beyond the blastocyst stage. Arch. Biol. Med. Exp. 16: 51-54.

FISHMAN, W.H. (1974). Perspectives on alkaline phosphatase isoenzymes. *Am. J. Med.* **56**: 617-646.

FISHMAN, W.H. & GHOSH, N.K. (1967). Isoenzymes of human alkaline phosphatase. *Adv. Clin. Chem.* **10**: 255-370.

FLACH, G.; JOHNSON, M. H.; BRAUDE, P.R.; TAYLOR, R.A.S. & BOLTON, V.N. (1982). The transition from maternal to embryonic control in the 2-cell mouse embryo. *EMBO J.* **1**: 681-686.

FLEMING, T.P. & JOHNSON, M.H. (1988). From egg to epithelium. *Ann Rev. Cell Biol.* **4**: 458-485.

FLEMING, T.P.; CANNON, P.M. & PICKERING, S.J. (1986). The cytoskeleton, endocytosis and cell polarity in the mouse preimplantation embryo. *Dev. Biol.* **113**: 406-419.

GALL, W.E. & EDELMAN, G.M. (1981). Lateral diffusion of surface molecules in animal cells and tissues. *Science* **213**: 903-905.

GOODALL, H. & JOHNSON, M.H. (1984). The nature of intercellular coupling within the preimplantation mouse embryo. *J. Embryol. exp. Morphol.* **79**: 53-76.

- GRAHAM, C.F. & DEUSSEN, Z.A. (1978). Features of cell lineage in preimplantation mouse embryos. *J. Embryol. exp. Morphol.* **48**: 53-72.
- HAHEL, A.C.; RAPPOLEE, A., MILLAN, J.L.; MANES, T.; ZIOMEK, C.A.; THEODOSIOU, N.G.; WERB, Z.; PEDERSER, R.A. & SCHULTZ, G.A. (1990). Two alkaline phosphatase genes are expressed during early development in the mouse embryo. *Development* **110**: 555-564.
- HALL, Z.W. & SANES, J.R. (1993). Synaptic structure and development: the neuromuscular junction. *Cell* **72**: 99-121.
- HALLCHER, L.M. & SHERMAN, W.R. (1980). The effects of lithium ion and other agents on the activity of myo-inositol-1-phosphatase from bovine brain. *J. Biol. Chem.* **255**: 10896-10901.
- HANDYSIDE, A.H.; EDIDIN, M. & WOLF, D.E. (1987). Polarized distribution of membrane components on two-cell mouse embryos. *Roux's Arch. Dev. Biol.* **196**: 273-278.
- 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.

- HERTZ, F. (1985). Alkaline phosphatase isoenzyme in cultured human cancer cells. *Experientia* **41**: 1357-1490.
- HOCH, W.; CAMPANELLI, J.T. & SCHELLER, R.H. (1994). Agrin-induced clustering of acetylcholine receptors: a cytoskeletal link. *J. Cell Biol.* **126**: 1-4.
- HOFFMAN-BLUME, E.; GARCIA-MARENCO, M.B.; EHLE, H.; BUBLITZ, R.; SCHULZE, M. & HORN, A. (1991). Evidence for glycosylphosphatidylinositol anchoring of intraluminal alkaline phosphatase of the calf intestine. *Eur. J. Biochem.* **199**: 305-312.
- HOUSLITON, E.; PICKERING, S.J. & MARO, B. (1987). Redistribution of microtubules and pericentriolar material during the development of polarity in mouse blastomeres. *J. Cell Biol.* **104**: 1299-1308.
- HUI, M.; HU, M. & TENENBAUM, H.C. (1993). Changes in cell adhesion and cell proliferation are associated with the expression of tissue non-specific alkaline phosphatase. *Cell Tissue Res.* **274**: 429-437.
- HUANG, Z.; OLSON, N.A.; YOU, W. & HAUGLAND, R.P. (1992). A sensitive competitive ELISA for 2,4-dinitrophenol using 3,6-fluorescein diphosphate as a fluorogenic substrate. *J. Immunol. Methods* **149**: 261-266.

- HYAFIL, F.; BABINET, C. & JACOB, F. (1981). Cell-cell interactions in early embryogenesis: a molecular approach to the role of calcium. *Cell* **26**: 447-454.
- ISHIYAMA, V. & IZQUIERDO, L. (1977). The onset of phosphatase activity in early mammalian embryos. *J. Embryol. exp. Morphol.* **42**: 305-308.
- IZQUIERDO, L. (1977). Cleavage and differentiation. En: "Development in mammals" (Johnson, M.H., ed.). North Holland Publ., Amsterdam. **2**: 99-118.
- IZQUIERDO, L. (1986). Desde la especificación regional a la diferenciación celular en el desarrollo preimplantacional de mamíferos. *Arch. Biol. Med. Exp.* **19**: 279-300.
- IZQUIERDO, L. & BECKER, M.I. (1980). Effect of Li⁺ on preimplantation mouse embryos. *J. Embryol. exp. Morphol.* **67**: 51-58.
- IZQUIERDO, L. & EBENSPERGER, C. (1982). Cell membrane regionalization in early mouse embryos as demonstrated by 5'-nucleotidase activity. *J. Embryol. exp. Morphol.* **69**: 115-126.
- IZQUIERDO, L. & MARTICORENA, P. (1975). Alkaline phosphatase in preimplantation mouse embryos. *Exp. Cell Res.* **92**: 399-402.
- IZQUIERDO, L.; FERNANDEZ, S. & LOPEZ, T. (1976). Cell membrane and cell

junctions in differentiation of preimplanted mouse embryos. *Arch. Biol. Med. Exp.* **10**: 130-134.

IZQUIERDO, L.; LOPEZ, T. & MARTICORENA, P. (1980). Cell membrane regions in preimplantation mouse embryos. *J. Embryol. exp. Morphol.* **59**: 89-102.

IZQUIERDO, L; LOPEZ, T. & PANUNCIO, A. (1984). Plasma membrane regionalization and compaction of mouse cleaving embryos: effect of microtubule and microfilament inhibitors. *Arch. Biol. Med. Exp.* **17**: 29-39.

JOHNSON, L.V. (1986). Wheat germ agglutinin induces compaction- and cavitation-like events in two-cell mouse embryos. *Dev. Biol.* **113**: 1-9.

JOHNSON, M.H. & MARO, B. (1984). The distribution of cytoplasmic actin in mouse 8-cell blastomeres. *J. Embryol. exp. Morphol.* **82**: 97-117.

JOHNSON, S.M.; ASHERNON, G.L.; WATTS, R.W.E.; NORTH, M.E.; ALLSOP, J. & WEBSTER, A.D.B. (1977). Lymphocyte purine 5' nucleotidase deficiency in primary hypogammaglobulinemia. *Lancet* **1**: 168-170.

KIM, J.; KIM, H.K.; KIM, K.; KIM, S.R. & CHO, W.K. (1989). Multiple forms of alkaline phosphatase in mouse preimplantation embryos. *J. Reprod. Fert.* **86**: 65-72.

- KIMBER, S.J. & BAGLEY, P.R. (1987). Cell-surface enrichment of fucosylated glycoconjugates in the 8- to 16-cell mouse embryo. *Roux's Arch. Dev. Biol.* **196**: 492-498.
- KIMBER, S.J. & BIRD, J.M. (1985). Cell surface changes in preimplantation mouse embryos during compaction investigated using FITC conjugated lectins after proteolytic enzyme treatment. *Roux's Arch. Dev. Biol.* **194**: 470-479.
- KIMBER, S.J. & SURANI, M.A.H. (1983). Coated beads stimulate single cells from mouse embryos to spread. En: "Lectins" (Bøg-Hansen, T.C. & Spengler, G.A., eds.) pp. 63-72.
- KLAUSHOFER, K. & VON MAYERBASCH, H. (1979). Freeze substituted tissue in 5'-nucleotidase histochemistry. Comparative histochemical and biochemical investigations. *J. Histochem. Cytochem.* **27**: 1582-1587.
- LEE, S.; GILULA, N.B. & WARNER, A.E. (1987). Gap junctional communication and compaction during preimplantation stages of mouse development. *Cell* **51**: 851-860.
- LEHTONEN, E. & BADLEY, R. (1980). Localization of cytoskeletal proteins in preimplantation mouse embryos. *J. Embryol. Exp. Morphol.* **55**: 211-225.
- LISANTI, M.P. & RODRIGUEZ-BOULAN, E. (1990). Glycophospholipid membrane

anchoring provides clues to the mechanism of protein sorting in polarized epithelial cells. TIBS March 15: 113-118.

LO, C.W. & GILULA, N.B. (1979). Gap junctional communication in the preimplantation mouse embryo. *Cell* **18**: 411-422.

LOIS, P. & IZQUIERDO, L. (1984). Cell membrane regionalization and cytoplasm polarization in the rat early embryo. *Roux's Arch. Dev. Biol.* **193**: 205-210.

LOW, M.G. (1987). Biochemistry of the glycosyl-phosphatidyl-inositol membrane protein anchors. *Biochem. J.* **244**: 1-13.

LOW, M.G. & FINEAN, B. (1977). Release of alkaline phosphatase from membranes by a phosphatidylinositol-specific phospholipase C. *Biochem. J.* **167**: 281-284.

LOW, M.G. & ZILVERSMIT, D.B. (1980). Role of phosphatidylinositol in attachment of alkaline phosphatase to membranes. *Biochemistry* **19**: 3913-3918.

LOW, M.G.; FERGUSON, M.A.J.; FUTERMAN, A.H. & SILMAN, I. (1986). Covalently attached phosphatidylinositol as a hydrophobic anchor for membrane proteins. TIBS 11 May: 212-215.

LUTHARDT, F.W. & DONAHUE, R.P. (1975). DNA synthesis in developing two-cell

embryos. *Dev. Biol.* **44**: 210-216.

MAGNUSON, T.; DEMSEY, A. & STACKPOLE, C.W. (1977). Characterization of intracellular junctions in the preimplantation mouse embryo by freeze-fracture and thin-section electron microscopy. *Dev. Biol.* **61**: 252-261.

MANEJWALA, F.; KAJI, E. & SCHULTZ, R.M. (1986). Development of activable adenylate cyclase in the preimplantation mouse embryo and a role for cyclic AMP in blastocoel formation. *Cell* **46**: 95-103.

MANEJWALA, F.M. & SCHULTZ, R.M. (1989). Blastocoel expansion in the preimplantation mouse embryo: stimulation of sodium uptake by cAMP and possible involvement of cAMP-dependent protein kinase. *Dev. Biol.* **136**: 560- 563.

MATTE, C.; DOGGENWEILER, C. & IZQUIERDO, L. (1987). Development of mouse embryos following the destruction of blastomeres. *Arch. Biol. Med. Exp.* **20**: 295-303.

MAYAHARA, H.; HIRANO, H.; SAITO, T. & OGAWA, K. (1967). The new lead citrate method for the ultracytochemical demonstration of activity of non-specific alkaline phosphatase (orthophosphoric monoester phosphohydrolase). *Histochimie* **11**: 88-96.

MAYOR, R. (1990). Desarrollo inicial de mamíferos: efecto de la inhibición del cambio

de forma celular y de la replicación del DNA, sobre el patrón de síntesis proteica.
Tesis de Doctorado, Fac. de Ciencias, U. de Chile.

MAYOR, R.; PEY, R. & IZQUIERDO, L. (1989). Development of cytoskeletal connections between cells of preimplantation mouse embryos. *Roux's Arch. Dev. Biol.* **198**: 233-241.

McLACHLIN, J.R.; CAVENEY, S. & KIDDER, G.M. (1983). Control of gap junction formation in early mouse embryos. *Dev. Biol.* **98**: 155-164.

MURAMATSU, T. (1988). Developmentally regulated expression of cell surface carbohydrates during mouse embryogenesis. *J. Cell Biochem.* **36**: 1-14.

MYSTKOWSKA, E.T. & SAWICKI, W. (1987). Modification of cell division by phorbol ester in preimplantation mouse embryos. *Development* **101**: 403-408.

MULNARD, J. & HUYGENS, R. (1978). Ultrastructural localizations of non specific alkaline phosphatase during cleavage and blastocyst formation in the mouse. *J. Embryol. exp. Morphol.* **41**: 121-131.

MUNKHOLM, C.; PARKINSON, D.R. & WALT, D.R. (1990). Intramolecular fluorescence self-quenching of fluoresceinamine. *J. Am. Chem. Soc.* **112**: 2608-2611.

- NASTUK, M.A. & FALLON, J.R. (1993). Agrin and the molecular choreography of synapse formation. *TINS* **16**: 72-81.
- NICOLA, N.A. & METCALF, D. (1991). Subunit promiscuity among hemopoietic growth factor receptors. *Cell* **67**: 1-4.
- NIMIERKO, A. & KOMAR, A. (1985). Action of phorbol myristate acetate (PMA) at fertilization of mouse oocytes *in vitro*. *J. Embryol. exp. Morphol.* **90**: 171-177.
- NIZEYIMANA-RUGINA, E. & MULNARD, J. (1979). Ultrastructural localization of 5'-nucleotidase in preimplantation mouse embryos. *Arch. Biol.* **90**: 131-140.
- NODA, M.; YOON, K.; RODAN, G.A. & KOPPEL, D.E. (1987). High lateral mobility of endogenous and transfected alkaline phosphatase: a phosphatidylinositol-anchored membrane protein. *J. Cell Biol.* **105**: 1671-1677.
- NUÑEZ, M.T.; ESCOBAR, A.; AHUMADA, A. & GONZALEZ, M. (1992). Sealed reticulocyte ghosts. *J. Biol. Chem.* **267**: 11490-11494.
- PEARSE, A.G.E. (1968). *Histochemistry*. Vol. 1. J. & A. Churchill Ltd.
- PEDERSEN, R.A. & SPINDLE, A. I. (1980). Role of the blastocoele microenvironment in early mouse embryo differentiation. *Nature* **284**: 550-552.

PERSAT, F.; AZZAR, G.; MARTEL, M.-B. & GOT, R. (1983). Properties of uridine diphosphate glucose pyrophosphorylase from golgi apparatus of liver. *Biochem. Biophys. Acta* **749**: 329-350.

PETZOLD, U.; BURKI, K.; ILLMENSEE, G.R. & ILLMENSEE, K. (1983). Protein synthesis in mouse embryos with experimentally produced asynchrony between chromosome replication and cell division. *Roux's Arch. Dev. Biol.* **192**: 138-144.

PEY, R. (1992). Reordenamiento del citoesqueleto y función del Calcio en la compactación de la mórula de ratón. Tesis de Doctorado, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.

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.

PIERCE, K.E. & CALARCO, P.G. (1990). Establishment and maintenance of a regionalized glycoprotein distribution during early mouse development. *Dev. Biol.* **137**: 56-67.

PRATT, H.P.M.; ZIOMEK, C.A.; REEVE, W.J.D. & JOHNSON, M.H. (1982). Compaction of the mouse embryo: an analysis of its components. *J. Embryol. exp. Morphol.* **70**: 113-132.

- REEVE, W.J.D. & ZIOMEK, C.A. (1981). Distribution of microvilli on dissociated blastomeres from mouse embryos: evidence for surface polarization at compaction. *J. Embryol. exp. Morphol.* **62**: 339-350.
- REIMA, I. & LEHTONEN, E. (1985). Localization of nonerythroid spectrin and actin in mouse oocytes and preimplantation embryos. *Differentiation* **30**: 68-75.
- RINGWALD, M.; SCHUH, R.; VESTWEBER, D.; EISTETTER, H.; LOTTSPPEICH, F.; ENGEL, J.; DOLZ, R.; JAHNIG, F.; EPPLER, J.; MAYER, S.; MULLER, C. & KEMLER, R. (1987). The structure of cell adhesion molecule uvomorulin. Insights into the molecular mechanism of Ca²⁺-dependent cell adhesion. *EMBO J.* **6**: 3647-3653.
- RINK, T.J.; SANCHEZ, A. & HALLAM, T.J. (1983). Diacylglycerol and phorbol ester stimulate secretion without raising cytoplasmic free calcium in human platelets. *Nature* **305**: 317-319.
- ROBLERO, L. & IZQUIERDO, L. (1976). Effect of progesterone on the cleavage rate of mouse embryos *in vitro*. *J. Reprod. Fert.* **46**: 475-476.
- ROTUNDO, R.L. & GOMEZ, A.M. (1990). Nucleus-specific translation and assembly of acetylcholinesterase in multinucleated muscle cells. *J. Cell Biol.* **110**: 715-719.

SAWICKI, W. & MYSTKOWSKA, E.T. (1981). Phorbol ester-mediated modulation of cell proliferation and primary differentiation of mouse preimplantation embryos. *Exp. Cell Res.* **136**: 455-458.

SCHATTEN, H.; CHENEY, R.; BALCZON, R.; WILLARD, M.; CLINE, C.; SIMERLY, C. & SCHATTEN, G. (1986). Localization of fodrin during fertilization and early development of sea urchin and mice. *Dev. Biol.* **118**: 457-466.

SEPULVEDA, M.S. (1990). Función del contacto celular en la regionalización durante el desarrollo inicial de mamíferos. Tesis de Doctorado, Universidad de Chile.

SEPULVEDA, M.S. & IZQUIERDO, L. (1990). Effect of cell contact on the regionalization of mouse embryos. *Dev. Biol.* **139**: 363-369.

SEPULVEDA, M.S.; DOGGENWEILER, C. & IZQUIERDO, L. (1985). Scanning microscopy of disaggregated and aggregated preimplantation mouse embryos. *Roux's Arch. Dev. Biol.* **194**: 445-452.

SHAKLAI, M. & TAVASSOLI, M. (1977). A modified technique to obtain uniform precipitation of lanthanun tracer in extracellular space. *J. Histochem. Cytochem.* **25**: 1013-1015.

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.

SIMONS, K. & VAN MEER, G. (1988). Lipid sorting in epithelial cells. *Biochemistry* **27**: 6197-6202.

SOBEL, S. (1983 a). Cell-cell contact modulation of myosin organization in the early mouse embryo. *Dev. Biol.* **100**: 207-213.

SOBEL, S. (1983 b). Localization of myosin in the preimplantation mouse embryo. *Dev. Biol.* **95**: 227-231.

SOBEL, S. & ALLIEGRO, M.A. (1985). Changes in the distribution of a spectrin-like protein during developmental of the preimplantation mouse embryo. *J. Cell Biol.* **100**: 333-336.

STANLEY, K.K.; EDWARDS, M.R. & LUZIO, J.P. (1980). Subcellular distribution and movement of 5'-nucleotidase in rat cells. *Biochem. J.* **186**: 59-59.

STANLEY, K.K.; NEWBY, A.C. & LUZIO, J.P. (1982). What do ectoenzymes do? *TIBS* Abril: 145-147.

STOCHAJ, U.; DIECKHOFF, J.; MOLLENHAUER, J., CRAMER, J. & MANNHERZ,

- H.G. (1989). Evidence for the direct interaction of chicken gizzard 5'-nucleotidase with laminin and fibronectin. *Biochem. Biophys. Acta* **992**: 385-392.
- SU, B.; WANECK, G.L.; FLAVELL, R.A. & BOTHWELL, A.L. (1991). The glycosyl phosphatidylinositol anchor is critical for Ly-6A/E-mediated T cell activation. *J. Cell Biol.* **112**: 377-384.
- SUNDSTROM, B. & MORNSTAD, H. (1975). Lead citrate-containing media for use at alkaline pH: their stabilization with glucose and increased buffer strength. *Stain Technol.* **50**: 287-288.
- TAKAI, Y.; KAIBUCHI, K.; TSUDA, T. & HOSHIJIMA, M. (1985). Role of protein kinase C in transmembrane signaling. *J. Cell. Biochem.* **29**: 143-155.
- TARKOWSKI, A.K. & WROBLEWSKA, J. (1967). Development of blastomeres of mouse eggs isolated at the 4 and 8 cell stage. *J. Embryol. exp. Morphol.* **18**: 155-180.
- TARTAKOFF, A.M. & JAMIESON, J.D. (1974). Subcellular fractionation of the pancreas. En: "Methods in Enzymology" (Flischer, S. & Packer, L., eds). vol. **31**: 41-59. Academic Press, Inc.
- TELLEZ, V.; AHUMADA, A.; MURO, J.; SEPULVEDA, S. & IZQUIERDO, L. (1988). Centrifugation of 2-cell mouse ova: cytoplasm stratification and recovery. *Roux's*

Arch. Dev. Biol. **197**: 360-365.

UUSITALO, R.J. & KARNOVSKY, M.J. (1977). Surface localization of 5'-nucleotidase on the mouse lymphocyte. *J. Histochem. Cytochem.* **25**: 87-96.

VESTWEBER, D.; GOSSLER, A.; BOLLER, K. & KEMLER, R. (1987). Expression and distribution of cell adhesion molecule uvomorulin in mouse preimplantation embryos. *Dev. Biol.* **124**: 451-456.

VORBRODT, A.; KONWINSKI, M.; SOLTER, D. & KOPROWSKI, H. (1977). Ultrastructural cytochemistry of membrane-bound phosphatases in preimplantation mouse embryos. *Dev. Biol.* **55**: 117-134.

WARTIOVAARA, J.; LEHTONEN, E. & VIRTANEN, I. (1978). Lectin binding in early mouse embryos. *Med. Biol.* **56**: 393-397.

WATSON, A.J. & KIDDER, G.M. (1988). Immunofluorescence assessment of the timing of appearance and cellular distribution of Na/K-ATPase during mouse embryogenesis. *Dev. Biol.* **126**: 80-90.

WILEY, L.M. (1984). Cavitation in the mouse preimplantation embryo: Na/K-ATPase and the origin of nascent blastocoele fluid. *Dev. Biol.* **105**: 330-342.

- WISHER, M.H. & EVANS, W.H. (1975). Functional polarity of the rat hepatocyte surface membrane. *Biochem. J.* **146**: 375-388.
- WOLF, D.E. (1983). The plasma membrane in early embryogenesis. En: "Development in mammals" (Johsin, M.H., ed.) vol. **5**: 187-207.
- WU, T.C.; WAN, Y.-J.; CHUNG, A.E. & DAMJANOV, I. (1983). Immunohistochemical localization of entactin and laminin in mouse embryos and fetuses. *Dev. Biol.* **100**: 496-505.
- YAKAMURA, H. & SPINDLE, A. (1988). Stage-specific response of preimplantation mouse embryos to W-7, a calmodulin antagonist. *J. Exp. Zool.* **248**: 45-54.
- YAMASHINA, S. & KAWAI, K. (1979). Cytochemical studies on the localization of 5'-nucleotidase in the acinar cells of the rat salivary glands. *Histochem.* **60**: 255-263.
- ZIOMEK, C.A.; LEPIRE, H.; MOYNIHAN, M. & WOLF, D. (1984). Membrane protein and lipid diffusion and regionalization in 8-cell mouse embryos. *J. Cell Biol.* **99**: 279a.
- ZIOMEK, C.A.; LEPIRE, H.; MOYNIHAN, M. & WOLF, D. (1986). Preimplantation mouse embryos express a human placental-like alkaline phosphatase. *J. Cell Biol.*

103: 488 a.

ZUZACK, J.S. & TASCA, R.J. (1985). Lectin-induced blockage of developmental processes in preimplantation mouse embryos **in vitro**. *Gamete Res.* **12**: 275-290.