



UNIVERSITAT DE  
BARCELONA

## Utilidad de los teratocarcinomas para el estudio de los linajes embrionarios

Miguel Amat Roca

**ADVERTIMENT.** La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX ([www.tdx.cat](http://www.tdx.cat)) i a través del Dipòsit Digital de la UB ([diposit.ub.edu](http://diposit.ub.edu)) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

**ADVERTENCIA.** La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR ([www.tdx.cat](http://www.tdx.cat)) y a través del Repositorio Digital de la UB ([diposit.ub.edu](http://diposit.ub.edu)) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

**WARNING.** On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX ([www.tdx.cat](http://www.tdx.cat)) service and by the UB Digital Repository ([diposit.ub.edu](http://diposit.ub.edu)) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.

**UTILIDAD DE LOS TERATOCARCINOMAS PARA EL ESTUDIO DE LOS  
LINAJES EMBRIONARIOS**

**TESIS PRESENTADA POR MIGUEL AMAT ROCA PARA ACCEDER AL GRADO  
DE DOCTOR EN MEDICINA Y CIRUGIA POR LA UNIVERSIDAD DE  
BARCELONA**

**FACULTAD DE MEDICINA**

**FEBRERO 1988**

A mis padres María y Miguel.

Agradezco al Prof. Dr. Domingo Ruano Gil la ayuda recibida a lo largo del desarrollo de la tesis.

Agradezco, también, al Prof. Mariano Monzó Planella el haberme iniciado en los fundamentos de la investigación biomédica así como su apoyo constante.

Agradezco la confianza con la que me han honrado a todos cuantos con su aliento y amistad me han animado durante estos años.

La beca concedida por la Fundació Universitària "Agustí Pedro i Pons" en la convocatoria 1986-87 contribuyó en gran medida a la realización de este trabajo.

## **OBJETIVOS Y MOTIVACION**

La fecundación de una célula femenina haploide por una célula masculina haploide de la misma especie conduce a la formación de un organismo de la propia especie. La formación de este organismo nuevo se encuentra sujeta a diversas vicisitudes. Entre ellas cabe destacar dos: la distribución de substancias en el interior del ser vivo y la relación con el medio ambiente.

En cualquier caso, el desarrollo del organismo puede ajustarse a lo sabido para cada especie o quedar alterado por enfermedad o accidente.

El esfuerzo desplegado en las tres últimas generaciones ha permitido dominar el campo de las enfermedades infecciosas. De manera coincidente, el trabajo se centra en la actualidad en el conocimiento de las causas de las enfermedades neoplásicas.

Se considera que el conocimiento de los procesos que participan en la diferenciación y crecimiento celulares es básico para el control de la célula neoplásica. En esta línea se supone el interés del estudio del embrión y de sus células como modelo al cual se asemejan las células neoplásicas.

Por todos estos motivos decidimos, hace unos años, integrarnos en el Departamento de Ciencias Morfológicas y Odontostomatología de nuestra Alma Mater -dirigido a la sazón por el Prof. Dr. Domingo Ruano Gil.

Nuestro objetivo consistía en establecer la semejanza de células embrionarias de ratón con células de ciertas neoplasias de ratón; y, en concreto, con neoplasias de células germinales de ratón. Una vez establecida la diferencia específica entre unas células y otras sería más sencilla la detección precoz del embrión o de células neoplásicas.

## **TABLA DE MATERIAS**

<b>EL DESARROLLO PRECOZ DEL RATON</b>	<b>13</b>
<b>La procedencia y el desplazamiento de las células germinales.</b>	<b>17</b>
<b>Los estímulos procedentes de la cresta genital influyen sobre el desarrollo de la célula germinal.</b>	<b>21</b>
<b>El crecimiento y la maduración del ovocito.</b>	<b>22</b>
<b>La ovulación.</b>	<b>25</b>
<b>La fecundación.</b>	<b>27</b>
<b>El citoesqueleto del cigoto antes y después de la fecundación.</b>	<b>30</b>
<b>La necesidad de los genomas materno y paterno para el desarrollo completo.</b>	<b>31</b>
<b>Los ciclos celulares hasta la etapa de mórula no compactada de ocho células.</b>	<b>36</b>
<b>Los primeros procesos relacionados con la diferenciación: la compactación y la blastulación.</b>	<b>41</b>
<b>Las relaciones de la adhesividad celular con la compactación.</b>	<b>49</b>
<b>La polarización celular y la compactación.</b>	<b>50</b>
<b>Segregación de los linajes trofocodérmicos y de la masa celular interna.</b>	<b>55</b>
<b>Restricción en el potencial de desarrollo de los núcleos.</b>	<b>79</b>

La implantación.	80
El trofotodermo y sus derivados.	87
La segunda oleada de diferenciaciones: Formación del endodermo primitivo y del ectodermo primitivo.	89
Empleo de marcadores de estirpe en embriones murinos.	90
La estirpe ectodérmica primitiva.	91
Los ciclos cortos de las células endodérmicas primitivas.	92
La pluripotencia y oncogénesis de algunas células del ectodermo primitivo.	92
La regulación del tamaño.	95
La inactivación del cromosoma X.	95
La gastrulación y la formación de las células mesodérmicas.	96
La generación de un mesodermo segmentado en la gastrulación.	97
La procedencia del endodermo definitivo.	102
La elaboración de un mapa de linajes en el embrión murino.	103
El desarrollo del sistema nervioso.	104
Los tejidos extraembrionarios.	105
El origen del endodermo visceral y del endodermo parietal.	106
La expresión genética en el endodermo visceral.	109
La expresión genética en el endodermo parietal.	111
La diferenciación del mesodermo extraembrionario.	113

<b>La estructura y la función de la placenta.</b>	114
<b>MATERIAL Y METODOS</b>	116
<b>Obtención de cuerpos embrioides.</b>	117
<b>Aislamiento de cuerpos embrioides.</b>	118
<b>Recuento de cuerpos embrioides.</b>	119
<b>Prueba de la exclusión tintorial para la comprobación     de la viabilidad celular.</b>	120
<b>Obtención de antisueros.</b>	122
<u>Pauta de inmunización sin adyuvante de Freund.</u>	122
<u>Pauta de inmunización con adyuvante de Freund.</u>	123
<u>Extracción.</u>	123
<u>Procesado.</u>	124
<b>Electroforesis de tejidos adultos de ratón.</b>	124
<u>Obtención de la muestra.</u>	124
<u>Electroforesis de las proteínas problema.</u>	126
<b>Electroblotting.</b>	130
<u>Procesado de la nitrocelulosa.</u>	133
<b>Elisa.</b>	136
<b>Obtención de embriones.</b>	140
<b>Procesamiento de los embriones.</b>	141
<u>Inclusión en parafina.</u>	141
<u>Seccionamiento.</u>	142
<b>Tinción de embriones mediante la técnica de     hematoxilina eosina.</b>	142
<b>Inmunohistoquímica de los embriones.</b>	143

<u>Controles.</u>	146
<b>RESULTADOS</b>	147
De la obtención de cuerpos embrioides.	148
Del aislamiento de cuerpos embrioides.	148
Del recuento y de la prueba de exclusión tintorial de cuerpos embrioides.	153
De la obtención de antisueros y del ELISA.	153
De la electroforesis y del electroblotting.	154
De la obtención y procesamiento de embriones.	157
<u>Embrión de ratón de 6 días de edad.</u>	157
<u>Tinción hematoxilina-eosina.</u>	157
<u>Inmunohistoquímica.</u>	162
<u>Embrión de ratón de 7 días de edad.</u>	167
<u>Tinción hematoxilina-eosina.</u>	167
<u>Inmunohistoquímica.</u>	171
<u>Embrión de ratón de 8 días de edad.</u>	174
<u>Tinción hematoxilina-eosina.</u>	174
<u>Inmunohistoquímica.</u>	178
<u>Embrión de ratón de 9 días de edad.</u>	182
<u>Tinción hematoxilina-eosina.</u>	182
<u>Inmunohistoquímica.</u>	186
<b>DISCUSION</b>	192
<b>CONCLUSIONES</b>	225

<u>Controles.</u>	146
<b>RESULTADOS</b>	147
De la obtención de cuerpos embrioides.	148
Del aislamiento de cuerpos embrioides.	148
Del recuento y de la prueba de exclusión tintorial de cuerpos embrioides.	153
De la obtención de antisueros y del ELISA.	153
De la electroforesis y del electroblotting.	154
De la obtención y procesamiento de embriones.	157
<u>Embrión de ratón de 6 días de edad.</u>	157
<u>Tinción hematoxilina-eosina.</u>	157
<u>Inmunohistoquímica.</u>	162
<u>Embrión de ratón de 7 días de edad.</u>	167
<u>Tinción hematoxilina-eosina.</u>	167
<u>Inmunohistoquímica.</u>	171
<u>Embrión de ratón de 8 días de edad.</u>	174
<u>Tinción hematoxilina-eosina.</u>	174
<u>Inmunohistoquímica.</u>	178
<u>Embrión de ratón de 9 días de edad.</u>	182
<u>Tinción hematoxilina-eosina.</u>	182
<u>Inmunohistoquímica.</u>	186
<b>DISCUSION</b>	192
<b>CONCLUSIONES</b>	225



## **EL DESARROLLO PRECOZ DEL RATON**

El desarrollo del embrión significa la especificación de las células en el espacio y en el tiempo. La especificación de las células según su ubicación se consigue mediante un proceso de interacción celular y el reconocimiento de la posición celular relativa. El establecimiento dentro de una sola célula de asimetrías de organización pone en marcha algunas señales relativas a la posición. Dichas asimetrías conducen a diferencias intercelulares tras la división mitótica. Otras señales se basan en poblaciones "fundadoras" de células precursoras homogéneas. Estas células generan diversidad por medio de señales inductivas o señales difusivas gradualmente de varios tipos (Johnson, Pratt 1983). La especificidad se consigue mediante la interacción de señales de posición con células receptoras "estimuladas" para responder a dichas señales. La "estimulación" permite a las células receptoras un período limitado de competencia de desarrollo. Durante este período puede tener lugar la respuesta diferenciadora reflejando así la expresión de la parte temporal del programa de desarrollo. Cada célula, en un momento dado del desarrollo, tiene la capacidad de responder de un número limitado de maneras. Puede, por lo tanto, contemplarse el programa temporal del desarrollo como la presentación secuencial de varias opciones. Cada una de estas opciones, en un momento dado, refleja la historia del

desarrollo de cada célula; es decir, su linaje. Así la competencia de una célula se definiría por su "historia". Esta herencia molecular proporciona el substrato sobre el cual pueden intervenir las interacciones celulares para seleccionar una vía concreta de desarrollo.

El desarrollo embrionario del ratón comienza con la fecundación del huevo por el espermatozoo. Una característica importante de la embriogénesis murina es su lentitud relativa con respecto al erizo de mar, *Drosophila* y *Xenopus*. A las veinticuatro horas tras la fecundación, los embriones de estas especies han avanzado mucho en la vía de larva y contienen más de 60.000 células organizadas en muchas capas tisulares diversas. Por el contrario, el embrión de ratón se encuentra todavía en la etapa de dos células; se continuará dividiendo lentamente sin aumento alguno de su masa a medida que se traslada a lo largo del oviducto. Llegará a implantarse en el útero 4,5 días después de la fecundación. Este desarrollo lento significa que el tejido uterino puede prepararse para recibir al embrión. éste, a su vez, genera los dos primeros linajes celulares (el trofotodermo y el endodermo primitivo) que forman la base de la placenta y de los sacos vitelinos extraembrionarios necesarios para la interacción con la madre. Una vez se ha conseguido la implantación tiene lugar un gran aumento en la tasa de crecimiento del embrión; especialmente en el pequeño grupo de

células pluripotenciales conocidas como ectodermo primitivo a partir de las cuales se desarrollará el feto. El ectodermo primitivo es en muchos aspectos equivalente al blastodermo celular de *Drosophila* o al blastodisco del pollo. Entre el quinto y décimo día tras la fecundación se establece el plan básico del organismo murino dentro de las células del ectodermo primitivo y de sus descendientes. En definitiva, el mesodermo se forma y se divide en pares repetidos de bloques de somitos constituyendo un patrón segmentado a lo largo del eje corporal anterior-posterior. La placa neural es inducida y se dobla para formar el tubo neural, y aparecen los ojos, nariz y oídos. Las células de la cresta neural comienzan su migración y aparecen el corazón, el sistema circulatorio y los esbozos de las extremidades. Por lo tanto, durante este período entran en juego muchos de los genes que controlan la diferenciación y morfogénesis de los órganos adultos (Hogan y cols. 1986).

El período de gestación del embrión murino es de 19 a 20 días, según las cepas. Para algunas cepas endógamas, como la C3H, el proceso es algo más lento. El conocimiento actual de los linajes celulares en el embrión murino se resume en la figura 1 (el fondo rayado indica los tejidos que darán lugar al embrión propiamente dicho y a células extraembrionarias; las letras negras sobre fondo blanco indican tejidos



extraembrionarios; las letras rojas indican los tejidos del embrión propiamente dicho; tomado de Hogan y cols. 1986).

Aunque el desarrollo embrionario comienza con la fecundación, tanto el óvulo como el espermatozoo son resultado de procesos complejos de maduración comenzados cuando las células germinales primordiales se introducen en las crestas genitales. Este resumen del desarrollo murino comienza por lo tanto con una descripción del origen y crecimiento de las células germinales, las cuales se encuentran entre las células más interesantes del organismo entero.

**La procedencia y el desplazamiento de las células germinales.**

Los gametos maduros son resultado de procesos complejos de diferenciación. Dichos procesos preparan los gametos para participar en el establecimiento de una nueva generación de organismos. Durante su diferenciación, los gametos masculinos y femeninos adquieren características propias. Estas características definen sus funciones en la fecundación. Los gametos masculinos son móviles y deben trasladarse hasta el huevo. Para facilitar su movilidad, los espermatozoo tienen orgánulos locomotores especializados; además carecen de gran cantidad de citoplasma. También disponen de los medios para

unirse a la superficie del huevo y depositar el núcleo haploide en el interior del mismo. El gameto femenino carece de orgánulos patentes de locomoción. Tiene grandes cantidades de citoplasma a partir del cual se forma el embrión.

Las células germinales primordiales se diferencian a partir de células del ectodermo primitivo. Se identifican claramente por vez primera en el embrión postcoital (p.c.) de 8 a 8,5 días en la base de la alantoides. Se distinguen por dos características: por su forma redonda y grande y por su elevada concentración de actividad fosfatásica alcalina. Esta actividad puede demostrarse mediante tinciones histoquímicas y permite seguir las células germinales a lo largo de su migración hasta las crestas genitales (Clark, Eddy 1975; Eddy, Hahnel 1983). La conclusión de que las células germinales surgen del ectodermo primitivo se basa en experimentos en los cuales se extirparon fragmentos de huevo cilindro de 7 y 7,5 días p.c. cultivándose in vitro; a continuación se valoró la aparición de células grandes positivas para la fosfatasa alcalina (Snow 1981; Snow y Monk 1983). Únicamente trozos extraídos de las cercanías del extremo posterior del huevo cilindro dieron lugar a tales células.

A medida que las células germinales se mueven desde la base de la alantoides, comienzan una migración compleja: en

primer lugar llegan hasta el epitelio endodérmico del intestino posterior, luego se introducen en el mesenterio y finalmente dentro de las crestas genitales. Estas crestas son bandas de tejido mesodérmico que se encuentran en el techo del peritoneo. Se supone que esta migración conlleva ciertos movimientos activos de las células germinales; ya sea a lo largo de tractos de material de la matriz extracelular o en respuesta a sustancias quimiotáxicas liberadas por las células de la cresta genital.

En la ruta hacia su destino final, las células germinales se dividen aproximadamente una vez cada 16 horas. Se calcula que en el embrión de 8 días p.c. se encuentran entre 10 y 100 células germinales primordiales; esta cantidad aumenta hasta unas 25.000 en el momento en el que las crestas genitales se encuentran completamente colonizadas alrededor de los 13,5 días p.c. de desarrollo (Tam, Snow 1981). Se conocen varias mutaciones que afectan a la proliferación de las células germinales provocando esterilidad en los homocigotos. El proceso consiste en reducir el número de células germinales en las crestas genitales. Por ejemplo el carácter blanco moteado (W) y el carácter blanco moteado viable (W<sup>v</sup>) reducen ambos la proliferación y la migración de las células germinales desde la base de la alantoides (Mintz y Russell 1957). Por el contrario, en ratones homocigotos para el carácter Steel (Sl), las células germinales por lo visto migran normalmente hacia las crestas genitales pero no

proliferan o no pueden mantenerse ahí (McCoshen, McCallion 1975). Ambas mutaciones afectan asimismo las células de la cresta neural y las células progenitoras del sistema hematopoyético; estas dos poblaciones migran también a lo largo de grandes distancias. En ratones Sl/Sl pero no en ratones W/W, las células pigmentarias pueden recuperarse mediante el trasplante de células de la cresta dentro de un ambiente de tipo salvaje (Mayer 1973). Sin embargo, se desconoce si las células germinales primordiales Sl/Sl pueden recuperarse de la misma manera.

La identificación de estas y otras mutaciones genéticas (p. ej., las expresadas relativamente tarde en la embriogénesis o las expresadas de forma no mortal en el hemicígote) permite estudiar el desarrollo de los mamíferos. Se podrían extraer conclusiones acerca del tiempo, lugar y modo de la activación de genes importantes para el desarrollo. Por su planteamiento estos estudios implican principalmente un análisis del resultado de las vías de desarrollo seguidas más que un análisis del proceso mismo. Una característica del desarrollo precoz es una "clausura" generalizada de la cromatina. Esta "clausura" luego se libera parcialmente y queda bajo control. En el ratón, las vías de desarrollo son seguidas por pequeños grupos de células en el embrión. Ello comporta que la tecnología empleada para el análisis correspondiente sea sensible de manera proporcional.

Un enfoque complementario, como se verá, empleado con frecuencia para el estudio del desarrollo de mamíferos es el análisis sistemático de ciclos celulares en subpoblaciones celulares embrionarias relativamente homogéneas. Así, pueden comprobarse variaciones en las interacciones del ADN, ARN y proteínas. También pueden estudiarse los cambios en la naturaleza de las relaciones de estos procesos con respecto a las propiedades de las células como un todo. En esta línea, los ciclos celulares largos del embrión de ratón permiten el análisis de aspectos del desarrollo relacionados con el ciclo celular.

**Los estímulos procedentes de la cresta genital influyen sobre el desarrollo de la célula germinal.**

Las primeras diferencias en las crestas genitales de embriones masculinos y femeninos pueden detectarse alrededor de los 12,5 días p.c. En este momento, las células germinales femeninas entran en la fase de meiosis como respuesta a un estímulo proporcionado por las células somáticas de la cresta genital (Monk, McLaren 1981; McLaren 1983). Por el contrario, las células germinales masculinas responden al ambiente de la cresta genital masculina sufriendo un paro mitótico en la fase G<sub>1</sub> del ciclo celular y no entran en meiosis hasta más

tarde en el desarrollo. Se han puesto a punto técnicas de cultivo tisular (De Felici, McLaren 1983) que pueden permitir estudiar la naturaleza del influjo de las células somáticas de la cresta genital sobre la diferenciación de la célula germinal in vitro (McLaren 1983). Este efecto del ambiente gonadal local tiene una enorme influencia sobre la diferenciación de células germinales en quimeras XX/XY obtenidas mediante la agregación de mórulas o mediante la inyección de células dentro del blastocisto. Las células germinales XX en un ambiente local predominantemente XY comienzan a desarrollarse en dirección masculina, aunque no forman espermatozoos; mientras que células XY en un ambiente XX pueden formar ovocitos (McLaren 1983).

#### **El crecimiento y la maduración del ovocito.**

A los cinco días después del nacimiento, todos los ovocitos se encuentran en la etapa de diploteno de la profase de la primera división meiótica. Son, por lo tanto, diploides pero contienen cuatro veces la cantidad haploide de ADN (4C). Durante la prolongada fase de descanso, los cromosomas homólogos emparejados se encuentran completamente desenrollados y tiene lugar la transcripción del ARNm ovocitario (materno). Los estudios acerca de la actividad del cromosoma X han demostrado que únicamente un solo cromosoma X se encuentra activo en las células germinales primordiales XX

y en las ovogonias de 11,5 días p.c; pero a los 12,5 días p.c. ambos cromosomas X se tornan activos (Monk, McLaren 1981; McLaren 1983).

Cada ovocito se encuentra dentro de un folículo y está rodeado de capas múltiples de células foliculares. Dichas células foliculares desempeñan diversas funciones en el crecimiento y diferenciación del ovocito. Las células foliculares periovocitarias tienen numerosas proyecciones que forman uniones especializadas dentro del huevo. Estos complejos de unión engloban las bandas de cierre y permiten el intercambio metabólico. Se mantienen incluso a medida que las células foliculares y el ovocito se separan gradualmente debido al depósito de zona pelúcida. Esta zona pelúcida consiste en una capa de material extracelular sintetizado y depositado por el ovocito en crecimiento (Bleil, Wassarman 1980a, b; Greve, Wassarman 1985). La zona está compuesta de tres sulfoglicoproteínas ácidas principales (ZP1, M<sub>r</sub> 200.000; ZP2, M<sub>r</sub> 120.000; ZP3 M<sub>r</sub> 83.000) y alcanza un grosor de unas 7 micras. Pueden aislarse del ovario y cultivarse in vitro, con o sin células foliculares, ovocitos en las diversas etapas de maduración.

Dejando aparte los estudios sobre la síntesis y ensamblamiento de los glicoproteínas de la zona, las cuales en conjunto representan un 10% de la síntesis proteica total,

se conoce relativamente poco sobre la actividad genética de los ovocitos en crecimiento. Se han realizado análisis electroforéticos bidimensionales de las proteínas totales sintetizadas por ovocitos en maduración y por huevos no fertilizados marcadas con metionina [ $^{35}\text{S}$ ] (Van Blerkom 1981; Howlett, Bolton 1985). Además, se ha divulgado la síntesis de varias proteínas específicas. Por ejemplo, un 1,3% de la síntesis proteica total de los ovocitos se destina a la tubulina (Schultz y cols. 1979); los ovocitos también sintetizan y segregan una proteína de Mr 43.000 de función desconocida por el momento (Brinster y cols. 1981). Más pruebas de la capacidad del ovocito murino para glicosilar y segregar proteínas provienen de los estudios acerca del destino de la ovoalbumina de pollo sintetizada a partir de ARNm exógeno inyectado dentro del citoplasma (Paynton y cols. 1983). Finalmente se ha demostrado que varias secuencias repetitivas diferentes se encuentran inframetiladas en los ovocitos murinos (Sanford y cols. 1984).

De manera sorprendente, más de la mitad de los folículos primordiales existentes en el ovario murino en el nacimiento degeneran antes de las 3-5 semanas de edad, pero se sabe poco acerca de los factores hormonales y locales que controlan esta pérdida (Faddy y cols. 1983). La hembra murina alcanza la madurez sexual alrededor de las 6 semanas de edad, dependiendo de la cepa y de las condiciones ambientales. En

este momento cada ovario contiene aproximadamente 10.000 ovocitos en diversas etapas de maduración.

### **La ovulación.**

A medida que el ovocito aumenta de tamaño, adquiere gradualmente la competencia para entrar en las etapas finales de la meiosis como respuesta a los estímulos hormonales adecuados. La ovulación necesita la respuesta coordinada tanto de las células foliculares como del ovocito; en condiciones de laboratorio óptimas, la ovulación se presenta espontáneamente una vez cada 4 días. Sin embargo, muchos factores ambientales pueden influir en la duración del ciclo; éste puede inducirse artificialmente mediante administración hormonal. En un ciclo natural cualquiera, sólo unos cuantos folículos responden al aumento de la hormona estimuladora de los folículos (FSH); dicha hormona es sintetizada por la hipófisis. Las células foliculares estimuladas se despegan del ovocito e incrementan su síntesis y su secreción de proteoglicanos de peso molecular elevado y de activador de plasminógeno tisular (Hsueh y cols. 1984). Al mismo tiempo, el folículo acumula fluido, se hincha, y se traslada hacia la periferia del ovario, listo para la maduración final y para la liberación del ovocito. Las unidades foliculares maduras y llenas de líquido se denominan folículos antrales o de Graaf

(graafianos). Toman su nombre del científico que los describió por primera vez en 1672 (Regnier de Graaf).

La ovulación tiene lugar como respuesta a un aumento de la concentración de hormona luteinizante (LH), sintetizada también por la hipófisis. Tras la estimulación por la LH, el ovocito sufre la maduración nuclear. El núcleo (denominado asimismo vesícula germinal) pierde su membrana; los cromosomas se disponen en huso y se desplazan hacia la periferia de la célula donde tiene lugar la primera división meiótica. Como primer cuerpo polar se expulsa un grupo de cromosomas homólogos, rodeado de una escasa cantidad de citoplasma. El ovocito es liberado finalmente del folículo en este punto.

Cada ovocito ovulado se encuentra rodeado por su zona y por una masa de células foliculares con sus proteoglicanos asociados. Los huevos son barridos dentro del extremo abierto, o infundíbulo, del oviducto mediante la acción de numerosos cilios que se encuentran en la superficie del epitelio. Otras células del epitelio segregan diversas sustancias. En el momento de la ovulación el extremo distal del oviducto se hincha y aumenta hasta formar una ampolla donde ocurre la fecundación. En una ovulación natural se liberan de 8-12 huevos (según la cepa de la que se trate); pero el proceso no es sincrónico y transcurre durante un

período de 2-3 horas. Tras la ovulación, las células foliculares sobrantes se diferencian en células secretoras de esteroides (células de la granulosa luteínica) las cuales contribuyen a mantener el embarazo. Un método para determinar cuántos huevos fueron liberados de hecho, consiste en contar el número de cuerpos amarillos brillantes cerca de la superficie del ovario.

Puede ser conveniente analizar el comienzo del desarrollo como la reanudación del ciclo celular suspendido del ovocito primario intrafolicular. Dicho ovocito se ha mantenido en la profase de la primera división meiótica desde la vida fetal. Los cambios nucleares durante la transición del ovocito primario al ovocito secundario ovulado detenido en la metafase de la segunda división meiótica duran unas doce horas en el ratón. Estos cambios nucleares se acompañan de muchos cambios cualitativos y cuantitativos en el perfil sintético proteico (Cascio, Wassarman 1982). También tienen lugar desplazamientos en la distribución de orgánulos celulares como mitocondrias, lisosomas y gránulos corticales (Van Blerkom, Runner 1984).

### **La fecundación.**

En cada eyaculación se liberan dentro de la vía reproductora femenina unos  $58 \times 10^6$  de espermatozoos. Algunos

alcanzan la ampolla a los cinco minutos aunque no están en condiciones de fertilizar hasta transcurrida una hora. Este proceso de maduración se denomina capacitación y es mal conocido por el momento. Para llegar a la superficie del huevo, el espermatozoo debe atravesar en primer lugar las células foliculares y luego la zona pelúcida. En muchos mamíferos, los lugares de unión de los espermatozooos son muy específicos de especie (aunque no absolutamente) e impiden el paso de espermatozooos de otras especies. En algún momento durante el paso a través de las células foliculares o de la zona, el espermatozoo sufre la reacción acrosómica. El acrosoma (una estructura secretora, parecida a una vacuola, que se encuentra en la cabeza del espermatozoo) se une con la membrana plasmática de la cabeza del espermatozoo liberando diversas enzimas hidrolíticas. Si no hay reacción acrosómica, el espermatozoo no puede fecundar el huevo. En el ratón, se ha relacionado la proteína más pequeña de la zona ZP3 en el desencadenamiento de la reacción acrosómica pudiendo servir como receptor del espermatozoo (Bleil y Wassarman 1983).

La fusión de la parte posterior de la cabeza del espermatozoo con la membrana del huevo desencadena una cascada de reacciones conocida como fecundación. Un acontecimiento muy precoz es un cambio en la superficie del huevo inhibiendo la fusión de espermatozooos adicionales. Otro acontecimiento es la liberación dependiente del  $\text{Ca}^{++}$

(exocitosis) de los gránulos corticales situados bajo la membrana plasmática. Esto es el comienzo de la "reacción zonal" la cual conlleva el entrecruzamiento de las glicoproteínas de la zona y la modificación de la glicoproteína ZP3; ésta deja de unirse a espermatozoos y tampoco da inicio a la reacción acrosómica. Estos acontecimientos también contribuyen a impedir la polispermia. Durante la fecundación, la cabeza, parte media y una gran parte de la cola del espermatozoo se incorporan al citoplasma del huevo. La parte media del espermatozoo proporciona los centriolos paternos y mitocondrias al cigoto; aunque éstas últimas quedan muy diluidas por las mitocondrias del ovocito.

La fecundación da comienzo a la segunda división meiótica y a la expulsión del segundo cuerpo polar. Las membranas nucleares, incluyendo las proteínas nucleares, se constituyen entonces alrededor de los cromosomas maternos y paternos y los pronúcleos haploides femenino y masculino se mueven hacia el centro del huevo. La replicación del ADN tiene lugar durante esta migración. Los pronúcleos no se fusionan, pero las membranas se rompen y los cromosomas se ensamblan en el huso; en una población de cigotos fecundados de modo natural la primera mitosis transcurre durante varias horas. Mediante la fecundación in vitro puede conseguirse un desarrollo más sincrónico. Los huevos no fecundados

permanecen viables durante unas 12 horas y los espermatozoos durante unas 6 horas.

La mayor parte de las proteínas sintetizadas durante estas fases precoces del desarrollo hasta la primera división celular permanecen detectables cualitativamente hasta la etapa de mórula (Pratt y cols. 1983). Los estudios cuantitativos indican que la mayoría de las proteínas tienen una vida media larga (Brinster y cols. 1976).

**El citoesqueleto del cigoto antes y después de la fecundación.**

En todo el citoplasma del ovocito se encuentra una matriz compleja de elementos citoesqueléticos. Estos elementos incluyen la actina, la tubulina y ciertas citoqueratinas (Lehtonen y cols. 1983a; Maro y cols. 1984; Schatten y cols. 1985). Los diferentes sistemas deben contribuir a coordinar los acontecimientos en la superficie celular con los cambios en los pronúcleos a medida que éstos migran hacia el centro del huevo. La migración es inhibida tanto por la citocalasina B (la cual inhibe la polimerización de la actina) como por la colcemida (que inhibe la polimerización de la tubulina). Se necesitan ambos inhibidores en los experimentos de transferencia nuclear para permitir que los núcleos queden englobados dentro de un

carioplasto. Los primeros cambios ontogénicos en la organización de la actina del cigoto se ven en la fecundación (Maro y cols. 1984). En el ovocito ovulado, la membrana plasmática por encima del huso meiótico carece de microvellosidades y de lugares de fijación para la concanavalina A (Con A); además por su parte inferior hay una capa subcortical rica en actina. La fecundación comporta la formación de una segunda zona sin receptores para la Con A, el cono de fecundación. Dicho cono se encuentra alrededor del lugar de entrada del espermatozoo. Una capa rica en actina queda subyacente, también en esta región, a la membrana plasmática. A medida que los pronúcleos se trasladan hacia el centro del huevo, la distribución de los filamentos de actina se torna más uniforme y las áreas sin receptores para la Con A desaparecen.

#### **La necesidad de los genomas materno y paterno para el desarrollo completo.**

La activación partenogenética de huevos no fecundados puede provocarse de varias maneras. Entre las sustancias empleadas se encuentran: alcohol, hialuronidasa, el ionóforo del  $Ca^{++}$  A23187, un medio sin  $Ca^{++}$  ni  $Mg^{++}$ , el "shock" frío/calor o los anestésicos. Además, un 10% de los ovocitos de la cepa murina LT/Sv presentan una activación espontánea

en el oviducto o en el ovario. Aquellos embriones que se implantan, se desarrollan hasta la etapa de huevo cilindro (7 días p.c.) y a continuación se desorganizan y mueren. Por el contrario, aquéllos que permanecen en el ovario dan lugar a teratomas. (Kaufman 1981, 1983a; Whittingham 1980).

El genotipo del embrión partenogenético puede variar de acuerdo con las condiciones experimentales y, en especial, la edad postovulatoria del ovocito activado. El factor más importante puede ser el estado y la orientación de los elementos citoesqueléticos del huevo en el momento de la activación. Entre los genotipos que pueden surgir de la activación partenogenética de un ovocito procedente de una hembra  $F_1$  (heterocigota) se encuentran:

1. Haploide uniforme (expulsión del segundo cuerpo polar).
2. Haploide mosaico (el segundo cuerpo polar reacciona como una blastómera normal).
3. Diploide heterocigoto (resultado de la supresión de la formación del segundo cuerpo polar o de la fusión del pronúcleo y del segundo cuerpo polar). El carácter heterocigoto en estos huevos es resultado de la recombinación durante la meiosis.

#### 4. Diploide homocigoto (resultado de la diploidización del pronúcleo femenino).

Debe observarse también que hasta un 20% de los huevos activados con alcohol pueden ser aneuploides como resultado de no disyunción (Kaufman 1982, 1983b). La mayoría de los huevos partenogénéticos, y en especial los haploides uniformes, mueren antes de la etapa blastocística. Una pequeña parte continúa desarrollándose después de la implantación, por ejemplo hasta la etapa de huevo cilindro (LT/Sv y los haploides mosaicos) y hasta la etapa de esbozo precoz de las extremidades (diploides heterocigotos; Kaufman y cols. 1977). Sin embargo no se ha conseguido ningún desarrollo normal a término a partir de ningún tipo de huevo partenogénético. Las razones de este fracaso todavía no se comprenden, aunque la mortalidad celular claramente no es un factor, por varias razones. En primer lugar tanto los huevos LT/Sv como otros huevos partenogénéticos pueden dar lugar a teratomas si se trasplantan a lugares ectópicos. Estos teratomas contienen una gran variedad de tejidos diferenciados normalmente pero desorganizados. En segundo lugar, pueden recuperarse mediante la formación de quimeras con embriones normales (Stevens y cols. 1977; Surani y cols. 1977). Además, a partir de blastocistos partenogénéticos haploides cultivados in vitro, se han obtenido líneas

celulares pluripotentes (Kaufman y cols. 1983). Las células se diploidizan pronto en estas líneas y en teratomas derivados de huevos partenogenéticos.

Algún trastorno en algún proceso necesario para el crecimiento y desarrollo coordinados del embrión como un todo provocaría la insuficiencia de los embriones partenogenéticos para llegar a término; más que la viabilidad celular per se. Una posibilidad es que las cepas endógamas murinas posean mutaciones mortales recesivas en los genes que controlan la organización tisular o la formación del patrón. Si se supone que tales mutaciones recesivas tuvieran penetrancia completa en homocigotos un 25% de la descendencia de las cepas endógamas de ratones moriría in utero; ésto hace poco probable la explicación precedente. Aunque la mortalidad prenatal puede ser muy elevada en algunas cepas endógamas, nunca alcanza este nivel. Otra posibilidad es que el desarrollo embrionario normal necesite alguna contribución no genética del espermatozoo o algún acontecimiento citoplásmico desencadenado únicamente por la fecundación. Los resultados de Hoppe e Illmensee (1981) apoyaban inicialmente este último punto de vista. Trasplantaron núcleos de masas celulares internas de blastocistos LT/Sv partenogenéticos a huevos fecundados C57BL extrayendo a continuación ambos pronúcleos del receptor. Una proporción pequeña de huevos inyectados se desarrolló con normalidad

(Hoppe, Illmensee 1981). En experimentos previos habían obtenido por lo visto alguna descendencia viable de huevos fecundados tras extraer uno de los pronúcleos y dejar que el otro sufriera diploidización en la presencia de citocalasina (Hoppe, Illmensee 1977). Sin embargo, en otros laboratorios no han tenido éxito los intentos de conseguir ratones diploides homocigotos a partir de un único progenitor (Markert 1982; Surani, Barton 1983).

Experimentos más recientes en dos laboratorios independientes han proporcionado pruebas para apoyar una tercera hipótesis: el desarrollo normal sólo tiene lugar si un grupo de cromosomas ha pasado por una etapa de inactivación en la línea germinal masculina. En otras palabras, el citoplasma de huevos activados partenogénicamente es completamente competente para sostener el desarrollo a término con tal que los pronúcleos masculino y femenino contribuyan al genoma embrionario (McGrath, Solter 1984b; Surani y cols. 1984). Ambos laboratorios han empleado la técnica de trasplante nuclear ideada por McGrath y Solter (1983a,b). Surani y sus colegas demostraron que si un pronúcleo masculino se transfiere a un huevo haploide activado partenogénicamente, el embrión resultante tiene muchas probabilidades de llegar a término. Sin embargo, si se transfiere un pronúcleo femenino, los embriones no se desarrollaran más allá del décimo día;

además, hay muy poco crecimiento de los tejidos extraembrionarios. El trasplante de pronúcleos entre huevos fecundados ha demostrado también la necesidad de los genomas materno y paterno para el desarrollo completo (McGrath, Solter 1984b). Una explicación de estos resultados es que habría una frecuencia elevada de errores en la inactivación del cromosoma X en los tejidos extraembrionarios en el caso de que ambos cromosomas X deriven únicamente de la hembra. Normalmente hay una inactivación preferente del cromosoma X paterno en los tejidos extraembrionarios. Por el momento se desconoce la base molecular de la inactivación del genoma paterno.

**Los ciclos celulares hasta la etapa de mórula no compactada de ocho células.**

Actualmente se dispone de un gran caudal de información referente a los patrones de síntesis de ARN y de proteínas durante el desarrollo preimplantatorio a pesar del pequeño tamaño de los embriones murinos durante la etapa de morulación. También ha habido adelantos en la correlación de estos cambios con momentos tales como la fecundación, la replicación de ADN, la división celular y el compromiso de los blastómeros hacia distintos destinos de desarrollo. Esta información se ha resumido en dos revisiones recientes (Johnson 1981; Pratt y cols. 1983).

Como se describe en estas revisiones, la electroforesis bidimensional en gel de poliacrilamida-SDS (PAGE) ha demostrado varios cambios en el patrón de proteínas marcadas con [<sup>35</sup>S]metionina sintetizadas por embriones en morulación. Ha sido difícil situar en el tiempo con precisión estos cambios; especialmente en relación con otros acontecimientos celulares (por ejemplo, síntesis de ADN y mitosis celular). Esta dificultad se debe a la asincronía existente dentro de una población de embriones fecundados normalmente y entre blastómeros de embriones individuales. Esta asincronía puede reducirse mediante la fecundación in vitro; mediante la separación de embriones tras la división a dos células y mediante la disociación y recombinación de grupos de blastómeros en etapas concretas del ciclo celular antes del marcado. La exposición durante pocas horas por lo visto carece de efecto sobre el desarrollo posterior (Van Blerkom 1981) aunque la exposición prolongada a metionina[<sup>35</sup>S] puede tener efectos perjudiciales, debido a lesión por radiación, que no pueden ser reparados (MacQueen 1979).

Hay una pérdida física de ARNm derivado de la madre por parte del embrión, de manera que en la etapa de dos células tardía, casi todo -si no todo- el ARNm materno ha desaparecido. La mayor parte de esta pérdida ocurre durante la etapa de dos células; el ARNm materno es reemplazado

durante la etapa de dos células con ARNm embrionario (Bolton y cols. 1984). Se ha controlado la actividad genética embrionaria con cierta precisión. Se ha demostrado que tiene lugar en dos momentos. El primero inmediatamente antes y el segundo momento inmediatamente después del periodo de replicación del ADN (Flach y cols. 1982; Bolton y cols. 1984).

Las variaciones en el patrón de síntesis proteica comprobadas tras la fecundación pueden deberse a varios procesos:

1. Aumento en las tasas de recambio de algunas proteínas sintetizadas en ARNm maternos estables. Se han recogido pruebas de tales procesos en huevos de mamífero (Howlett, Bolton 1985).
2. Modificación posttraduccional de proteínas sintetizadas tanto en ARN materno como embrionario. Hay algunas pruebas de modificaciones proteicas mediante fosforilación, glicosilación o hidrólisis proteica (Van Blerkom 1981; Cascio, Wassarman 1982; Pratt y cols. 1983).
3. Empleo selectivo de subespecies de ARNs materno. Algunas especies de ARNm se emplean o suprimen selectivamente; la

comprobación experimental proviene de estudios con embriones cuidadosamente controlados cronológicamente. También de comparar productos de traducción in vitro e in vivo.

4. Degradación específica de ARNm materno conservado del ovocito. En la etapa de dos células hay un descenso brusco de la concentración de ARN total y poli(A)<sup>+</sup> (Clegg, Piko 1983); también lo hay en la traducción de ARNm globínico inyectado dentro del cigoto (Brinster y cols. 1980) y en la traducción de proteínas presuntamente codificadas por el ARN materno (para una revisión, ver Johnson 1981; Pratt y cols. 1983). Giebelhaus y cols. (1983), en una serie muy clara de experimentos empleando hibridación Northern para vectores de ADN recombinado, demostraron una pérdida notable del conjunto de ARNm de actina y de la histona H3 presente en el huevo. Posteriormente, las concentraciones de estos ARNm en el embrión comenzaron a aumentar después de la etapa de cuatro células. A partir de ese momento ha empezado ya la transcripción del genoma embrionario.

5. Síntesis de proteínas en ARNm transcritos de novo a partir del genoma embrionario. Se ha demostrado que la síntesis de ARN nuevo es necesaria para el desarrollo a partir de la etapa de dos células y para la síntesis de

muchas proteínas nuevas; esta demostración se realizó incubando huevos en presencia de alfa-amanitina (inhibidora de la polimerasa de ARN) (Flach y cols. 1982). Se considera que las transcripciones de los ARN ribosómicos y poli(A)<sup>+</sup>, por lo visto suspendidas en el momento de la rotura de la vesícula germinal, recomienzan en pequeña escala alrededor de la etapa de dos células. Los estudios referentes a la expresión de variantes genéticas enzimáticas o de antígenos han permitido determinar el momento de comienzo de la síntesis de proteínas codificadas paternalmente. Mediante el marcado metabólico y la inmunoprecipitación se ha seguido la síntesis de algunas proteínas.

Diversos estudios (McLachlin y cols. 1983; Bolton y cols. 1984) ponen de manifiesto que el ARNm embrionario parece cubrir todas las necesidades del embrión durante los dos ciclos celulares siguientes. La consecuencia clara es que gran parte del proceso precoz de interacción celular y de reconocimiento posicional que lleva a la diversificación celular puede regularse también a un nivel post-transcripcional. El análisis molecular del desarrollo posterior hasta la etapa de blastocisto permanece todavía en una etapa preliminar si se compara con etapas anteriores.

En resumen, hasta la mitad de la etapa de dos células (27 horas después de la fecundación) el embrión recurre principalmente a proteína y ARN sintetizados durante la ovogénesis. A partir de ese momento, muchos genes embrionarios comienzan a funcionar. De manera coincidente gran parte del ARNm materno heredado parece ser degradado rápidamente. Sin embargo, las proteínas codificadas maternalmente pueden conservarse más allá de esa etapa.

**Los primeros procesos relacionados con la diferenciación: la compactación y la blastulación.**

Es de sumo interés el proceso por el cual surgen dos linajes celulares comprometidos y diferenciados (la masa celular interna y el trofotodermo) en el blastocisto murino. Se disponen de numerosas pruebas indicativas de un acontecimiento crucial en este proceso. Este acontecimiento se denomina compactación. Consiste en el reordenamiento de la organización celular y en las interacciones que ocurren en la etapa de ocho células. La compactación conlleva cambios importantes en las relaciones espaciales existentes entre las células componentes del embrión. Además se observan signos de depósito de una matriz extracelular (Wan y cols. 1984).

La etapa más precoz en la cual la diversidad celular es evidente tiene lugar después de la transición de la fase de ocho a dieciseis células. Esta diversidad parece surgir de la partición diferencial de blastómeros polarizados de ocho células (Maro y cols. 1985; fig. 2). El proceso de polarización que acontece durante la etapa de ocho células está regulado por interacciones celulares (Johnson y cols. 1986b). Este proceso comporta la redistribución de muchos componentes de la célula tanto en la superficie (Pratt, 1985) como dentro del citoplasma y del citoesqueleto (Fleming, Pickering 1985).

Se dispone de un gran caudal de conocimientos acerca del reordenamiento espacial que ocurre en la compactación. No se conoce tanto respecto a la regulación del mismo. Algunos elementos de la compactación pueden presentarse incluso cuando la síntesis proteica se halla inhibida desde la etapa de dos células tardía o desde la etapa de cuatro células precoz (Levy y cols. 1986). Además algunos acontecimientos de síntesis proteica se inhibe al comienzo de la etapa de cuatro células. El planteamiento de inhibir una actividad

1/8 y 1/16

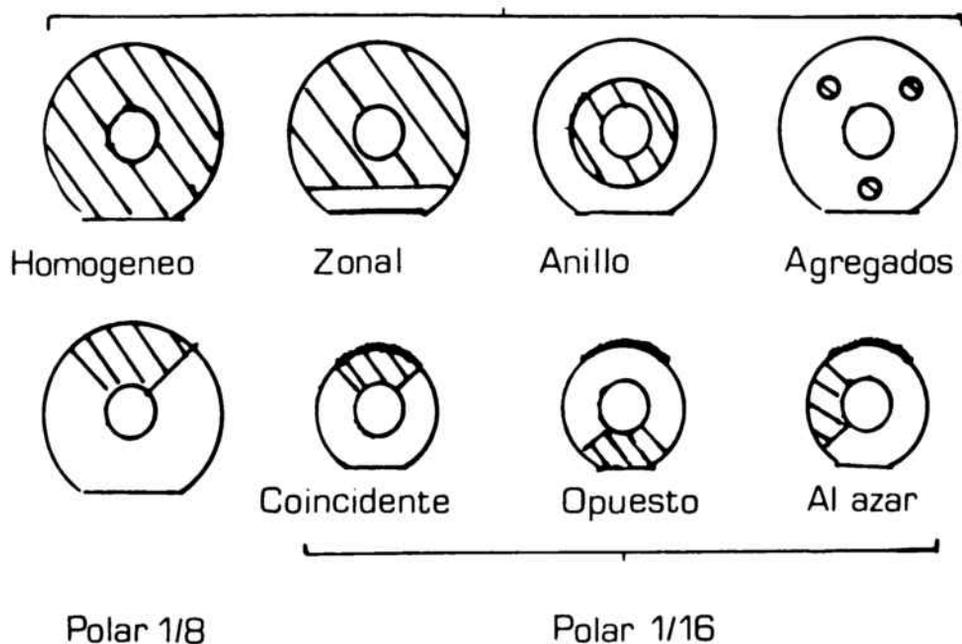


FIGURA 2. Resumen esquemático de los patrones de distribución de orgánulos en pares de blastómeros de embriones de 8 y de 16 células. La línea ondulada negra en los blastómeros procedentes de embriones de 16 células indica el polo superficial (tomado de Maro y cols. 1985).

biosintética dada y de observar el efecto sobre la compactación no permite sacar muchas conclusiones acerca de la regulación de las características que no se desarrollan. Sin embargo puede arrojar mucha luz acerca de aquellas características resistentes a la acción inhibidora (Smith, Johnson 1985). En particular, la exposición a drogas inhibidoras de la mayoría de embriones precoces de cuatro células y de muchos embriones tardíos de dos células no impide ni el aplanamiento celular ni la polarización de superficie (Levy y cols. 1986). Estos y otros resultados (Fleming y cols. 1986) permiten concluir que la mayoría de los embriones poseen las proteínas necesarias en cantidad suficiente para terminar casi todo el proceso de compactación mucho antes de que tenga lugar ésta. Tal conclusión no excluye la posibilidad de que en el desarrollo normal haya una síntesis continuada de estas proteínas hasta y durante la compactación. La mayoría de las proteínas con una función conocida durante la compactación parecen estar presentes en la etapa de una célula (Ogou y cols. 1982) como en el caso de la uvomorulina. Además, la constancia relativa del patrón cualitativo de biosíntesis proteica entre la etapa de dos células tardía y la de ocho células se conoce desde hace algún tiempo (Van Blerkom, Brockway 1976); también se sabe que la vida media de la mayoría de las especies proteicas es de muchas horas (Pratt y cols. 1983). Puede, por lo tanto, concluirse que la mayoría, si no todas, de las

redistribuciones físicas que ocurren en la compactación pueden funcionar con proteínas sintetizadas sobre "plantillas" presentes ya en la etapa de dos células tardía.

Parece razonable concluir que muchos de los cambios en la organización celular que tienen lugar en la compactación están regulados a un nivel post-traducciona. Esta regulación podría mediar mediante una variación en la estructura, estabilidad, conformación y/o actividad de las proteínas sintetizadas previamente. Para la compactación, los blastómeros se convierten de esféricos en "cilíndricos" y los espacios intercelulares se estrechan mucho. Parece que la compactación se presenta al cabo de un tiempo fijo tras la fecundación. No ha sido posible adelantar experimentalmente la compactación a una etapa anterior a la de ocho células. Levy y cols. (1986) han observado que muchos embriones de dos células tardíos y de cuatro células precoces incubados con drogas inhibidoras se aplanan y se polarizan en la superficie de modo prematuro. Sorprende que este resultado se presentara con regularidad en todos los experimentos en una proporción tan elevada de embriones. En conjunto, estos resultados parecen apuntar a que algunas de las proteínas sintetizadas durante la etapa de cuatro células pueden relacionarse con la supresión de la compactación.

Cualquiera que sea la característica responsable de la respuesta a las drogas en el comienzo de la señal para compactarse, una vez se ha dado la señal, el restablecimiento de la síntesis proteica no invierte el proceso. En efecto, el restablecimiento de la síntesis proteica permite la continuación de la compactación hasta el final en la mayoría o en todos los embriones. Quizá en el desarrollo normal no se emite una señal similar hasta la etapa de ocho células precoz. En esta etapa, la señal podría controlarse de dos maneras: negativamente, por la anulación de una limitación previa; positivamente proporcionando o activando un componente previamente limitante.

La hipótesis de que un acontecimiento clave en el desarrollo como la compactación pueda regularse de un modo permisivo mediante la disposición de los componentes estructurales necesarios y modulando posteriormente la concentración de un factor regulador o de un estado celular es plausible puesto que hay pruebas de que un tipo parecido de sistema funciona para regular la activación del desarrollo en la fecundación.

El empleo de una señal permisiva para comenzar un programa de desarrollo mediado post-traduccionalmente presenta varias ventajas. Una de las principales es la facilidad con la que señales espaciales instructivas podrían

integrarse dentro del proceso de desarrollo. Tales señales instructivas funcionan en la compactación; la interacción celular regularía tanto la sincronización como la organización espacial del proceso (Johnson y cols. 1986a, b).

Una inducción o una señal permisiva es aquella en la que el tejido estimulado se encuentra ya tan comprometido con su estado final de diferenciación que cualquier estímulo, a menudo inespecífico, servirá para completar el proceso; en tal caso, la naturaleza de la respuesta está casi totalmente determinada por el tejido estimulado. Por el contrario, una inducción o una señal instructiva es aquella en la que el tejido estimulado se encuentra hasta cierto punto no comprometido y necesita una señal específica del inductor señalando la dirección o direcciones en las que diferenciarse (Gurdon 1987).

Hasta la etapa de ocho células hay pruebas seguras de que los blastómeros del embrión murino son equipotentes. Los blastómeros individuales obtenidos de mórulas de dos y de cuatro células pueden dar lugar cada uno a un ratón. Los blastómeros precoces de la etapa de ocho células no pueden generar un ratón por sí mismos; aunque si se recombinan con mórulas marcadas genéticamente puede surgir una amplia gama de tejidos diferentes en una descendencia quimérica (Kelly 1977). Sin embargo, a medida que se llega a la etapa de 16

células hay una restricción gradual en la potencia de desarrollo de las células. Esta restricción genera dos linajes distintos: el trofotodermo (TE) y la masa celular interna (MCI). Este proceso de diferenciación comienza con la compactación. En la compactación, los blastómeros se aplanan y aumentan su contacto mutuo. Además desarrollan volúmenes citoplasmáticos y regiones membranosas basales y apicales diferenciadas (polarización). Este proceso termina con la formación de un blastocisto completamente expandido. Este consiste en una vesícula de trofotodermo rodeando una cavidad llena de líquido (el blastocelo) y un pequeño grupo de células de la MCI. El trofotodermo tiene todas las características de un epitelio verdadero; presenta complejos de unión apicales constituyendo una barrera de permeabilidad completa contra el ambiente externo.

Algunos cambios celulares asociados con la compactación no ocurren sincrónicamente dentro de todas las células de un embrión. De manera parecida, los ciclos celulares no están sincronizados (Graham, Deussen 1978). Los cambios asociados con la compactación apuntan claramente a alteraciones en las propiedades de la superficie celular y en la organización del citoesqueleto. Son campos de investigación activa la base molecular de estos cambios, la(s) señal(es) que los provocan y su relación mutua y con el ciclo celular.

## Las relaciones de la adhesividad celular con la compactación.

Desde el punto de vista de la adhesividad celular, hay pruebas seguras de que los embriones en compactación no sintetizan ni fibronectina ni colágenos (I a IV); ambas son proteínas de matriz extracelular (Wartiovaara y cols. 1979; Leivo y cols. 1980). Las mórulas sintetizan laminina (Cooper, MacQueen 1983) y ésta puede localizarse histoquímicamente entre las células de la mórula compactada (Leivo y cols. 1980; Wu y cols. 1983). Sin embargo, antisuero de conejo polivalente dirigido contra la proteína nativa no inhibe ni deshace la compactación (A.R. Cooper y H. MacQueen, no publ., cit. por Hogan y cols. 1986) como tampoco lo hace la adición de laminina purificada exógena. Por el contrario, anticuerpos de conejo polivalentes (tanto suero entero como fragmentos Fab IgG) contra células de carcinoma embrionario F9 inhiben la compactación (Kemler y cols. 1977). Este efecto decompactante parece mediar, al menos en parte, a través de la unión a una glicoproteína de superficie denominada ovomorulina (Hyafil y cols. 1980, 1981; Peyrieras y cols. 1983). El  $M_r$  de este componente es de aproximadamente 123.000 aunque en la presencia de  $Ca^{++}$  la tripsina lo hidroliza dando lugar a un fragmento glicoproteico de  $M_r$  84.000. Este fragmento sigue siendo hidrolizado por la tripsina en fragmentos de peso molecular bajo si el medio carece de  $Ca^{++}$ .

Estos resultados apuntan a un cambio en la conformación de la uvomorulina dependiente del  $Ca^{++}$ ; este cambio puede quedar reflejado en la dependencia de la compactación con respecto al  $Ca^{++}$ . Hay pruebas recientes demostrando que la uvomorulina es la glicoproteína "cadherina". La cadherina se identificó en las células F9. Estas células están relacionadas con la adhesión intercelular y la compactación mediadas por el  $Ca^{++}$  (Yoshida, Takeichi 1982; Shirayoshi y cols. 1983; Yoshida-Noro y cols. 1984). La uvomorulina puede también ser idéntica a la molécula de adhesión celular CAM 120/80 descrita por Damsky y cols. (1983) y a la molécula L-CAM. Esta última es una glicoproteína superficial sializada relacionada con la adhesión intercelular hepática y de otros tejidos dependiente del  $Ca^{++}$ . Es importante poner de relieve que la síntesis de uvomorulina no es exclusiva de las mórulas en compactación. Puede detectarse en la superficie celular antes de la compactación (Hyafil y cols. 1981). Las células de carcinoma embrionario, las células de embriones de etapas tardías y muchos tejidos epiteliales en animales adultos sintetizan también uvomorulina (Damsky y cols. 1983).

#### **La polarización celular y la compactación.**

Una de las características esenciales de la compactación es la polarización de los blastómeros. Mediante este proceso, los blastómeros presentan regiones distintas en las áreas

basolateral y apical de la membrana. En la compactación se establecería un gradiente radial de información citoplásmica. Este gradiente se demuestra en los blastómeros de ocho células como una polaridad axial. La observación con el microscopio electrónico de barrido de embriones compactados y disociados mediante la incubación sin calcio permite ver claramente estas regiones (Reeve, Ziomek 1981); los polos externos de las células tienen numerosas microvellosidades, mientras que las superficies internas son lisas. Si no se establece la comunicación intercelular, cada unidad citoplásmica discreta intenta establecer su propia polaridad. Esta determinación coincide con la pérdida de capacidad de las células individuales para originar esta polaridad. Los orgánulos citoplásmicos también parecen polarizarse tras la compactación; los núcleos se disponen basalmente. La incubación de blastómeros previa a la compactación permite seguir in vitro el comienzo de la polarización. Durante el cultivo, las superficies con microvellosidades y los lugares de unión de la ConA siempre aparecen en los polos opuestos a los puntos de contacto célula-célula (Ziomek, Johnson 1980; Johnson, Ziomek 1981a, b). Una cuestión importante objeto de investigación es si la redistribución de las regiones de membrana plasmática precede o es resultado de una reorganización de elementos citoesqueléticos.

La etapa de ocho células en la embriogénesis murina se caracteriza por cambios morfológicos para conseguir el mayor contacto celular posible y la reorganización de componentes citoplásmicos y de superficie para generar células polarizadas a partir de células que previamente eran radialmente simétricas. Aparecen varias diferencias más durante la etapa de dieciseis células dando lugar a fenotipos y potenciales de desarrollo progresivamente divergentes (Fleming, Pickering 1985).

Trabajos recientes (Johnson cit. por Hogan y cols. 1986) sugieren que la polarización citoplásmica en la etapa de ocho células in vivo depende de un sistema citoesquelético funcional. Hay pruebas de que los microfilamentos no sólo se redistribuyen durante la etapa de ocho células; toman, asimismo, parte activa en el proceso mismo de aplanamiento. Aunque la función de los microfilamentos en la polarización no está bien definida del todo (Johnson, Maro 1984). Las proteínas de los filamentos intermedios no se ensamblan en filamentos intermedios hasta la etapa de ocho células tardía o la de dieciseis células temprana. También se ha observado que, en general, la ausencia de microtúbulos es compatible con el aplanamiento y la polarización blastoméricos (Maro, Pickering 1984).

Los estudios acerca de los efectos de drogas inhibidoras de la formación de microtúbulos tienen dos limitaciones serias. En primer lugar sólo se ha estudiado la etapa de ocho células. En segundo lugar, los estudios se han realizado sobre embriones enteros; ello dificulta el protocolo experimental y su análisis posterior. Por ejemplo, existe una heterogeneidad considerable en el momento de la división entre los blastómeros dentro de un mismo embrión; de esta manera algunos blastómeros de ocho células en un embrión pueden ser de 3-4 horas más viejos en el momento en que el último blastómero de cuatro células se divide en dos blastómeros de ocho células (Lehtonen 1980).

Aunque las drogas inhibidoras perturban la forma del polo celular que se desarrolla, es evidente sin embargo que existe un polo. La polaridad citoplásmica detectable aparece varias horas antes que la polaridad superficial patente durante la etapa de ocho células; se ha postulado que esta secuencia temporal pueda ser también causal (Maro y cols. 1985). Los resultados de Johnson y Maro (1985) sugieren que esta interpretación no es correcta. Una vez se ha establecido la polaridad en el blastómero de ocho células, persiste una "memoria" de polaridad en el citocórtex. Por lo tanto, en la mitosis hacia los blastómeros de dieciseis células, la polaridad superficial es evidente en el transcurso de la misma (Johnson, Ziomek 1981b). Además, una vez se ha

completado la división, la polaridad de la clatrina citoplásmica únicamente se restablece en la progenie polar (Maro y cols. 1985). Así, los elementos citoesqueléticos serían esenciales para:

1. Dirigir la redistribución postmitótica de clatrina a la región cortical subyacente al polo superficial. Las leyes sobre la polarización de mórulas murinas podrían aplicarse más generalmente a la diferenciación de tejidos epiteliales a partir de células precursoras no polarizadas en etapas posteriores del desarrollo.
2. Situar los acúmulos lisosómicos polarizados basalmente.
3. Mantener ambas localizaciones.

Puesto que esta relocalización polar de la clatrina en los blastómeros de ocho células tiene lugar mucho antes de la polarización superficial detectable, la conclusión es que las fases más precoces de la polarización pueden no ser detectadas por el momento.

Tal reorganización encubierta dentro del citocórtex debería desarrollarse durante las primeras tres horas de la etapa de ocho células. Debería localizarse en sentido opuesto

al punto de contacto con otros blastómeros (Ziomek, Johnson 1980). Este cambio podría ser tanto un cambio positivo localizado apicalmente que permitiría la estabilización de novo; o podría ser una pérdida localizada de una propiedad estabilizante, uniforme hasta ese momento desde las regiones basolaterales. De cualquier manera debería funcionar independientemente de la organización citoesquelética intracelular y por lo tanto de una matriz citoplásmica organizada. La señal inductora podría transmitirse al apex mediante corrientes iónicas; es improbable que el movimiento físico de proteínas macromoleculares dentro del plano de la membrana pudiera transmitir la información, aunque un potencial de acción podría actuar de esta manera (Wolf 1983).

#### **Segregación de los linajes trofodérmicos y de la masa celular interna.**

El blastocisto murino expandido contiene dos subpoblaciones celulares: el trofodermo y la MCI. La asignación a uno de estos dos linajes depende de su ubicación interna o externa dentro del embrión en etapas previas (Tarkowski, Wroblewska 1967). En el embrión no perturbado, las células del interior contribuyen de media el 75% de las células de la MCI. El 25% restante de las células de la MCI deriva casi exclusivamente de una segunda asignación de

células al interior en el embrión de 32 células (Fleming 1987). La asignación de células a una ubicación interior se consigue mediante la división organizada asimétricamente (polarizada) de un blastómero de ocho o dieciseis células de forma que las células hijas no reciben dotaciones equivalentes. Una mitosis de estas características se denomina diferenciadora; mediante esta mitosis aparece una célula polar externa derivada de la región apical de la célula progenitora y una célula apolar interna derivada de la región basolateral (Johnson 1986).

No todos los blastómeros de ocho a dieciseis células se dividen de forma diferenciadora. Algunos se dividen a lo largo del eje de polaridad, más que a su través, de manera que surgen dos células similares polares y externas. Una división de este tipo se denomina conservadora. El número de células internas dentro de un embrión individual estará por lo tanto determinado por la proporción de mitosis diferenciadoras a conservadoras por las células polarizadas en las transiciones de ocho a 16 y de 16 a 32 células. Se ha demostrado en el embrión intacto que una vez las células se quedan en el interior como resultado de una división diferenciadora, rara vez re-emergen para situarse externamente (Pedersen y cols. 1986).

La asignación de células al linaje de la MCI durante la partición está relacionado con el orden de la división de las células. La descendencia de las células que se dividen antes efectúa una aportación preferencial. Tal contribución preferencial podría conseguirse si los blastómeros de ocho o 16 células polares que se dividen antes tienden a dividirse diferenciadoramente (dando una célula interna y una célula externa) más que conservadoramente (dando dos células externas).

La existencia de tales mitosis diferenciadoras originantes de descendencia polar y no polar ilustra que, durante la maduración del linaje trofotodérmico, la pluripotencia celular se mantiene y se expresa en los blastómeros externos hasta, por lo menos, la transición de 16 a 32 células. No está tan claro si, durante la expansión blastocélica, las células trofotodérmicas de la etapa de 32 células pueden dar lugar a derivados de la MCI mediante una mitosis diferenciadora (Dyce y cols. 1987).

Si las células comienzan un ciclo celular de desarrollo concreto en momentos distintos y si las células adquieren una propiedad dada en un momento dado de ese ciclo celular, las células formadas más precozmente adquirirán esa propiedad antes que las células formadas posteriormente. La heterogeneidad temporal llevará a la heterogeneidad física.

Si la propiedad ligada al ciclo celular afecta a la forma celular o a la interacción, las diferencias físicas podrían también generar heterogeneidad espacial. Así, las diferencias en el orden de la división celular podrían generar un patrón espacial dentro del embrión. Un proceso de este tipo puede relacionarse con el establecimiento del eje embrionario: abembrionario del embrión murino (Garbutt y cols. 1987a).

Los resultados de Garbutt y cols. (1987a) revelan una clara ventaja de las células formadas antes que otras en su contribución relativa al linaje de las células internas. Las células internas generadas en la transición de la etapa de ocho a 16 células proporcionan el 75% de las células de la MCI. Parece probable que la segunda asignación de células al interior del embrión ocurrida en la mitosis posterior muestre una contribución preferencial similar por parte de las células que se han dividido antes. Hay que preguntarse qué

propiedad de las células que se dividen antes hace que sus divisiones sean diferenciadoras en vez de conservadoras.

Los estudios de Graham y Lehtonen (1979) demuestran que las células que se dividen antes tienden a establecer más contactos con otras células y a encontrarse más en el interior del embrión; sugirieron que alguna propiedad asociada con la adhesión de la superficie celular podría ser importante para determinar la ubicación preferencial interna de las células que se dividen antes y de su descendencia. Se ha demostrado que las propiedades adhesivas intercelulares cambian durante el cuarto ciclo celular (Ziomek, Johnson 1980). También otras características aparecen durante este ciclo como uniones funcionales y la polarización del citoesqueleto (Johnson, Maro 1986; fig. 3).

Hay dos maneras mediante las cuales una interacción celular puede influir sobre los planos de partición. La interacción celular podría "marcar" la cara interna del citocórtex adyacente al punto de contacto. Este volumen marcado podría actuar como un foco para orientar tanto un polo o el borde de la placa ecuatorial del huso en desarrollo. De manera alternativa, el aplanamiento celular podría influir en la forma celular y los cambios de forma podrían determinar secundariamente el eje longitudinal del

huso con respecto al eje polar de la célula, determinando eficazmente la orientación del plano de partición.

Apical

microvelloso  
no adhesivo  
receptorConA +  
endocitosis preferente  
corriente adentro  
colesterol abundante

Apical

endosomas  
vesículas recubiertas  
microfilamentos  
microtúbulos  
COMT

Basolateral

no microvelloso  
adhesivo  
+ para uvomorulina  
+ para fosfatasa alcalina  
bandas de cierre  
uniones íntimas

Depleción submem.  
branosa de:

miosina  
microtúbulos  
microfilamentos  
orgánulos

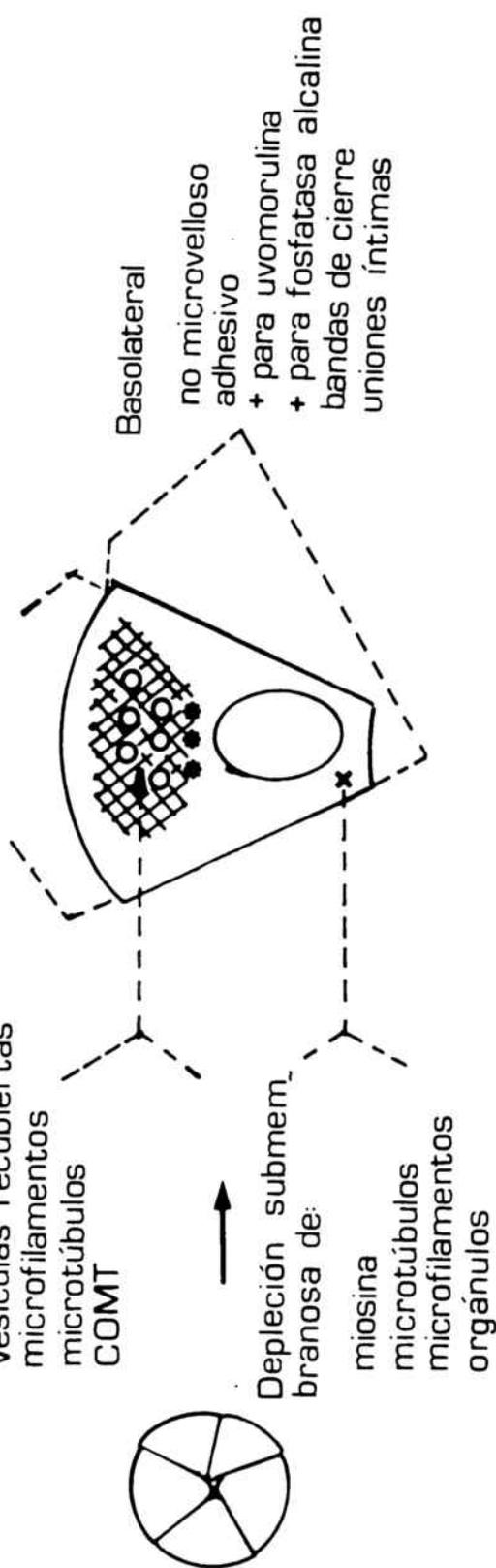


FIGURA 3. Visión esquemática de un embrión compactado de ocho células (a la izquierda). Se ha extraído una de sus células ilustrándose ésta con más detalle para poner de manifiesto la distribución polarizada de muchos de sus componentes (tomado de Johnson y cols. 1986a).

En el embrión murino de ocho células, parece improbable que el contacto intercelular influya directamente en la orientación en la que se dispone el huso naciente. Más bien, el efecto de la distribución celular sobre la forma celular comporta una mayor proporción de divisiones diferenciadoras en las células que se aplanan antes. Este efecto regularía la orientación del plano de partición en la transición de 16 a 32 células (Johnson, Ziomek 1983).

La primera consecuencia reconocible de la diferenciación en el embrión murino de preimplantación es la formación de células trofoblásticas nutritivas y de la masa celular interna del embrión.

Las interacciones celulares inmediatas dentro de la mórula se consideran importantes en determinar la contribución al interior de la misma más que algún acontecimiento previo en la división precoz. A consecuencia de la morulación, el volumen celular disminuye más que la superficie celular mientras que la superficie total del embrión aumenta muchísimo. Suponiendo una forma esférica para las células, en cada mitosis el volumen celular disminuye un 50% y la superficie celular un 37%. Cuando un cigoto unicelular se divide para convertirse en una mórula de

dieciseis células, la superficie celular del embrión aumenta por un factor de 2,5. Realmente, aunque en la morulación el embrión disminuye de tamaño (Brinster, 1967; Abramczuk, Sawicki 1974), el aumento de la superficie total sobrepasa lo calculado antes puesto que las mórulas precoces se compactan y se pierde la forma esférica de los blastómeros (Ducibella, Anderson 1975). El aplanamiento de la superficie proporcionaría la membrana celular necesaria. Por lo visto no sucede así ya que no se observan cambios en la densidad o dimensión de los microvilli antes de la etapa de blastocisto (Calarco, Epstein 1973). Puede suponerse por lo tanto que se forma membrana nueva. Si los componentes de ésta difieren según la actividad sintética de cada ciclo celular, la membrana nueva contendría información relativa a la etapa correspondiente; esto es, contendría información temporal.

La superficie celular de los embriones murinos de preimplantación contiene glicoproteínas que también reflejan diferencias de etapa (Pinsker, Mintz 1973). Los resultados obtenidos mediante fusiones experimentales sugieren otro ejemplo de diferenciación temporal en embriones murinos de preimplantación. La producción eficaz de quimeras depende en gran parte de la etapa equivalente de desarrollo de los embriones a fusionar (Mintz, 1964, 1971); incluso aunque la fusión de pares no sincrónicos es posible (Mulnard, 1971; Stern y Wilson, 1972) el rendimiento es menor. Esto sugiere

la posibilidad de haber ocurrido variaciones en la afinidad celular de acuerdo con la etapa del desarrollo.

Los estudios mediante microscopio electrónico para demostrar la fosfatasa alcalina indican que la membrana plasmática puede contener información espacial durante la morulación (Izquierdo, 1977). Es posible estudiar el lugar de síntesis de la membrana nueva y la distribución de la misma definiendo la membrana nueva como aquella que en embriones murinos precoces aparece marcada por la actividad de la fosfatasa alcalina.

Las observaciones acerca de la localización ultraestructural de la actividad de fosfatasa alcalina sugieren el desplegamiento gradual de un patrón intrínseco. El desarrollo de una configuración espacial en la mórula implicaría, en primer lugar, que la morulación siguiera un patrón estricto y, segundo, que la membrana formada en cada ciclo celular sea añadida de manera discreta. Así aparecería un mosaico ordenado de partes de membrana específicas de etapa, proporcionando a cada blastómero información concreta relativa a su propia ubicación en el embrión y a la edad cronológica del mismo.

La posición relativa de los blastómeros dentro del embrión murino en morulación es crítica en la determinación

de este paso de la diferenciación. Si la ubicación de los blastómeros afecta realmente la determinación, el influjo del microambiente inmediato y de las interacciones celulares en la superficie de los blastómeros puede ser un factor en este proceso.

Se ha postulado por diversos autores (Granholm, Brenner 1976; Kirby y cols. 1967; Jenkinson, Wilson 1970) que los blastómeros se mueven activamente durante la transformación de mórula a blastocisto; además la masa celular interna migra activamente a una posición mesometrial durante la implantación. Las uniones tipo macula y fascia occludens podrían proporcionar apoyo estructural dentro del embrión en la etapa blastocística permitiendo a la masa celular interna moverse como una unidad cohesiva.

En la etapa de dieciseis células se hace patente por vez primera la heterogeneidad celular dentro del embrión murino (Johnson, Maro 1985). Se encuentran tanto células polares como apolares. Esta heterogeneidad celular surge inicialmente de la división de los blastómeros polarizados de un embrión de ocho células; durante la división, la distribución polarizada de clatrina se pierde a medida que el antígeno se redistribuye en los blastómeros resultado de la mitosis (Maro y cols. 1985). La polaridad superficial se conserva aunque el área ocupada por el polo superficial se extiende

sobre toda la región apical de la célula 1/8 para dar lugar a una célula 1/16, cubierta de microvilli (Johnson, Maro 1985; fig. 4).

En segundo lugar, una característica de la heterogeneidad celular en el embrión de dieciseis células es que al cabo de cinco a ocho horas de encontrarse en la etapa de dieciseis células, las células polares rodean las células apolares en un proceso que anticipa el englobamiento trofodérmico de células en la MCI.

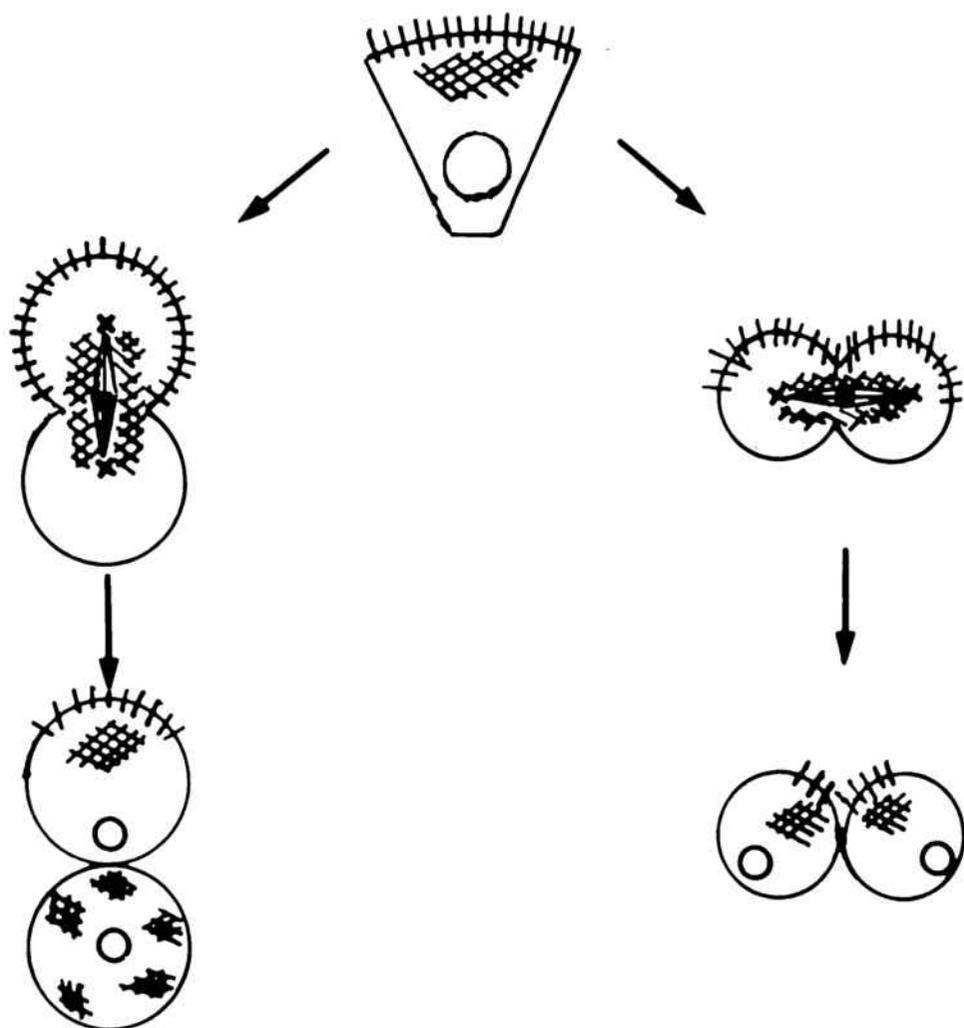


FIGURA 4. Esquema de las dos consecuencias posibles de la división de un blastómero polarizado procedente de un embrión de 8 células (o de dieciseis). Si el plano de mitosis es el dibujado en la izquierda, la división es diferenciadora y de ella resultan dos células con fenotipos distintos. Por el contrario, un plano de mitosis orientado conservadoramente, como aparece en la derecha del esquema, proporciona dos células polares. Los polos de las dos células hijas son contiguos a través de los restos del surco de mitosis. Las rayas cruzadas representan microfilamentos, endosomas y clatrina; las rayas en la superficie representan microvellosidades (tomado de Johnson y cols. 1986a).

En tercer lugar, en la etapa de dieciseis células hay una redistribución de los elementos lisosómicos tanto de blastómeros polares como apolares. Como se ha expuesto más arriba, la compactación acompaña a la polarización celular. Esta propiedad fundamenta una hipótesis de polarización para explicar la diferenciación de los dos linajes celulares distintos del blastocisto: el trofoblasto y la masa celular interna. Los planos de mitosis perpendiculares al eje de polarización a través de las células morulares compactadas darán lugar a células basales o internas y a células apicales o externas. Cada una de ellas heredará distintas moléculas de membrana y citoplásmica (por ejemplo, glicoproteínas de membrana plasmática, receptores, centros de organización citoesquelética, etc.). Se considera que estas moléculas heredadas son la causa del comienzo de las diferencias en el potencial de desarrollo de las células internas y externas. Según esta hipótesis, la diferenciación es el resultado de una polarización celular provocada precozmente en la compactación.

Según una hipótesis alternativa de microambiente interno/externo, la diferenciación no tendría lugar hasta que se formara una red de uniones íntimas entre las células externas. Esto conduciría a diferencias entre el

microambiente interno y el externo. Las células reaccionarían de manera propia: las células internas darían lugar a la masa celular interna y las externas al trofotodermo (Johnson y cols. 1981; Johnson, Ziomek 1981b; Gardner, 1983). La etapa de blastocisto en el ratón comprende unos dos días. Dentro de esta fase cabe distinguir, según Nadijcka y Hillman (1974) cuatro subetapas: en la primera se forma la cavidad blastocélica sin llegar ésta a su completa expansión. En la segunda subetapa, la cavidad blastocélica se encuentra totalmente expandida, aunque la masa celular interna está compuesta de un solo tipo celular. En la tercera subetapa, la masa celular interna se divide en dos tipos celulares morfológicamente distintos: el epiblasto y el endodermo proximal (visceral). En la cuarta subetapa se desarrolla el endodermo parietal constituyendo una capa continua alrededor de la cavidad blastocélica.

Las dos primeras subetapas del blastocisto acontecen antes de la expulsión de la zona pelúcida; la tercera subetapa se observa inmediatamente antes y después de dicha expulsión. La cuarta subetapa se observa siempre después de la liberación de la zona pelúcida.

En los blastocistos de las dos primeras subetapas, cuando las células todavía se encuentran muy adheridas,

numerosos desmosomas y algunas uniones íntimas focales unen las células de la masa celular interna entre sí y al trofoblasto embrionario. En los blastocistos de subetapas posteriores raramente se observan desmosomas y las uniones íntimas se tornan más numerosas. Se ha postulado que la formación de uniones íntimas en la superficie apical de células trofoblásticas adyacentes en el embrión murino es condición necesaria para la formación y expansión de la cavidad blastocélica.

La formación del blastocisto comienza con la aparición del blastocele. Este acontecimiento ocurre a los tres días del desarrollo. Aproximadamente en la etapa de 32 células. En la etapa de blastocisto murino completamente expandido, aparece el eje embrionario-abembrionario (eje EA; fig 5.). El eje EA es importante puesto que las células dentro de los dos tejidos constitutivos del blastocisto se diversifican según su posición con respecto al mismo. Así, hacia el polo abembrionario, el trofotodermo mural forma células gigantes primarias no proliferativas que inician el anclaje al endometrio; mientras que la cara abembrionaria o blastocélica de la MCI constituye endodermo primitivo (o hipoblasto). En el polo embrionario, el trofotodermo polar prolifera para formar el cono ectoplacentario, las células gigantes secundarias y el ectodermo extraembrionario; mientras que la MCI adyacente forma ectodermo primitivo (o epiblasto;

Gardner, 1983). Poco después, se desarrollan dentro del epiblasto los ejes embrionarios anteroposterior y dorsoventral (Smith, 1980, 1985).

El establecimiento del eje EA definitivo se observa durante la segregación, dentro del centro del embrión, de las células de la MCI desde el líquido blastocélico. La orientación del eje EA podría depender del lugar, dentro de

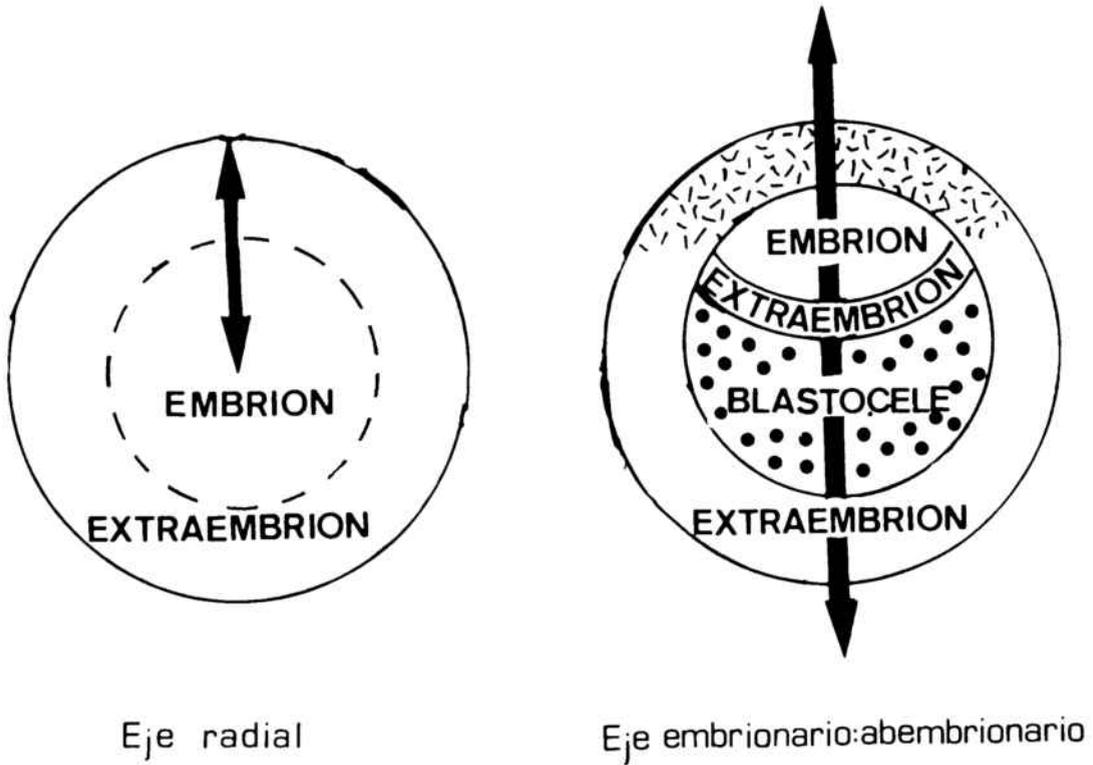


FIGURA 5. Vista esquemática de los dos primeros ejes establecidos durante el desarrollo murino. En primer lugar aparece un eje radial y comporta la generación de diferencias entre el centro y la periferia del embrión; las regiones centrales dan lugar a la masa celular interna (MCI) mientras que las regiones periféricas dan lugar a trofocotilodermo extraembrionario. Con la aparición del blastocele (punteado) y el desarrollo de la MCI y del trofocotilodermo queda establecido un eje embrionario:abembrionario. La MCI se encuentra en el polo embrionario y se diferencia en endodermo primario (saco vitelino) abembrionariamente (extraembrión) y en ectodermo primario hacia el polo embrionario (embrión). El trofocotilodermo "polar" que se encuentra "por encima" del ectodermo embrionario prolifera (rayado) mientras que el trofocotilodermo abembrionario "mural" proporciona células gigantes mediante endoreduplicación (tomado de Johnson y cols. 1986a).

la mórula tardía, en donde se produce el primer líquido blastocélico (Surani, Barton 1984). A medida que el blastocisto se expande, las células internas de la mórula quedarían restringidas al polo opuesto del embrión y señalarían el polo embrionario.

Se han propuesto dos modelos para explicar el comienzo de la formación de la cavidad blastocélica; cada uno de ellos depende de la observación de que existe una heterogeneidad temporal considerable entre las blastómeras dentro de cualquier embrión de preimplantación individual (Chisholm y cols. 1985).

Surani y Barton (1984) argumentan que durante la transición de 16 a 32 células, aquellas células externas que se dividen relativamente tarde (y que por lo tanto se retrasan con respecto a las células más rápidas) tienden a quedar "estiradas" debido a la acumulación interna de células. Consideran que las células estiradas menos probablemente sufrirán citoquinesis y por lo tanto es más probable que se vuelvan polinucleadas. Surani y Barton consideran que la aparición de células polinucleadas indica, asimismo, una diferenciación terminal prematura en trofotodermo e identifica por lo tanto las primeras células capaces de formar líquido blastocélico. La ubicación de estas

células en mitosis más tardías correspondería a la posición del polo abembrionario.

Una explicación alternativa propone que la consecución de propiedades de desarrollo está ligada al ciclo celular; pero que los ciclos celulares (o alguna característica asociada a ellos) se emplean como recursos enumerativos y que solo en un ciclo celular determinado (el sexto o equivalente al de 32 células) se consigue la competencia para formar el blastocele (Smith, McLaren 1977). Con esta explicación, las células más precoces en dividirse (las primeras que alcancen el sexto ciclo celular) conseguirían primero la competencia y de esta manera señalarían el polo abembrionario del embrión. Las dos explicaciones suponen que la heterogeneidad temporal entre las células contribuye de forma importante a la formación del patrón espacial. Sin embargo proporcionan predicciones contradictorias acerca de la relación entre el orden de mitosis y el lugar del comienzo del blastocele.

Los experimentos de Garbutt y cols. (1987b) empleando cuentas de latex fluorescente permiten afirmar que no existe una relación absoluta entre el orden de la división y el lugar de la formación del blastocele naciente.

Puede buscarse otra explicación a la falta de una correlación absoluta entre la posición de las células que se

dividen antes y la posición del blastocele naciente. Esta explicación puede radicar en la naturaleza del proceso de formación del blastocele. La obtención de un depósito de líquido dentro del embrión debe cumplir dos condiciones: la existencia de transporte vectorial de líquido y una impermeabilidad suficiente para retenerlo. Se desconoce el modo de formarse el líquido blastocélico precoz (Fleming y cols. 1984). Hay pruebas del desarrollo de procesos de transporte vectoriales en la etapa de ocho células (Fleming y Goodall, 1986). Hay muchas discusiones acerca del momento en el que se forma una impermeabilización completa en el embrión.

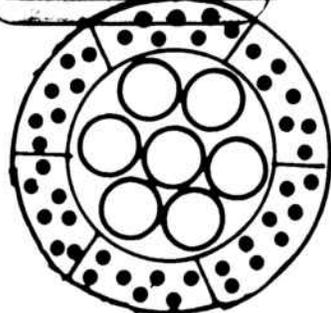
Sin embargo, el establecimiento de un blastocele naciente no necesita ni que todas las células puedan segregar líquido ni que deba haber una impermeabilización completa y permanente. Además, podría formarse un blastocele cuando la filtración de líquido a través de una "grieta" fuera más que contrarrestada por el transporte vectorial de líquido hacia el interior.

Los resultados de Garbutt y cols. (1987b) sugieren que el orden de la división desempeña cierto efecto sobre el lugar de la formación del blastocele naciente; las células que se dividen antes participan más a menudo. Sin embargo, la naturaleza del proceso por el cual se forma el blastocele-

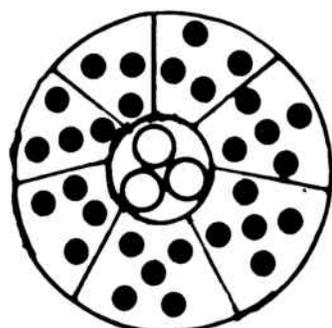
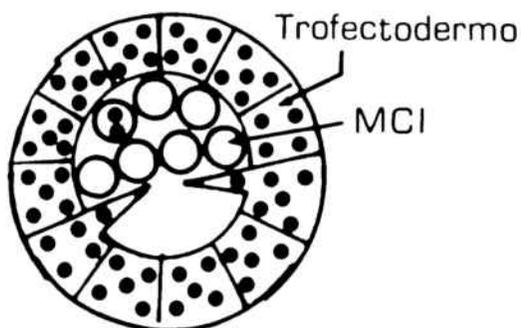
necesitando la cooperación entre las células- significa que esta influencia no es el único factor de la posición del blastocele. Es posible que un grupo más numeroso de células con mitosis precoces dentro del embrión, tal como puede suceder in situ en muchos embriones no perturbados, pueda desempeñar una función más decisiva.

Se sabe que en el blastocisto en expansión, las células trofocotodérmicas pasan desde la región polar hasta la región abembrionaria (Cruz, Pedersen 1985). La división diferenciadora de células 1/8 o 1/16 polares externas genera células de la MCI o sus precursoras (fig. 6); la porción apicolateral de cada célula en división permanece externa y polar (presuntivamente trofocotodérmica) mientras que la porción basolateral permanece interna y apolar (presuntivamente MCI). El cuerpo medio, un residuo de la fisura de partición, puede permanecer como una conexión física entre las células hijas durante dos ciclos (Goodall, Johnson 1984). Por lo tanto, las células polares 1/16 de mitosis precoz que contribuyan con una célula hija a la MCI podrían permanecer ancladas por el cuerpo medio residual a la MCI naciente; al menos durante las etapas precoces de la expansión blastocélica. En aquellos embriones en los cuales hay una contribución celular significativa a la MCI en la transición de 16 a 32 células, habría varios cuerpos medios participando en tales anclajes.

En definitiva, la mitosis precoz de las células afecta al lugar del polo abembrionario; pero indica que tal efecto no es exclusivo. En parte debido a la naturaleza misma del proceso de formación del blastocelo; en parte debido a la confusión derivada del conocimiento del efecto de la división precoz sobre la asignación de las células a la MCI.



Muchas células  
apolares internas  
(p.ej.: 6 ó 7)



Pocas células  
apolares internas  
(p.ej.: 2-4)

FIGURA 6. Representación esquemática de las relaciones de linajes celulares existentes in situ entre la etapa de 16 células y la de blastocisto precoz. Todas las células exteriores en la etapa de 16 células fueron marcadas con látex fluorescente (células punteadas). En embriones de 16 células con un número relativamente alto de células apolares internas, todas o la mayoría de las células polares se dividen conservadoramente proporcionando única o principalmente descendencia trofectormática (embrión superior). Sin embargo, cuando el número de células internas es bajo (embrión inferior), una mayor proporción de células polares se divide diferenciadoramente regulando por lo tanto el tamaño de la MCI. Las células apolares internas en la etapa de 16 células contribuyen exclusivamente a la MCI independientemente del tamaño relativo de las poblaciones de células polares y apolares en la etapa de 16 células (tomado de Johnson y cols. 1986a).

## **Restricción en el potencial de desarrollo de los núcleos.**

Los experimentos de trasplante nuclear de Hoppe e Illmensee (1981) sugirieron que la modificación irreversible del genoma no ocurría hasta la diferenciación del trofotodermo (TE). Los experimentos que fundamentaron la hipótesis consistieron en trasplantar núcleos de células trofotodérmicas de blastocistos de 4 días a huevos fecundados enucleados. La mayor parte de los huevos huéspedes no llegaron más allá de la morulación precoz. En un pequeño porcentaje de experimentos, los núcleos trasplantados de células de la masa celular interna sostuvieron por lo visto el desarrollo hasta llegar a ratones viables y fértiles.

Experimentos recientes de McGrath y Solter (1984a,b,c), presentan una imagen muy distinta. Observaron que incluso núcleos trasplantados de mórula a huevos enucleados eran incapaces de sostener el desarrollo más allá de la etapa de blastocisto. Postulan una sincronía estrecha entre los acontecimientos celulares, la mitosis celular y la redistribución de moléculas citoplásmicas. El trasplante entre embriones que se encuentran en etapas distintas alteraría esta sincronía. Parecería como si la fecundación

comenzara la cuenta atrás de relojes tanto en el núcleo como en el citoplasma. Para un desarrollo correcto estos relojes deberían estar sincronizados. A mayor discrepancia temporal (p.ej., un núcleo procedente de la etapa de ocho células dentro del citoplasma de un huevo fecundado de una sola célula), peor sería el desarrollo.

### **La implantación.**

El blastocisto completamente expandido contiene unas 64 células de las cuales unas 20 se encuentran en la MCI. La MCI puede separarse del trofotodermo mediante inmunocirugía (Solter, Knowles 1975) o microcirugía. Durante el 5º día del desarrollo el blastocisto sale de la zona pelúcida y está listo para implantarse. La liberación de la zona pelúcida se consigue mediante una enzima parecida a la tripsina sintetizada por células en el trofoblasto mural (Wassarman y cols. 1984) y por la contracción y dilatación del blastocisto. Coincidiendo con la liberación de la zona pelúcida, las paredes del útero se unen firmemente de manera que se cierra la luz del mismo. Los cambios en el epitelio uterino dan lugar a una superficie que favorece la unión del blastocisto. No hay criptas preformadas dentro de las cuales se acantonen los blastocistos. Se piensa que cada embrión induce la formación de una cripta en el proceso de

implantación. El espaciamiento de los embriones a lo largo del útero se debe a movimiento peristáltico del mismo.

Durante el proceso de implantación, las células del trofoblasto mural invaden en primer lugar el epitelio uterino y la lámina basal subyacente del mismo. A continuación se introducen en el estroma uterino (conocido también como endometrio). Alrededor del punto de implantación se ha comprobado muerte local de células epiteliales uterinas y fagocitosis activa de estas células por parte del trofoblasto (Enders y cols. 1981). Los blastocistos cultivados in vitro se anclan a superficies de plástico y a capas de células y de matriz extracelular libre de células. El cultivo in vitro sobre una matriz extracelular se ha empleado recientemente como un modelo para investigar la base molecular de la invasividad trofoblástica (Glass y cols. 1983).

Se ha sugerido que la masa celular interna interacciona con el trofoblasto para promover la proliferación del mismo (Gardner, Johnson 1975; Gardner y cols. 1973) Se desconoce si esta interacción se presenta en el blastocisto murino de preimplantación aunque a los 4,5 días post coitum son evidentes los primeros signos de transformación en células gigantes en el trofodermo mural, situado en oposición directa a la masa celular interna (Dickson, 1963, 1966). El contacto con la masa celular interna per se es innecesario

para la proliferación trofoblástica. Células sin contacto alguno con la masa celular interna pueden continuar dividiéndose por cierto tiempo (Snell, Stevens, 1966).

Según Copp (1979) el análisis de la distribución de mitosis dentro de la región mural muestra que las células del trofotodermo proximal se dividen más rápido que las células distales. Las células murales opuestas a la masa celular interna son las que antes pierden el contacto con la masa celular interna. Más adelante, células más proximales sufren la misma transformación.

Copp explica también la formación del huevo cilindro basándose en el alojamiento endometrial de las células murales. El blastocisto queda fijado dentro de la cripta luminal uterina y por tanto se impide cualquier entrada adicional de células polares dentro de la región mural del blastocisto implantado. De manera consecuente la proliferación polar continuada produce una acumulación de células trofoblásticas encima de la masa celular interna la cual constituye una formación de muchas capas extendiéndose antimesometrialmente como ectodermo extraembrionario y extendiéndose mesometrialmente como cono ectoplacentario. Por tanto la morfogenésis podría depender de procesos comparativamente sencillos como proporciones diferenciadas de

mitosis celular actuando dentro de formaciones con limitaciones físicas de espacio.

Antes de la implantación, mientras el blastocisto flota por la luz uterina, hay movimiento celular desde el trofotodermo polar al mural. La división de células polares comporta un acúmulo de células sobre la masa celular interna. El aumento de volumen de la región polar ocurrirá en la dirección de menor resistencia física. El crecimiento en sentido antimesometrial no presenta dificultades de espacio blastocélico. Ésto quedaría apoyado por la observación de que huevo-cilindros precoces tienen conos ectoplacentarios pequeños; pero regiones ectodérmicas extraembrionarias bien desarrolladas (Copp, 1979). Una vez el extremo antimesometrial del huevo cilindro se pone en contacto con la membrana de Reichert queda restringido su crecimiento adicional. El camino de menor resistencia al crecimiento polar se encuentra ahora en sentido mesometrial puesto que el cono ectoplacentario puede desarrollarse separando las paredes uterinas. Estos movimientos morfogénéticos se completan en unas doce horas después de la implantación. La formación de la cavidad proamniótica tiene lugar en la última fase de la secuencia descrita.

Si se ovariectomiza una hembra embarazada, los blastocistos no se implantarán in vivo pero permanecerán en

el útero viables o "retrasados" (Van Blerkom y cols. 1979). El motivo posiblemente sea que el epitelio uterino no presenta un substrato adecuado para la implantación. El fenómeno de la implantación retrasada tiene lugar, in vivo, en los casos en los que las condiciones morfofisiológicas y/o bioquímicas en la luz uterina no permiten la implantación (Daniel 1970). Tal fenómeno reduciría la potencial pérdida de embriones si las condiciones uterinas fueran adversas. Además aseguraría el nacimiento durante la estación apropiada, en ciertas especies de mamíferos. En el ratón, mantendría un estado casi constante de embarazo.

Los procesos moleculares y celulares que acompañan la implantación retrasada se han estudiado ampliamente en el ratón hembra de laboratorio. En ésta, el retraso ocurre habitualmente si una hembra murina queda en gestación mientras amamanta una camada previa. El comienzo de la implantación retrasada se acompaña de una disminución rápida y progresiva en las tasas de metabolismo y síntesis de proteína y ARN. Se acompaña, al cabo de unas veinticuatro horas, de un paro en la síntesis de ADN y de mitosis en la mayoría de las células del blastocisto. La síntesis de ARN durante el paro del desarrollo parece afectar principalmente a la actividad de recambio. Los ARN ribosomales y de transferencia son los que principalmente se transcriben

(Chavez, Van Blerkom 1979). Según la especie, la detención del desarrollo puede durar de días a meses (Daniel 1970).

La activación a partir del estado retrasado es rápida. Conlleva un restablecimiento de las condiciones celulares y moleculares existentes antes del comienzo de la detención del desarrollo. La activación parece incluir una secuencia de cambios moleculares, celulares y metabólicos. Esta secuencia es iniciada por los estrógenos y desemboca en los primeros signos de implantación a las 24 horas. Está clara la participación de señales extraembrionarias (extragenómicas) en el comienzo, mantenimiento y fin del estado retrasado. Permanece obscura la naturaleza bioquímica de estas señales. Los factores relacionados con la inducción y detención del paro en el desarrollo pueden ser macromoléculas específicas (Weitlauf 1976). Pueden ser, asimismo, señales inespecíficas relativamente simples tales como cambios cualitativos o cuantitativos en la disponibilidad intrauterina de aminoácidos (Van Blerkom y cols. 1979).

La secuencia de acontecimientos celulares y moleculares que tienen lugar durante la activación blastocística representan la reanudación de un programa de desarrollo. Este programa proporciona al embrión la capacidad de anclarse e implantarse posteriormente dentro del epitelio uterino. La activación del programa de desarrollo que conduce a la

implantación es rápida. De esta manera existe la posibilidad de que la información requerida para tal programa se suministre; pero no que se exprese durante el prolongado periodo de suspensión. Se supone que la expresión proteica diferencial es un aspecto de tal programa. El análisis de la síntesis proteica proporcionaría indicios relativos a la naturaleza del programa de activación. Las separaciones electroforéticas uni- y bidimensionales de las proteínas sintetizadas antes, durante y después de la suspensión ponen de manifiesto patrones cuantitativa- y cualitativamente similares (Chavez, Van Blerkom 1979; Van Blerkom y cols. 1979). Por el momento no hay pruebas indicativas de la traducción de proteínas específicas de activación a partir de ARN mensajeros sintetizados pero no expresados durante la implantación retrasada. Sin embargo, mediante la actividad fijadora de lectinas y técnicas citoquímicas, se han demostrado cambios progresivos en la naturaleza glicoproteica de la superficie celular durante la activación (Chavez, Enders 1982). La activación, a partir del retraso, en el ratón, se acompaña de cambios específicos en los patrones de fosforilación proteica (Johnson y cols. 1984). Quizá, tanto la fosforilación proteica como la glicosilación son partes integrantes del programa de activación a partir de la implantación retrasada.

El tratamiento hormonal de la hembra lleva a una implantación rápida. Los blastocistos retrasados contienen más células de la MCI de lo normal. Estas células no avanzan en su diferenciación más allá de la formación de endodermo primitivo (Evans, Kaufman 1981). Las células mesenquimáticas del estroma endométrico o muscular liso reaccionan ante la implantación del embrión (o de sustancias inertes como aceite o cabello) de varias maneras. Esto se conoce como reacción decidual; depende de la progesterona. Se observa un aumento de mitosis. Las células, que previamente tenían pocas uniones intercelulares, establecen numerosos complejos de unión con sus vecinas. Los vasos sanguíneos en la decidua pierden sus membranas basales y se rompen para dar lugar a senos sanguíneos (Finn 1971).

#### **El trofodermo y sus derivados.**

La organización de las células en un epitelio típico es una característica esencial de la diferenciación del trofodermo, como se ha dicho ya. Las células tienen complejos de unión apicales y regiones de membrana distintas apicales y basales. Los complejos de unión comportan desmosomas extensos; acompañando a éstos se encuentra un gran número de haces de filamentos intermedios (Jackson y cols. 1980).

Durante el desarrollo postimplantatorio, el trofotodermo no permanece como un epitelio simple; se especializa de manera regional con respecto a la morfología y al potencial de crecimiento (Gardner 1983). Una subpoblación, el trofotodermo mural, deriva de las células que rodean la cavidad blastocélica pero no están en contacto con la MCI. Estas células dejan de dividirse y se vuelven grandes y poliploides; pueden contener hasta 1.000 veces la cantidad haploide de ADN. En una extensión se han llegado a contar hasta 160 cromosomas (Ilgren 1981). Estas son las denominadas células primarias trofoblásticas gigantes. Por el contrario, las células trofotodérmicas cercanas a la MCI y a sus derivados permanecen diploides y continúan proliferando rápidamente.

Tras la implantación, esta población de trofotodermo polar se extiende en varias direcciones. En primer lugar, algunas células migran alrededor del embrión; reemplazan a las células primarias murales trofoblásticas gigantes volviéndose ellas mismas poliploides. En segundo lugar, una proyección de trofotodermo polar parecida a un dedo se introduce dentro de la cavidad blastocélica formando el ectodermo extraembrionario del huevo cilindro; además empuja los derivados de la MCI por delante de sí misma. Esta proyección desarrolla una cavidad central y se torna epitelial. Tras la formación del mesodermo extraembrionario,

el ectodermo extraembrionario retrocede hacia la placenta donde forma el corion. Finalmente, algunas células trofodérmicas siguen introduciéndose dentro del endometrio formando el grueso de la placenta. Algunas de estas células, y células del corion, también se vuelven poliploides (células secundarias gigantes).

La proliferación del trofodermo parece quedar controlada por su cercanía a los derivados de la MCI; en ausencia de derivados de MCI las células TE se agigantan en vez de proliferar. Esto es muy ventajoso para impedir el crecimiento continuado del trofodermo en caso de muerte fetal intrauterina.

**La segunda oleada de diferenciaciones: Formación del endodermo primitivo y del ectodermo primitivo.**

El segundo acontecimiento de la diferenciación en la embriogénesis de los mamíferos se caracteriza también por la aparición de una capa epitelial (el endodermo primitivo) sobre la superficie libre de un grupo de células no polarizadas (la MCI). El núcleo restante de células de la MCI se organiza entonces en una capa conocida como el ectodermo primitivo. (El endodermo primitivo se conoce también como hipoblasto y el ectodermo primitivo como epiblasto o

ectodermo embrionario). La diferenciación del endodermo primitivo empieza alrededor de 4 días p.c., poco antes de la implantación, cuando sólo hay 20-40 células en la MCI. Debido al corto número de células afectadas, ha sido hasta ahora muy difícil definir con precisión la secuencia de cambios moleculares y celulares que ocurren en esta diferenciación. También es difícil relacionar estos cambios con el ciclo celular, con la comunicación y la organización intercelulares (Gardner 1983; Hogan y cols. 1983).

Las células del endodermo primitivo no colonizan los tejidos endodérmicos del feto, según se desprende de experimentos realizados con quimeras de inyección empleando como marcador de linajes la glucosa fosfato isomerasa (GPI). Las células del endodermo primitivo únicamente colonizan el endodermo extraembrionario parietal y el endodermo visceral en los sacos vitelinos que rodean el embrión en desarrollo (Gardner 1982, 1983). Experimentos similares han demostrado que el linaje del ectodermo primitivo da lugar a los tejidos ectodérmicos, mesodérmicos y endodérmicos del feto, a las células germinales y a los componentes mesodérmicos de las membranas extraembrionarias y de la placenta (Gardner, Rossant 1979). Estos linajes se resumen en la figura 1.

**Empleo de marcadores de estirpe en embriones murinos.**

Hasta hace poco tiempo los únicos marcadores de estirpe genéticamente determinados disponibles para su empleo en embriones murinos eran las alozimas GPI<sup>a</sup> y GPI<sup>b</sup> de la GPI. Estas alozimas difieren en movilidad electroforética y sólo pueden titularse en homogenados tisulares (Gardner, Rossant 1979). Su sensibilidad y precisión eran limitadas. Sin embargo, en la actualidad hay disponibles varios marcadores que pueden usarse a escala celular en cortes de tejidos.

#### **La estirpe ectodérmica primitiva.**

El núcleo interno de las células no polarizadas del ectodermo primitivo se organiza gradualmente en un epitelio simple rodeando una cavidad central. La formación de esta cavidad amniótica posiblemente conlleve la muerte de algunas células centrales, puesto que con mucha frecuencia contiene retos celulares. Las células del ectodermo primitivo se unen mediante complejos apicales desmosómicos de unión. Presentan, además, un acúmulo polarizado subapical de polipéptidos citoqueratínicos (Jackson y cols. 1981). Están unidas, por medio de su superficie basal, a una lámina basal delgada depositada entre el endodermo visceral y el ectodermo (Wartiovaara y cols. 1979; Leivo y cols. 1980).

## **Los ciclos cortos de las células endodérmicas primitivas.**

Snow (1977, 1978) ha realizado un estudio cuidadoso de la tasa de crecimiento del ectodermo primitivo (epiblasto) en la cepa Q (criada al azar). Este tejido contiene unas 120 células a los 5,5 días p.c. y 660 células un día más tarde, cuando la gastrulación empieza. Las células mesodérmicas que se exfolian a través del surco primitivo durante la gastrulación derivan del ectodermo primitivo. La duración media del ciclo celular de las células del ectodermo primitivo debe ser de alrededor de 4,4 horas entre los 6,5 y los 7 días p.c.; así se explicaría el aumento en el número de células, primero en el ectodermo primitivo por sí mismo y luego tanto en el ectodermo como en el mesodermo. De hecho Snow aporta pruebas de que la tasa de mitosis no es uniforme en todo el ectodermo primitivo; es significativamente más rápida (duración calculada del ciclo: 2-3 horas) en un grupo de células ectodérmicas que él denomina zona proliferativa (ZP). El mesodermo parece dividirse relativamente despacio, con un ciclo de 20 horas.

## **La pluripotencia y oncogénesis de algunas células del ectodermo primitivo.**

Los resultados de varios experimentos distintos indican que, por lo menos, algunas células del ectodermo primitivo, antes de unos 7 días p.c., no están restringidas en su potencial de desarrollo. Pueden dar lugar a distintos tejidos si se transfieren a un nuevo ambiente. Por ejemplo:

1. Gardner y Rossant aislaron células individuales del ectodermo primitivo de blastocistos de 4,5 días inyectándolas dentro de blastocistos huéspedes con un genotipo GPI distinto. Las células del ectodermo primitivo originaron descendencia en muchos tejidos distintos embrionarios y extraembrionarios (Gardner, Rossant 1979).
2. Los blastocistos cultivados in vitro pueden originar líneas celulares que pueden diferenciarse en muchos tejidos diferentes; tanto como teratocarcinomas o como quimeras con embriones normales (Evans, Kaufman 1983). Una posibilidad es que todas las células en el ectodermo del blastocisto tardío son igualmente capaces de originar líneas tallo ("stem") celulares pluripotentes. Otra alternativa es que esta transformación se restrinja a aquellas células del ectodermo primitivo destinadas a originar células germinales primordiales. Por el momento esta cuestión se encuentra sin resolver.

3. Los embriones de preimplantación de cepas murinas adecuadas explantados a puntos ectópicos, se desarrollan con más o menos normalidad hasta la etapa de huevo cilindro (equivalente aproximadamente a los 6 días p.c. de desarrollo normal). A continuación se desorganizan y originan o un teratoma o un teratocarcinoma conteniendo células tallo no diferenciadas. De manera parecida, los huevos partenogénéticos de la cepa LT en el ovario se desarrollan también hasta la etapa de huevo cilindro de 6 días; o incluso hasta la etapa de surco primitivo precoz antes de desorganizarse como teratomas o teratocarcinomas (Stevens, Pierce 1975; Martin, 1980). Los ectodermos primitivos aislados de embriones murinos de 6 días y trasplantados a puntos ectópicos también dan lugar a teratomas o teratocarcinomas; unos y otros contienen una amplia gama de tejidos diferentes de las tres capas germinales, así como células tallo indiferenciadas de teratocarcinoma conocidas como células de carcinoma embrionario (CE) (Diwan, Stevens 1976). Tampoco se sabe si todas las células del ectodermo primitivo pueden originar células tallo de CE o únicamente aquellas que se diferencian en células germinales primordiales.

Por otro lado, hay pruebas de que a los 7,5 días p.c. el embrión en puntos ectópicos ya no puede originar teratocarcinomas conteniendo células de CE (Stevens 1970)

encontrándose las células restringidas en su potencial de desarrollo. Las pruebas provienen de estudios de trasplante y de los resultados de cultivar fragmentos del huevo cilindro de 7 días p.c. in vitro (Snow 1981).

#### **La regulación del tamaño.**

La descendencia de embriones de tamaño doble del normal conseguido mediante la agregación de mórulas es de tamaño normal. La disminución en el número de células tiene lugar entre los 5,5 y los 6,5 días p.c. Esta disminución ocurre, aproximadamente al mismo tiempo, tanto en el trofotodermo como en los derivados de la MCI (Lewis, Rossant 1982).

#### **La inactivación del cromosoma X.**

La inactivación del cromosoma X ocurre en primer lugar en el trofotodermo y en el endodermo extraembrionario. En ambos tejidos el cromosoma paterno X es inactivado de manera preferente (Takagi, Sasaki 1975; Kratzer y cols. 1983; Lyon, Rastan 1984). Podría postularse que el paso a través de la línea germinal masculina marca el cromosoma X paterno con una sensibilidad mayor al proceso de inactivación. Podría ser, también, que el cromosoma X materno quedara marcado con una resistencia relativa. Únicamente en el ectodermo primitivo tiene lugar la inactivación al azar de los cromosomas X

paterno y materno. Se ha concluido, empleando dos técnicas distintas, que esta inactivación X al azar ha quedado completada a los 5,5 días p.c. (Rastan 1982; McMahon y cols. 1983).

### **La gastrulación y la formación de las células mesodérmicas.**

El proceso de gastrulación comienza en el embrión murino alrededor de los 6,5 días p.c. cuando hay unas 1000 células en el ectodermo primitivo. Las células se desprenden de la capa epitelial del ectodermo primitivo y se acumulan como una capa de células individuales mesodérmicas entre el ectodermo primitivo y el endodermo visceral. Se sabe muy poco sobre los procesos que regulan el desprendimiento de las células mesodérmicas; aunque posiblemente comporte cambios en las moléculas de adhesión intercelular, en la polaridad celular y en la organización citoesquelética. Franke y cols. (1982) han demostrado que las células mesodérmicas precoces expresan filamentos intermediarios de vimentina pero no desmosomas ni citoqueratinas. Por el contrario, las células del ectodermo primitivo no expresan vimentina; pero tienen citoqueratinas asociadas a uniones íntimas desmosómicas (Jackson y cols. 1981).

La generación de un mesodermo segmentado en la gastrulación.

El proceso de gastrulación termina con el establecimiento gradual de una secuencia de unos 65 pares de bloques de células mesodérmicas, los somitos, a lo largo del eje corporal anterior-posterior. Smith (1985) analiza el momento de la aparición de este eje. Estos bloques somíticos se diferencian al final en vértebras, costillas, músculos y la dermis de la piel. Se considera que el ratón es un animal segmentado puesto que los somitos se disponen en un patrón simple lineal a lo largo del eje corporal originando los componentes principales del organismo (Hogan y cols. 1985). Para entender los principios básicos de la gastrulación y de la somitogénesis en el ratón es útil establecer analogías con el embrión de pollo. Si el ectodermo primitivo y el endodermo visceral, en forma de copa, del embrión murino se extienden sobre un plano, se parecen mucho al blastodermo discoide del embrión de pollo; éste presenta una capa epitelial superior de células epiblasticas encima de una lámina de hipoblasto.

La formación del mesodermo en el pollo y la aparición de un patrón segmentado dentro del mismo se han estudiado durante mucho tiempo (Balinsky 1975). Meier y sus colaboradores han realizado el análisis más reciente y detallado empleando técnicas de microscopía electrónica

tridimensional (Meier 1979, 1981). Tam ha realizado estudios parecidos en embriones de ratón y todas las pruebas apuntan a que la secuencia de acontecimientos es esencialmente la misma que en el pollo (Tam 1981; Meier, Tam 1982; Tam, Meier 1982).

En el pollo, la delaminación de células mesodérmicas comienza en la parte posterior del epiblasto y se extiende hacia adelante para formar un surco o línea primitiva. La gastrulación, de hecho, no es únicamente un acontecimiento local; comporta amplios movimientos dentro de la lámina epiblastica entera. De manera que las células son barridas hacia el interior de la línea primitiva desde las regiones externas del disco embrionario, para emerger como mesodermo lateral y paraaxial.

El siguiente mojón en la gastrulación es la aparición del nodo de Hensen en el extremo anterior de la línea primitiva. Aquellas células epiblasticas barridas a través del nodo de Hensen se depositan a lo largo de la línea media como una banda de células mesodérmicas las cuales se diferencian en notocorda. La posición del nodo no es estática; gradualmente se mueve en una dirección posterior; a medida que retrocede deja una estela de células de la notocorda separando el mesodermo a ambos lados. A continuación ocurren dos acontecimientos importantes. Uno es la formación de los pliegues neurales en el ectodermo

suprayacente. Esto sucede como reacción a las señales inductoras procedentes del mesodermo subyacente (inducción neural). El otro es la condensación de las células mesodérmicas a cada lado en bloques cilíndricos emparejados, o somitos. Estos cambios no suceden instantáneamente; proceden durante varias horas (en el pollo) o días (en el ratón) durante los cuales tiene lugar una enorme proliferación celular. Así, a los 8,5 días p.c. todavía aparecen nuevas células mesodérmicas a medida que se introducen a través del extremo posterior de la línea primitiva (o más tarde en la región del esbozo de las extremidades). En este período los somitos se condensan detrás del nodo en retroceso. También hay un gradiente anteroposterior en la maduración de los somitos. La región entre los somitos condensados, más maduros, y el nodo de Hensen se denomina mesodermo presomítico (en el ratón) o placa segmental (en el pollo). Con el microscopio óptico esta región no parece segmentada. Sin embargo, el análisis de embriones cuidadosamente fijados observados mediante microscopía electrónica tridimensional de barrido ha demostrado que en ambos organismos el mesodermo se distribuye en acúmulos emparejados de células o somitómeros (Meier 1979; Tam, Meier 1982). En el ratón hay unos seis somitómeros en el mesodermo presomítico. Los somitos presuntivos cultivados in vitro se condensan y maduran en la ausencia de señales del resto del embrión (Tam y cols. 1982). Se han observado

somitómeros en embriones muy precoces en la etapa de línea primitiva (Tam y cols. 1982). No puede saberse el destino de estos acúmulos mesodérmicos hasta disponer de un buen marcador celular para esta etapa del desarrollo.

En el ratón, los primeros bloques somíticos son visibles al microscopio óptico alrededor de los 7.75 días (Theiler 1972) cuando hay unas 25.000 células en el ectodermo y mesodermo conjuntamente (Snow 1977). Los primeros cinco somitos permanecen pequeños y dispersos; dan lugar a unos pocos músculos del ojo y del cuello (Balinsky 1975; Noden 1983). (La mayor parte del mesodermo de la cabeza y de la cara deriva de la cresta cefálica neural.) Los somitos restantes se diferencian en diversos tejidos, incluyendo vértebras y músculos. Esta diferenciación oculta gradualmente el patrón segmentado del embrión. En el adulto, el único recuerdo es la secuencia de vértebras y costillas en el raquis. Cada vértebra tiene una morfología única. Clásicamente la serie de vértebras en el ratón se ha dividido en cinco regiones: cervical, torácica, lumbar, sacra y caudal. El número final varía muy poco dentro de una cepa endógama, excepto en la región caudal. El número de células en cada somito no es igual. Hay unas 150-200 células en cada somito cervical, aumenta a 1000-1500 en las regiones lumbar y sacra y disminuye progresivamente en los somitos de la cola (Tam 1981).

La maduración final y la diferenciación de los somitos en el embrión implica una serie compleja de cambios en la adhesión y movimiento celular. Las células, en primer lugar, se vuelven epiteliales. Sus superficies apicales internas rodean una cavidad central; sus superficies basales descansan sobre una lámina basal externa de glicoproteínas extracelulares, incluyendo el colágeno tipo I y la laminina (Leivo y cols. 1980). Cada bloque somítico se divide entonces en tres regiones: el esclerotomo, el dermatomo y el miotomo. El destino de las células en cada región es:

1. **Esclerotomo:** Vértebras (los esclerotomos anteriores de un par de somitos y los esclerotomos posteriores del par precedente cooperan para formar una vértebra); costillas en la región torácica.
2. **Dermatomo:** Tejido conectivo en la dermis de la piel; componente dérmico de los folículos pilosos.
3. **Miotomo:** Músculos de pared; los miotomos de los cuatro o cinco somitos adyacentes a los esbozos de las extremidades anteriores y posteriores originan los músculos de las extremidades.

El riñón murino tiene también una historia segmentada. Se desarrolla en la región abdominal a partir de bloques

seriados repetidos de células mesodérmicas (los nefrotomos) conectados a los somitos. En el ratón, la placa lateral del mesoderma da lugar a diversos tejidos, incluyendo el mesénquima del esbozo de las extremidades (y finalmente el cartilago y hueso de la extremidad). En los mamíferos, la placa lateral mesodérmica no está claramente dividida en bloques segmentados (Hogan y cols. 1985).

#### **La procedencia del endodermo definitivo.**

Hay pruebas seguras de que el endodermo del feto (el denominado endodermo definitivo) deriva del ectodermo primitivo en contraste con el endodermo extraembrionario de los sacos vitelinos. Estas pruebas provienen de los experimentos de inyección blastocística (p. ej. Gardner, Rossant 1979), trasplante ectópico de células de ectodermo primitivo (Diwan, Stevens 1976) y del seguimiento de células marcadas con timidina [ $H^3$ ] injertadas en embriones en cultivo en la etapa de línea primitiva (Beddington 1981). Sin embargo, hay muy poca información precisa disponible referente a los movimientos morfogenéticos implicados en la formación del endodermo in vivo; posiblemente a partir de células moviéndose a través del extremo anterior de la línea primitiva (el proceso cefálico) (Tam, Meier 1982). Posteriormente, los tejidos como el hígado y los pulmones derivan del endodermo definitivo (ver fig 1).

## La elaboración de un mapa de linajes en el embrión murino.

La gastrulación en el embrión murino conlleva movimientos morfogenéticos amplios. Durante estos movimientos, las células en la capa epitelial del ectodermo primitivo son barridas hacia y a través de la línea primitiva. Estas células emergen luego como células mesodérmicas o endodérmicas. En el pollo, los mapas de destino empleando timidina [ $H^3$ ] (Nicolet 1970) u otros colorantes vitales son muy rudimentarios. Se han conseguido delimitar acúmulos celulares que terminarán constituyendo los diferentes tejidos del cuerpo: somitos, intestino, notocorda, tubo neural, etc. (Balinsky 1975; Slack 1983). Estos mapas no dicen nada acerca del momento del compromiso irreversible de su desarrollo (Slack 1983).

Los estudios de estirpes celulares en el embrión murino son una tarea formidable. Las razones son múltiples: pequeño tamaño del embrión murino, necesidades de cultivo más complejas, inexistencia de un buen marcador histoquímico celular y la dilución rápida de la timidina [ $H^3$ ] debido a la división celular. Sin embargo, se ha observado que a los 7 días p.c. hay regiones dentro del ectodermo y del mesodermo

que están restringidas en su abanico de desarrollo. Para llegar a esta conclusión se han realizado estudios con timidina [ $H^3$ ] (Beddington 1981) y se han cultivado trozos de huevo cilindro in vitro para comprobar los tejidos originados (Snow 1981; Tam, Snow 1980).

### **El desarrollo del sistema nervioso.**

El cerebro y la médula espinal (sistema nervioso central) se desarrollan a partir del tubo neural. Este, a su vez, se desarrolla a partir de la placa neural. Ésta es un engrosamiento del ectodermo situado por encima de la notocorda y del mesodermo paraaxial. Este engrosamiento se dobla gradualmente hasta formar un tubo. El tubo neural comienza a cerrarse alrededor de la etapa de siete somitos (8 días p.c.) al nivel del cuarto y quinto somitos. A continuación sigue hacia adelante y hacia atrás a modo de cremallera. El neuroporo anterior está cerrado por completo en la etapa de 15 a 20 somitos (9 días p.c.); mientras que el neuroporo posterior se cierra por completo en la etapa de 32 somitos (10 días p.c.) (Theiler 1972). La formación inicial de la placa neural se ha estudiado durante muchos años en varias especies de vertebrados (Slack 1983). Aunque la base molecular se desconoce por el momento. Muchos factores intervienen en el plegamiento de la capa epitelial simple de la placa neural; entre ellas se encuentran la elongación

neural precoz muestra también varias hinchazones conocidas como neurómeros y que en la región del cuerpo son intersomíticos (Morriss-Kay 1981; Tuckett y cols. 1985). Los factores que intervienen en la formación de neurómeros son objeto de investigación. También es objeto de investigación el dilucidar si las constricciones que separan los neurómeros representan barreras a la migración celular.

El sistema nervioso periférico se desarrolla a partir de la cresta neural. Estas células se desprenden de las crestas de los pliegues neurales a medida que las paredes laterales se fusionan. Las células individuales se acumulan en la línea media. A partir de ese punto migran en diversos frentes a lo largo de los tractos ricos en matriz que se encuentran entre los somitos. Desde allí divergen a lo largo de diversas vías diferenciándose finalmente en tejidos distintos (p.ej., ganglios periféricos, músculo facial y cartilago, células pigmentarias) según el ambiente en que vayan a parar (Le Douarin 1982).

### **Los tejidos extraembrionarios.**

Los tejidos extraembrionarios constituyen una parte integrante del conjunto de estructuras que contribuyen al mantenimiento, nutrición y protección del feto dentro del útero. Forman la placenta, el saco vitelino parietal

mantenimiento, nutrición y protección del feto dentro del útero. Forman la placenta, el saco vitelino parietal (endodermo parietal y trofoblasto), el saco vitelino visceral (endodermo visceral y mesodermo) y el amnios (mesodermo y ectodermo). Los estudios acerca de la expresión genética de los tejidos extraembrionarios se han dirigido a proteínas sintetizadas en concentraciones grandes para desempeñar ciertas funciones especializadas. El endodermo visceral, por ejemplo, segrega la alfa-fetoproteína (AFP). La laminina, una glicoproteína de la matriz extracelular, es depositada por el endodermo parietal. Estos tejidos tienen otras propiedades. Por ejemplo, el cromosoma X paterno es inactivado específicamente en el trofoblasto y en los endodermos visceral y parietal (pero no en el mesodermo visceral o amnios) (Takagi, Sasaki 1975; Kratzer y cols. 1983; Lyon, Rastan 1984). Además hay una gran expresión del proto-oncogene c-fos en todos los tejidos extraembrionarios y, sobre todo, en el amnios (Muller y cols. 1983; Curran y cols. 1984). No se conoce todavía el significado fisiológico de todas estas observaciones.

#### **El origen del endodermo visceral y del endodermo parietal.**

Las células endodérmicas de los sacos vitelinos que rodean el embrión murino derivan de un grupo precursor de

unas 20 células bipotenciales del endodermo primitivo (PrE). El endodermo primitivo no contribuye al endodermo definitivo del ratón adulto, según se desprende de estudios de linaje mediante células marcadas con una alozima de la GPI. Contribuye únicamente a los ectodermos extraembrionarios visceral y parietal (Gardner, Rossant 1979; Gardner 1982, 1983). Este estudio de linaje se ha confirmado empleando los marcadores Mod-1<sup>+</sup>/Mod-1<sup>-</sup> (Gardner 1984).

Las células PrE se diferencian en la superficie blastocélica de la MCI a los 4-4,5 días p.c. Pueden distinguirse de las 20 células del ectodermo primitivo por varias características morfológicas (Nadijcka, Hillman 1974). Especialmente por un retículo endoplásmico más desarrollado lleno de sustancias como colágeno tipo IV, laminina y fibronectina. Las células PrE no forman en esta etapa, sin embargo, un epitelio polarizado bien definido (Enders y cols. 1978). A medida que las capas del ectodermo primitivo y extraembrionario crecen y se alargan para formar el núcleo del huevo cilindro, las células endodérmicas externas se diferencian en dos subpoblaciones morfológica- y bioquímicamente distintas: el endodermo visceral (VE) y el endodermo parietal (PE). Las células endodérmicas que permanecen en contacto con el huevo cilindro se organizan en un epitelio distinto de células VE. Presentan uniones desmosómicas apicales y microvellosidades; además tienen

muchas vacuolas grandes y pequeñas y orgánulos distribuidos en el citoplasma de forma polarizada. Las células VE que rodean el ectodermo primitivo se conocen como endodermo visceral embrionario y tienden a ser planas; mientras que las células que rodean el ectodermo extraembrionario (endodermo visceral extraembrionario) son más altas y tienen un citoplasma muy vacuolado y microvellosidades numerosas (Hogan, Tilly 1981). En las células del PE la morfología observada es distinta. Estas células aparecen por primera vez en el momento de la implantación (Enders y cols. 1978). En ese momento las células del endodermo primitivo migran hacia la superficie interna del trofectodermo que se encuentra cubierta por una lámina basal delgada conteniendo fibronectina y laminina (Wartiovaara y cols. 1979; Leivo y cols. 1980). A diferencia de las células del VE, las células PE son individuales y migran; no forman uniones intercelulares especializadas ni presentan una clara polaridad en la distribución de sus orgánulos intracelulares; expresan vimentina y citoqueratinas (Lane y cols. 1983; Lehtonen y cols. 1983b). La característica más significativa de las células PE es su enorme retículo endoplásmico lleno de material para segregar; por ejemplo, componentes de la membrana basal gruesa (membrana de Reichert) la cual es depositada por las células PE. In vivo, las superficies apicales de las células PE y VE se encuentran muy cercanas; el espacio limitado entre las dos se llena de secreciones

procedentes de las células PE y VE y de sustancias que han sido filtradas a través de la membrana de Reichert (Hogan, Tilly 1981; Hogan y cols. 1983; Gardner 1982, 1983).

### **La expresión genética en el endodermo visceral.**

Las funciones más importantes del endodermo visceral son: 1) absorción, es decir, toma de sustancias de la circulación materna que se han filtrado a través de la membrana de Reichert dentro de la cavidad del saco vitelino parietal y 2) secreción, es decir, producción y secreción de proteínas séricas y de otras sustancias necesarias para el feto como la AFP, la transferrina, las apolipoproteínas de densidad alta y baja y la alfa<sub>1</sub>-antitripsina. El endodermo visceral realiza, por lo tanto, algunas de las funciones del intestino grueso y del hígado fetal (Meehan y cols. 1984).

La morfología de las células del endodermo visceral está enormemente especializada para la absorción; las células tienen muchas microvellosidades situadas apicalmente, lisosomas, etc. Puesto que las células están polarizadas, es probable que las funciones de absorción radiquen en la superficie apical; mientras que la secreción de AFP, transferrina y otros componentes séricos puede tener lugar a través de la superficie basal. Sin embargo, esta cuestión no se ha resuelto por el momento. En el saco vitelino visceral,

la superficie basal se encuentra adyacente a la capa mesodérmica que contiene los vasos sanguíneos fetales. Es objeto de especulación la dirección de la secreción de otros productos del VE como el activador del plasminógeno.

El "marcador" más específico reconocido hasta ahora es la AFP. Es ésta una glicoproteína de  $M_r$  68.000 sintetizada solamente por el endodermo visceral o por el hígado fetal o en regeneración. En embriones murinos de 15,5 días representa aproximadamente un 25% de la síntesis proteica total del endodermo visceral; y su ARNm representa el 15% del ARN poli(A<sup>+</sup>) total (Andrews y cols. 1982a,b). Se desconoce la función precisa de la AFP; pero puesto que es la globulina principal en la sangre fetal, puede desempeñar la misma función que la albúmina sérica en la sangre adulta. El gen de la AFP se encuentra estrechamente relacionado con el gen de la albumina, quizá por duplicación y divergencia de una secuencia común antigua (Gorin, Tilghman 1980; Eiferman y cols. 1981).

La AFP se detecta en primer lugar en el endodermo visceral embrionario a los 7 días p.c., mediante tinción inmunoperoxidásica de cortes de embriones murinos de distintas etapas (Dziadek, Adamson 1978; Dziadek, Andrews 1983). No aparece en el endodermo visceral que rodea el ectodermo extraembrionario debido a la influencia inhibidora

de este tejido. Si se separa el endodermo visceral extraembrionario del ectodermo extraembrionario subyacente, las células comenzarán a sintetizar AFP en un plazo máximo de 12 horas (Dziadek 1978). Los experimentos de hibridación in situ empleando vectores de cADN [H<sup>3</sup>] para la AFP ha confirmado los resultados de los experimentos previos de marcado metabólico; también han demostrado que el ARNm de la AFP se encuentra en todas las células del saco vitelino visceral de 14 días y no en las células mesodérmicas (Dziadek, Andrews 1983).

#### **La expresión genética en el endodermo parietal.**

La característica más patente de las células del endodermo parietal es su especialización en la síntesis y secreción de una gruesa membrana basal, denominada membrana de Reichert, entre ellas mismas y el trofotodermo. Hasta los 16 días de gestación (momento en el que se deshace), la membrana de Reichert es una de las cuatro barreras principales entre los ambientes materno y fetal. Esto se debe a que en el ratón, las células endoteliales de los vasos sanguíneos maternos se rompen dando lugar a grandes senos sanguíneos; las células trofotodérmicas situadas entre estos senos sanguíneos y el embrión no permanecen como una capa continua por debajo de la placenta y gradualmente mueren. Hay muy pocas pruebas acerca de las propiedades de permeabilidad

de la membrana de Reichert y se sabe todavía menos acerca de la relación entre la función de la membrana de Reichert y su estructura y composición; se supone, sin embargo, que esta membrana actúa como un filtro pasivo impidiendo el paso de células maternas y de moléculas grandes. Las células del PE sintetizan grandes cantidades de componentes de la membrana basal incluyendo laminina, entactina, procolágeno tipo IV y el proteoglicano sulfato de heparán. Las células maduras no sintetizan fibronectina (Hogan 1980; Smith, Strickland 1981; Amenta y cols. 1983); ésta no se considera un componente estructural de la membrana de Reichert (Semoff y cols. 1982). Sin embargo, es probable que las células del endodermo primitivo sintetizen fibronectina y la empleen posiblemente en la migración al trofotodermo (Hogan y cols. 1983). El ARN de las células del PE se ha usado para aislar clones de ADNc tanto para el procolágeno tipo IV como para la laminina (Kurkinen y cols. 1983a,b; Barlow y cols. 1984). Además la membrana de Reichert demuestra ser un buen modelo para estudiar la síntesis, ensamblaje y modelación de la membrana basal (Hogan y cols. 1984). Las células del PE sintetizan también grandes cantidades del activador tisular de plasminógeno; éste tiene un peso molecular, antigenicidad y sensibilidad a inhibidores distintos del activador de plasminógeno similar a la uroquinasa sintetizado por el VE (Marotti y cols. 1982).

## **La diferenciación del mesodermo extraembrionario.**

Ciertas células mesodérmicas generadas por la línea primitiva precoz contribuyen a los tejidos extraembrionarios siguientes (Gardner 1983):

1. Amnios. Surge a partir del ectodermo embrionario y del mesodermo. Aparece primero como un pliegue y luego como un techo continuo por encima del ectodermo primitivo. A continuación se extiende rápidamente y forma una membrana delgada rodeando el feto. Las células ectodérmicas y mesodérmicas del amnios tienen morfologías distintas y están separadas por una membrana basal.
2. Alantoides. Comienza como una proyección digital de células mesodérmicas a partir del borde posterior del ectodermo embrionario donde empieza a levantarse la línea primitiva. Se extiende hacia arriba, se fusiona con el corion, contribuye a la placenta y origina los vasos sanguíneos del cordón umbilical.
3. Mesodermo del corion y del saco vitelino visceral. Las células mesodérmicas originadas de la línea primitiva posterior migran hacia la superficie interna del endodermo visceral. Dan lugar al primer tejido hematopoyético fetal en forma de islas sanguíneas en el

hematopoyético fetal en forma de islas sanguíneas en el saco vitelino visceral. Las células mesodérmicas que tapizan el corion también contribuyen a la placenta.

### **La estructura y la función de la placenta.**

A mitad de la gestación, la placenta se ha convertido en un órgano muy complejo consistente en tejidos maternos y fetales y en células sanguíneas. Una característica importante que distingue la placenta murina de la humana es que los vasos sanguíneos maternos se rompen, de manera que las células sanguíneas se ponen en contacto directo con el trofoblasto fetal.

Los tejidos fetales principales de la placenta murina son:

1. Trofoblasto. En la capa espongiotrofoblástica externa más cercana al tejido uterino decidual, la mayoría de las células trofoblásticas son diploides; mientras que en la capa laberíntica interna muchas de las células son poliploides y gigantes. En ambas capas hay senos sanguíneos maternos conteniendo células sanguíneas maternas; e incluso tras la disección del útero, la capa externa presenta células maternas deciduales (Rossant, Croy 1985).

2. Mesodermo. Tras fusionarse con el corion, la alantoides da lugar a los capilares fetales y a los vasos sanguíneos. Estos se entremezclan con las células trofoblásticas y con los senos sanguíneos maternos en el laberinto.
  
3. Endodermos parietal y visceral. Las criptas de Duval contienen tanto endodermo visceral como parietal. Las células viscerales sintetizan AFP y las células parietales, membrana basal.

La placenta sintetiza muchas hormonas de tipo esteroide, polipéptido y prostaglandina necesarias para la coordinación de las fisiologías materna y fetal durante la gestación; además de jugar una función importante en la transferencia de nutrientes y metabolitos hacia y fuera de la circulación fetal (Soares y cols. 1985).

## **MATERIAL Y METODOS**

### **Obtención de cuerpos embrioides.**

Se emplean ejemplares de la especie *Mus musculus* de la cepa 129/Sv cedidos por el Prof. Dr. François Jacob del Instituto Pasteur de París. En esta cepa se obtiene una mayor proporción de tumores.

Los cuerpos embrioides empleados derivan del teratocarcinoma denominado OTT6050. Stevens (1970) obtuvo este teratocarcinoma al implantar un embrión de seis días de la cepa 129/Sv en el testículo de un híbrido F<sub>1</sub> A/HeJx129.

Si se tritura e inyecta dicho tumor en la cavidad peritoneal de ratones isogénicos, tras varias generaciones aparecen en la ascitis resultante cuerpos embrioides.

En nuestro laboratorio se mantienen los cuerpos embrioides mediante injerto intraperitoneal cada 20 días; a partir del vigésimo día la ascitis se hace progresivamente hemorrágica.

Los animales son sacrificados mediante dislocación cervical. El contenido de la cavidad peritoneal se aspira mediante jeringa y aguja estériles. A continuación se observa

una muestra de la ascitis con el microscopio invertido para verificar la existencia de cuerpos embrioides.

#### **Aislamiento de cuerpos embrioides.**

El resultado del lavado de la cavidad peritoneal se centrifuga en gradientes de densidad discontinuos de Ficoll<sup>®</sup> con el fin de separar los distintos tipos morfológicos de cuerpos embrioides que se encuentran en el líquido ascítico.

El protocolo que se ha seguido es el utilizado en el Departamento (Monzó y cols. 1982). Los gradientes se elaboran a partir del Ficoll-400 (Pharmacia Fine Chemicals). El Ficoll es un co-polímero sintético de sacarosa y epiclorhidrina. Proporciona una densidad elevada y una presión osmótica baja. Además no atraviesa las membranas celulares (Monzó 1984).

Se preparan gradientes de densidad discontinuos con las siguientes concentraciones de Ficoll V/P: 6%, 10%, 20% y 35%. Se emplean gradientes discontinuos porque el tiempo de centrifugación es más corto que en gradientes autoformativos; el tiempo de centrifugación se invierte en sedimentar la muestra y no para formar el gradiente de densidad (Hames 1984).

El contenido de la cavidad abdominal es centrifugado durante cinco minutos a 120g formándose un "pellet" que contiene todos los cuerpos embrioides. A continuación se resuspende el "pellet" y se deposita encima del gradiente discontinuo. La muestra así dispuesta se centrifuga a 120g durante quince minutos. Se produce una migración de los cuerpos embrioides hasta encontrar su punto de igual densidad en la solución de Ficoll. Se resuelven así cuatro bandas. Los cuerpos embrioides se extraen con pipeta Pasteur y se lavan con suero fisiológico hasta tres veces con el fin de eliminar el Ficoll.

Se observan muestras de las poblaciones mediante el microscopio invertido. Las cuatro bandas de cuerpos embrioides se aíslan en los gradientes correspondientes al 6%, 10%, 20% y 35%. Se denominan, respectivamente, BC1, BC2, BS1 y BS2.

#### **Recuento de cuerpos embrioides.**

El recuento de elementos formes es la técnica más empleada en biología para evaluar el comportamiento de las células "in vitro" (Absher 1973). Así puede saberse con certeza el efecto relativo y absoluto de una situación concreta sobre los cuerpos embrioides.

La obtención de cuerpos embrioides es la misma descrita en el apartado "Aislamiento de cuerpos embrioides". Se resuspende el "pellet" pipeteándolo con una pera de goma y una pipeta Pasteur. Se aspira una muestra y se diluye en una proporción exacta con suero fisiológico. Se observa una cantidad pequeña de muestra al microscopio mediante cámaras especiales. Para ello se necesita un retículo de Neubauer (Císcar, Farreras 1960). Mediante sencillas operaciones matemáticas se calcula el número de estos cuerpos embrioides. La muestra se deposita encima del retículo y se cuentan diez cuadrados de un milímetro cuadrado de superficie cada uno. Si la cámara tiene una profundidad de 0,1 milímetro, el volumen de la muestra será de un milímetro cúbico. Multiplicando por el factor de dilución se determina la cantidad de cuerpos embrioides por mililitro en la muestra diluida; multiplicando el resultado por el volumen total se obtiene el número de cuerpos embrioides en la suspensión original.

#### **Prueba de la exclusión tintorial para la comprobación de la viabilidad celular.**

La prueba de exclusión tintorial para la comprobación de la viabilidad celular se basa en el hecho de que las células viables no absorben ciertos colorantes mientras que las

células no viables si absorben esos mismos colorantes (Phillips 1973).

El colorante más empleado es el azul tripano. Dicho colorante se prepara así:

Agua destilada	95 ml.
Fosfato potásico monobásico	0,06 gr.
Azul tripano	0,4 gr.
Cloruro sódico	0,81 gr.

La solución se calienta para disolver los componentes de la misma. A continuación se deja enfriar ajustándose el pH a 7,2-7,3 con hidróxido sódico 1N (unas 8 gotas). El volumen final se ajusta a 100 ml. con agua destilada.

Se aspira un mililitro de cuerpos embrioides tal como se describe en el apartado "Recuento de cuerpos embrioides". Se le añade 0,1 ml. de solución "madre" del colorante. La mezcla se dispersa 10 veces con pipeta anotándose el momento. Se coloca una gota de la suspensión encima del retículo de Neubauer. Se realiza un recuento cuatro minutos después de efectuada la dispersión. Se cuentan los cuerpos embrioides teñidos y no teñidos sobre un área dada del retículo. El porcentaje de células viables es igual a  $\frac{\text{células teñidas}}{\text{células teñidas} + \text{células no teñidas}} \times 100$ .

### **Obtención de antisueros.**

Se han empleado cuatro conejos ("Oryctolagus cuniculus") albinos machos de raza neozelandesa de dos quilogramos de peso cada uno. Dos de los conejos han recibido inmunógeno con adyuvante de Freund y dos conejos inmunógeno sin adyuvante. En cada uno de los dos grupos uno de los conejos ha sido inmunizado con cuerpos embrioides BC1. El otro conejo ha sido inmunizado con cuerpos embrioides BS1. Antes de comenzar las pautas de inmunización se extrae sangre de los conejos para emplearla como control.

Estos cuerpos embrioides se han obtenido tal como se describe en el apartado "Aislamiento de cuerpos embrioides".

### **Pauta de inmunización sin adyuvante de Freund.**

Las inmunizaciones se realizan en la vena marginal posterior de una de las dos orejas. Esta vena se observa por transparencia. Si la vena no está dilatada de manera suficiente, se moja la punta de la oreja con xilol. Para la venoclisis se emplea un dispositivo de los denominados "mariposa" (Eschmann 196). Se administran cada vez  $1,6 \times 10^6$  cuerpos embrioides en un mililitro de suero fisiológico. El

inmunógeno se ha administrado quincenalmente hasta un total de tres inoculaciones. Transcurridos diez días desde la última inmunización se procede a la extracción sanguínea.

#### Pauta de inmunización con adyuvante de Freund.

Los cuerpos embrioides se suspenden en cada caso en una mezcla 1:1 de suero fisiológico y adyuvante completo de Freund hasta conseguir una emulsión de agua en aceite. El inmunógeno se administra cinco veces de acuerdo con el calendario siguiente (inspirado en Wiley, Calarco 1975): en la primera semana se administran 400 cuerpos embrioides por vía intramuscular con adyuvante completo de una vez; en la 2ª, 3ª, 4ª semanas se administran cada vez 400 cuerpos embrioides con adyuvante incompleto por vía subcutánea. Se hace un descanso de cuatro semanas y en la 9ª semana se administran 1000 cuerpos embrioides con adyuvante incompleto por vía subcutánea.

Transcurridos siete días desde la última inmunización se procede a la extracción y procesamiento de la sangre. El protocolo empleado es el mismo para ambas pautas de inmunización.

#### Extracción.

Los conejos están en ayunas desde 24 horas antes de la extracción. La sangre se extrae de la arteria central de la oreja, ya que la mayor presión intravascular hace la extracción más fácil y rápida.

#### Procesado.

La sangre extraída es repartida en tubos de ensayo. Las muestras se mantienen a 37°C durante una hora. Así se forma un coágulo denso conteniendo todos los elementos formes. El suero se extrae con pipeta Pasteur centrifugándose de forma secuencial a 700g y 1400g para extraer todos los elementos formes. A continuación el suero resultante se descomplementa mediante su exposición a 56°C durante media hora. La conservación se realiza en alícuotas a -70°C.

#### **Electroforesis de tejidos adultos de ratón.**

Se separan las proteínas citoplásmicas y de la membrana presentes en estos tejidos adultos murinos según la técnica de electroforesis descrita por Laemmli (1970): intestino, cerebro, hígado, testículo, músculo y riñón.

#### Obtención de la muestra.

Los tejidos adultos se lisan por separado en proporción 1/1 (p/v) en el tampón hipotónico siguiente:

Se preparan 200 ml de solución de ClNa 0,15M y TRIS 10mM.

A esta solución se añaden:

- 1mM de EDTA como quelador del  $Ca^{++}$  y del  $Mg^{++}$ .
- 40 mg de  $NaN_3$  (azida sódica) para inhibir la glicolisis.
- 370 mg de yodoacetamida (IAA) para impedir la formación de puentes disulfuro.
- 4 ml de una solución de fluoruro de sulfofenilmetilo (PMSF). Este compuesto inhibe las proteasas. La solución de PMSF se prepara disolviendo 80 mg de PMSF en 10 ml de etanol puesto que es muy insoluble en agua.
- 4 ml de Nonidet P-40 que separa las proteínas de membrana.
- 2mM de tetrahidrocloruro de benzamidina como inhibidor de la tripsina.

Los tejidos adultos se incuban en el tampón mencionado durante una hora a 4°C. Transcurrido este tiempo se centrifugan durante 3 minutos a 4°C. En el sobrenadante se encuentran las proteínas objeto de estudio. La muestra obtenida puede almacenarse a -70°C.

### Electroforesis de las proteínas problema.

Se realiza una electroforesis vertical de los sobrenadantes obtenidos en geles de acrilamida-SDS al 12% de uno o de uno y medio milímetros de grueso. La intensidad de la corriente se mantiene constante a 20mA. Las soluciones usadas son:

-Tampón de concentración (pH 6,8):

TRIS	6,06 gr.
SDS	0,4 gr.
Agua destilada hasta 100 ml.	
Guardar a 4°C.	

-Tampón de separación (pH 8,8):

TRIS	18,17 gr.
SDS	0,4 gr.
Agua destilada hasta 100 ml.	
Guardar a 4°C.	

-Solución de acrilamida:

Acrilamida	43,8 gr.
------------	----------

Bis-acrilamida 1,2 gr.

Agua destilada hasta 100 ml.

Filtrar y guardar a 4°C al abrigo de la luz.

Para que las proteínas puedan desplazarse a lo largo del gel de acrilamida es necesario establecer una diferencia de potencial. Debido al pH de los tampones en los que se disuelven las proteínas, la carga eléctrica que presentan éstas es negativa. De esta manera, las proteínas pueden desplazarse hacia el polo positivo.

Los geles se interponen entre dos cubetas las cuales contienen un tampón determinado. La corriente eléctrica se establece entre estas dos cubetas. El gel de acrilamida ofrece una resistencia. De esta manera se crea la diferencia de potencial necesaria para que migren las proteínas.

-Tampón de las cubetas (pH 8,3):

TRIS 3,03 gr.

Glicina 14,4 gr.

SDS 1 gr.

Agua destilada hasta 1 litro.

Puede guardarse a temperatura ambiente.

Los geles de acrilamida se preparan así:

-Gel de separación:

Tampón de separación	8 ml.
Solución de acrilamida	8,5 ml.
Agua destilada	15,5 ml.
Persulfato de amonio	159 $\mu$ l.
TEMED	20 $\mu$ l.

Se realiza el vacío durante 10 minutos. A continuación se coloca la solución entre placas de cristal hasta la polimerización del gel (unos 20 minutos).

-Gel de concentración en el cual se suspenden inicialmente las proteínas problema:

Solución de acrilamida	1 ml.
Agua destilada	6,5 ml.
Persulfato de amonio	50 $\mu$ l.
TEMED	10 $\mu$ l.

Se hace el vacío durante 10 minutos y se deposita la solución encima del gel de separación ya polimerizado. Tras 1,5 horas pueden ya colocarse las muestras sobre este segundo gel.

Las proteínas han de disolverse en el tampón que se describe a continuación antes de colocarlos en el gel de concentración. Así las proteínas migran correctamente:

Agua destilada	4,2 ml.
Tampón de concentración	1 ml.
Glicerol	0,8 ml.
SDS al 10%	1,6 ml.
2-mercaptoetanol	0,4 ml.

El 2-mercaptoetanol crea condiciones reductoras que rompen los puentes disulfuro existentes entre las proteínas problema. Para actuar adecuadamente debe usarse a una temperatura de 100°C. Por término medio se diluyen 5-15  $\mu$  de la muestra en 45  $\mu$  de este tampón. Se deja al baño María durante 5 minutos.

Se usan proteínas estándar (Bio-Rad<sup>®</sup>) de peso molecular conocido para poder identificar mediante comparación, el peso molecular de las proteínas problema. Se disuelven 2  $\mu$ l. de la suspensión de proteínas en 45  $\mu$ l. del tampón y se deja al baño María.

Para realizar la técnica de electroblotting empleamos geles de 1,5 mm. de grueso. En este caso, las proteínas problema no se mezclan con 2-mercaptoetanol para evitar las condiciones reductoras. El objetivo es no romper los puentes disulfuro que proporcionan una conformación proteica causante de la unión con el anticuerpo específico que luego se utilizará. En este caso, en lugar de 2-mercaptoetanol ponemos el mismo volumen de agua destilada. Las electroforesis que luego no se transferirán se realizan en geles de 1mm. de espesor.

Una vez desplazadas todas las proteínas a lo largo del gel separador se tiñen los geles con "Coomassie brilliant blue". La solución se prepara con agua destilada, metanol y ácido acético a las concentraciones (v/v) de 45/45/10 respectivamente añadiéndose 200mg/100ml de colorante.

Los geles se depositan en el interior de la solución durante toda una noche. Al día siguiente se destiñen con una solución de agua destilada, metanol y ácido acético a las concentraciones (v/v) de 8/3/1 repectivamente.

### **Electroblotting.**

La técnica de electroblotting se emplea comúnmente desde hace tiempo para el estudio cualitativo tanto de ácidos

nucleicos como de proteínas (Towbin y cols. 1979; Towbin, Gordon 1984).

Las proteínas separadas en la electroforesis en geles de 1,5 mm. de grosor se transfieren a papeles de nitrocelulosa según el método de Towbin y cols. (1979).

Para transferir las proteínas del gel al papel se establece una diferencia de potencial que arrastra las proteínas hacia el polo positivo en donde se encuentra la nitrocelulosa. El gel se encuentra en el polo negativo. La nitrocelulosa no es el único soporte conocido aunque sí uno de los más utilizados por sus características.

Las proteínas en el gel se encuentran mezcladas con la red que forma la acrilamida; en el papel se quedan adheridas a la superficie del mismo. La nitrocelulosa retiene fuertemente las proteínas de manera que no se pierden aunque haya diversos lavados.

Para transferir las proteínas al papel de nitrocelulosa se prepara un "sandwich" de la siguiente manera (Bittner y cols. 1980):

-Electrodo negativo.

-1 Scotch Brite 3R (que actúa como material poroso).

- 2 hojas de papel grueso.
- Gel con las proteínas separadas según sus pesos moleculares.
- Papel de nitrocelulosa.
- 3 hojas de papel grueso.
- 1 Scotch Brite 3R.
- Electrodo positivo.

El "sandwich" se sumerge en una cubeta que contiene el tampón de transferencia:

Glicina                      0,192 M

TRIS                              0,025 M

Añadir agua destilada hasta un volumen de 800 ml.

Añadir 200 ml. de metanol hasta un volumen final de un litro.

El "sandwich" se sumerge en el tampón durante unos 25 minutos. El metanol contrae el gel y el papel; durante este tiempo ambas estructuras se estabilizan de manera que en el momento de la transferencia proteica no se producen ya distorsiones.

Al cabo de los 25 minutos se hace circular una corriente eléctrica continua de 12 V durante cinco horas al cabo de las cuales puede comenzarse el procesado de la nitrocelulosa.

### Procesado de la nitrocelulosa.

En primer lugar se comprueba si la transferencia se ha realizado correctamente. Para ello se recorta la zona de nitrocelulosa que corresponde a las proteínas estándar. A continuación se tiñe esta tira durante 1-2 minutos dentro de la solución siguiente:

Negro amido 0,1% en una solución de metanol, ácido acético y agua en las proporciones (v/v) 25/10/65.

Se destiñe con la misma solución empleada para desteñir electroforesis. Así puede comprobarse si la transferencia al papel ha tenido lugar correctamente. El resto de papel de nitrocelulosa puede guardarse a 4°C o continuar el procesado.

En esta técnica se usan anticuerpos específicos dirigidos contra determinadas proteínas. La unión antígeno-anticuerpo se detecta mediante un segundo anticuerpo conjugado con peroxidasa dirigido contra el anticuerpo específico. Esta unión se pone de manifiesto con una solución de diaminobencidina (DAB). Así se detecta la presencia de determinados antígenos en la muestra problema.

Las proteínas de peso molecular superior a 100 Kd pasan con dificultad, o no pasan, del gel al papel debido a que se entrecruzan fuertemente con la red formada por la acrilamida.

La nitrocelulosa se lava con PBS (pH 7,2) durante 10 minutos para extraer el SDS o las impurezas que pueda haber retenidas. Luego se procede al bloqueo de la nitrocelulosa.

El fundamento del bloqueo radica en que la nitrocelulosa es un material con gran avidez por todas las substancias orgánicas que entran en contacto con ella.

Las proteínas problema ocupan un espacio sobre el papel; pero gran parte del mismo se encuentra libre. Este espacio debe quedar ocupado (bloqueo de la nitrocelulosa) ya que al incubar con el anticuerpo éste se uniría de forma inespecífica al papel.

Para bloquear la nitrocelulosa se usa una solución de ovoalbúmina al 5% en PBS. Se lava el papel durante una hora con esta solución empleando agitación continua. Luego se incuba con el anticuerpo específico. Este anticuerpo se diluye, con la misma clase de solución que la empleada para el bloqueo, a 1/400. Se incuba el papel con el anticuerpo

durante una hora. Transcurrido este tiempo se realizan tres lavados de 20 minutos cada uno con la solución siguiente:

TRIS	50 mM
ClNa	0,15 M
Gelatina	0,25%
Agua destilada	

Para disolver la gelatina la solución se calienta hasta 60°C. Una vez disuelta se deja enfriar y se equilibra el pH a 7,6.

Estos lavados tienen como finalidad completar el bloqueo de la nitrocelulosa.

El segundo anticuerpo conjugado con peroxidasa se diluye con esta solución de TRIS salino gelatina a una concentración de 1/400.

Se incuba el papel durante una hora con este anticuerpo. Transcurrido este tiempo se hacen 3 lavados de 20 minutos cada uno con la solución de TRIS salino gelatina.

Luego se lava la nitrocelulosa con PBS durante 10 minutos. La actividad peroxidásica se revela con DAB. La solución contiene:



DAB 5 mg.

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30% (Perhydrol Merck) 10 µl.

PBS hasta 10 ml.

Filtrar y utilizar inmediatamente ya que la degradación es rápida por acción de la luz.

La nitrocelulosa se incuba con la solución de DAB durante unos minutos. La peroxidasa desdobla el agua oxigenada en H<sub>2</sub>O y O<sub>2</sub>. La DAB se oxida con el O<sub>2</sub> liberado y toma una coloración marrón marcando con este color la proteína a la que se ha unido el anticuerpo específico. La reacción se detiene con un baño de agua.

### Elisa.

La técnica de Elisa (enzyme-linked immunosorbent assay) permite obtener una gran sensibilidad en la determinación de actividad presente en la reacción antígeno-anticuerpo (Engvall y Perlman 1971). Esta técnica ya descrita ha sido modificada por nosotros para adecuarla al material con el cual trabajamos: cuerpos embrioides.

El método consiste en preparar placas de 96 pocillos. En cada pocillo se deposita el tipo de cuerpo embrioide que interesa. Para facilitar la ejecución de las tareas es muy

práctico preparar cada placa con un mismo tipo de cuerpo embriode. Se prepararon placas con poblaciones de cuerpos embrioides BC1 y BS1.

Las placas se preparan así:

1. Se llena cada pocillo con 50  $\mu$ l. de poli-L-lisina al 1% (p/v) en suero fisiológico. La placa se deja en estas condiciones durante 30 minutos a temperatura ambiente. Al cabo de este tiempo la placa se vacía por expulsión.
2. A continuación se depositan 10<sup>9</sup> cuerpos embrioides de la población que interese, centrifugándose luego a 150g durante 5 minutos.
3. Los cuerpos embrioides se fijan con 50  $\mu$ l. de glutaraldehído al 0,5% en suero fisiológico durante 15 minutos. El exceso de fijador se lava dos veces en suero fisiológico.
4. En cada pocillo se depositan 50  $\mu$ l. de gelatina en suero fisiológico (la gelatina se toma de una disolución de 200 mg. de la misma en 100 ml. de suero fisiológico). Esta incubación dura 30 minutos. La placa debe encontrarse a una temperatura de 37°C.

5. Transcurrido el tiempo previsto la placa se congela y se conserva a  $-70^{\circ}\text{C}$ .

La placa puede mantenerse congelada o puede proseguirse la técnica desde el punto número 4. Los pasos siguientes llevan hasta la determinación de la actividad del antisuero.

La descongelación de la placa se realiza a temperatura ambiente. Una vez descongelada la placa se procede como sigue:

1. Se lava tres veces la placa con suero fisiológico.
2. Se lava una vez más con suero fisiológico y Nonidet P-40 al 0,2%.
3. Se realiza la primera incubación con el anticuerpo del que interese determinar la actividad. Cada anticuerpo se diluye por separado en suero fisiológico con albúmina sérica bovina al 1%. Las diluciones empleadas fueron desde 1/100 hasta 1/102400. Esta incubación dura 90 minutos.
4. El exceso se lava cuatro veces con suero fisiológico.

5. Se lava una vez más con suero fisiológico y Nonidet P-40 al 0,2%.
6. Se procede, luego, a la incubación con el conjugado peroxidasa-IgG de cabra anticonejo a una dilución de 1/1600. Se prepara la dilución en suero fisiológico y albúmina sérica bovina al 1%. Esta incubación dura 90 minutos.
7. Se lava cinco veces con suero fisiológico, la última con Nonidet P-40 al 0,2%.
8. A continuación se añaden 200  $\mu$ l. del sustrato de la peroxidasa a cada pocillo. Esta incubación dura 30-50 minutos. El sustrato se prepara así:

Ortofenilendiamina	20 mg.
Acido cítrico 0,1M pH 4,5	20 ml.
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	8 $\mu$ l.

El ácido cítrico se prepara disolviendo 2,1 gr. del mismo en unos 30 ml. de agua destilada; el pH se iguala a 4,5 con NaOH concentrado; finalmente se llega a un volumen final de 100 ml de solución añadiendo agua destilada hasta ese nivel.

9. La reacción se detiene añadiendo 25  $\mu$ l. de  $\text{SO}_4\text{H}_2$  2N por pocillo.
10. El resultado se observa mediante una lectura óptica con el espectrofotómetro a 492 nm.

#### **Obtención de embriones.**

Para obtener embriones de ratón de distintos días de evolución se procede a determinar la fase de estro, siguiendo la pauta descrita por Monzó (1984).

La determinación de esta fase del ciclo permite recurrir con éxito a la superovulación según la pauta siguiente:

1. 7 U.I. de hormona estimuladora del folículo y 7 U.I. de hormona estimuladora del cuerpo lúteo administradas por vía intraperitoneal.
2. A las 24 horas de esta estimulación se administran 10 U.I. de gonadotropina coriónica humana por la misma vía.
3. A las 12 horas de la última inyección se acoplan con los machos.

La presencia de un tapón vaginal se considera como día cero de la gestación.

#### **Procesamiento de los embriones.**

##### Inclusión en parafina.

El protocolo utilizado es el siguiente: lavado del embrión o del saco uterino con PBS durante cinco minutos.

La fijación se realiza con uno de los fijadores propuestos por Sainte-Marie (1962) para evitar la desnaturalización de los antígenos. El fijador empleado consiste en una mezcla de 99 volúmenes de etanol 96° y un volumen de ácido acético glacial.

La deshidratación de los embriones se consigue mediante una serie de cuatro baños consecutivos de etanol absoluto a 4°C de temperatura. Cada baño tiene una duración de 45 minutos.

A continuación siguen tres baños de xilol de una hora cada uno de duración. Los dos primeros se realizan a 4°C y el último a temperatura ambiente.

La inclusión se realiza en tres baños de parafina líquida a 56°C durante 45 minutos cada baño. Terminado el último baño, se deja solidificar como bloque a temperatura ambiente. Los bloques obtenidos se conservan a 4°C.

#### Seccionamiento.

Los bloques parafinados se cortan mediante un microtomo en secciones de cinco micras de grosor. Las secciones se colocan sobre un portaobjetos limpio. La adherencia de la preparación se consigue mediante una disolución de albúmina al 2%. Los portaobjetos se dejan en la estufa un mínimo de 24 horas.

**Tinción de embriones mediante la técnica de hematoxilina eosina.**

Se ha aplicado el protocolo siguiente:

1. Desparafinado de los cortes en dos baños sucesivos de xilol de tres minutos de duración cada uno.
2. Hidratación de los cortes mediante un baño de etanol absoluto de 3 minutos de duración seguido de un baño de

etanol de 70° durante 5 minutos. Al terminar se aplica un lavado con agua destilada.

3. Aplicación de hematoxilina durante 3 minutos procediéndose luego al azulado con agua corriente. A continuación prosigue la tinción mediante un baño de eosina de 2 minutos de duración.
4. Deshidratación de las preparaciones con un baño de etanol de 70° de 5 minutos de duración seguido de tres baños de etanol absoluto de 5 minutos de duración cada uno. Se acaba con un baño de xilol durante 5 minutos.
5. El montaje se realiza mediante una solución de poliestirol (polietilenobenzol) en xilol (D.P.X.).

#### **Inmunohistoquímica de los embriones.**

Esta técnica se desarrolla mejor a la temperatura de 4°C. El protocolo empleado es el siguiente:

1. Desparafinación de las preparaciones con dos baños sucesivos de xilol de 3 minutos de duración cada uno.

2. Hidratación mediante una serie graduada de baños de etanol: el primer baño de 3 minutos con etanol absoluto; luego un baño de etanol de 80° en PBS durante 3 minutos seguido de otro baño de etanol de 70° en PBS de 3 minutos de duración. La hidratación termina con tres baños sucesivos de PBS de 10 minutos de duración cada uno. Al último baño se le añade Nonidet P-40 (Fluka) al 0,25% para conseguir una mejor exposición de los lugares reactivos de las moléculas.
3. Inhibición de las peroxidasas endógenas durante 45 minutos mediante 1,7 ml de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 0,25% diluidos en 100 ml de metanol.
4. Lavado de 20 minutos con dos baños sucesivos de PBS.
5. Incubación con los antisueros específicos. Los antisueros de conejo anti BC1 y antiBS1 respectivamente se diluyen por separado a 1/400 en ovoalbúmina al 1% (preparada en PBS). La incubación dura doce horas.
6. Dos lavados de 10 minutos cada uno con PBS.
7. Incubación con un complejo de IgG de cabra anticonejo conjugado con peroxidasa (Nordic). La incubación dura 30 minutos a temperatura ambiente y al abrigo de la luz. El

conjugado se emplea a dilución 1/400 en ovoalbúmina al 1% (preparada en PBS).

8. Dos baños de PBS de 10 minutos cada uno.

9. A continuación se añade el sustrato de la peroxidasa en forma de diaminobencidina (DAB) (Fluka). La solución se prepara inmediatamente antes del uso pues se degrada rápidamente. Por su elevada toxicidad, la DAB debe manipularse con guantes y bajo una campana extractora de humos. La diaminobencidina se prepara así:

PBS                                    10 ml.

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30%)                            5 µl.

DAB                                      15 mg.

Se filtra con papel Whatman nº5. El corte se incuba con DAB durante 5 minutos.

10. Los cortes se lavan con agua destilada. Este lavado se sigue de dos baños de PBS de 10 minutos de duración.

11. Se realiza una postfijación con tetraóxido de osmio al 0,25% durante 1,5 minutos, lavándose a continuación con agua destilada.

12. La deshidratación tiene lugar mediante un baño de etanol de 70° de 3 minutos seguido de tres baños sucesivos de etanol absoluto de 3 minutos de duración cada uno. Acaba con un baño de xilol de 5 minutos.

13. El montaje se realiza con D.P.X.

#### Controles.

Como control, diversos cortes histológicos son sometidos al mismo protocolo descrito con excepción de la incubación con un anticuerpo específico. En lugar de éste, la primera incubación se realiza con suero de animal no inmunizado diluido 1/400 en ovoalbúmina al 1% (preparada en PBS). La duración de la incubación control es también de doce horas.

## **RESULTADOS**

### **De la obtención de cuerpos embrioides.**

Se han obtenido con regularidad cuerpos embrioides en el líquido ascítico aspirado en ratones 129/Sv con esta forma de teratocarcinoma. La diversidad de cuerpos embrioides se correlaciona con la edad de la ascitis (Monzó 1984). Además la ascitis hemorrágica favorece el aumento numérico de los cuerpos embrioides (Torregrosa 1987). Se ha observado asimismo que realizando el pasaje intraperitoneal en ratones muy jóvenes, la ascitis provoca una mayor mortalidad que en ratones adultos. La observación de cuerpos embrioides al microscopio invertido permite distinguir diversos tipos de cuerpos embrioides como se describe en el apartado siguiente.

### **Del aislamiento de cuerpos embrioides.**

La centrifugación en gradiente isopícnico en Ficoll 400R permite la separación de cuatro tipos morfológicos de cuerpos embrioides denominados: BC1, BC2, BS1 y BS2. Las iniciales B, C y S significan "body", "cystic" y "simple", respectivamente, en lengua inglesa (figs. 7, 8 y 9).

La población BC1 se encuentra formada por una capa de células externas. En esta capa predominan las células de

endodermo visceral. Al mismo tiempo se encuentran células de endodermo parietal. Esta capa rodea una población de células de carcinoma embrionario contenida dentro de una cavidad llena de líquido. Corresponde al tipo de cuerpo embriode cavitado. Se parece tanto a vesículas endodérmicas como a blastocistos de 3,5 días de evolución.

La población BC2 se compone de una capa celular externa. El tipo celular predominante en esta capa es el endodermo parietal; también se observan células de endodermo visceral. Esta capa rodea a un mayor número de células de carcinoma embrionario que en el caso anterior. Es una población similar a blastocistos tardíos de ratón.

La población BS1 carece de cavidades y corresponde a los cuerpos embrioides simples. Las células de la capa externa son tanto de endodermo visceral como de endodermo parietal sin predominio cuantitativo de un tipo sobre el otro. Como característica propia debe destacarse el elevado número de microvellosidades en su superficie (Monzó 1984). No hay cavidad interna pues ésta está ocupada por células de carcinoma embrionario. Este tipo de cuerpos embrioides es comparable a embriones de ratón de 6 días de evolución.

La población BS2 es una población en estado de lisis

observándose la existencia de autofagosomas y de figuras de mielina.

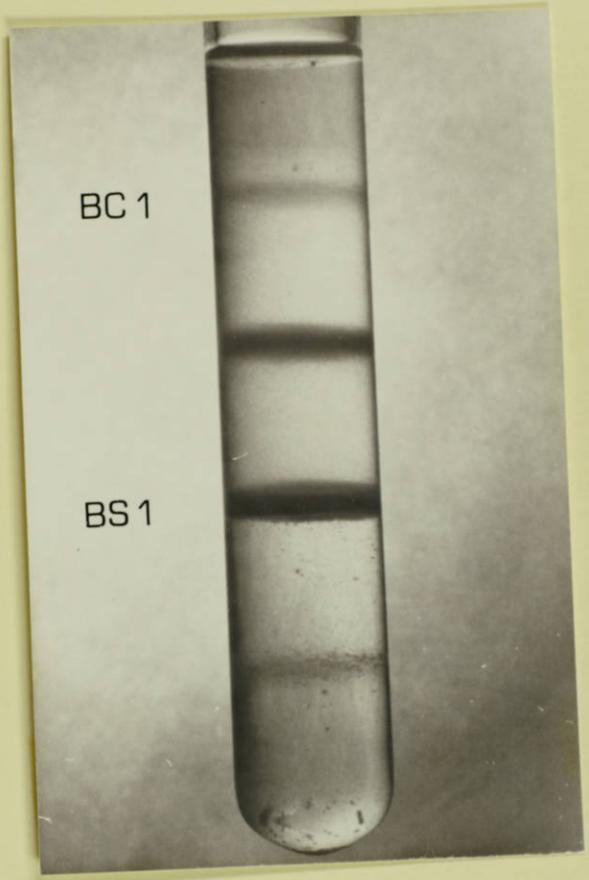


FIGURA 7. En la fotografía se observan las diversas bandas en las que se recogen los cuerpos embrioides tras la centrifugación.

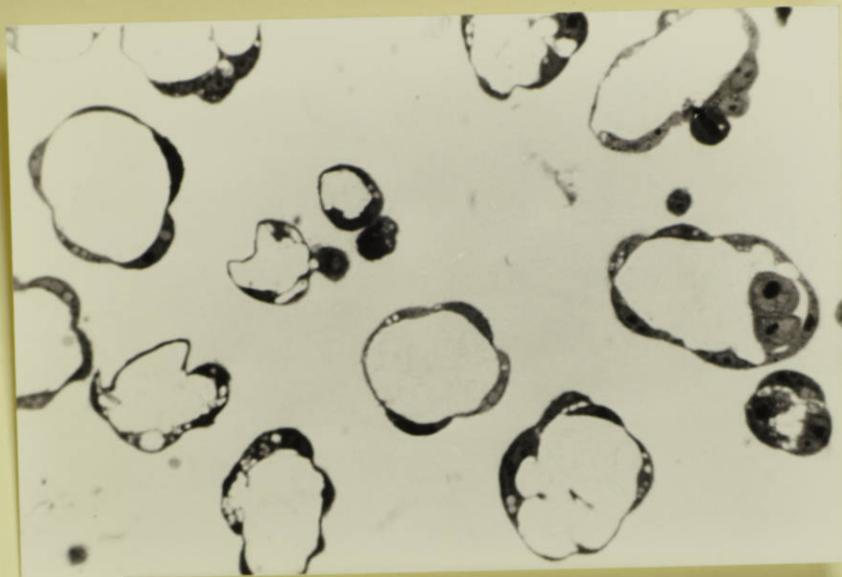


FIGURA 8. Cuerpos embrioides correspondientes a la banda BC1. La preparación de la fotografía procede de un corte semifino. Obsérvense los anillos de células externas sin nada en su interior. 100x.

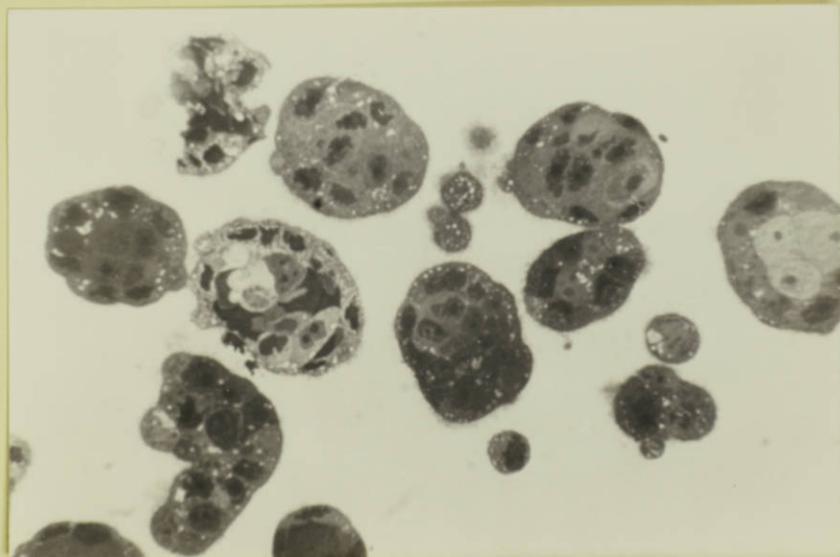


FIGURA 9. Cuerpos embrioides correspondientes a la banda BS1. Observación de un corte semifino. Apréciase el núcleo de células interiores. x100.

### **Del recuento y de la prueba de exclusión tintorial de cuerpos embrioides.**

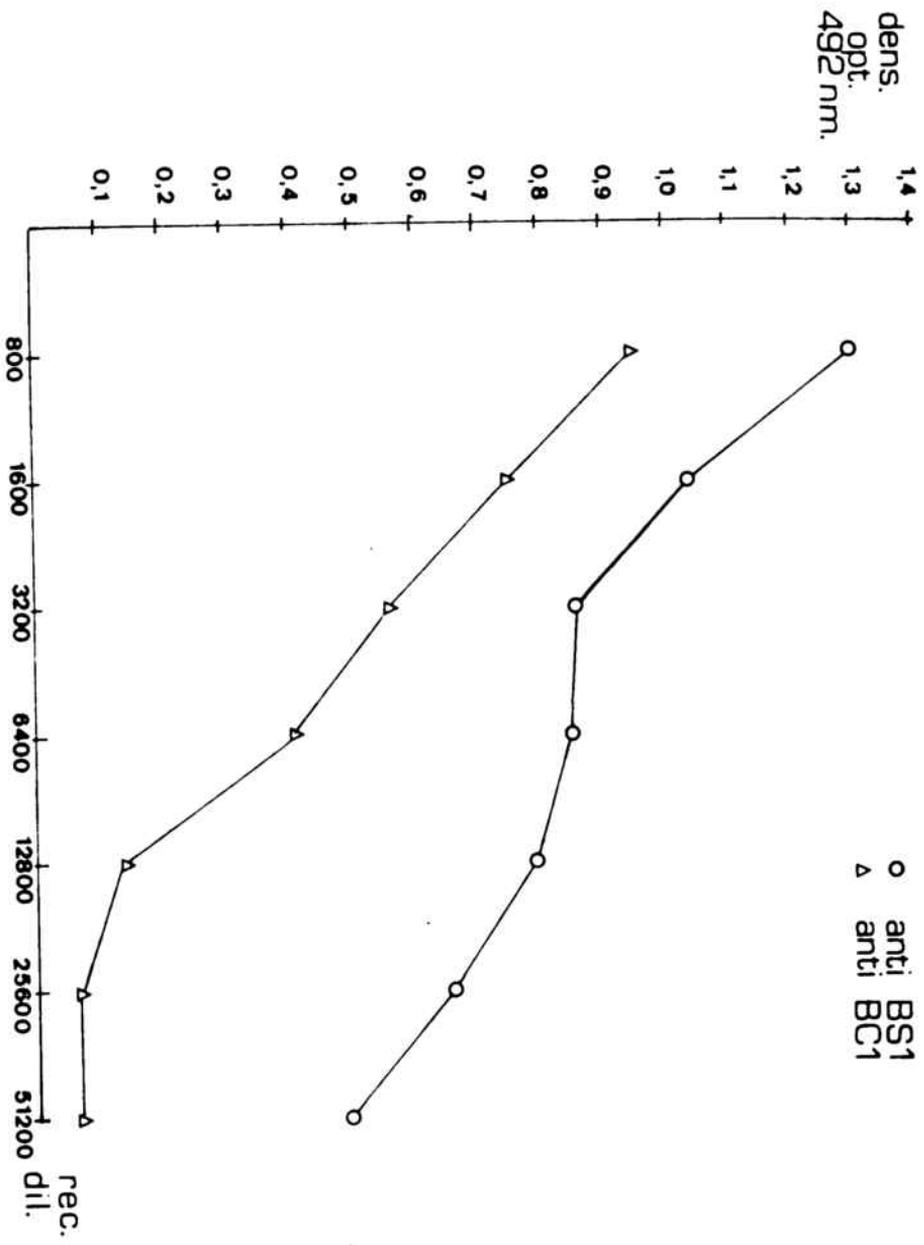
Las diversas poblaciones de cuerpos embrioides se han estudiado para comprobar el efecto de las manipulaciones previas a su administración como inmunógeno.

Las centrifugaciones preparativas, la suspensión en Ficoll 400™, la suspensión en suero fisiológico así como el tiempo invertido (45 minutos en total) en todas estas operaciones permiten una viabilidad del 95% cuando se compara con la viabilidad de cuerpos embrioides dejados en suero fisiológico a temperatura ambiente.

### **De la obtención de antisueros y del ELISA.**

Como resultado de la inmunización de conejos a partir de dos poblaciones distintas de cuerpos embrioides obtenemos dos antisueros. Un antisuero anti-cuerpos embrioides tipo BC1 y un antisuero anti-cuerpos embrioides tipo BS1.

Ambos antisueros se han probado con la técnica ELISA para determinar el rango útil de diluciones. Como puede comprobarse por la gráfica adjunta las diluciones útiles son



inferiores a 1/50000 para el antiBS1. Las titulaciones de los antisueros obtenidos mediante adyuvante de Freund o sin él, no mostraron diferencias significativas.

En la gráfica observamos que el antiBC1 presenta, para el mismo valor de densidad óptica, una titulación inferior que el antiBS1. Por debajo de un valor de densidad óptica de 0,3 se considera que las titulaciones no son valorables. El suero preinmune analizado mediante esta técnica da unos valores inferiores a 0,3 para las diluciones de la gráfica.

#### **De la electroforesis y del electroblotting.**

La electroforesis de los tejidos adultos de ratón dan los patrones correspondientes a las proteínas presentes en cada línea celular.

Como paso previo a la utilización de los antisueros obtenidos en la técnica de inmunohistoquímica se ha procedido a determinar la reactividad de los antisueros con diversos tejidos adultos de ratón: intestino, cerebro, hígado, testículo, músculo, riñón.

El electroblotting realizado permite observar una única banda en las tiras de papel correspondientes a intestino y testículo en el caso de que el antiBC1 sea el anticuerpo

reaccionante. Las proteínas con las que reacciona tienen un peso molecular superior a 90.000-100.000 daltons (fig. 10).

El antiBS1 revela diversas bandas en cada tejido correspondientes a proteínas de bajo, mediano y elevado peso molecular (fig. 11).

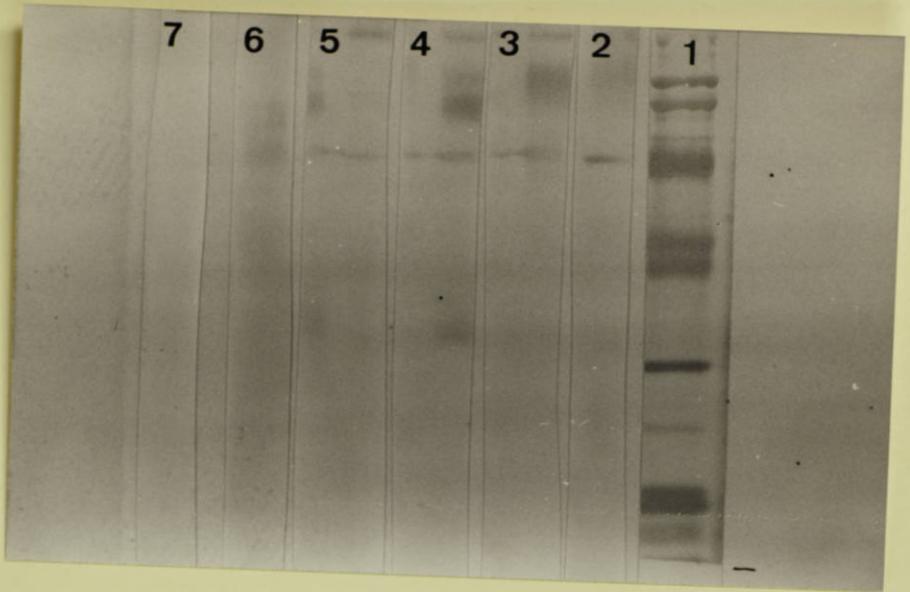


FIGURA 10. Blotting con el antiBC1. 1 estándares, 2 intestino, 3 cerebro, 4 higado, 5 testiculo, 6 músculo, 7 riñón.

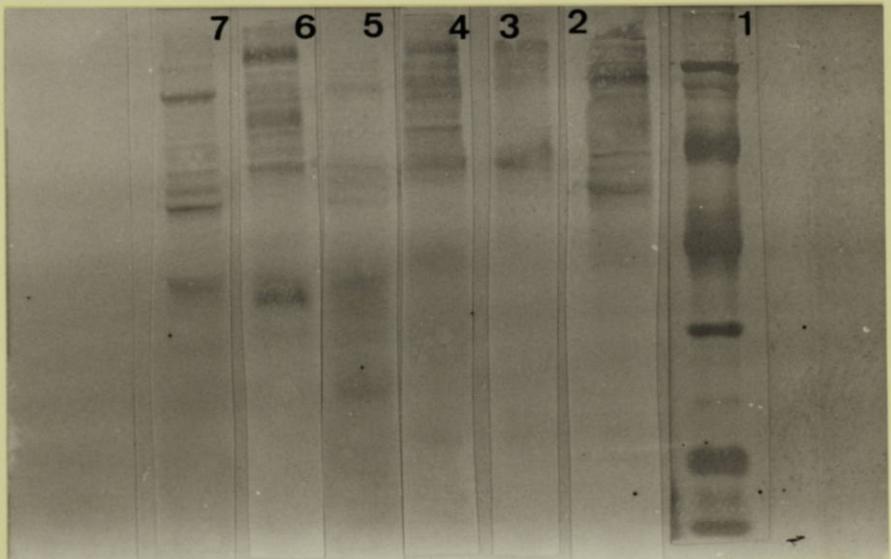


FIGURA 11. Blotting con el antiBS1. La leyenda es la misma que para la figura anterior.

## **De la obtención y procesamiento de embriones.**

Como resultado del acoplamiento entre machos y hembras 129/Sv hemos obtenido embriones de ratón de 6,7,8 y 9 días de gestación. Tras realizar histerectomías obtenemos un número variable de sacos vitelinos conteniendo los embriones; por lo general obtenemos en cada hembra entre 5 y 9 embriones que procesamos y teñimos de la manera descrita en el apartado precedente.

En primer lugar describimos, por edades, la anatomía normal del desarrollo de los diversos embriones. A continuación analizamos las áreas en las que se detecta la afinidad de los antisueros obtenidos a partir de las poblaciones BC1 y BS1.

### **Embrión de ratón de 6 días de edad.**

#### **Tinción hematoxilina-eosina.**

A esta edad han aparecido ya las primeras diferenciaciones embrionarias. En las figuras 12, 13, 14 y 15

se muestra un embrión de la edad indicada. Distinguimos las siguientes estructuras:

1. Cavity amniótica: es una cavity que aparece en el interior del ectodermo primitivo. Es alargada y separa la región embrionaria de la extraembrionaria. Recibe el nombre de amniótica porque a los 8 días quedará limitada por el amnios.

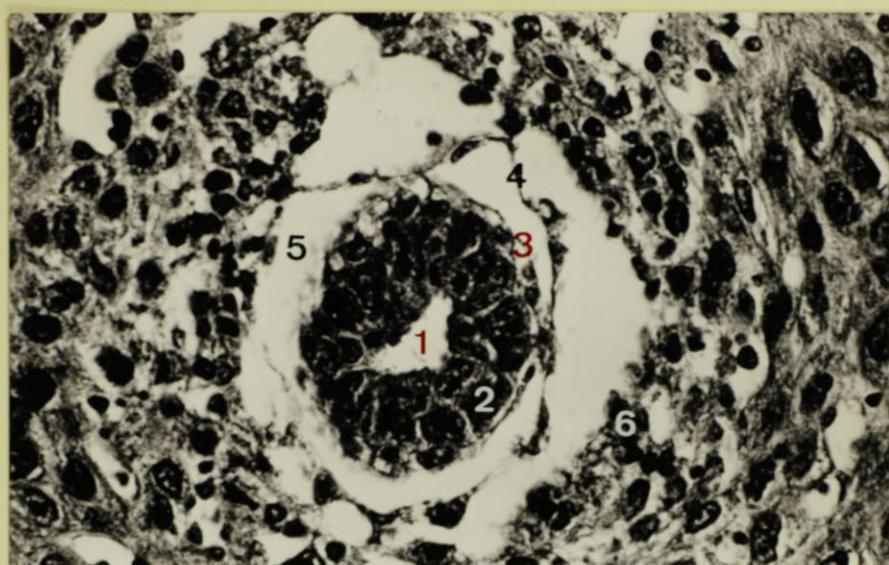


FIGURA 12. Sección de un embrión de 6 días de edad. Tinción hematoxilina-eosina. x400. 1 cavidad proamniótica, 2 ectodermo primitivo, 3 endodermo visceral, 4 endodermo parietal, 5 cavidad vitelina, 6 células trofoblásticas primarias.

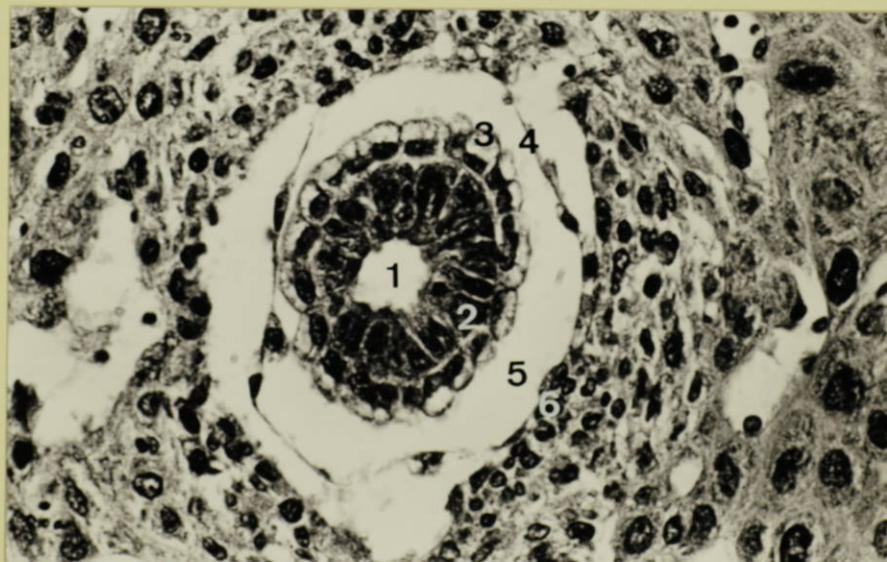


FIGURA 13. Embrión, aumento, tinción y leyenda iguales a los de la figura 12.

2. Ectodermo primitivo: capa de células que delimita la cavidad citada. La cavidad proamniótica queda limitada por el ectodermo primitivo y el ectodermo extraembrionario.

3, 3'. Endodermo embrionario visceral: deriva del endodermo primitivo. De él se van descamando las células del endodermo parietal y las del endodermo visceral extraembrionario (3'). En la figura 15 se observa la disposición basal de los núcleos de este linaje; así como la membrana basal que lo separa del ectodermo primitivo.

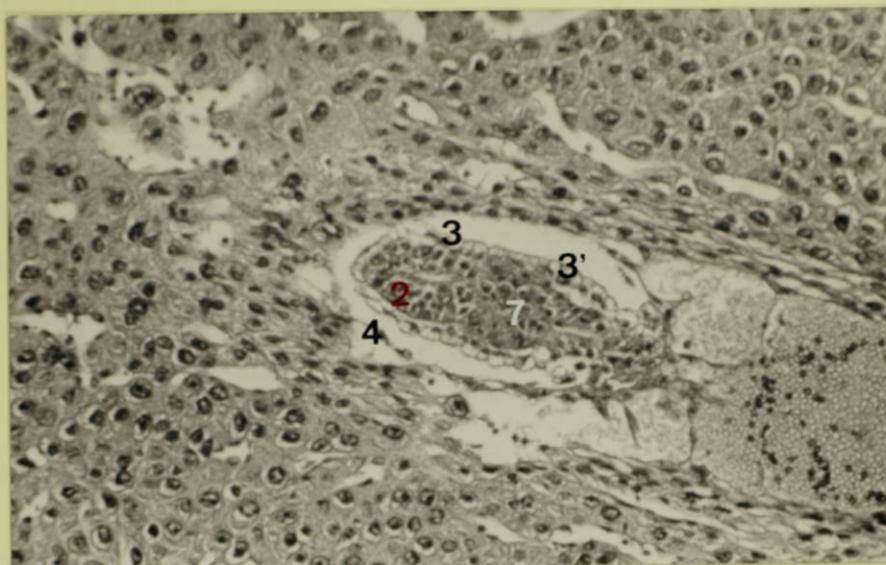


FIGURA 14. Embrión de 6 días. Sección perpendicular a las anteriores. Tinción hematoxilina-eosina. x100. 2 ectodermo primitivo, 3 endodermo visceral embrionario, 3' endodermo visceral extraembrionario, 4 endodermo parietal, 7 ectodermo extraembrionario (cono ectoplacentario).

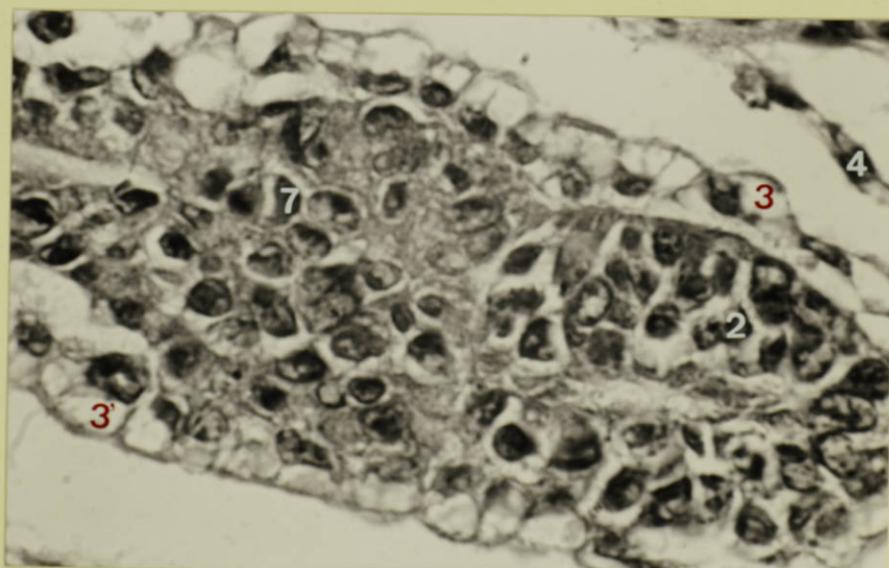


FIGURA 15. Embrión, tinción y leyenda iguales a los de la figura 14. x400.

4. Endodermo parietal: morfológicamente procede del endodermo primitivo. En las figuras 12 y 13 se observa separado de las células gigantes trofoblásticas primarias (6).
5. Cavidad vitelina: espacio delimitado por el endodermo visceral y el endodermo parietal. Corresponde al blastocele primitivo.
6. Las células gigantes trofoblásticas primarias derivan del trofotodermo mural.
7. El trofotodermo polar origina el cono ectoplacentario (7) constituido a los 6 días de edad gestacional por ectodermo extraembrionario.

#### Inmunohistoquímica.

En las secciones homólogas incubadas con anticuerpos por separado se observa lo siguiente:

-El anticuerpo antiBC1 tiñe el endodermo embrionario visceral así como el ectodermo extraembrionario y el endodermo visceral extraembrionario (figs. 16, 17). Queda

también teñido el borde de las células que miran a la cavidad proamniótica. No se observa tinción del endodermo parietal ni del ectodermo embrionario.



FIGURA 16. Embrión de 6 días. Tinción con antiBC1. x400. 1 cavidad proamniótica, 2 ectodermo primitivo, 3 endodermo visceral embrionario, 3' endodermo visceral extraembrionario, 4 ectodermo extraembrionario (cono ectoplacentario), 5 endodermo parietal.

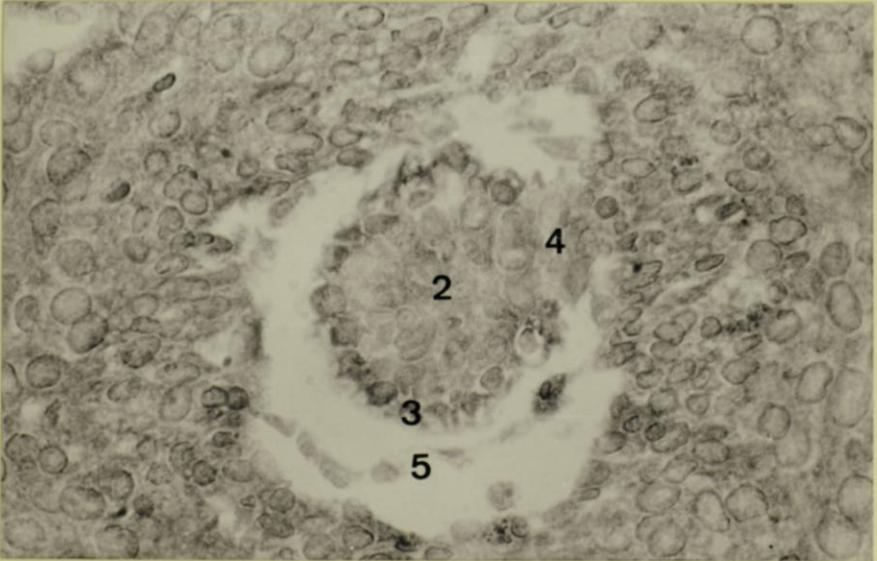


FIGURA 17. Embrión seccionado perpendicularmente al anterior. Aumento, tinción y leyenda iguales a los de la figura 16.

-El anticuerpo antiBS1 tiñe el endodermo visceral embrionario intensamente. El ectodermo embrionario aparece marcado además del borde libre de las células que miran a la cavidad amniótica. Únicamente el borde libre correspondiente al ectodermo extraembrionario no se tiñe (flechas rojas). Se observa tinción notable del endodermo parietal (fig. 18).



FIGURA 18. Embrión de 6 días. Tinción con anti BS1. x400.  
Leyenda igual a la de la figura 16.



FIGURA 19. Embrión de 7 días. Tinción hematoxilina-eosina.  
x100. 1 cavidad amniótica, 2 cavidad exocelómica, 3 cavidad  
ectoplacentaria, 4 ectodermo embrionario, 5 mesodermo  
embrionario, 6 endodermo embrionario, 7 corion, 8 endodermo  
parietal.

Embrión de ratón de 7 días de edad.

Tinción hematoxilina-eosina.

A los 7 días de edad gestacional el embrión de ratón comienza a desarrollar la tercera hoja embrionaria o mesodermo (5) (figs. 19, 20, 21, 22, 26).

En las secciones se observan las estructuras siguientes:

1. Cavity amniótica: limitada aquí por el ectodermo embrionario y el amnios. El amnios está constituido por ectodermo embrionario (4) y mesodermo extraembrionario (5').

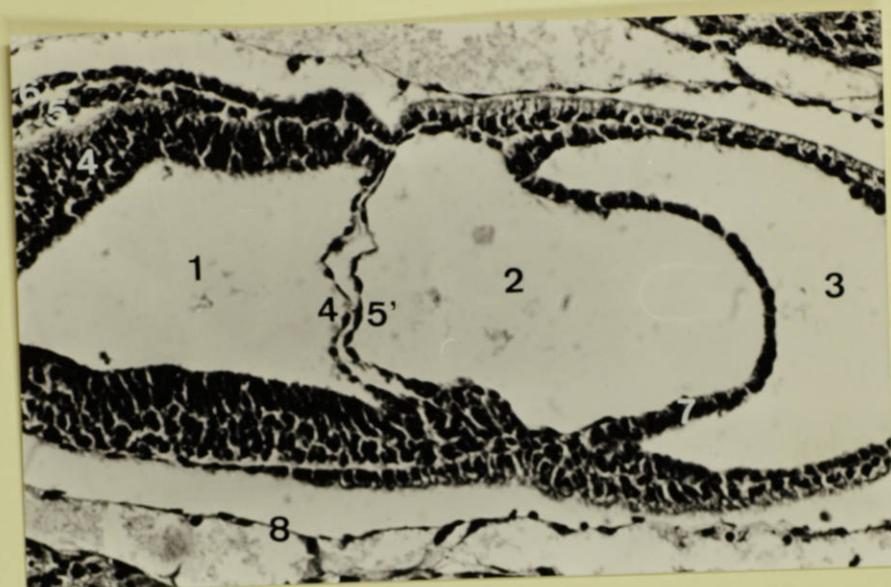


FIGURA 20. 5' Mesodermo extraembrionario. Embrión, aumento, tinción y resto de leyenda como en la figura 19.

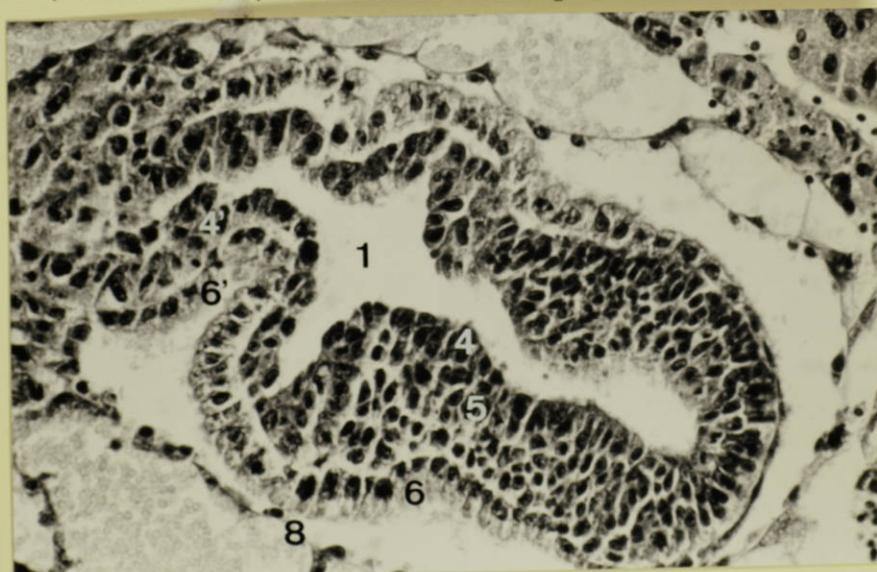


FIGURA 21. Embrión de 7 días. Tinción hematoxilina-eosina. x400. 4' ectodermo extraembrionario, 6' endodermo extraembrionario. Resto de leyenda como en la figura 19.

2. Cavity exocelómica: comienza como una invaginación del ectodermo extraembrionario. Se encuentra tapizada por el mesodermo extraembrionario y el mesodermo coriónico (7).
3. Cavity ectoplacentaria: es un remanente de la cavity proamniótica y se encuentra limitada por el ectodermo extraembrionario coriónico.
4. Ectodermo primitivo: a través del cual se deslizan las células para constituir el mesodermo.

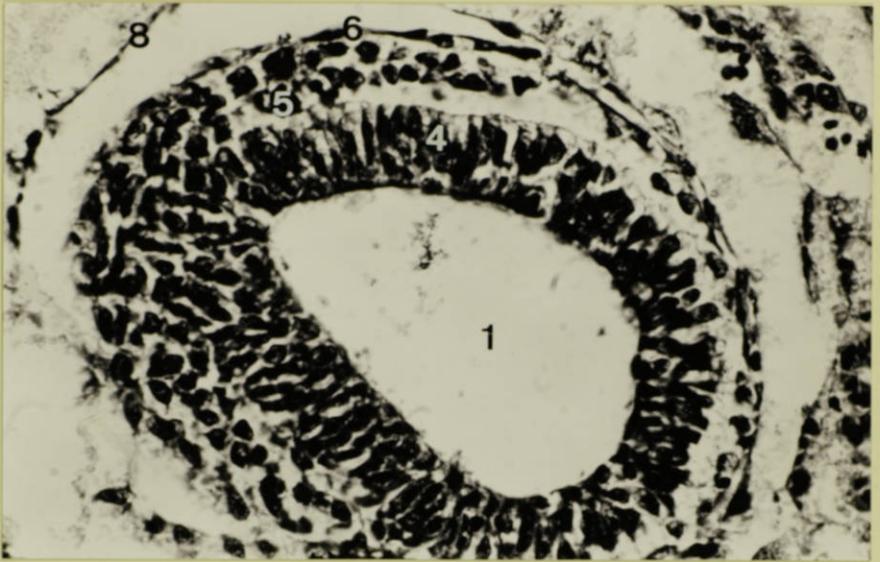


FIGURA 22. x400. Embrión, tinción y leyenda como en la fig. 19.

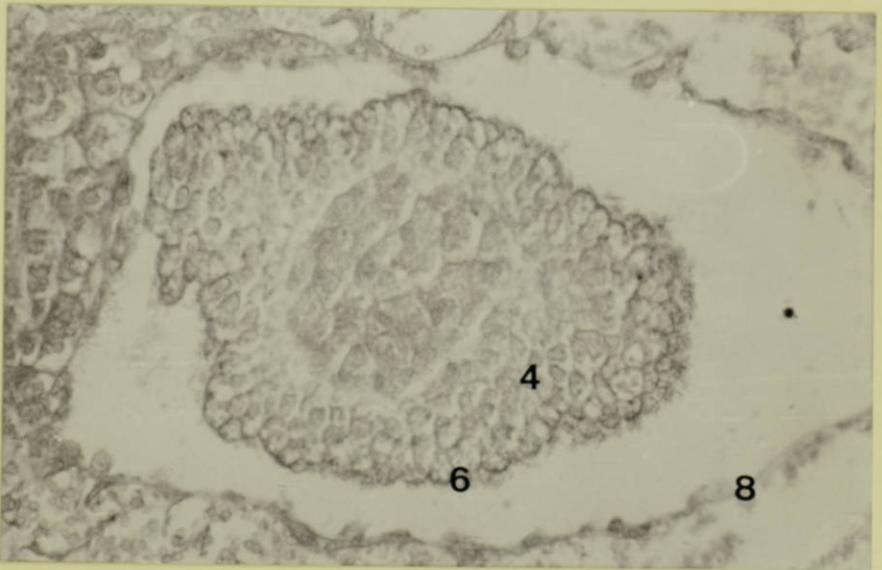


FIGURA 23. Embrión de 7 días. Tinción con antiBC1. x400. 4 ectodermo embrionario, 6 endodermo embrionario, 8 endodermo parietal.

5. Mesodermo: procede de las células que se deslizan por la línea primitiva situándose entre el ectodermo y el endodermo.
6. Endodermo.
7. Corion: constituye una lámina compuesta por mesodermo y ectodermo coriónicos. Contribuye a limitar la cavidad ectoplacentaria.
8. Endodermo parietal: originado a partir del ectodermo extraembrionario.

#### Inmunohistoquímica.

-El anticuerpo antiBC1 tiñe el borde libre de las células de endodermo visceral embrionario. El endodermo parietal no fija el anticuerpo. Tampoco se observa tinción del ectodermo embrionario (fig. 23).

-El anticuerpo antiBSI se fija intensamente en el borde libre de las células del endodermo visceral. No se observa tinción del borde libre de las células del ectodermo embrionario ni extraembrionario que miran a la cavidad amniótica. El endodermo parietal queda teñido notablemente (figs. 24, 25).

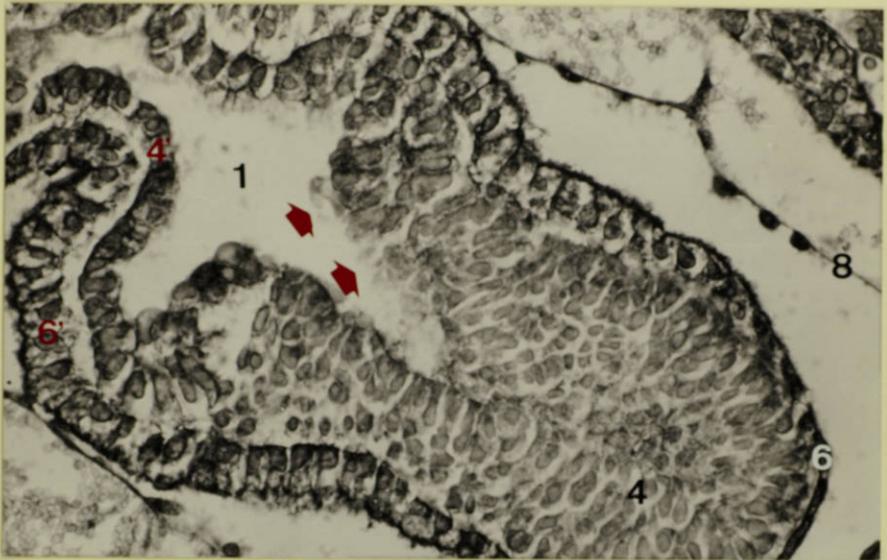


FIGURA 24. Embrión de 7 días. Tinción con anti BS1. x400. Leyenda como en figs. 19, 21. Las flechas rojas señalan el borde libre de las células que rodean la cavidad amniótica.



FIGURA 25. Embrión, tinción, aumento y leyenda como en la figura 24.

Embrión de ratón de 8 días de edad.

Tinción hematoxilina-eosina.

Aparecen las primeras estructuras que conducen a la formación del feto. En las figura 27, 28 y 29 distinguimos:

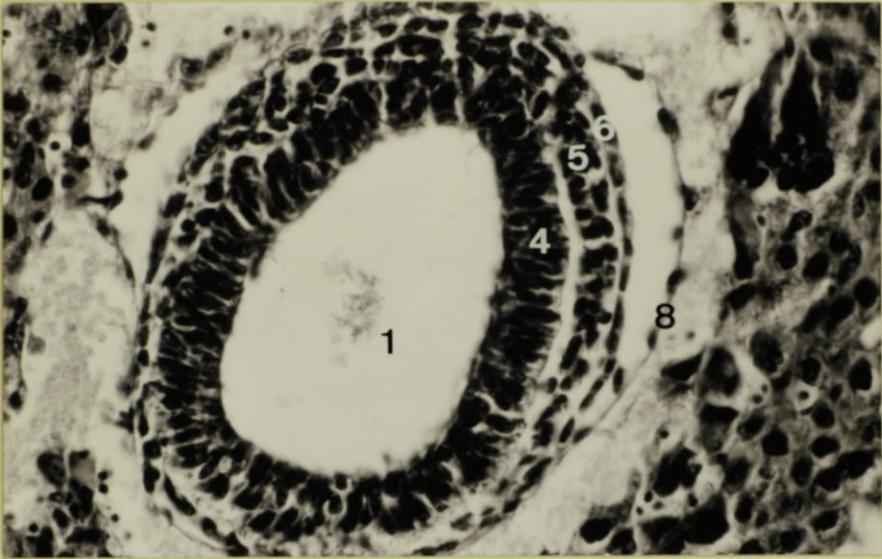


FIGURA 26. Embrión de 7 días. Tinción hematoxilina-eosina. x400. Leyenda como en la figura 19.

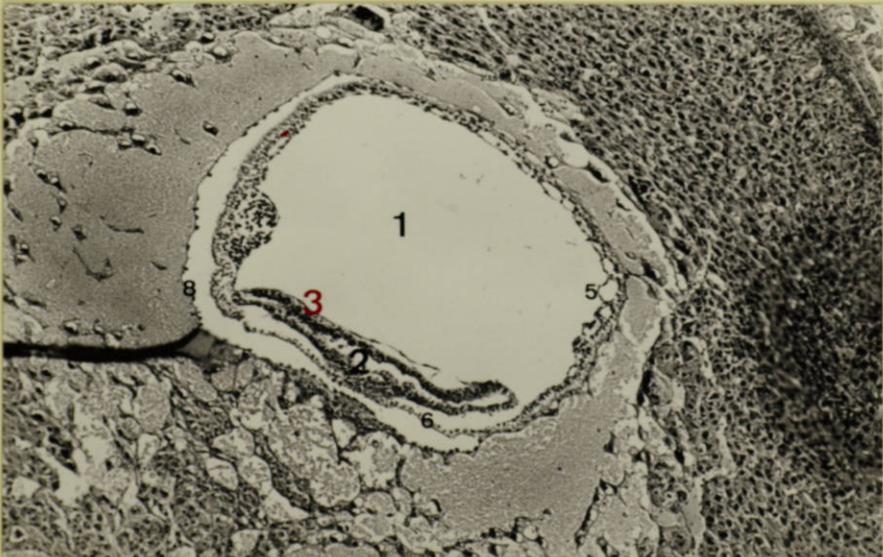


FIGURA 27. Embrión de 8 días. Tinción hematoxilina-eosina. x100. 1 cavidad exocelómica, 2 cavidad ectoplacentaria, 3 corion, 5 mesodermo, 6 endodermo visceral, 8 endodermo parietal.

1. Embrión de ratón.

2. Cavityad amniótica.

3. Amnios.

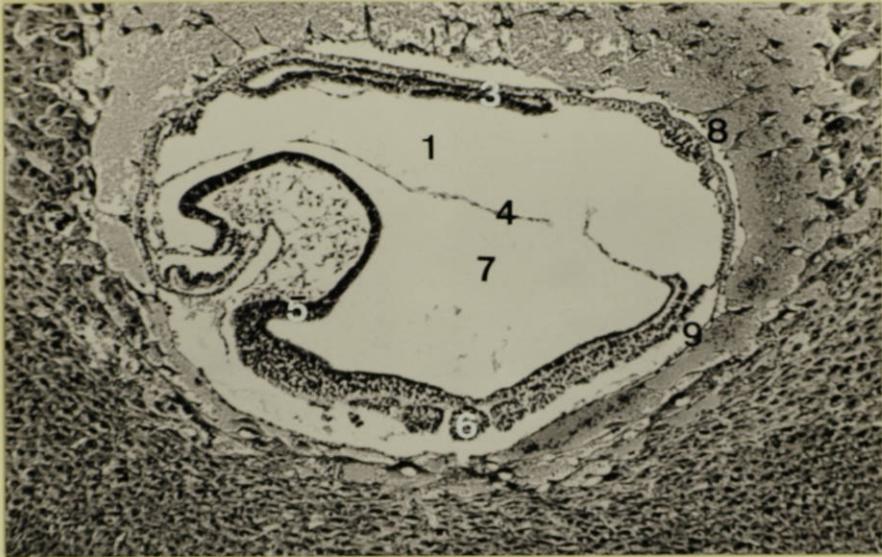


FIGURA 28. Embrión de 8 días. Tinción hematoxilina-eosina. x100. 1 cavidad exocelómica, 3 corion, 4 amnios, 5 ectodermo embrionario, 6 somitos, 7 cavidad amniótica, 8 endodermo parietal, 9 endodermo visceral.

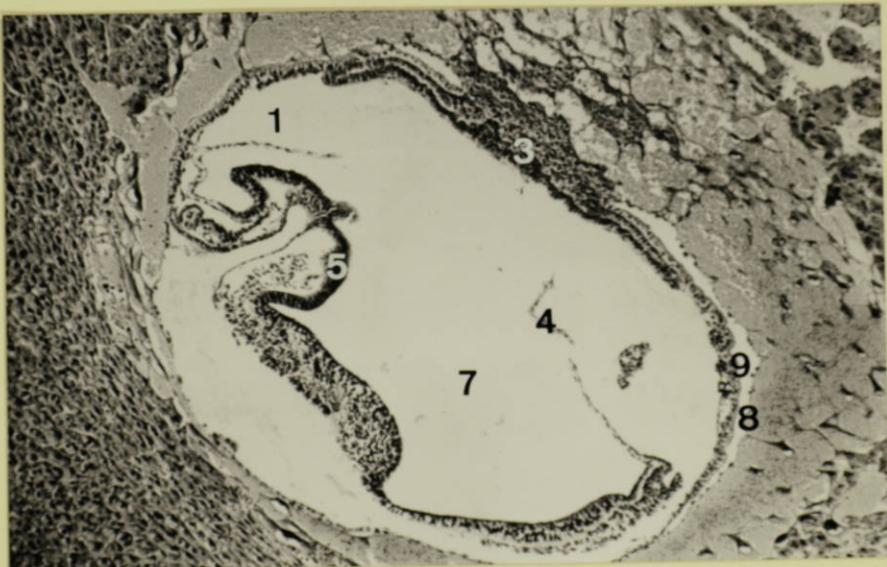


FIGURA 29. Embrión, tinción, aumento y leyenda como en la figura 28.

4. Cavidad exocelómica.
5. Saco vitelino: constituido por mesodermo y endodermo.
6. Endodermo parietal.
7. Somitos.
8. Alantoides.

#### Inmunohistoquímica.

-Con el anticuerpo antiBC1 se marca el linaje celular del endodermo visceral del saco vitelino, el cual se origina a partir del endodermo primitivo. No se observa tinción de la alantoides (fig. 30, 32).

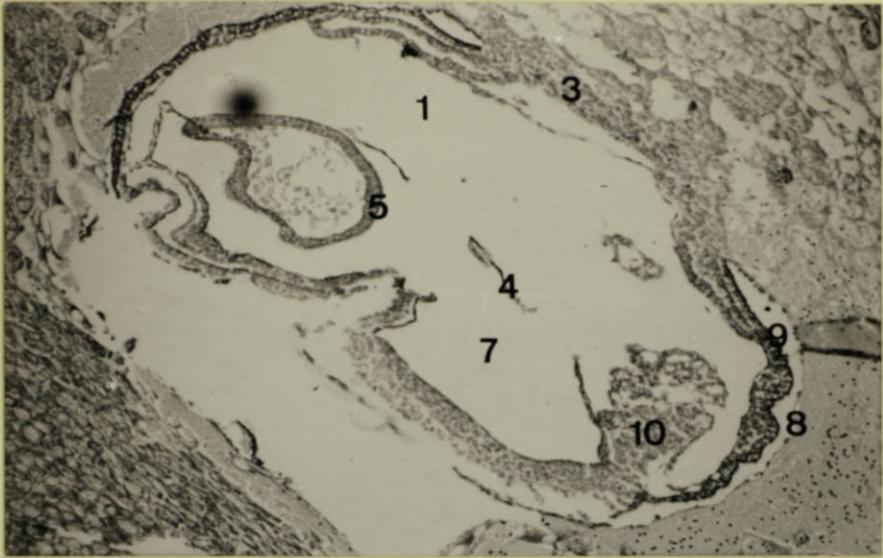


FIGURA 30. Embrión de 8 días. Tinción con antiBC1. x100. 10 alantoides. Resto de la leyenda como en la figura 28.



FIGURA 31. Embrión de 8 días. Tinción con antiBS1. x100. Leyenda como en la figura 28.

-Con el anticuerpo antiBS1 se tiñen derivados de las tres hojas embrionarias (fig. 31, 33).



FIGURA 32. Detalle de la fig. 30. x200. Se observa la tinción del endodermo visceral (9) netamente diferenciada del resto de linajes celulares. Leyenda como en la figura 28.



FIGURA 33. Detalle de la figura 31. x200. Leyenda como en la figura 28.

Embrión de ratón de 9 días de edad.

Tinción hematoxilina-eosina.

De manera esquemática, la numeración empleada es (figs. 34, 35, 36):

1. Medula espinal. 1' Vesícula encefálica.
2. Somitos.
3. Esbozos de los miembros.
4. Amnios.

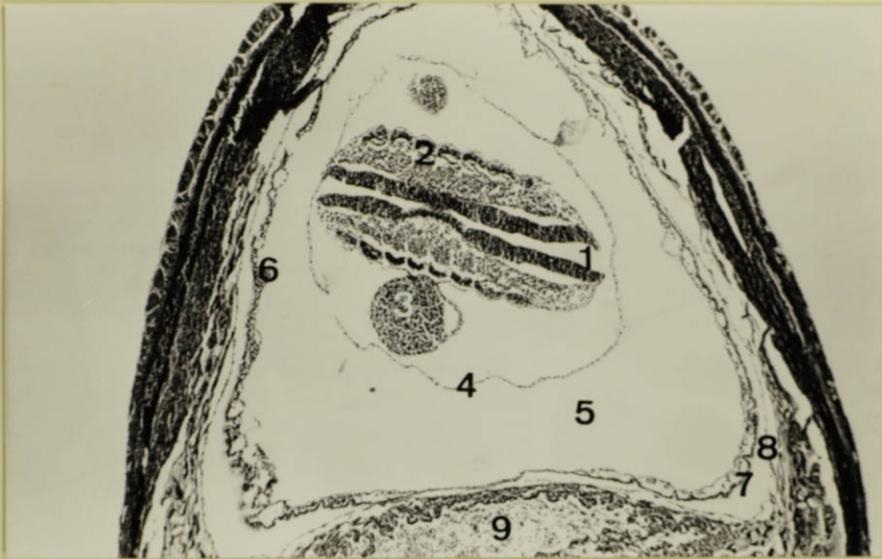


FIGURA 34. Embrión de 9 días. Tinción hematoxilina-eosina. x40. 1 médula espinal, 1' vesícula encefálica, 2 somitos, 3 esbozo de miembro, 4 amnios, 5 cavidad exocelómica, 6 islotes sanguíneos en mesodermo, 7 endodermo visceral, 8 endodermo parietal, 9 corioalantoides.

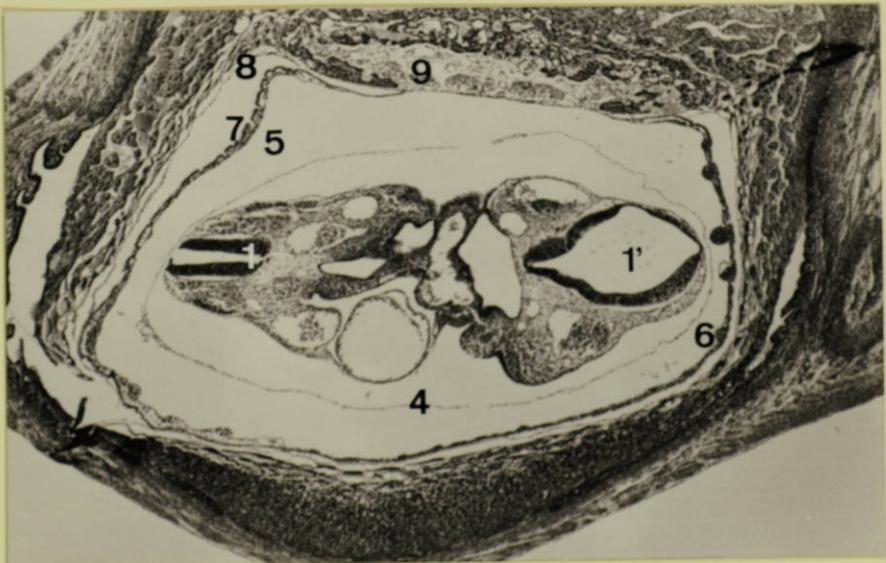


FIGURA 35. Corte perpendicular al anterior. Embrión, tinción, aumento y leyenda como en la figura 34.

5. Cavidad exocelómica.
6. Islotes sanguíneos en mesoderma.
7. Endoderma visceral.
8. Endoderma parietal.
9. Corioalantoides.

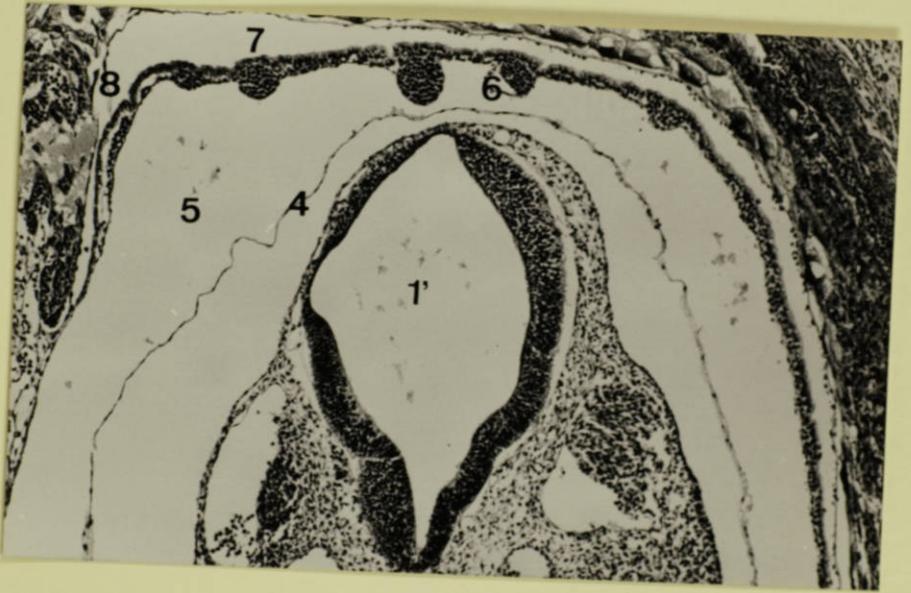


FIGURA 36. Detalle figura 35. x100. Leyenda como en la figura 34.

### Inmunohistoquímica.

-Con el anticuerpo antiBC1 se observa la tinción del endodermo visceral del saco vitelino nitidamente separado del mesodermo componente de esta capa. Este mesodermo no queda teñido; tampoco quedan teñidos amnios, somitos ni otras estructuras embrionarias (figs. 37, 39).

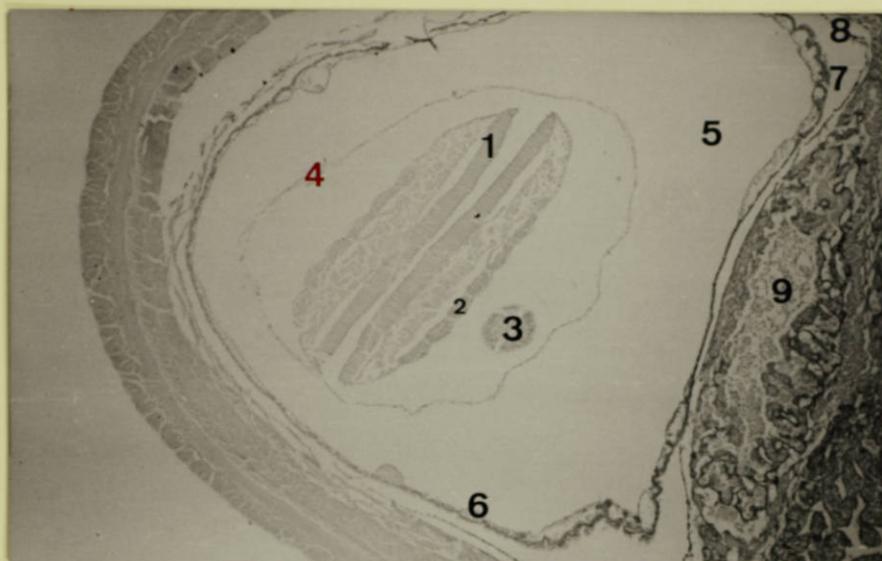


FIGURA 37. Embrión de 9 días. Tinción anti BC1. x40. Leyenda como en la figura 34.



FIGURA 38. Embrión de 9 días. Tinción antiBS1. x40. Leyenda como en la figura 34.

-Con el anticuerpo anti BS1 se observa un intenso marcaje de estructuras nerviosas, endodermo y mesodermo del saco vitelino visceral. No se tiñen amnios ni derivados somíticos (fig. 38, 40).

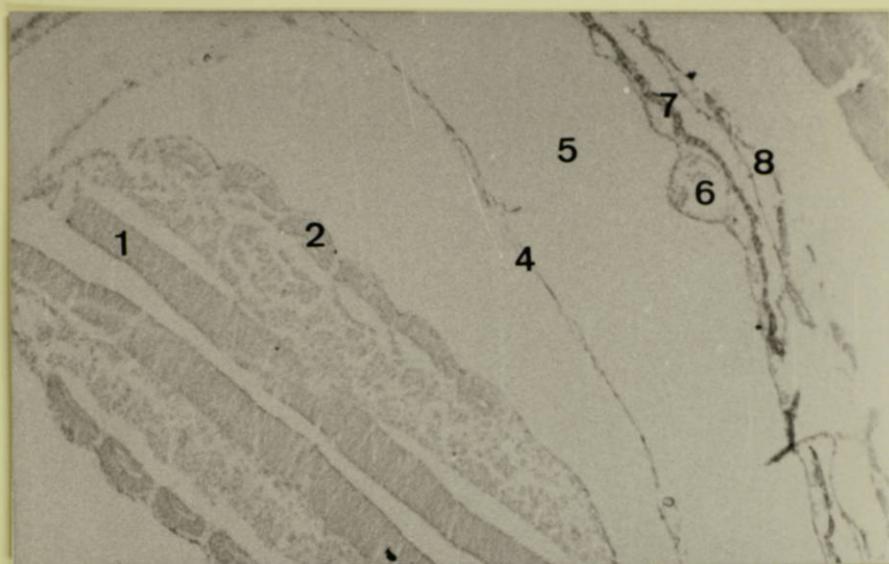


FIGURA 39. Detalle de la figura 37. x80. Leyenda como en la figura 34.



FIGURA 40. Detalle de la figura 38. x80. Leyenda como en la figura 34.

En resumen, la distribución de intensidades de tinción en embriones de 6 y 7 días se expone en esta tabla:

	antiBC1	antiBS1
ectodermo extraembrionario	neg.	+
ectodermo embrionario	neg.	neg.
endodermo visceral extraembrionario	+	++
endodermo parietal	neg.	++
cono ectoplacentario	++	+

La distribución de intensidades de tinción en embriones de 8 y 9 días se resume en esta tabla:

	antiBC1	antiBS1
endodermo embrionario	+/-	+++
mesodermo embrionario	neg.	+
amnios	neg.	neg.
islotes sanguíneos	neg.	++

	antiBC1	antiBS1
alantoides	neg.	++
cono ectoplacentario y corion	neg.	++
endodermo del saco vitelino	++	+++
mesodermo del saco vitelino	neg.	++
endodermo parietal	neg.	+
somitos	neg.	++
tejido nervioso	neg.	+++

En las dos tablas el número decreciente de cruces indica una menor intensidad de marcado.

## **DISCUSION**

El estudio de la superficie celular es de interés considerable debido a la posición que ocupa la superficie en la interfase entre una célula y su ambiente externo. En particular es importante en la comprensión de la diferenciación y de la morfogénesis para individualizar los cambios que se presentan en los componentes de la superficie celular durante el desarrollo. La información actual referente a la composición de la superficie celular en embriones de postimplantación precoces es fragmentaria; aunque se ha descrito la distribución de algunos antígenos glicosilados en tejidos embrionarios murinos (Randle 1983).

Muchas de las moléculas de matriz extracelular asociadas con superficies celulares son también glicoproteínas y proteoglicanos (Aplin, Hughes 1982). Algunas de ellas se han detectado durante el periodo postimplantatorio precoz localizadas en membranas basales (Wu y cols. 1983); la individualización de la composición de tejidos y esbozos de órganos durante el desarrollo precoz puede proporcionar indicios referentes a las macromoléculas que toman parte en la comunicación intercelular y en los cambios en el comportamiento celular.

El ciclo de células embrionarias en algunos casos se parece más al ciclo de células tumorales que al de células adultas normales, especialmente con respecto a las propiedades de la superficie celular o al papel atribuido a la función de la superficie celular. De manera consecuente, uno de los objetivos colectivos de estudios previos ha sido comparar la expresión de antígenos de superficie celular por células embrionarias con la expresión de antígenos superficiales por células normales o tumorales.

Hay diversos estudios con espermatozoides o componentes del mismo como inmunógenos para sintetizar anticuerpos contra el espermatozoides. En su mayoría con el objetivo de controlar la fertilidad. En uno de los estudios (Menge y Fleming, 1978) se produjeron IgG sérica e IgA calostroal contra espermatozoides de ratón, en conejos. Los anticuerpos IgG detectaron antígenos en ovocitos y en todos los estados de preimplantación. La absorción de este antisuero con tejido ovárico murino extrae toda la actividad contra todas las etapas de la preimplantación, con excepción hecha de las fases de 4 y 8 células y blastocística. La IgA calostroal de los mismos conejos reaccionó únicamente con las etapas de 4 y 8 células y blastocística. Estos resultados llevaron a la conclusión de que estos anticuerpos estaban detectando los antígenos de superficie celular expresados por embriones de preimplantación murinos; uno ya expresado en huevos no

fertilizados y el otro expresándose por vez primera después de la fertilización.

Investigaciones anteriores de isoanticuerpos antiesperma de conejo (Menge y cols. 1974) habían demostrado por inmunofluorescencia que los blastocistos de conejo fijan anticuerpos IgA del líquido uterino pero no IgG uterina ni IgG ni IgA séricas. Además sólo la IgA uterina inhibió "in vitro" la formación de blastocistos. Por lo visto los antígenos de trasplante no están implicados en estas reacciones puesto que la absorción con linfocitos paternos no extrae los efectos antiembrionarios.

También se ha elaborado un antisuero xenogénico (en conejos) preparado contra células germinales fetales murinas de 13,5 días post coitum que reacciona con células germinales fetales, células germinales adultas murinas y células de carcinoma embrionario de líneas celulares de teratocarcinoma. No se observó reactividad con embriones de preimplantación con la posible excepción de la masa celular interna de blastocistos de 3,5 días.

En contraste con el espermatozoides, hay muy pocos intentos divulgados de emplear huevos de ratón como inmunógeno, debido principalmente a la dificultad de obtener grandes cantidades de huevos de ratón.

En la primera de estas experiencias divulgadas, se elaboró un suero antihuevo inyectando huevos no fertilizados de ratón a hembras de conejos de indias. El inmunógeno se trató con hialuronidasa (para extraer células foliculares) y con Pronasa (para extraer la zona pelúcida). Este antisuero era citotóxico para huevos no fertilizados tratados con Pronasa y para fibroblastos murinos transformados mediante el SV40 no tratados con Pronasa. No fue citotóxico para fibroblastos de otras especies sometidos al mismo tipo de tratamiento (Baranska y cols., 1970). Fue también citotóxico para embriones murinos de preimplantación; la masa celular interna era algo menos susceptible a la lisis que el trofotodermo. Este antisuero no lisó ninguna porción del huevo cilindro murino de seis ni de siete días; tampoco lisó células sanguíneas adultas murinas, ni espermatozoos (Moskalewski y Koprowski, 1972). El problema para interpretar los resultados obtenidos con este antisuero es el empleo de Pronasa sobre el inmunógeno junto con la omisión de probar el antisuero sobre células tratadas con Pronasa. Aunque las pruebas demostraron que el suero antihuevo podía lisar huevos con la zona pelúcida íntegra, la lisis disminuyó mucho y podría haber sido inespecífica puesto que no se absorbió el antisuero de ninguna manera (Moskalewski y Koprowski, 1972). La Pronasa puede alterar profundamente las propiedades de la superficie celular; y en particular, la antigenicidad de los

huevos murinos y de los embriones de preimplantación (Wiley y Calarco, 1975). Sin embargo, es necesario extraer la zona pelúcida de los materiales empleados como inmunógeno. La elevada inmunogenicidad de la zona murina probablemente impediría una respuesta inmune originada por antígenos embrionarios más débiles de la superficie celular debido a competición inmunológica.

Para evitar los problemas provocados por la Pronasa, se intentó conseguir un suero antihuevo administrando a ratones machos blastocistos cuya zona pelúcida se había extraído mediante pipeta bucal (Wiley y Calarco, 1975). Las inmunizaciones repetidas con un total de tres mil huevos por conejo no consiguieron producir un antisuero que reaccionara con huevos murinos no fertilizados tras la absorción con tejidos adultos murinos. Esta observación planteó la cuestión de si la superficie celular del huevo no fertilizado expresaba antígenos específicos de huevo que eran inmunogénicos normalmente.

Hay un éxito divulgado de un antisuero obtenido usando embriones murinos de preimplantación como inmunógeno. El antisuero se consiguió inyectando a conejos machos blastocistos cuya zona pelúcida se había extraído mediante pipeta bucal (Wiley y Calarco, 1975). Este antisuero reaccionó débilmente con huevos murinos no fertilizados y con

cigotos tras su absorción con tejidos murinos adultos (hígado, riñón y bazo). La reacción aumentó con cada mitosis hasta llegar a un máximo en la etapa de ocho a doce células; a partir de ahí, la reactividad disminuyó con las etapas sucesivas, estando ausente en los blastocistos. El suero antiblastocisto no reaccionó con cerebro ni espermatozoos ni con células ováricas murinas. Este antisuero provocaba una inhibición dependiente de la concentración del desarrollo de preimplantación in vitro cuando los cultivos se comenzaron en la etapa de dos células (Wiley y Calarco, 1975).

Hay dos antisueros distintos contra placentas murinas probados sobre embriones de preimplantación. Ambos se consiguieron en conejos.

El primero (antiplacenta A) se elaboró con vistas al control de la fertilidad (Kometani y cols., 1973). Tras su absorción con hígado, riñón y bazo murinos, el suero antiplacenta A reaccionaba con placenta y embriones precoces empezando en la etapa de dos células; los huevos no fertilizados y los cigotos fueron negativos. La reacción se conservó en la etapa de blastocisto y tenía lugar tanto en la masa celular interna como en las partes trofoblásticas de embriones precoces de postimplantación. El suero antiplacenta A inyectado en hembras murinas embarazadas provocaba pérdida

del embrión en el cuarto día de la gestación, antes de la implantación.

El segundo suero de conejo antiplacenta (antiplacenta B) se obtuvo específicamente para usarlo en estudios del desarrollo de la preimplantación (Wiley y Calarco, 1975). El suero antiplacenta B reaccionó con y lisó los huevos murinos no fertilizados y todas las etapas del desarrollo de la preimplantación tras su absorción con hígado, riñón y bazo de ratón adulto.

Es sorprendente la reacción positiva con huevos no fertilizados a la luz de la reacción negativa con huevos no fertilizados del suero antiplacenta A descrito. La masa celular interna y el trofoblasto de blastocistos precoces así como el endodermo de saco vitelino reaccionaron con el suero antiplacenta B; no así el ectodermo embrionario de masas celulares internas en cultivo.

A pesar de todo, el suero antiplacenta B no tuvo efecto alguno sobre el desarrollo in vitro de ratones de preimplantación.

Searle y Jenkinson (1978) han descrito un antisuero de conejo empleando como inmunógeno como ectoplacentario de ratón de 7,5 días. Usando una técnica de inmunoperoxidasa

indirecta estos investigadores no detectaron reacción alguna sobre huevos no fertilizados ni cigotos; sí se observaron zonas de tinción peroxidásica en las áreas externas de blastómeros de embriones de ocho células. La intensidad de la tinción aumentó en mórulas y trofotodermo de blastocistos formando una capa continua. Sin embargo, las masas celulares internas aisladas inmunoquirúrgicamente sólo se tiñeron ligeramente. Las células gigantes trofoblásticas y el ectodermo extraembrionario en el embrión de postimplantación mantuvieron la actividad fijadora de anticuerpo. Los antígenos reconocidos por este suero anticono placentario posiblemente estén confinados a las poblaciones celulares trofoblásticas.

Se preparó un antisuero de conejo (antiNS-4) contra cerebelo de ratón de cuatro días; reaccionó con espermatozoos, huevos fertilizados y no fertilizados y embriones en la etapa de morulación. La máxima reactividad se observó contra masas celulares internas y células trofotodérmicas de blastocistos (Solter y Schachner, 1976). También se preparó un antisuero alogénico (antiNS-5) contra cerebelo de ratón de cuatro días (Zimmerman y cols., 1976). Se fija en embriones de preimplantación a partir de la etapa de dos células hasta la etapa de blastocisto. Los espermatozoos maduros y las células renales postnatales del

cuarto día, pero no las adultas, expresan antígenos detectados por el antiNS-5.

Otro antisuero contra células cerebelosas murinas de seis a ocho días de edad (Seeds, 1975) presenta una reactividad parecida con las etapas de preimplantación murinas.

Solter y Schachner (1976) han demostrado también que un antisuero de conejo contra esplenocitos murinos presenta una actividad citotóxica progresivamente creciente entre las etapas de cigoto y de blastocisto.

Una ventaja muy útil de la investigación serológica de la superficie celular es que los anticuerpos proporcionan un instrumento muy útil para aislar moléculas transportadoras de los antígenos de diferenciación en los embriones murinos. Varios de los anticuerpos mejor caracterizados detectan determinantes glúcidos. Los embriones murinos más precoces expresan el antígeno I; pero no el antígeno i (Knowles y cols. 1982); mientras que en la diferenciación a endodermo, se expresan tanto el i como el I (Kapadia y cols. 1981).

Los diversos antígenos glúcidos transportados por glicolípidos y que muestran expresión específica de etapa, contienen una estructura glúcida común consistente en

unidades repetidas de N-acetil-lactosamina, los glicolípidos de la serie lacto. Se supone que la transición en la expresión de estos antígenos observada durante la embriogénesis ocurre mediante la modificación externa, añadiendo unos pocos glicidos a la estructura nuclear interna (Gooi y cols. 1981). Se ha demostrado la expresión específica de etapa secuencial de glicolípidos de la serie globo en el embrión de preimplantación; así se permite el reconocimiento de las estructuras interna y externa de los antígenos glicolípidos por los anticuerpos (Stern 1984).

Estos ejemplos de antígenos glicidos que varían durante la diferenciación sirven para subrayar la posible función de las partes glicidas en el desarrollo. Estos determinantes antigénicos pueden ser muy comunes (p. ej.: los grupos sanguíneos) y la expresión de los mismos sobre diversos tipos celulares específicos puede sencillamente ser el reflejo de modos distintos de trasladar la molécula antigénica en la membrana (Shinitzky y Souroujon 1979). Esto es, la molécula antigénica puede encontrarse más o menos "inmersa" en los fosfolípidos y colesterol de la membrana.

Ha sido muy difícil comprobar la función de numerosos antígenos definidos mediante antisueros convencionales sobre la superficie de células embrionarias murinas. Únicamente se han obtenido resultados positivos con antisueros xenogénicos

que impiden la compactación (Kemler y cols. 1977; Johnson y cols. 1979). Tales experimentos identificaron la ovomorulina que interacciona con iones  $Ca^{++}$  en la regulación de los contactos celulares (Hyafil y cols. 1980, 1981). Debe todavía determinarse la función biológica de las diversas estructuras glicidas transportadas por proteínas o lípidos. La mayoría de los antígenos embrionarios parecen ser de naturaleza glicida y ésto ha dirigido la atención a este tipo de molécula de superficie. Posiblemente hay otros tipos de moléculas inmunogénicas de las que pueden aislarse anticuerpos y realizar estudios similares.

Los antígenos del complejo mayor de histocompatibilidad son importantes en la determinación de las estructuras de la superficie celular. La expresión de los antígenos de histocompatibilidad puede ser importante en las interacciones celulares de la morfogénesis (Bennett y cols. 1971; Jacob 1977). Debido al interés de las relaciones inmunológicas entre el feto y la madre durante el desarrollo de los mamíferos se han realizado numerosos estudios dirigidos al estudio de la expresión antigénica del embrión precoz.

La mayor parte de los investigadores no han podido detectar antígenos H-2 en embriones murinos de preimplantación (Heyner y cols. 1969; Muggleton-Harris y Johnson 1976; Palm y cols. 1971). Por lo visto los antígenos

H-2 aparecen después de la implantación y están limitados a tejidos derivados de la masa celular interna (Searle y cols. 1975). La inmunoprecipitación revela que la síntesis de proteínas con especificidades antigénicas H-2 no tiene lugar hasta hasta la última etapa de blastocisto y sucede principalmente en la masa celular interna y no en el trofoblasto (Webb y cols. 1977). Sin embargo, otras investigaciones indican que los antígenos H-2 pueden expresarse muy débilmente en blastocistos.

Hakansson y cols. (1975) detectaron antígenos paternos H-2 en blastocistos con la implantación retrasada experimentalmente. La activación hormonal de estos blastocistos retrasados provocó la desaparición de estos antígenos coincidiendo con el comienzo de la implantación. Estudios inmunohistoquímicos (Searle y cols. 1976) demuestran que las células trofodérmicas expresan concentraciones bajas de antígenos H-2 que se pierden con motivo de la implantación. También se ha detectado beta-2-microglobulina, subunidad del complejo de histocompatibilidad principal y de otros antígenos de superficie celular, en blastocistos murinos (Hakansson, Peterson 1976).

Las líneas celulares derivadas de blastocistos murinos de cuatro días también expresan antígenos H-2 aunque algunas especificidades se desvían de la expresión esperada. Esto

puede indicar la presencia de antígenos H-2 incompletos o modificados en la superficie celular embrionaria (Johnson, Calarco 1980).

Sin embargo, se han detectado antígenos de histocompatibilidad secundarios (p. ej.: H-3, H-6) en mórulas y en blastocistos (masas celulares internas y trofotodermo) mediante técnicas serológicas y de aloinjerto (Palm y cols. 1971; Searle y cols. 1974). Estos antígenos no H-2 pueden o no (Sellens 1977) limitarse a las masas celulares internas o en blastocistos in vitro. La presencia de antígenos secundarios de histocompatibilidad en embriones es interesante pero no proporciona indicio alguno respecto a su función durante el desarrollo.

Se ha postulado que los alelos salvajes de una serie de haplotipos recesivos  $t$  en el complejo T/t del ratón especifican componentes de la superficie celular que funcionan en etapas de desarrollo identificadas por desarrollo anormal en los mutantes homocigotos

Uno de los haplotipos T/t ( $t^{1e}$  o  $t^{w3e}$ ) es mortal en homocigotos en la etapa de mórula a blastocisto (Hillman y cols. 1970), aunque  $t^{w3e}$  puede actuar en un momento ligeramente distinto del desarrollo que  $t^{1e}$  (Hillman, Hillman 1975).

Los antígenos de superficie están codificados, por lo visto, por alelos *t* mutados. Se han detectado varios haplotipos mutados en espermatozoos (Bennett y cols. 1971). Kemler y cols., (1976) han demostrado antígenos  $t^{33E}$  (mortal en la preimplantación),  $t^{10}$ ,  $t^0$  y  $t^{10}$  (mortales en la postimplantación) en embriones de ocho células. Por lo tanto aunque distintos haplotipos *t* pueden impedir el desarrollo en diversos momentos del desarrollo, sus antígenos respectivos no se expresan de manera secuencial durante el desarrollo.

Hay diversas analogías entre el complejo T/t y el complejo principal de histocompatibilidad (H-2) del ratón (Artzt y Bennett 1975). Estos dos complejos genéticos están unidos en el cromosoma 17, y sus productos pueden ser parecidos en peso molecular; ambos están asociados con un componente similar a la beta-2-microglobulina (Vitetta y cols. 1975) aunque quizá sean inmunológicamente distintos (Dubois y cols. 1976). Además, un mutado concreto *t* y todos los componentes de ese grupo *t* están asociados a un haplotipo H-2 dado (Levinson y McDevitt 1976).

Cada vez hay más pruebas de que el cáncer se acompaña de anomalías en la regulación genética expresadas en múltiples moléculas en la superficie de las membranas celulares. La

regulación genética anormal puede dirigir un bloqueo o un desvío en la síntesis y organización de moléculas de la superficie celular que intervienen en interacciones celulares, el desarrollo y la diferenciación (Hakomori, 1981). La enzimología clásica descubrió paralelismos en las desviaciones enzimáticas, especialmente en los patrones isozimicos, entre tejidos embrionarios y cancerosos (Weinhouse 1982); y la inmunología clásica reconoció parecidos antigénicos entre ambos tipos (Coggin y Anderson 1974). Los cambios dependientes de la diferenciación o asociados a tumores de clases químicamente bien definidas de moléculas de membrana como glicolípidos, polisacáridos y glicoproteínas, apoyan la idea de una expresión "oncofetal" o de "oncodiferenciación" de moléculas de superficie celular.

La cantidad y la organización de estas macromoléculas en las membranas y su reactividad con ligandos específicos no se definen únicamente según su origen genético; se encuentran también bajo control epigenético y varían de acuerdo con el ciclo celular y el contacto celular. Su expresión global refleja la etapa de la diferenciación y la transformación oncogénica.

Puesto que cada tipo celular posee un perfil específico de macromoléculas de superficie, el cambio de este perfil tras la transformación en cada tipo celular difiere mucho; a

menudo como resultado de la detención del desarrollo o de la regresión. Los cuatro tipos básicos de cambio son: bloqueo de la síntesis; neosíntesis; pérdida de la "respuesta de contacto" y cambios en la organización.

El bloqueo de la síntesis de macromoléculas en tumores, a menudo, se acompaña de una acumulación de sus precursores; la neosíntesis provoca la aparición de una macromolécula nueva. Cualquiera de ambos procesos comporta una acumulación de una macromolécula característica de células tumorales; pero ausente o escasa en células progenitoras no transformadas. Estos marcadores macromoleculares apenas son inmunogénicos para el huésped y se comparten con varios tipos de tumores. Son, por lo tanto, distintos de los clásicos "antígenos asociados a tumores" y es más apropiado el término "marcador tumoral". Su presencia se ha determinado mediante un sistemático análisis químico de tumores y de tejidos y células normales.

Diversas observaciones demuestran que las proteínas de membrana afectan la expresión inmunológica de antígenos glicolípidos. La reactividad de globósido en eritrocitos humanos y de algunos gangliósidos en linfocitos murinos (Stein y cols. 1978) aumentó muchísimo cuando se trataron las células con proteasas. Otros resultados (Gahmberg y Hakomori 1975) indican que la sialidasa y ciertas lectinas pueden

provocar una reorganización de las proteínas de membrana y pueden causar un aumento de la exposición de glicolípidos de membrana.

Otras experiencias indican que la reactividad de un glicolípido en la superficie celular podría quedar afectada por la interacción con un segundo o tercer glicolípido (Stellner y cols. 1973).

Otro factor importante para determinar la reactividad de antígenos de membrana es el contenido de colesterol. Shinitzky y cols. (1979) observaron que la inmunogenicidad tumoral puede provocarse eficazmente por la incorporación de colesterol incubando las células con hemisuccinato de colesterol. Su hipótesis es que un antígeno tumoral latente puede convertirse en accesible al aumentar la rigidez de la capa lipídica de la membrana.

Ciertos determinantes antigénicos, como los del grupo sanguíneo ABH, son transportados por estructuras polilactosaminil de diferentes longitudes de cadena. La reactividad de dos determinantes en una estructura ramificada es mucho mayor que la del mismo determinante en una estructura no ramificada. Tal estructura recibe el nombre de "bivalencia monógama" (Klinman, Karush 1967).

Las diferencias en composición de ceramidas afectan el estado de organización de los glicolípidos en las membranas de la superficie celular de modo que alteran la reactividad de los glicolípidos a sus anticuerpos y ligandos. En tejidos y células normales, la composición de ceramidas se encuentra estrictamente regulada. También se encuentra regularidad entre la composición de ceramidas y la estructura de los glicidos (Kannagi y cols. 1982). En células y tejidos tumorales, se observan alteraciones en la regularidad normal entre composición de ceramidas y estructura de glicidos. Tal discordancia puede provocar un cambio drástico en la estabilidad glicolípida de la capa lipídica y puede potenciar la antigenicidad glicolípida (Hakomori y Kannagi 1983).

La reactividad de los glicolípidos de membrana depende mucho de la naturaleza de los ligandos y del tipo de inmunoglobulina.

¿Por qué las células tumorales varían su cadena glicida tanto en los glicolípidos como en las glicoproteínas? La cuestión se relaciona con la función general básica de las cadenas glicidas en la superficie celular. La tendencia de algunos estudios es intentar entender cómo formaciones glicidas aberrantes pueden impedir el reconocimiento

intercelular. La ausencia de respuesta de contacto en la síntesis glicolípida puede reflejar el fracaso del reconocimiento celular (la respuesta de contacto es el aumento en la síntesis de moléculas en cultivos confluentes de células).

Un perfil aberrante de macromoléculas superficiales, como consecuencia del bloqueo de la síntesis o de neosíntesis, puede provocar un fracaso de la interacción celular mediado por una proteína reconocedora de glicidos (cognina) en la superficie de células congéneres; aunque la cognina no se altera con la transformación. La cognina podría ser una glicosiltransferasa (Shur 1982), una hidrolasa (Rauvala y Hakomori 1981), o una lectina animal (Barondes 1981). Aunque se han realizado descubrimientos sorprendentes de receptores de superficie celular para glicoproteínas séricas en hepatocitos y para enzimas lisosómicas en fibroblastos y aunque ha aumentado mucho el conocimiento de la endocitosis mediada por receptores (Neufeld y Ashwell 1980) no se han aplicado estos conocimientos a una posible función de la interacción glicido-cognina en la oncogénesis.

Una fase del reconocimiento celular conlleva el anclaje celular mediante matriz adhesiva (Culp 1978), placa adhesiva (Geiger 1979) o matriz insoluble con detergentes (Carter Hakomori 1981). Recientemente se ha prestado mucha atención

en los procesos moleculares asociados a estas formaciones, puesto que una pérdida de adhesividad celular se acompaña de transformación oncogénica, acumulación del producto del gen src (p60src) en el volumen citoplásmico de placas adhesivas focales (Rohrschneider 1980) y fosforilación de grupos tirosínicos de la vinculina en el lugar de adhesión (Septon y cols. 1982). Un grupo de proteínas de membrana (140K, 170K, 250K), la fibronectina y los componentes citoesqueléticos vinculina y actinina cooperan de manera muy organizada (Chen, Singer 1982). Aunque no se considera que los gangliósidos sean componentes funcionales de la placa adhesiva, podrían desempeñar funciones importantes en la adhesión celular puesto que: 1) los gangliósidos se encuentran tanto en la matriz substrato del anclaje como en la matriz insoluble con detergentes (Hagmann, Fishman 1982) y 2) los gangliósidos pueden inhibir la adhesividad sobre substrato recubierto de fibronectina (Kleinman y cols. 1979) así como sobre otros substratos de manera inespecífica (Rauvala y cols. 1981).

Puesto que se considera que las moléculas de la superficie celular tienen funciones de mediación en la expresión genética diferencial que caracteriza el desarrollo embrionario precoz, se emplean cultivos de células de teratocarcinoma como modelos de la superficie celular embrionaria. Como podría esperarse, los numerosos parecidos de células de carcinoma embrionario con células embrionarias

normales incluyen la expresión de moléculas comunes de la superficie celular.

Muchos de estos estudios se refieren al antígeno F9. Dicho antígeno es detectado mediante anticuerpos contra la línea celular de carcinoma embrionario murino F9. El antígeno F9 aparece pocas horas después de la fertilización y aumenta de cantidad en la superficie celular del embrión en desarrollo hasta la etapa de mórula. En el blastocisto se encuentra tanto en el trofocotodermo como en la masa celular interna y, tras la implantación, se expresa en el ectodermo embrionario. Desaparece del embrión alrededor del noveno día del desarrollo y no parece que sea expresado por ninguna otra célula adulta con excepción de las células germinales masculinas (Jacob 1977).

El cultivo de embriones de ratón en la presencia de suero antiF9 singénico o suero antiF9 xenogénico de conejo no inhibe el desarrollo preimplantatorio murino (Kemler y cols. 1977). Se ha sugerido que los antígenos F9 pueden estar relacionados con el calcio y con la formación de uniones intercelulares (Kemler y cols. 1977) puesto que los efectos del Fab antiF9 de conejo son similares a los observados cuando se incuban embriones en medios con poco  $Ca^{++}$ . Kemler y cols. (1977) observaron asimismo que los fragmentos Fab de anticuerpos de conejo contra F9 pueden inhibir de manera

reversible la compactación celular y la blastulación posterior en embriones murinos de preimplantación; aunque este anticuerpo por lo visto tiene pocos efectos sobre la división celular. Los fragmentos Fab de este anticuerpo inhiben, también, la adhesividad de células en las masas celulares internas aisladas de blastocistos precoces así como de las células en cultivos de carcinoma embrionario, sin inhibir su división (Jacob 1977).

Se ha indicado que el antígeno de célula tallo detectado mediante antisueros contra F9 es el producto de un gen o genes en el locus T/t (Kewler y cols. 1976). Este complejo genético afecta a la embriogénesis precoz, como se demostró al observar que los embriones homocigotos mutados para ciertos T/t mueren en etapas concretas de desarrollo precoz (Sherman, Wudl 1977). La hipótesis de que los productos del complejo T/t son antígenos de superficie celular que participan en pasos críticos del desarrollo precoz fundamenta el concepto de que el antígeno F9 puede estar codificado por el complejo T/t. Aunque algunos datos indican que los genes en el locus T/t especifican antígenos de superficie celular, y apuntan que el antígeno F9 puede estar entre ellos, las pruebas no son concluyentes (Dewey y cols. 1977). También se ha sugerido que productos codificados por T/t, incluyendo posiblemente el antígeno F9, forman parte de un sistema de reconocimiento embrionario homólogo bioquímicamente del

complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) (Artzt, Bennett 1975). La observación de que las células que expresan el antígeno F9 generalmente no expresan antígenos del MHC (antígenos H-2 del ratón) y viceversa concuerda con esa idea (Solter, Knowles 1979). Aunque otros estudios indican que una homología estructural grande entre los antígenos F9 y H-2 es improbable (Muramatsu y cols. 1978).

Edidin y cols. (1971) consiguieron un anticuerpo de conejo contra cuerpos embrioides de una sublínea ascítica multipotencial (402AX) del teratocarcinoma de la cepa murina 129. Esta sublínea se desarrolla en cuerpos embrioides. Este anticuerpo era citotóxico para huevos de ratón no fertilizados tratados con Pronasa; también era citotóxico para fibroblastos murinos transformados por el SV40. Este anticuerpo también se fijaba en la masa celular interna de blastocistos murinos y en el endodermo embrionario de embriones murinos de seis días. Estos autores sugieren que los antígenos detectados pueden ser característicos de antígenos superficiales presentes en células embrionarias antes de la aparición de antígenos de histocompatibilidad principales (H-2). Cuando este antisero se absorbió con tejidos murinos normales, conservó su positividad (inmunofluorescencia) para el teratoma y presentó reacciones cruzadas con antígenos de huevos murinos no fertilizados. Estos antígenos de teratoma no se observaron en células

murinas normales (Gooding, Edidin 1974). Los estudios adicionales de absorción demostraron que este antisuero detectaba, por lo menos, tres antígenos distintos. Uno de ellos (antígeno III) era específico de teratoma (Gooding, Edidin 1974), mientras que los otros dos (antígenos I y II) explicaban la reactividad del antisuero con huevos murinos y embriones (Gooding y cols. 1976). El antígeno I, que se expresa en primer lugar en huevos no fertilizados, se restringe a la masa celular interna en blastocistos antes de la implantación. El antígeno II, que se expresa en el trofotodermo mural del blastocisto, se extiende para incluir el trofotodermo polar y posteriormente se restringe a la masa celular interna de embriones de postimplantación.

Stern y cols. (1975) han descrito un anticuerpo singénico contra una línea celular de teratocarcinoma pluripotente (SIKR). Este anticuerpo reacciona con embriones murinos de cuatro a treinta y dos células, diversas células de carcinoma embrionario, espermatozoos, riñón y cerebro; pero no con hígado, timo, varias líneas celulares indiferenciadas o células endodérmicas de cuerpos embrioides. Artzt y cols. (1976) han descrito, asimismo, un antisuero hiperinmune murino contra un carcinoma endodérmico derivado de teratoma (Endo), que define antígenos superficiales sobre embriones murinos de ocho células, hígado embrionario,

espermatozoos, células tumorales endodérmicas y una pequeña proporción de tumores no endodérmicos.

Otro antisuero singénico contra teratocarcinoma murino pluripotente (PCC4) detecta antígenos en espermatozoos adultos y en la masa celular interna de blastocistos recién implantados; pero no detecta antígenos en células murinas durante la etapa de preimplantación (Gachelin y cols. 1977). Las masas celulares internas de blastocistos cultivados in vitro no presentan una reactividad semejante en pruebas de inmunofluorescencia.

Calarco y Linney prepararon un antisuero de conejo heterólogo contra la forma indiferenciada de una línea celular derivada de la PCC4 (PCC4-Aza-1). Las investigaciones preliminares usando inmunofluorescencia demostraron que este anticuerpo reacciona con masas celulares internas aisladas in vivo inmunquirúrgicamente de blastocistos cultivados in vitro (Solter, Knowles 1975).

Un antisuero singénico preparado contra cuerpos embrioides multipotenciales de la forma ascítica del teratocarcinoma trasplantable OTT6050 reconoce antígenos de superficie celular sobre embriones murinos desde la etapa de dos células hasta la etapa de blastocisto (Dewey y cols. 1977). Tanto la masa celular interna como el trofoblasto de

blastocistos son positivos aunque los huevos no fertilizados son negativos. Los embriones de preimplantación resultado de uniones de heterocigotos  $+/t^{1E}$  son positivos de modo uniforme. Este antisuero también reacciona con varios tejidos adultos normales, incluyendo ovario y testículo, pero no espermatozoos.

Un antisuero de conejo contra una línea celular de teratocarcinoma nulipotencial (Nulli-SCC-1) detecta los antígenos superficiales siguientes: en ovocitos foliculares murinos, huevos no fertilizados, cigotos, todas las etapas de preimplantación, masas celulares internas aisladas inmunquirúrgicamente y blastocistos de uniones de heterocigotos  $+/t^{1E}$  (Calarco, Banka 1979). El suero anti N-1 reacciona también con ovocitos primarios de 15½ días; pero no con espermatogonias de 15½ días ni con espermatozoos maduros. El cultivo en suero anti N-1 inhibe el desarrollo normal de una manera dependiente de la concentración. Sin embargo, el suero no es citotóxico para los embriones de preimplantación en pruebas de citotoxicidad mediada por complemento.

Las fases del desarrollo embrionario estudiadas en esta tesis están dominadas por la formación y la migración del mesénquima del surco primitivo y su diferenciación en alantoides, partes del saco vitelino y amnios así como derivados mesodérmicos embrionarios como los primeros

derivados mesodérmicos embrionarios como los primeros somitos. Estos tejidos difieren en sus perfiles fijadores de los anticuerpos empleados; no sólo respecto al mesénquima de la línea primitiva sino también uno respecto al otro.

La tinción a menudo fue intensa en la superficie celular; especialmente en las células que se relacionan con una cavidad. Con microscopio óptico no es posible determinar si los anticuerpos se fijaron a la membrana celular y a sus componentes extrínsecos o a estructuras por debajo de la membrana celular o a ambos. Puede ser significativo el hecho de que ambos anticuerpos tiñen el endodermo visceral; éste es un tejido muy fagocítico conteniendo muchas vesículas membranosas. El marcaje intenso de la superficie externa del endodermo visceral y las superficies de las células limitantes de la cavidad proamniótica puede reflejar la mayor cantidad de membrana en estas superficies celulares.

Hay ciertos parecidos en los patrones tintoriales de estos anticuerpos que tienen especificidad por derivados mesodérmicos. Sin embargo existen también diferencias en el marcado.

Un ejemplo de parecido en el patrón tintorial es la unión con el endodermo visceral que fue más intenso para el antiBS1 que para el antiBC1. Por el contrario, el endodermo

parietal no quedó teñido por el antiBC1; pero sí fue marcado por el antiBS1 aunque, incluso en este último caso, la intensidad disminuyó a los 8 días.

Esto sugiere que los grupos receptores para el antiBS1 se encuentran en densidad decreciente en este tejido. Es de notar asimismo que la unión del antiBC1 no queda restringida a la superficie celular. El marcado de la superficie celular fue más intenso que el del citoplasma. Estos patrones de reacción indican la presencia de grupos reactivos en células del endodermo visceral, especialmente en las estructuras superficiales. La superficie de la cavidad amniótica es rica en grupos reactivos receptores para el antiBC1.

El antiBC1 no tiñe la porción apico-basal limitante del endodermo embrionario visceral; por el contrario, el antiBS1 sí tiñe la superficie limitante con el ectodermo primitivo. El antiBS1 tiñe también la superficie limitante del endodermo con el ectodermo; el antiBC1 no marca esta estructura. Obsérvese, además, que las células del endodermo visceral de 6 días son más cuboideas en comparación con las de 7 días; las células del endodermo visceral de 7 días son más columnares.

Esto concuerda con lo publicado en la literatura respecto al antígeno F9. Este antígeno se ha definido

mediante un antisuero singénico murino; aparece en embriones de preimplantación y se expresa hasta el 8º día de desarrollo. Este antígeno presenta asimismo una relación recíproca interesante en cuanto a expresión con los antígenos H-2 (Jacob 1977).

Sin embargo, los antisueros antiF9 contienen muchas clases de anticuerpos que difieren en su especificidad concreta; el empleo de diversas técnicas lleva a detectar distintas estructuras antigénicas (Stern 1984).

Se han descrito otros antígenos, como la brochina. Esta no se expresa en los embriones de preimplantación, aunque sí en la superficie externa de la MCI de un blastocisto tardío. En embriones de 6 días, la brochina se detecta únicamente en el endodermo visceral (Sato y cols. 1985).

Es importante, por lo tanto, saber a qué tipo de células embrionarias precoces se parecen las células de carcinoma embrionario. Durante la embriogénesis precoz, la población celular pluripotencial en el embrión normal sufre muchos cambios morfológicos y bioquímicos. Ya se ha visto que las diferencias entre células pluripotenciales en varias etapas del desarrollo quedan reflejadas en los tipos celulares a que dan lugar. Algunas líneas de células de carcinoma embrionario

dan lugar a células parecidas a las del endodermo primario (Martin 1980).

Esto sugiere analogías entre células de carcinoma embrionario y células de la MCI embrionaria. Los cuerpos embrioides son el mejor ejemplo del patrón de diferenciación mostrado por las células de carcinoma embrionario. Con todo, es difícil establecer una equivalencia de potencialidades entre las células de carcinoma embrionario y algún linaje celular del embrión precoz.

Esta dificultad en seleccionar una población equipotente a las células embrionarias concuerda con la dificultad de establecer una homogeneidad de potencia dentro de una misma población embrionaria.

Así, Cockroft (1986) demuestra que las células del endodermo parietal de diferentes regiones en un mismo embrión presentan una heterogeneidad morfológica notable. Las células cercanas a la placenta mantienen el mismo aspecto bulloso durante el periodo estudiado; pero a medida que el embrión crece y por lo tanto se desarrolla el saco vitelino, las células distales suavizan la superficie y adquieren una forma redondeada. También presentan heterogeneidad las células del endodermo parietal de embriones de edades distintas. Se desconoce la significación funcional, si existe, de la

diversidad en la forma de las células del endodermo parietal. Hogan y Tilly (1981) habían demostrado previamente que, cuando el endodermo visceral de ratones de 7 días se cultiva en contacto con ectodermo extraembrionario se diferencia hacia endodermo parietal. El endodermo parietal sintetiza grandes cantidades de laminina y de procolágeno tipo IV (proteínas características de la membrana de Reichert). Además, Gardner (1982), ha demostrado que las células de endodermo visceral, tras su inyección dentro de blastocistos, contribuyen casi exclusivamente al endodermo parietal de las quimeras resultantes.

Las potencialidades de los cuerpos embrioides BC1 y BS1 son distintas como se advierte comparando los patrones de electroblotting obtenidos con los antisueros. Así, el antiBC1 reacciona con una única proteína en todos los tejidos analizados; mientras que el antiBS1 reacciona con diversas proteínas en cada tejido. Esta amplitud de reacción permite pensar que las células componentes de los cuerpos embrioides BS1, y en concreto las de carcinoma embrionario, se encuentran ya comprometidas en diferenciaciones somáticas concretas. Las dos diferenciaciones embrionarias presentes son el endodermo visceral y el parietal (Damjanov y cols. 1987).

El anticuerpo antiBS1 tiñe derivados de las tres hojas embrionarias; el antiBC1 tiñe principalmente derivados del endodermo visceral. En definitiva, a partir de los patrones de marcado descritos, parece claro que los dos anticuerpos se fijan de manera predominante en la superficie de las células del embrión murino de postimplantación. Hay patrones específicos de fijación de anticuerpos característicos de cada tipo celular en una etapa dada del desarrollo, aunque no parece haber reacción específica de linaje para los anticuerpos empleados.

El conocimiento de las propiedades tintoriales será útil en el seguimiento de la diferenciación divergente de tejidos embrionarios y de células de carcinoma embrionario o de líneas celulares derivadas directamente de embriones en cultivo.

No está clara todavía la importancia embriológica de la presencia o ausencia de estos antígenos en algunos tejidos. Los estudios experimentales, como la perturbación del desarrollo embrionario empleando anticuerpos, pueden proporcionar pruebas acerca de la función de estos antígenos como receptores y en la adhesión y comunicación entre las células. Pueden, asimismo, aportar pruebas referentes a los posibles procesos de diferenciación de las células.

## **CONCLUSIONES**

1. Las células del teratocarcinoma OTT6050 procedente de la cepa murina 129/Sv pueden agregarse formando cuerpos embrioides.
2. Los gradientes discontinuos de Ficoll 400<sup>m</sup> permiten aislar diversos tipos morfológicos e inmunológicos de cuerpos embrioides del teratocarcinoma OTT6050.
3. Los antisueros obtenidos a partir de cuerpos embrioides (población BC1), que son semejantes a embriones de ratón de 3½ días, reaccionan con embriones de 6 y 7 días. Estos antisueros antiBC1, marcan el ectodermo extraembrionario y el endodermo visceral del embrión.
4. Los antisueros obtenidos de cuerpos embrioides similares a embriones de 6 días (BS1), reaccionan con derivados de las tres hojas embrionarias. Esta reacción, se observa en todos los embriones del periodo estudiado.
5. La técnica de ELISA permite comprobar la menor actividad del antisuero preparado contra los cuerpos embrioides BC1 comparada con la actividad del antisuero preparado contra los cuerpos embrioides BS1.

6. Como consecuencia deducimos que el antisuero obtenido contra los cuerpos embrioides BS1, posee una mayor diversidad de anticuerpos cuando se compara con el antisuero obtenido contra los cuerpos embrioides BC1.
7. La técnica del inmunoblotting permite comprobar la reactividad del antisuero elaborado contra los cuerpos embrioides BC1. Esta reactividad, se expresa frente a proteínas de peso molecular elevado de tejido testicular.
8. Empleando la misma técnica, el anticuerpo obtenido a partir de cuerpos embrioides BS1 da lugar a una amplia gama de reacciones con proteínas de pesos moleculares diversos. Las proteínas reaccionantes se encuentran en intestino, testículo, cerebro, hígado, músculo y riñón de ratón adulto macho de la cepa 129/Sv.
9. Las conclusiones precedentes indican la existencia de potencialidades distintas en los cuerpos embrioides BC1 comparadas con las potencialidades encontradas en los cuerpos embrioides BS1. Así, las células de los cuerpos embrioides BC1 son más pluripotentes que las células de los cuerpos embrioides BS1.

10. Los cuerpos embrioides BS1 tienen células determinadas hacia diferenciaciones concretas. Estas determinaciones corresponden presumiblemente al endodermo embrionario y extraembrionario, al ectodermo y al mesodermo.
  
11. Las células de carcinoma embrionario indiferenciadas de los cuerpos embrioides BC1 iniciarían su diferenciación de forma similar a las primeras fases de la embriogénesis murina normal. Esta diferenciación derivaría principalmente hacia la línea germinativa. Este hecho, concuerda con la hipótesis de Snow y Monk relativa a la estirpe germinativa. Según esta hipótesis, parte de las células del ectodermo primitivo embrionario estarían ya determinadas hacia la línea germinativa.
  
12. Los cuerpos embrioides siguen un proceso de diferenciación de tipo ontogénico semejante al que ocurre en las primeras fases de la embriogénesis murina normal. Este hecho, facilita su empleo como modelo para el estudio diferenciación de células cancerosas y embrionarias, poniéndose de manifiesto las relaciones existentes entre células cancerosas y embrionarias.
  
13. En consecuencia, los cuerpos embrioides derivados del teratocarcinoma OTT6050 son de gran utilidad para el estudio de los linajes embrionarios ya que nos permiten

obtener antisueros que reaccionan con etapas específicas de la diferenciación embrionaria.

14. El modelo presentado, en definitiva, permitiría en futuros trabajos obtención de anticuerpos monoclonales que serían de gran utilidad tanto para la obtención de marcadores embrionarios como tumorales.

## **BIBLIOGRAFIA**

- Abramczuk, J., W. Sawicki. 1974. Variation in dry mass and volume of non-fertilized oocytes and blastomeres of 1-2 and 4 celled mouse embryos. *J. Exp. Zool.* 188, 25-33.
- Absher, M. 1973. Hemocytometer counting. En "Tissue culture. Methods and applications." (ed. P.F. Kruse Jr., M.K. Patterson Jr.). pp 395-397. Academic Press. New York.
- Amenta, P.S., C.C. Clark, A. Martínez-Hernández. 1983. Deposition of fibronectin and laminin in the basement membrane of the rat parietal yolk sac: Immunohistochemical and biosynthetic studies. *J. Cell Biol.* 96, 104-111.
- Andrews, G.K., M. Dziadek, T. Tamaoki. 1982a. Expression and methylation of the mouse alpha-fetoprotein gene in embryonic, adult, and neoplastic tissues. *J. Biol. Chem.* 257, 5148-5153.
- Andrews, G.K., R.G. Janzen, T. Tamaoki. 1982b. Stability of alpha-fetoprotein messenger RNA in mouse yolk sac. *Dev. Biol.* 89, 111-116.

- Aplin, J.D., R.C. Hughes. 1982. Complex carbohydrates of the extracellular matrix. Structures, interactions and biological roles. *Biochim. Biophys. Acta* 694, 375-418.
- Artzt, K., L. Hamburger, H. Jakob, F. Jacob. 1976. Embryonic surface antigens: A "quasi-endodermal" teratoma antigen. *Dev. Biol.* 51, 152-157.
- Artzt, K., D. Bennett. 1975. Analogies between embryonic (T/t) antigens and adult major histocompatibility (H-2) antigens. *Nature* 256, 545-547.
- Balinsky, B.I. 1975. An introduction to embryology, 4th edition. W.B. Saunders, Philadelphia.
- Baranska, W., P. Koldovsky, H. Koprowski. 1970. Antigenic study of unfertilized mouse eggs: Cross reactivity with SV-40-induced antigens. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 67, 193-199.
- Barlow, D.P., N.R. Green, M. Kurkinen, B.L.M. Hogan. 1984. Sequencing of laminin B chain cDNAs reveal C-terminal regions of coiled alpha helix. *EMBO J.* 3, 2355-2362.
- Barondes, S. 1981. Lectins: their multiple endogenous cellular functions. *Annu. Rev. Biochem.* 50, 207-232.

Beddington, R.S.P. 1981. An autoradiographic analysis of the potency of embryonic ectoderm in the 8th day postimplantation mouse embryo. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 64, 87-104.

Bennett, D., E.A. Boyse, L.J. Old. 1971. Cell surface immunogenetics in the study of morphogenesis. En: "Cell Interactions". Ed. L.G. Silvestri, p. 247. North-Holland, Amsterdam.

Bittner, M., P. Kupferer, C.F. Morris. 1980. Electrophoretic transfer of proteins and nucleic acids from slab gels to diazobenzylxymethyl cellulose or nitrocellulose sheets. *Anal. Biochem.* 102, 459-471.

Bleil, J.D., P.M. Wassarman. 1980a. Structure and function of the zona pellucida: Identification and characterisation of the proteins of the mouse oocyte zona pellucida. *Dev. Biol.* 76, 185-202.

———. 1980b. Synthesis of zona pellucida proteins by denuded and follicle-enclosed mouse oocytes during culture in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 77, 1029-1033.

- . 1983. Sperm-egg interactions in the mouse: Sequence of events and induction of the acrosome reaction by a zona pellucida glycoprotein. *Dev. Biol.* 95, 317-324.
- Bolton, V.N., P.J. Oades, M.H. Johnson. 1984. The relationship between cleavage, DNA replication, and gene expression in the mouse 2-cell embryo. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 79, 139-163.
- Brinster, R.L. 1967. Protein content of the mouse embryo during the first five days of development. *J. Reprod. Fert.* 13, 413-420.
- Brinster, R.L., H.Y. Chen, M.E. Trumbauer, M.R. Avarbock. 1980. Translation of globin mRNA by the mouse ovum. *Nature* 283, 499-501.
- Brinster, R.L., H.Y. Chen, M. Trumbauer, B.V. Paynton. 1981. Secretion of proteins by the fertilized mouse ovum. *Exp. Cell Res.* 134, 291-296.
- Brinster, R.L., J.L. Wiebold, S. Runner. 1976. Protein metabolism in preimplanted mouse ova. *Dev. Biol.* 51, 215-224.

- Buc-Caron, M.H., G. Gachelin, M. Hofnung, F. Jacob. 1974. Presence of a mouse embryonic antigen of human spermatozoa. Proc. Natl. Acad. Sci. 71, 1730-1733.
- Calarco, P.G., C.L. Banka. 1979. Surface antigens of preimplantation mouse embryos. Biol. Reprod. 20, 699-704.
- Calarco, P.G., C.J. Epstein. 1973. Cell surface changes during preimplantation development in the mouse. Dev. Biol. 32, 208-213.
- Carter, W.G., S. Hakomori. 1981. A new cell surface detergent insoluble glycoprotein matrix of human and hamster fibroblasts: The role of disulfide bonds in stabilization of the matrix. J. Biol. Chem. 256, 6953-6960.
- Cascio, S.M., P.M. Wassarman. 1982. Program of early development in the mammal: Post-transcriptional control of a class of proteins synthesised by mouse oocytes and early embryos. Dev. Biol. 89, 397-408.
- Císcar Rius, F., P. Farreras Valenti. 1960. Diagnóstico hematológico, laboratorio y clínica. Pp. 83-95. Editorial Jims, Barcelona.

- Clark, J.M., E.M. Eddy. 1975. Fine structural observations on the origin and association of primordial germ cells of the mouse. *Dev. Biol.* 47, 136-155.
- Clegg, K.B., L. Piko. 1983. Poly(A) length, cytoplasmic adenylation and synthesis of poly(A)+RNA in early mouse embryos. *Dev. Biol.* 95, 331-341.
- Cockroft, D.L. 1986. Regional and temporal differences in the parietal endoderm of the midgestation mouse embryo. *J. Anat.* 145, 35-47.
- Coggin Jr., J.H., N.G. Anderson. 1974. Cancer, differentiation and embryonic antigens: some central problems. En "Advances in Cancer Research", vol. 19. (ed. G. Klein, S. Weinhouse). Academic Press.
- Cooper, A.R., H. MacQueen. 1983. Subunits of laminin are differentially synthesised in mouse eggs and early embryos. *Dev. Biol.* 96, 467-471.
- Copp, A.J. 1979. Interaction between inner cell mass and trophoctoderm of the mouse blastocyst. II. The fate of the

- polar trophoctoderm. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 51, 109-120.
- Cruz, Y.P., R.A. Pedersen. 1985. Cell fate in the polar trophoctoderm of mouse blastocysts as studied by microinjection of cell lineage tracers. *Dev. Biol.* 112, 73-83.
- Culp, L.A. 1978. Biochemical determinants of cell adhesion. *Curr. Top. Membr. Transp.* 11, 327-396.
- Curran, T., A.D. Miller, L. Zokas, I.M. Verma. 1984. Viral and cellular fos proteins: A comparative analysis. *Cell* 36, 259-268.
- Chavez, D.J., A.C. Enders. 1982. Lectin binding of mouse blastocysts: appearance of Dolichus biflorus binding sites on the trophoblast during delayed implantation and their subsequent disappearance during implantation. *Biol. Reprod.* 26, 545-552.
- Chavez, D.J., J. Van Blerkom. 1979. Persistence of embryonic RNA synthesis during facultative delayed implantation in the mouse. *Devl. Biol.* 70, 39-49.

- Chen, W., S.J. Singer. 1982. Immunoelectron microscopic studies of the sites of cell-substratum on cell-cell contacts in cultured fibroblasts. *J. Cell Biol.* 93, 205-222.
- Chisholm, J.C., M.H. Johnson, P.D. Warren, T.P. Fleming, S.J. Pickering. 1985. Developmental variability within and between mouse expanding blastocysts and their ICMs. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 86, 311-336.
- Damjanov, I., A. Damjanov, D. Solter. 1987. Production of teratocarcinomas from embryos transplanted to extra-uterine sites. En "Teratocarcinomas and embryonic stem cells" (ed. E. J. Robertson) pp. 1-18. IRL Press, Oxford.
- Damsky, C.H., J. Richa, D. Solter, K. Korudsen, C.A. Buck. 1983. Identification and purification of a cell surface glycoprotein mediating intracellular adhesion in embryonic and adult tissue. *Cell* 34, 455-466.
- Daniel, J.C. 1970. Dormant embryos in mammals. *BioScience* 20, 754-757.
- De Felici, M., A. McLaren. 1983. In vitro culture of mouse primordial germ cells. *Exp. Cell Res.* 144, 417-427.

- Dewey, M.J., J.D. Gearhart, B. Mintz. 1977. Cell surface antigens of totipotent mouse teratocarcinoma cells grown in vivo: Their relation to embryo, adult and tumor antigens. *Dev. Biol.* 55, 359-374.
- Dickson, A.D. 1963. Trophoblastic giant cell transformation of mouse blastocysts. *J. Reprod. Fertil.* 6, 465-466.
- . 1966. The form of the mouse blastocyst. *J. Anat.* 100, 335-348.
- Diwan, S.B., L.C. Stevens. 1976. Development of teratomas from the ectoderm of mouse egg cylinders. *J. Natl. Cancer Inst.* 57, 937-939.
- Dubois, P., M. Fellous, G. Gachelin, F. Jacob, R. Kemler, D. Pressman, N. Tanigaki. 1976. Absence of a serologically detectable association of murine  $\beta_2$ -microglobulin with the embryonic F9 antigen. *Transpl.* 22, 467-473.
- Ducibella, T., E. Anderson. 1975. Cell shape and membrane changes in the eight-cell mouse embryo. Prerequisites for morphogenesis of the blastocyst. *Dev. Biol.* 47, 45-58.

- Dyce, J., M. George, H. Goodall, T.P. Fleming. 1987. Do trophoctoderm and inner cell mass in the mouse blastocyst maintain discrete lineages? *Development* 100, 685-698.
- Dziadek, M. 1978. Modulation of alphafoetoprotein synthesis in the early postimplantation mouse embryo. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 46, 135-146.
- Dziadek, M., E. Adamson. 1978. Localisation and synthesis of alphafoetoprotein in postimplantation mouse embryos. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 43, 289-313.
- Dziadek, M., G.K. Andrews. 1983. Tissue specificity of alpha-fetoprotein messenger RNA expression during mouse embryogenesis. *EMBO J.* 2, 549-554.
- Eddy, E.M., A.C. Hahnel. 1983. Establishment of the germ cell line in mammals. En "7th Symposium of British Society for Developmental Biology" (ed. A. McLaren y C.C. Wylie), pp.41-69. Cambridge University Press, Inglaterra.
- Edidin, M., H.L. Patthey, E.J. McGuire, W.D. Sheffield. 1971. An antiserum to "embryoid body" tumor cells that reacts with normal mouse embryos. En "Embryonic and fetal antigens in cancer" (eds. N.G. Anderson, J.H. Coggin, Jr.)

- pp. 239-248. Natl. Tech. Information Service, Springfield, Va.
- Eiferman, F.A., P.R. Young, R.W. Scott, S.M. Tilghman. 1981. Intragenic amplification and divergence in the mouse gene. *Nature* 294, 713-718.
- Enders, A.C., R.L. Given, S. Schlafke. 1978. Differentiation and migration of endoderm in the rat and mouse at implantation. *Anat. Rec.* 190, 65-78.
- Enders, A.C., P.J. Chavez, S. Schlafke. 1981. Comparison of implantation in utero and in vitro. In *Cellular and molecular aspects of implantation* (ed. S.R. Glasser, D.W. Bullock), pp. 365-382. Plenum Press, New York.
- Engvall, E., P. Perlman. 1971. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunocytochemistry* 8, 871-874.
- Evans, M.J., M.H. Kaufman. 1983. Pluripotential cells grown directly from normal mouse embryos. *Cancer Surv.* 2, 185-207.

- . 1981. Establishment or culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* 292, 154-156.
- Faddy, M.J., R.G. Gosden, R.G. Edwards. 1983. Ovarian follicle dynamics in mice: A comparative study of three inbred strains and a F1 hybrid. *J. Endocrinol.* 96, 23-24.
- Finn, C.A. 1971. The biology of decidual cells. *Adv. Reprod. Physiol.* 5, 1-26.
- Flach, G., M.H. Johnson, P.R. Braude, R.A.S. Taylor, V.N. Bolton. 1982. The transition from maternal to embryonic control in the 2-cell mouse embryo. *EMBO J.* 1, 681-686.
- Fleming, T.P. 1987. A quantitative analysis of cell allocation to trophoctoderm and inner cell mass in the mouse blastocyst. *Dev. Biol.* 119, 520-531.
- Fleming, T.P., P. Cannon, S.J. Pickering. 1986. The role of the cytoskeleton in generating and stabilising an asymmetric distribution of endocytotic organelles during the process of cell polarization in the mouse preimplantation embryo. *Dev. Biol.* 113, 406-419.
- Fleming, T.P., H. Goodall. 1986. Endocytic traffic in

trophectoderm and polarized blastomeres of the mouse preimplantation embryo. *Anat. Rec.* 216, 490-503.

Fleming, T.P., S.J. Pickering. 1985. Maturation and polarization of the endocytotic system in outside blastomeres during mouse preimplantation development. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 89, 175-208.

Fleming, T.P., P.D. Warren, J.C. Chisholm, M.H. Johnson. 1984. Trophectodermal processes regulate the expression of totipotency within the inner cell mass of the mouse expanding blastocyst. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 84, 63-90.

Franke, W.W., C. Grund, C. Kuhn, B.W. Jackson, K. Illmensee. 1982. Formation of cytoskeletal elements during mouse embryogenesis. *Differentiation* 23, 43-59.

Gachelin, G. 1978. The cell surface antigens of mouse embryonal carcinoma cells. *Biochim. Biophys. Acta* 516, 27-60.

Gachelin, G., R. Kemler, F. Kelley, F. Jacob. 1977. PCC4, A new cell surface antigen common to multipotential embryonal carcinoma cells, spermatozoa and mouse early embryos. *Dev. Biol.* 57, 199-209.

- Gahmberg, C.G., S. Hakomori. 1975. Surface carbohydrates of hamster fibroblasts. II. Interaction of hamster NIL cell surface with *Ricinus communis* lectin and Concanavalin A as revealed by surface galactosyl label. *J. Biol. Chem.* 250, 2447-2451.
- Garbutt, C.L., J.C. Chisholm, M.H. Johnson. 1987a. The establishment of the embryonic:abembryonic axis in the mouse embryo. *Development* 100, 125-134.
- Garbutt, C.L., M.H. Johnson, M.A. George. 1987b. When and how does cell division order influence cell allocation to the inner cell mass of the mouse blastocyst? *Development* 100, 325-332.
- Gardner, R.L. 1982. Investigation of cell lineage and differentiation in the extraembryonic endoderm of the mouse embryo. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 68, 175-198.
- . 1983. Origin and differentiation of extraembryonic tissues in the mouse. *Int. Rev. Exp. Pathol.* 24, 63-133.
- . 1984. An in situ cell marker for clonal analysis of

development of the extra-embryonic endoderm in the mouse.  
*J. Embryol. Exp. Morphol.* 80, 251-288.

Gardner, R.L., M.H. Johnson. 1975. Investigation of cellular interaction and deployment in the early mammalian embryo using interspecific chimaeras between the rat and mouse. En "Cell Patterning (Ciba Found. Symp.)", pp. 183-200. Amsterdam: Associated Scientific Publishers.

Gardner, R.L., V.E. Papaioannou, S.C. Barton. 1973. Origin of the ectoplacental cone and secondary giant cells in mouse blastocysts reconstituted from isolated trophoblast and inner cell mass. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 30, 561-572.

Gardner, R.L., J. Rossant. 1979. Investigation of the fate of 4.5 d post coitum mouse ICM cells by blastocyst injection. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 52, 141-152.

Geiger, B. 1979. A 130K protein from chicken gizzard: Its localization of the termini of microfilament bundles in cultured chicken cells. *Cell* 18, 193-205.

Giebelhaus, D.H., J.J. Heikkila, G.A. Schultz. 1983. Changes in the quantity of histone and actin mRNA during the development of preimplantation mouse embryos. *Dev. Biol.* 98, 148-154.

- Glass, R.H., J. Aggeler, A. Spindle, R.A. Pederson, Z. Werb. 1983. Degradation of extracellular matrix by mouse trophoblast outgrowths: A model for implantation. *J. Cell Biol.* 96, 1108-1116.
- Goodall, H., M.H. Johnson. 1984. The nature of intercellular coupling within the preimplantation mouse embryo. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 79, 53-76.
- Gooding, L.R., M. Edidin. 1974. Cell surface antigens of a mouse testicular teratoma. Identification of an antigen physically associated with H-2 antigens on tumor cells. *J. Exp. Med.* 140, 61-78.
- Gooding, L.R., Y.-C. Hsu, M. Edidin. 1976. Expression of teratoma-associated antigens on murine ova and early embryos. *Dev. Biol.* 49, 479-486.
- Gooi, H.C., T. Feizi, A. Kapadia, B.B. Knowles, D. Solter, M.J. Evans. 1981. Stage-specific embryonic antigen involves  $\alpha 1 \rightarrow 3$  fucosylated type 2 blood group chains. *Nature* 292, 156-158.

- Gorin, M.B., S.M. Tilghman. 1980. Structure of the gene in the mouse. Proc. Natl. Acad. Sci. 77, 1351-1355.
- Graham, C.F., Z.A. Deussen. 1978. Features of cell lineage in preimplantation mouse embryos. J. Embryol. Exp. Morphol. 48, 53-72.
- Graham, C.F., E. Lehtonen. 1979. Formation and consequences of cell patterns in preimplantation mouse development. J. Embryol. Exp. Morphol. 49, 277-294.
- Granholm, N.H., G.M. Brenner. 1976. Effects of cytochalasin B (CB) on the morula-to-blastocyst transformation and trophoblast outgrowth in the early mouse embryo. Exp. Cell Res. 101, 143-153.
- Greve, J.M., P.M. Wassarman. 1985. Mouse egg extracellular coat is a matrix of interconnected filaments possessing a structural repeat. J. Mol. Biol. 181, 253-264.
- Gurdon, J.B. 1987. Embryonic induction - molecular prospects. Development 99, 285-306.
- Hagmann, J., P.H. Fishman. 1982. Detergent extraction of

- cholera toxin and gangliosides from cultured cells and isolated membranes. *Biochim. Biophys. Acta* 720, 181-187.
- Hakansson, S., P.A. Peterson. 1976. Presence of beta-2-microglobulin on the implanting mouse blastocyst. *Transpl.* 21, 358-360.
- Hakansson, S., S. Heyner, K.-G. Sundqvist, S. Bergstrom. 1975. The presence of paternal H-antigens on hybrid mouse blastocysts during experimental delay of implantation and the disappearance of these antigens after onset of implantation. *Int. J. Fert.* 20, 137-140.
- Hakomori, S., R. Kannagi. 1983. Glycosphingolipids as tumor-associated and differentiation markers. *JNCI* 71, 231-251.
- Hakomori, S. 1981. Glycosphingolipids in cellular interaction, differentiation, and oncogenesis. *Annu. Rev. Biochem.* 50, 733-764.
- Hames, B.D. 1984. Choice of conditions for density gradient centrifugation. En "Centrifugation: a practical approach. (2nd edition)." (ed. D. Rickwood), pp. 45-93. IRL Press Ltd. Oxford y Washington.

- Harper, M.I., M.Fosten, M. Monk. 1982. Preferential paternal X-inactivation in extraembryonic tissues of early mouse embryos. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 67, 127-135.
- Hartmann, J.F., C.F. Hutchison. 1981. Modulation of fertilization in vitro by peptides released during hamster sperm-zona pellucida interaction. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 78, 1690-1694.
- Heyner, S., R.L. Brinster, J. Palm. 1969. Effect of isoantibody on preimplantation mouse embryos. *Nature* 222, 783-784.
- Hillman, N., R. Hillman. 1975. Ultrastructural studies of  $t^{32}/t^{32}$  mouse embryos. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 33, 685-695.
- Hillman, N., R. Hillman, G. Wileman. 1970. Ultrastructural studies of cleavage stage  $t^{12}/t^{12}$  mouse embryos. *Am. J. Anat.* 128, 311-340.
- Hogan, B.L.M. 1980. High molecular weight extracellular proteins synthesized by endoderm cells derived from mouse teratocarcinoma cells and normal extraembryonic membranes. *Dev. Biol.* 76, 275-285.

- Hogan, B.L., R. Tilly. 1981. Cell interactions and endoderm differentiation in cultured mouse embryos. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 62, 379-394.
- Hogan, B., F. Costantini, E. Lacy. 1986. Manipulating the Mouse Embryo. A Laboratory Manual, pp. 19-77. Cold Spring Harbor Laboratory.
- Hogan, B.L.M., D.P. Barlow, R. Tilly. 1983. F9 teratocarcinoma cells as a model for the differentiation into parietal and visceral endoderm in the mouse embryo. *Cancer Surv.* 2, 115-140.
- Hogan, B.L.M., D.P. Barlow, M. Kurkinen. 1984. Reichert's membrane as a model system for biosynthesis of basement membrane components. *CIBA Found. Symp.* 108, 60-69.
- Hogan, B.L.M., P. Holland, P. Schofield. 1985. How is the mouse segmented? *Trends Genet.* 1, 67-74.
- Hoppe, P.C., K. Illmensee. 1977. Microsurgically produced homozygous-diploid uniparental mice. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 74, 5657-5661.

- . 1981. Full-term development after transplantation of parthenogenetic embryonic nuclei into fertilized mouse eggs. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 74, 5657-5661.
- Howlett, S.K., V.N. Bolton. 1985. Sequence and regulation of morphological and molecular events during the first cell cycle of mouse embryogenesis. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 87, 175-206.
- Hsueh, A.J.W., E.Y. Adashi, P.B.C. Jones, T.H. Welsh. 1984. Hormonal regulation of the differentiation of cultured ovarian granulosa cells. *Endocrine Rev.* 5, 76-127.
- Hyafil, F., D. Morello, C. Babinet, F. Jacob. 1980. A cell surface glycoprotein involved in the compaction of embryonal carcinoma cells and cleavage stage embryos. *Cell* 21, 927-934.
- Hyafil, F., C. Babinet, F. Jacob. 1981. Cell-cell interactions in early embryogenesis: A molecular approach to the role of calcium. *Cell* 26, 447-454.
- Ilgren, E.B. 1981. Homotypic cellular interactions in mouse trophoblast development. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 62, 183-202.

- Izquierdo, L. 1977. Cleavage and differentiation. En "Development in mammals" vol. 2 pp. 99-118 (ed. M.H. Johnson). North Holland Publishing Company, Amsterdam, Nueva York, Oxford.
- Jackson, B.W., C. Grund, E. Schmid, K. Burki, W.W. Franke, K. Illmensee. 1980. Formation of cytoskeletal elements during mouse embryogenesis. I. Intermediate filaments of the cytokeratin type and desmosomes in preimplantation embryos. *Differentiation* 17, 161-179.
- Jackson, B.W., C. Grund, S. Winter, W.W. Franke, K. Illmensee. 1981. Formation of cytoskeletal elements during mouse embryogenesis. II. Epithelial differentiation and intermediate-sized filaments in early postimplantation embryos. *Differentiation* 20, 203-216.
- Jacob, F. 1977. Mouse teratocarcinoma and embryonic antigens. *Immunological Rev.* 33, 3-32.
- Jenkinson, E.J., I.B. Wilson. 1970. In vitro support system for the study of blastocyst differentiation in the mouse. *Nature* 228, 776-777.

- Johnson, M.H. 1981. The molecular and cellular basis of preimplantation mouse development. *Biol. Rev.* 56, 463-498.
- Johnson, M.H. 1986. Manipulation of early mammalian development: what does it tell us about cell lineages? In *Developmental biology: a comprehensive synthesis* (ed. R.B.L. Gwatkin), pp. 279-296. New York & London: Plenum Press.
- Johnson, M.H., B. Maro. 1984. The distribution of cytoplasmic actin in mouse 8-cell blastomeres. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 82, 97-117.
- . 1985. A dissection of the mechanisms generating and stabilizing polarity in mouse 8- and 16-cell blastomeres: the role of cytoskeletal elements. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 90, 311-334.
- . 1986. Time and space in the mouse early embryo: a cell biological approach to cell diversification. In *Experimental approaches to mammalian embryonic development* (ed. J. Rossant, R. Pedersen), pp. 35-66. Cambridge University Press, England.
- Johnson, L.V., P.G. Calarco. 1980. Mammalian preimplantation development: The cell surface. *Anat. Rec.* 196, 201-219.

- Johnson, M.H., J.C. Chisholm, T.P. Fleming, E. Houlston.  
1986a. A role for cytoplasmic determinants of the mouse  
early embryo? *J. Embryol. Exp. Morphol.* 97 Suppl., 97-121.
- Johnson, M.H., B. Maro, M. Takeichi. 1986b. The role of cell  
adhesion in the synchronization and orientation of  
polarization in 8-cell mouse blastomeres. *J. Embryol.  
Exp. Morphol.* 93, 239-255.
- Johnson, M.H., J. McConnell, J. Van Blerkom. 1984. Programmed  
mouse development. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 83, Suppl.,  
197-231.
- Johnson, M.H., H.P.M. Pratt. 1983. Cytoplasmic localizations  
and cell interactions in the formation of the mouse  
blastocyst. En "*Time, Space and Pattern in Embryonic  
Development*", (eds. W.R. Jeffrey & R.A. Raff), pp.287-312.  
New York: Alan R. Liss Inc.
- Johnson, M.H., H.P.M. Pratt, A.H. Handyside. 1981. The  
generation and recognition of positional information in  
the preimplantation mouse embryo. En "*Cellular and*

Molecular Aspects of Implantation". S.R. Glasser, D.W. Bullock, eds. Plenum, New York, pp. 55-74.

Johnson, M.H., C.A.Ziomek. 1981a. Induction of polarity in mouse 8-cell blastomeres: specificity, geometry, & stability. *J. Cell Biol.* 91, 303-308.

———. 1981b. The foundation of two distinct cell lineages within the mouse morula. *Cell* 24, 71-80.

———. 1983. Cell interactions influence the fate of blastomeres undergoing the transition from the 16- to the 32-cell stage. *Dev. Biol.* 95, 211-218.

Johnson, M.H., S. Chakraborty, A.H. Handyside, K.R. Willison, P.L. Stern. 1979. The effect of prolonged decapsulation on the development of the preimplantation mouse embryo. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 54, 241-261.

Kannagi, R., E. Nudelman, S. Hakomori. 1982. Possible role of ceramide in defining structure and function of membrane glycolipids. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 79, 3470-3474.

Kapadia, A., T. Feizi, M.J. Evans. 1981. Changes in the expression and polarization of blood group I and i antigens in post-implantation embryos and teratocarcinomas

- of mouse associated with cell differentiation. *Exp. Cell Res.* 131, 185-195.
- Karfunkel, P. 1974. The mechanism of neural tube formation. *Int. Rev. Cytol.* 38, 245-271.
- Kaufman, M.H. 1981. Parthenogenesis: A system facilitating understanding of factors that influence early mammalian development. *Prog. Anat.* 1, 1-34.
- . 1982. The chromosome complement of single-pronuclear haploid mouse embryos following activation by ethanol treatment. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 71, 139-154.
- . 1983a. Early mammalian development: parthenogenetic studies. *Dev. Cell Biol.* 14.
- . 1983b. Ethanol-induced chromosomal abnormalities at conception. *Nature* 302, 258-260.
- Kaufman, M.H., S.C. Barton, M.A.H. Surani. 1977. Normal post-implantation development of mouse parthenogenetic embryos to the forelimb bud stage. *Nature* 265, 53-55.

- Kaufman, M.H., E.J. Robertson, A.H. Handyside, M.J. Evans. 1983. Establishment of pluripotential cell lines from haploid mouse embryos. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 73, 249-261.
- Kelly, S.J. 1977. Studies on the development potential of 4- and 8-cell stage mouse blastomeres. *J. Exp. Zool.* 200, 365-376.
- Kemler, R., C. Babinet, H. Condamine, G.Gachelin, J.-L. Guenet, F. Jacob. 1976. Embryonal carcinoma antigen and the T/t locus of the mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 73, 4080-4084.
- Kemler, R., C. Babinet, H. Eisen, F. Jacob. 1977. Surface antigen in early differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 74, 4449-4452.
- Kirby, D.R.S., D.M. Potts, I.B. Wilson. 1967. On the orientation of the implanting blastocyst. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 17, 527-532.
- Kleinman, H.K., G.R. Martin, P.H. Fishman. 1979. Ganglioside inhibitor of fibronectin-mediated cell adhesion to collagen. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 76, 3367-3371.



- Klinman, N.R., F. Karush. 1967. Equine anti-hapten antibody. V. The nonprecipitability of bivalent antibody. *Immunochemistry* 4, 387-390.
- Knowles, B.B., J. Rappaport, D. Solter. 1982. Murine embryonic antigen (SSEA-I) is expressed on human cells and structurally related human blood group antigen I is expressed on mouse embryos. *Dev. Biol.* 93, 54-58.
- Kometani, K., D. Paine, J. Cossman, S.J. Behrman. 1973. Detection of antigens similar to placental antigens in mouse fertilized eggs by immunofluorescence. *Am. J. Obstet. Gynec.* 116, 351-357.
- Kratzer, P.G., V.M. Chapman, H. Lambert, R.E. Evans, R.M. Liskay. 1983. Differences in the DNA of the inactive X chromosome of fetal and extraembryonic tissues of mice. *Cell* 33, 37-42.
- Kurkinen, M., D.Pa Barlow, D. Helfman, J.G. William, B.L.M. Hogan. 1983a. cDNAs for basement membrane components. Type IV collagen. *Nucleic Acid Res.* 11, 6199-6209.
- Kurkinen, M., D.P. Barlow, J.R. Jenkins, B.L.M. Hogan. 1983b.

- In vitro synthesis of laminin and entactin polypeptides.  
J. Biol. Chem. 258, 6543-6548.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227, 680-685.
- Lane, E.B., B.L.M. Hogan, M. Kurkinen, J.J. Garrels. 1983. Coexpression of vimentin and cytokeratins in parietal endoderm cells of the early mouse embryo. Nature 303, 701-704.
- Le Douarin, N. 1982. The neural crest. Cambridge University Press, England.
- Lehtonen, E. 1980. Changes in cell dimensions and intracellular contacts during cleavage-stage cell cycles in mouse embryonic cells. J. Embryol. Exp. Morphol. 58, 231-249.
- Lehtonen, E., V.-P. Lehto, R. Paasivuo, I. Virtanen. 1983a. Parietal and visceral endoderm differ in their expression of intermediate filaments. EMBO J. 2, 1023-1028.
- Lehtonen, E., V.-P. Lehto, T. Vartio, R.A. Badley, I. Virtanen. 1983b. Expression of cytokeratin polypeptides in

- mouse oocytes and preimplantation embryos. *Dev. Biol.* 100, 158-165.
- Leivo, I., A. Vaheri, R. Timpl, J. Wartiovaara. 1980. Appearance and distribution of collagens and laminin in the early mouse embryo. *Dev. Biol.* 76, 100-114.
- Levine, A. 1974. Biochemical criteria for the in vitro differentiation of embryoid bodies produced by a transplantable teratoma of mice. The production of acetylcholinesterase and creatinine phosphokinase by teratoma cells. *J. Cell Physiol.* 84, 311-318.
- Levinson, J.R., H.O. McDevitt. 1976. Murine t factors: An association between alleles at t and at H-2. *J. Exp. Med.* 144, 834-839.
- Levy, J.B., M.J. Johnson, H. Goodall, B. Maro. 1986. The timing of compaction: control of a major developmental transition in mouse early embryogenesis. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 95, 213-237.
- Lewis, N.E., J. Rossant. 1982. Mechanism of size regulation in mouse embryo aggregator. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 72, 169-181.

- Lyon, M.F., S. Rastan. 1984. Parental source of chromosome implantation and its relevance for X-chromosome inactivation. *Differentiation* 26, 63-67.
- MacQueen, H.A. 1979. Lethality of radioisotopes in early mouse embryos. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 52, 203-208.
- Markert, C.L. 1982. Parthenogenesis, homozygosity, and cloning in mammals. *J. Hered.* 73, 390-397.
- Maro, B., M.H. Johnson, S.J. Pickering, G. Flach. 1984. Changes in actin distribution during fertilization of the mouse egg. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 81, 211-237.
- Maro, B., M.H. Johnson, S.J. Pickering, D. Louvard. 1985. Changes in the distribution of membranous organelles during mouse early development. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 90, 287-309.
- Maro, B., S.J. Pickering. 1984. Microtubules influence compaction in preimplantation mouse embryos. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 84, 217-232.

- Marotti, K.R., D. Belin, S. Strickland. 1982. The production of distinct forms of plasminogen activator by mouse embryonic cells. *Dev. Biol.* 90, 154-159.
- Martin, G.R. 1980. Teratocarcinoma and mammalian embryogenesis. *Science* 209, 768-776.
- Mayer, T.C. 1973. Site of gene action in Steel mice: Analysis of the pigment defect by mesodermal-ectodermal recombinations. *J. Exp. Zool.* 184, 345-352.
- McCoshen, J.A., D.J. McCallion. 1975. A study of the primordial germ cells during their migratory phase in Steel mutant mice. *Experientia* 31, 589-59.
- McGrath, J., D. Solter. 1983a. Nuclear transplantation in mouse embryos. *J. Exp. Zool.* 228, 355-362.
- . 1983b. Nuclear transplantation in the mouse embryo by microsurgery and cell fusion. *Science* 220, 1300-1302.
- . 1984a. Maternal T hp lethality in the mouse is a nuclear, not cytoplasmic defect. *Nature* 308, 550-551.

- . 1984b. Completion of mouse embryogenesis requires both the maternal and parental genomes. *Cell* 37, 179-183.
- . 1984c. Inability of mouse blastomere nuclei transferred to enucleated zygotes to support development in vitro. *Science* 226, 1317-1319.
- McLachlin, J.R., S. Caveney, G.M. Kidder. 1983. Control of gap junction formation in early mouse embryos. *Dev. Biol.* 98, 155-164.
- McLaren, A. 1983. Does the chromosomal sex of a mouse germ cell affect its development? En "7th Symposium of British Society for Developmental Biology" (ed. A. McLaren y C.C. Wylie), pp. 225-240. Cambridge University Press, England.
- McMahon, A., M. Fosten, M. Monk. 1983. X-chromosome inactivation mosaicism in the three germ layers and the germ line of the mouse embryo. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 74, 207-220.
- Meehan, R.R., D.P. Barlow, R.E. Hill, B.L.M. Hogan, N.D. Hastie. 1984. Pattern of serum protein gene expression in mouse visceral yolk sac and fetal liver. *EMBO J.* 3, 1881-1885.

- Meier, S. 1979. Development of the chick embryo mesoblast. Formation of the embryonic axis and establishment of the metameris pattern. Dev. Biol. 73, 25-45.
- . 1981. Development of the chick embryo mesoblast: Morphogenesis of the prechordal plate and cranial segments. Dev. Biol. 73, 25-45.
- Meier, S., P.P.L. Tam. 1982. Metameris pattern development in the embryonic axis of the mouse. I Differentiation of the cranial segments. Differentiation 21, 95-108.
- Menge, A.C., C.H. Fleming. 1978. Detection of sperm antigens on mouse ova and early embryos. Dev. Biol. 63, 111-117.
- Menge, A.C., A. Rosenberg, D.M. Burkons. 1974. Effects of uterine fluids and immunoglobulins from semen-immunized rabbits on rabbit embryos cultured in vitro. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 145, 371-378.
- Mintz, B. 1964. Synthetic processes and early development in the mammalian egg. J. Exp. Zool. 157, 85-100.
- . 1971. Allophenic mice of multi-embryo origin. En

- "Methods in mammalian embryology" (ed. J. Daniel Jr.) pp. 186-214. Freeman, San Francisco.
- Mintz, B., E.S. Russell. 1957. Gene-induced embryological modifications of primordial germ cells in the mouse. J. Exp. Zool. 134,207-237.
- Monk, M., A. McLaren. 1981. X-chromosome activity in foetal germ cells of the mouse. J. Embryol. Exp. Morphol. 63, 75-84.
- Monzó Planella, M. 1984. Tesis Doctoral. Facultad de Medicina. Universidad de Barcelona.
- Monzó, M., X. Andrés, V. Götzens, D. Ruano. 1982. Relaciones entre células de teratocarcinoma y células embrionarias de ratón. Potencialidades y capacidades de diferenciación. Rev. Esp. Oncol. 29, 473-479.
- Morriss-Kay, G.M. 1981. Growth and development of pattern in the cranial neural epithelium of rat embryos during neurulation. J. Embryol. Exp. Morphol. (suppl.) 65, 225-241.

- Moskalewski, S., H. Koprowski. 1972. Presence of egg antigen in immature oocytes and preimplantation embryos. *Nature* 237, 167-168.
- Mugleton-Harris, A.L., M.H. Johnson. 1976. The nature and distribution of serologically detectable alloantigens on the preimplantation mouse embryo. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 35, 52-72.
- Muller, R., I.M. Verma, E.D. Adamson. 1983. Expression of c-onc genes: c-fos transcripts accumulate to high levels during development of mouse placenta, yolk sac and amnion. *EMBO J.* 2, 679-684.
- Mulnard, J. 1971. Manipulation of cleaving mammalian embryo with special reference to a time-lapse cinematographic analysis of centrifuged and fused mouse eggs. *Adv. in Biosciences* 6, 255-274.
- Muramatsu, T., G. Gachelin, J.F. Nicolas, H. Condamine, H. Jakob, F. Jacob. 1978. Carbohydrate structure and cell differentiation: Unique properties of fucosylglycopeptides isolated from embryonal carcinoma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 75, 2315-2319.

- Nadijcka, M., N. Hillman. 1974. Ultrastructural studies of the mouse blastocyst substages. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 32, 675-695.
- Neufeld, E.F., G. Ashwell. 1980. Carbohydrate recognition systems for receptor-mediated pinocytosis. En "The biochemistry of glycoproteins and proteoglycans" (ed. W.J. Lennarz) pp. 241-262. Plenum Press, Nueva York y Londres.
- Nicolet, G. 1970. Analyse autoradiographique de la localisation des diferentes ebauches presomptives dans la ligne primitive l'embryon de poulet. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 23, 79-108.
- Noden, D.M. 1983. Embryonic origins of avian cephalic and cervical muscles and associated connective tissues. *Am. J. Anat.* 168, 257-276.
- Ogou, S.-I., T.S. Okada, M. Takeichi. 1982. Cleavage stage mouse embryos share a common cell adhesion system with teratocarcinoma cells. *Dev. Biol.* 92, 521-528.
- Palm, J., S. Heyner, R.L. Brinster. 1971. Differential immunofluorescence of fertilized mouse eggs with H-2 and non-H-2 antibody. *J. Exp. Med.* 133, 1282-1293.

- Paynton, B.V., K.M. Ebert, R.L. Brinster. 1983. Synthesis and secretion of ovalbumin by mouse growing oocytes following microinjection of chick ovalbumin mRNA. *Exp. Cell Res.* 144, 214-218.
- Pedersen, R.A., K. Wu, H. Balakier. 1986. Origin of the inner cell mass in mouse embryos: cell lineage analysis by microinjection. *Dev. Biol.* 117, 581-595.
- Peyrieras, N., Fr Hyafil, D. Louvard, H.L. Ploegh, F. Jacob. 1983. Uvomorulin, a non-integral membrane protein of early mouse embryo. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 80, 6274-6277.
- Phillips, H.J. 1973. Dye exclusion tests for cell viability. En "Tissue culture. Methods and applications." (eds. P.F. Kruse Jr., H.K. Patterson Jr.). pp. 406-408. Academic Press, Nueva York.
- Pinsker, M.C., B. Mintz. 1973. Change in cell-surface glycoproteins of mouse embryos before implantation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 70, 1645-1648.
- Pratt, H.P.M. 1985. Membrane organisation in the preimplantation mouse embryo. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 90, 101-121.

Pratt, H.P.M., V.N. Bolton, K.A. Gudgeon. 1983. The legacy from the oocyte and its role in controlling early development of the mouse embryo. En Molecular biology of egg maturation CIBA Found. Symp. 98, 197-227. Pitman, London.

Randle, B.J. 1983. Lined non-lineage related expression of an anti-teratocarcinoma monoclonal antibody reactivity in the post-implantation embryo and adult mouse. J. Reprod. Immunol. 5, 101-114.

Rastan, S. 1982. Timing of X-chromosome inactivation in post-implantation mouse embryos. J. Embryol. Exp. Morphol. 71, 11-24.

Rauvala, H., W.G. Carter, S. Hakomori. 1981. Studies on cell adhesion and recognition. I. Extent and specificity of cell adhesion triggered by carbohydrate-reactive proteins (glycosidases and lectins, and fibronectin). J. Cell Biol. 88, 127-137.

Rauvala, H., S. Hakomori. 1981. Studies on cell adhesion and recognition. III. The occurrence of  $\alpha$ -mannosidase at the

- fibroblast cell surface, and its possible role in cell recognition. *J. Cell Biol.* 88, 149-159.
- Reeve, W.J.D., C.A. Ziomek. 1981. Distribution of microvilli on dissociated blastomeres from mouse embryos: Evidence for surface polarization at compaction. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 62, 339-350.
- Rohrschneider, L.R. 1980. Adhesion plaques of Rous sarcoma virus-transformed cells contain the src gene product. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 77, 3514-3518.
- Rossant, J., B.A. Croy. 1985. Genetic identification of tissue of origin of cellular populations within the mouse placenta. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 86, 177-189.
- Sainte-Marie, G. 1962. A paraffin embedding technique for studies employing immunofluorescence. *J. Histochem. Cytochem.* 10, 250-256.
- Sanford, J., L. Forrester, V. Chapman, A. Chandley, N. Hastie. 1984. Methylation of repetitive DNA sequences in germ cells of *M. musculus*. *Nucleic Acids Res.* 12, 2823-2836.

Sato, M., M. Ozawa, H. Hamada, M. Kasai, T. Tokunaga, T. Muramatsu. 1985. Cell surface markers to monitor the process of visceral endoderm differentiation from embryonal carcinoma cells: identification of the stage sensitive to high concentration of retinoic acid. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 88, 165-182.

Schatten, G., C. Simmerly, H. Schatten. 1985. Microtubule configuration during fertilization, mitosis, and early development in the mouse and the requirement for egg microtubule mediated motility during mammalian fertilization. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 82, 4152-4156.

Schultz, R.M., G.E. Letourneau, P.M. Wasserman. 1979. Program of early development in the mammal. Changes in the patterns and absolute rates of tubulin and total protein synthesis during oocyte growth in the mouse. *Dev. Biol.* 73, 120-133.

Searle, R.F., E.J. Jenkinson. 1978. Localization of trophoblast defined surface antigens during early mouse embryogenesis. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 43, 147-156.

Searle, R.F., M.H. Sellens, J. Elson, E.J. Jenkinson, W.D. Billington. 1976. Detection of alloantigens during

- preimplantation development and early trophoblast differentiation in the mouse by immunoperoxidase labeling. *J. Exp. Med.* 143, 348-359.
- Searle, R.F., E.J. Jenkinson, M.H. Johnson. 1975. Immunogenicity of mouse trophoblast and embryonic sac. *Nature* 255, 719-720.
- Searle, R.F., M.H. Johnson, W.D. Billington, J. Elson, S. Clutterbuck-Jackson. 1974. Investigation of H-2 and non-H-2 antigens on the mouse blastocyst. *Transpl.* 18, 136-141.
- Seeds, N.W. 1975. Cerebellar cell surface antigens of mouse brain. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 72, 4110-4114.
- Sellens, M.H. 1977. Antigen expression on early mouse trophoblast. *Nature* 269, 60-61.
- Semoff, S., B.L.M. Hogan, C.R. Hopkins. 1982. Localisation of fibronectin, laminin-entactin and entactin in Reichert's membrane by immunoelectron microscopy. *EMBO J.* 1, 1171-1175.
- Septon, B.M., T. Hunter, B.H. Ball, S.J. Singer. 1981. Vinculin: A cytoskeletal target of the transforming protein of Rous sarcoma virus. *Cell*, 24, 163-174.

Sherman, M.I., L.R. Wudl. 1977. T-complex mutations and their effects. En "Concepts in mammalian embryogenesis" (ed. M.I. Sherman) pp. 136-234. MIT Press, Cambridge.

Shinitzky, M., M. Souroujon. 1979. Passive modulation of blood-group antigens. Proc. Natl. Acad. Sci. 76, 4438-4440.

Shinitzky, M., Y. Skornick, N. Haran-Ghera. 1979. Effective tumor immunization induced by cells of elevated membrane-lipid microviscosity. Proc. Natl. Acad. Sci. 76, 5313-5316.

Shirayoshi, Y., T.S. Okada, M. Takeichi. 1983. The  $Ca^{++}$  dependent cell-cell adhesion system regulates inner cell mass formation and cell surface polarization in early mouse development. Cell 35, 631-638.

Shur, B.D. 1982. Evidence that galactosyltransferase is a surface receptor for poly(N)-acetyllactosamine glycoconjugates on embryonal carcinoma cells. J. Biol. Chem. 257, 6871-6878.

- Slack, J.M.W. 1983. From egg to embryo. Cambridge University Press, England.
- Smith, K.K., S. Strickland. 1981. Structural components and characteristics of Reichert's membrane, an extraembryonic basement membrane. *J. Biol. Chem.* 256, 4654-4661.
- Smith, L.J. 1980. Embryonic axis orientation in the mouse and its correlation with blastocyst relationships to the uterus. I. Relationships between 82 hours and 4.5 days. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 55, 257-277.
- . 1985. Embryonic axis orientation in the mouse and its correlation with blastocyst relationships to the uterus. II. Relationships from 4.5 days to 9.5 days. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 89, 15-35.
- Smith, R.K.W., M.H. Johnson. 1985. DNA replication and compaction in the cleaving embryo of the mouse. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 89, 133-148.
- Smith, R., A. McLaren. 1977. Functional test of tight junctions in the mouse blastocyst. *Nature, Lond.* 267, 351-352.

- Snell, G.D., L.C. Stevens. 1966. Early embryology. En "Biology of the Laboratory Mouse" (ed. E.L. Green), pp. 205-245. New York: McGraw-Hill.
- Snow, M.H.L. 1977. Gastrulation in the mouse: Growth and regionalization of the epiblast. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 42, 293-303.
- . 1978. Proliferative centres in embryonic development. En *Development in mammals* (ed. M.H. Johnson), vol. 3, pp. 337-362. Elsevier/North-Holland, Amsterdam.
- . 1981. Autonomous development of parts isolated from primitive-streak-stage mouse embryos. Is development clonal? *J. Embryol. Exp. Morphol.* (suppl.) 65, 269-287.
- Snow, M.H.L., M. Monk. 1983. Emergence and migration of mouse primordial germ cells. En "Current problems in germ cell differentiation" (ed. A. McLaren, C.C. Wylie), pp. 115-136. Cambridge University Press, England.
- Soares, M.J., J.A. Julian, S.R. Glasser. 1985. Trophoblast giant cell release of placental lactogens: Temporal and regional characteristics. *Dev. Biol.* 107, 520-526.

- Sobis, H., M. Vandeputte. 1974. Development of teratomas from displaced visceral yolk-sac. *Intl. J. Cancer* 13, 444-453.
- Solter, D., B.B. Knowles. 1979. Developmental stage-specific antigens during mouse embryogenesis. *Curr. Top. Dev. Biol.* 13, 139-165.
- . 1975. Immunosurgery of mouse blastocysts. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 72, 5099-5102.
- Solter, D., M. Schachner. 1976. Brain and cell surface antigens (NS-4) on preimplantation mouse embryos. *Dev. Biol.* 52, 98-104.
- Stein, K.N., G.A. Schwarting, D.M. Marcus. 1978. Glycolipid markers of murine lymphocyte subpopulations. *J. Immunol.* 120, 676-679.
- Stellner, K., S. Hakomori, G.A. Warner. 1973. Enzymic conversion of "H<sub>1</sub>-glycolipid" to A or B glycolipid and deficiency of these enzyme activities in adenocarcinoma. *Biochem. Res. Commun.* 55, 439-445.

Stern, P.L. 1984. Differentiation antigens of teratomas and embryos. *Brit. Med. Bull.* 40, 3:218-223.

Stern, P.L., G.R. Martin, M.J. Evans. 1975. Cell surface antigens of clonal teratocarcinoma cells at various stages of differentiation. *Cell* 6, 455-465.

Stern, M.S., I.B. Wilson. 1972. Experimental studies on the organization of the preimplantation mouse embryo. I. Fusion of asynchronously cleaving eggs. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 28, 247-254.

Stevens, L.C. 1959. Embryology of testicular teratomas in strain 129 mice. *J. Natl. Cancer Inst.* 23, 1249-1295.

———. 1964. Experimental production of testicular teratomas in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 52, 654-661.

———. 1966. Development of resistance to teratocarcinogens by primordial germ cells in mice. *J. Natl. Cancer Inst.* 37, 859-861.

———. 1970. The development of transplantable teratocarcinomas from intratesticular grafts of pre- and post-implantation mouse embryos. *Dev. Biol.* 21, 364-382.

- . 1973. A new inbred subline of mice (129/terSv) with a high incidence of spontaneous congenital testicular teratomas. *J. Natl. Cancer Inst.* 50, 235-242.
- Stevens, L.C., G.B. Pierce. 1975. Teratomas: Definitions and terminology. En *Teratomas and differentiation* (ed. M.I. Sherman y D. Solter), pp. 13-16. Academic Press, New York.
- Stevens, L.C., D.S. Varnum, E.M. Eicher. 1977. Viable chimeras produced from normal and parthenogenetic mouse embryos. *Nature* 269, 515-517.
- Surani, M.A.H., S.C. Barton. 1984. Spatial distribution of blastomeres is dependent on cell division order and interactions in mouse morulae. *Dev. Biol.* 102, 335-343.
- . 1983. Development of gynogenetic eggs in the mouse: implications for parthenogenetic embryos. *Science* 222, 1034-1036.
- Surani, M.A.H., S.C. Barton, M.H. Kaufman. 1977. Development to term of chimeras between diploid parthenogenetic and fertilized embryos. *Nature* 270, 601-603.

- Surani, M.A.H., S.C. Barton, M.L. Norris. 1984. Development of reconstituted mouse eggs suggests imprinting of the genome during gametogenesis. *Nature* 308, 548-550.
- Takagi, N., M. Sasaki. 1975. Preferential inactivation of the paternally derived X chromosome in the extraembryonic membranes of the mouse. *Nature* 256, 640-641.
- Tam, P.P.L. 1981. The control of somitogenesis in mouse embryos. *J. Embryol. Exp. Morphol.* (suppl.) 65, 103-128.
- Tam, P.P.L., S. Meier. 1982. The establishment of a somitomeric pattern in the mesoderm of the gastrulating mouse embryo. *Am. J. Anat.* 164, 209-225.
- Tam, P.P.L., M.H.L. Snow. 1980. The in vitro culture of mouse embryos. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 59, 131-143.
- . 1981. Proliferation and migration of primordial germ cells during compensatory growth in mouse embryos. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 64, 133-147.
- Tam, P.P.L., S. Meier, A.G. Jacobson. 1982. Differentiation of the metameric pattern in the embryonic axis of the mouse. II. Somitomeric organisation of the presomitic mesoderm. *Differentiation* 21, 109-122.

- Tarkowski, A., J. Wroblewska. 1967. Development of blastomeres of mouse eggs isolated at the 4- and 8-cell stage. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 18, 155-180.
- Theiler, K. 1972. *The house mouse*. Springer-Verlag, New York.
- Torregrosa Bach, M.A. 1987. Tesis Doctoral. Facultad de Medicina. Universidad de Barcelona.
- Towbin, H., J. Gordon. 1984. Immunoblotting and dot immunobinding - current status and outlook. *J. of Immunological Methods* 72, 313-340.
- Towbin, H., T. Staehelin, J. Gordon. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 76, 4350-4354.
- Tuckett, F., L. Lim, G. Morriss-Kay. 1985. The ontogenesis of cranial neuromeres in the rat embryo. II. A scanning electron microscope and kinetic study. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 87, 215-228.

- Van Blerkom, J. 1981. Structural relationship and posttranslational modification of stage-specific proteins synthesised during early preimplantation development in the mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 78, 7629-7633.
- Van Blerkom, J., G. Brockway. 1976. Qualitative patterns of protein synthesis in the preimplantation mouse embryo. I. Normal pregnancy. *Dev. Biol.* 44, 148-157.
- Van Blerkom, J., D.J. Chavez, H. Bell. 1979. Molecular and cellular aspects of facultative delayed implantation in the mouse. En "Maternal Recognition of pregnancy" CIBA Found. Series 64, pp. 141-172.
- Van Blerkom, J., M.N. Runner. 1984. Mitochondrial reorganization during resumption of arrested meiosis in the mouse oocytes. *Am. J. Anat.* 171, 335-355.
- Vitetta, E.S., K. Artzt, D. Bennett, E.A. Boyse, F. Jacob. 1975. Structural similarities between a product of the T/t locus isolated from sperm and teratoma cells, and H-2 antigens isolated from splenocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 73, 905-909.
- Wan, Y.-J., T.-C. Wu, A.E. Chung, I. Damjanov. 1984. Monoclonal antibodies to laminin reveal the heterogeneity

- of basement membranes in developing and adult mouse tissues. *J. Cell Biol.* 98, 971-979.
- Wartiovaara, J., I. Leivo, A. Vaheri. 1979. Expression of the cell surface-associated glycoprotein, fibronectin, in the early mouse embryo. *Dev. Biol.* 69, 247-257.
- Wassarman, P.M., J.M. Greve, R.M. Perona, R.J. Roller, G.S. Salzmann. 1984. How mouse eggs put on and take off their extracellular coat. In *Molecular biology of development* (ed. E. Davidson, R. Firtel), p. 213. A.R. Liss, New York.
- Webb, C.G., W.E. Gall, G.M. Edelman. 1977. Synthesis and distribution of H-2 antigens in preimplantation mouse embryos. *J. Exp. Med.* 146, 923-932.
- Weinhouse, S. 1982. Guest editorial: What are isozymes telling us about gene regulation in cancer? *JNCI* 68, 343-349.
- Weitlauf, H.M. 1976. Effect of uterine flushing on RNA synthesis by "implanting" and "delayed implanting" mouse blastocysts in vitro. *Biol. reprod.* 14, 566-571.

- Whittingham, D.G. 1980. Parthenogenesis in mammals. Oxford Rev. Reprod. Biol. 2, 205-231.
- Wiley, L.M., P.G. Calarco. 1975. The effects of antiembryo sera and their localization on the cell surface during mouse preimplantation development. Dev. Biol. 47, 407-418.
- Wolf, D. E. 1983. The plasma membrane in early embryogenesis. In Development in mammals, 5. (ed. M.H. Johnson), pp. 187-208. Amsterdam, Elsevier.
- Wu, T.-C., Y.-J. Wan, A.E. Chung, I. Damjanov. 1983. Immunohistochemical localization of entactin and laminin in mouse embryos and fetuses. Dev. Biol. 100, 496-505.
- Yoshida, C., M. Takeichi. 1982. Teratocarcinoma cell adhesion: Identification of a cell-surface protein involved in calcium-dependent cell aggregation. Cell 28, 217-224.
- Yoshida-Noro, C., N. Suzuki, M. Takeichi. 1984. Molecular nature of the Ca<sup>++</sup> dependent cell-cell adhesion system in mouse and embryonic cells studied with a monoclonal antibody. Dev. Biol. 101, 19-27.

Zimmermann, A., M. Schachner, J.L. Press. 1976. Central nervous system antigen (NS-5) and its presence during murine ontogenesis. J. Supramol. Struct. 5, 417-429.

Ziomek, C.A., M.H. Johnson. 1980. Cell surface interaction induces polarization of mouse B-cell blastomeres at compaction. Cell 21, 935-942.