



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Influència de la gestació en el control de la diferenciació de les cèl·lules de carcinoma embrionari

Begonya Torres i Gallardo



Aquesta tesi doctoral està subjecta a la llicència **Reconeixement- NoComercial – SenseObraDerivada 4.0. Espanya de Creative Commons.**

Esta tesis doctoral está sujeta a la licencia **Reconocimiento - NoComercial – SinObraDerivada 4.0. España de Creative Commons.**

This doctoral thesis is licensed under the **Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs 4.0. Spain License.**

INFLUENCIA DE LA GESTACION EN EL
CONTROL DE LA DIFERENCIACION DE LAS
CELULAS DE CARCINOMA EMBRIONARI

TESI PER ACCEDIR AL GRAU DE DOCTOR EN CIENCIES
BIOLOGIQUES PER LA UNIVERSITAT DE BARCELONA.

PRESENTADA PER BEGONYA TORRES I GALLARDO.

BARCELONA, 1987.

BIBLIOTECA DE LA UNIVERSITAT DE BARCELONA



0701179157

als meus pares

i

a la meva germana

als meus amics

al Professor DOMINGO RUANO-GIL qui
m'acollí en el seu Departament i a
qui deu la realització d'aquesta Tesi



a tots els que han col.laborat en la
realització d'aquesta Tesi Doctoral i molt
especialment al Doctor M. MONZO I PLANELLA
director i amic que m'ajudà en tot moment

a la Professora M. DURFORT I COLL
qui sempre confià en mi i em donà
tot el seu suport

I N D E X

<u>INTRODUCIO</u>	1
INTRODUCCIO GENERAL	2
LLINATGE CEL·LULAR DE L'EMBRIÓ DE RATOLI	5
CULTIU <i>IN VITRO</i> D'EMBRIONS	9
LA COMPACTACIO	12
CANVIS MORFOLOGICS EN L'EMBRIÓ DE VUIT CEL·LULES	14
FORMACIO DEL TROFOBLAST I LA MASSA CEL·LULAR INTERNA	18
CONTROL DE LA COMPACTACIO	20
1. IMPORTANCIA DEL CITOESQUELET	21
2. IMPORTANCIA DE LA MEMBRANA CEL·LULAR	22
2.1. FOSFOLIPDS I ESTEROLS	23
2.2. PAPER DE L'IO CALCI. OVOMORULINA	26
2.3. ANTIGENS DE MEMBRANA IMPLICATS EN LA COMPACTACIO. ANTIGEN F9.	27
MECANISMES DE LA DETERMINACIO CEL·LULAR	29
LA IMPLANTACIO	35
HORMONES I GESTACIO	37
1. HORMONES ESTEROIDES	38
1.1. ELS ESTROGENS	39
1.2. LA PROGESTERONA	40
2. LES PROSTAGLANDINES	41
3. LA PROLACTINA HUMANA	42
L'EMBRIÓ I L'ENDOMETRI EN LA IMPLANTACIO	44
1. SENYALS DECIDUALITZADORS	45
2. PRIMERES FASES DE LA IMPLANTACIO	47

2.1. L'EMBRIO	47
2.2. ACTIVITAT DE LES CEL·LULES EPITELIALS	48
2.3. FORMACIO DE LA CAMBRA D'IMPLANTACIO	50
2.4. PERDUA DE L'EPITELI UTERI	51
2.5. LES CEL·LULES ESTROMALS. FORMACIO DE LA DECIDUA	52
2.6. INVOLUCIO DE LA DECIDUA PRIMARIA	54
TUMORS DE CEL·LULES GERMINALS	57
ORIGEN DELS TUMORS TESTICULARS	58
CLASSIFICACIO DELS TUMORS DERIVATS DE LES CEL·LULES GERMINALS	62
MARCADORS DELS TUMORS DE CEL·LULES GERMINALS	71
1. L'AFP	72
2. L'HCG	74
3. ALTRES MARCADORS	75
ELS TERATOCARCINOMES	76
TERATOCARCINOMES: DEFINICIO	77
OBTENCIO DELS TERATOCARCINOMES	80
1. TUMORS ESPONTANIS	81
2. TUMORS EXPERIMENTALS	82
2.1. OBTINGUTS A PARTIR DE CRESTES GENITALS	82
2.2. OBTINGUTS A PARTIR DE L'EMPELT D'EMBRIONS	83
ELS COSSOS EMBRIOIDS	85
LES CEL·LULES DE CARCINOMA EMBRIONARI	90
1. SEMBLANCES MORFOLOGIQUES I BIOQUIMIQUES AMB LES CEL·LULES EMBRIONARIES	91

2. RELACIONS IMMUNOLOGIQUES AMB LES CEL·LULES EMBRIONARIES	92
3. PARTICIPACIO DE LES CEL·LULES DE CARCINOMA EMBRIONARI EN EL DESENVOLUPAMENT	95
SIMILITUDS ENTRE ELS SISTEMES EMBRIONARIS I NEOPLASICS	97
REGULACIO DEL CREIXEMENT TUMORAL	102
1. CANVIS FENOTIPICS DE LA CEL·LULA NEOPLASICA	103
2. CANVIS GENOTIPICS DE LA CEL·LULA NEOPLASICA	107
<u>MATERIAL I METODES</u>	113
ANIMALS I OBTENCIO DELS COSSOS EMBRIOIDS	114
AI LLAMENT DELS COSSOS EMBRIOIDS	115
OBTENCIO D'UN ANTICOS ANTI-EB (SERRA, 1985)	116
ELECTROFORESI DELS COSSOS EMBRIOIDS	117
ELECTROBLOTTING	121
OBTENCIO DE FEMELLES GESTANTS	126
TUMORS <i>IN UTERO</i>	127
OVIDUCTOMIES	128
TUMORS SUBCUTANIS	130
IMMUNOHISTOQUIMICA DELS TUMORS	131
OBTENCIO DE LES MARIUS	134
MICROSCOPIA D'ESCANDALLATGE	135
ANALISI HISTOLOGICA	137
<u>RESULTATS</u>	138

CARACTERITZACIO DELS COSSOS EMBRIOIDS I	
DE LES MATRIUS GESTANTS	139
CARACTERITZACIO BIOQUIMICA DELS COSSOS EMBRIOIDS	140
CARACTERITZACIO MORFOLOGICA DE LES	
MATRIUS GESTANTS	144
TUMORS DE L'INTERIOR DE LA CAVITAT UTERINA	148
INJECCIO DELS COSSOS EMBRIOIDS A LA CAVITAT	
UTERINA D'ANIMALS NO GESTANTS	153
INJECCIO DELS COSSOS EMBRIOIDS A LA CAVITAT	
UTERINA D'ANIMALS GESTANTS DE DOS DIES	155
1. COSSOS EMBRIOIDS INJECTATS A L'INTERIOR DE	
LA CAVITAT UTERINA	156
1.1. ANIMALS SACRIFICATS ABANS DEL PART	156
1.1.1. ANALISI HISTOLOGICA DELS TUMORS	157
1.1.2. IMMUNOHISTOQUIMICA DELS TUMORS	160
1.2. ANIMALS SACRIFICATS DESPRES DEL PART	161
2. COSSOS EMBRIOIDS INJECTATS EN POSICIO	
SUBMUCOSA	162
INJECCIO DELS COSSOS EMBRIOIDS A LA CAVITAT	
UTERINA D'ANIMALS GESTANTS DURANT EL PERIODE	
DE PERIIMPLANTACIO	163
TUMORS SUBCUTANIS	165
TEMPS D'EVOLUCIO DELS TUMORS	166
MIDA DELS TUMORS	170
MORFOLOGIA DELS TUMORS	175
1. DISTRIBUCIO DELS TEIXITS EN EL SI DEL TUMOR	176
2. HISTOLOGIA DELS TUMORS	179

<u>DISCUSSIO</u>	192
TUMORS A L'INTERIOR DE LA MARIU	193
IMPLANTACIO DELS COSSOS EMBRIOIDS	194
EVOLUCIO DEL TUMOR EN L'INTERIOR DE LA MARIU. FORMACIO DE VASOS PER PART DE L'ENDOMETRI	213
TUMORS SUBCUTANIS	228
TEMPS D'EVOLUCIO I MIDA DEL TUMOR	229
HISTOLOGIA DELS TUMORS	238
<u>CONCLUSIONS</u>	244
<u>BIBLIOGRAFIA</u>	250

OBJECTIUS I MOTIVACIO

Des de fa segles l'home coneix l'existència dels tumors, així per exemple ja en l'Antic Egipte s'intentava combatre'ls cremant amb ferros roents les excrescències de la pell.

Per a comprendre la natura dels tumors han calgut, però, diferents descobriments al llarg dels segles. Es creia en un principi que els tumors eren un desequilibri d'humors o una flema acumulada en un punt determinat de l'organisme. Amb el descobriment de l'estructura cel.lular dels organismes vius es donà també un avenç en la concepció dels teixits tumorals.

Hores d'ara entenem els tumors com a teixits formats per cèl.lules que poseeixen unes determinades característiques. Desconeixem exactament, però, l'etiologia dels tumors així com els mecanismes que controlen el seu creixement.

Cohnheim (1875) va ser un dels primers estudiosos que comparà la cèl.lula tumoral amb l'embrionària. Per a ell les neoplàsies provindrien de l'activació durant la vida adulta de cèl.lules embrionàries segrestades durant el seu desenvolupament.

Duran i Reynals a principis del nostre segle (1929) mitjançant el cultiu de cèl.lules embrionàries demostrà la relació entre la cèl.lula embrionària i el creixement tumoral. Escrigué: "Les cèl.lules embrionàries, mantingudes sense oxigen i amb glicosa, comencen a glicolitzar, però

moren en poques hores. Algunes d'elles, però, sobreviuen i llur inoculació produeix teratomes".

Actualment són molts els treballs que posen de manifest grans similituds entre els sistemes tumorals i els embrionaris. La cèl.lula de carcinoma embrionari del teratocarcinoma és una de les cèl.lules tumorals més estudiades perquè poseeix moltes característiques comunes amb les cèl.lules embrionàries dels primers estadis del desenvolupament. S'ha utilitzat tant en treballs d'embriologia com d'oncologia experimental.

Els teratocarcinomes es coneixen des del segle passat, però fou a partir dels treballs de Pierce i Dixon (1959) que s'inicià el seu estudi com a model de la diferenciació cel.lular. Aquests autors observaren que les cèl.lules canceroses de carcinoma embrionari d'un tumor testicular podien donar teixits benignes. Aquesta observació va fer canviar el concepte de cèl.lula cancerosa que es tenia en aquells moments. Fins aleshores es creia que una cèl.lula cancerosa sols podia donar altres cèl.lules canceroses i, evidentment, la cèl.lula de carcinoma embrionari no acomplia aquesta premisa. Aquests mateixos autors en treballs posteriors van trobar d'altres cèl.lules malignes que compartien amb la cèl.lula esmentada la capacitat de tornar-se benignes.

Treballs més recents posen de manifest que els sistemes tumorals en general comparteixen moltes propietats amb els sistemes embrionaris. S'ha vist també, que ambdós sistemes

cel·lulars estan sotmesos al mateix tipus de control epigenètic.

L'embrió dels mamífers, a diferència del que succeeix en altres grups animals, es desenvolupa dintre del claustre matern passant per dues etapes, una lliure (preimplantació), i l'altre unit íntimament als teixits de la mare (postimplantació). Aquesta unió entre l'embrió i la mare no és sols una unió física sinó que implica una sèrie de transformacions i informacions recíproques entre l'embrió i els teixits materns.

Durant la implantació, i els períodes posteriors, es fa imprescindible el concurs de l'organisme matern per a una bona evolució de l'embrió. *In vitro* s'ha volgut mimetitzar aquesta fase però mai cap resultat ha estat plenament satisfactori, mostrant-se que el paper de la matriu gestant, i de l'organisme matern en general, no és només el de receptacle passiu de l'embrió.

Les cèl·lules de carcinoma embrionari caricaturen les primeres fases del desenvolupament normal de l'embrió, i aquest està controlat per l'organisme matern. Això ens va fer pensar que possiblement molts dels inductors presents durant la gestació, i que actuen guiant el desenvolupament correcte de l'embrió, podrien controlar a les cèl·lules de carcinoma embrionari.

Creiem que seria de gran interès conèixer els mecanismes implicats en la regulació i control del

creixement tumoral i que la gestació pot ser un sistema òptim per a exercir aquest control.

Per a estudiar quina és la influència de la gestació sobre el creixement de les cèl.lules de carcinoma embrionari hem injectat aquestes cèl.lules tumorals sota la pell i a l'interior de l'úter de femelles gestants i hem analitzat la morfologia i l'evolució dels tumors obtinguts.

INTRODUCCIO

INTRODUCCIO GENERAL

Un dels problemes fonamentals en biologia és com a partir d'una única cèl.lula, l'oòcit fecundat, es pot desenvolupar un individu adult. Actualment, coneixem les diferents fases de l'embriologia però els mecanismes reguladors són encara obscurs.

Per a l'estudi de l'embriologia dels mamífers s'ha emprat un model cel.lular neoplàsic: la cèl.lula de carcinoma embrionari. Aquesta cèl.lula té grans similituds morfològiques, antigèniques i potencials amb les cèl.lules embrionàries.

La cèl.lula de carcinoma embrionari no és, però, l'única cèl.lula neoplàsica que té grans semblances amb la cèl.lula indiferenciada embrionària. Generalment, els teixits tumorals tenen un comportament anàleg al dels teixits embrionaris. Ambdós sistemes, el tumoral i l'embrionari, es troben endemés sotmesos al mateix tipus de control epigenètic.

Els estudis embriològics s'han realitzat també amb l'embrió dels rosegadors. Els resultats obtinguts, tant *in vivo* com *in vitro*, mostren que el desenvolupament embrionari pot dividir-se en dues fases: la de preimplantació, durant la qual l'embrió és autosuficient, i la de postimplantació en la que l'embrió depèn directament del control matern.

Durant la implantació i les fases posteriors és evident el paper de l'organisme matern en la regulació del desenvolupament embrionari. Quan s'ha intentat reproduir *in*

vitro aquesta fase crucial per a l'embrió tots els resultats han estat poc satisfactoris.

Les dades exposades anteriorment, fan pensar en la possibilitat que l'estat gestacional pugui controlar el creixement de les cèl.lules tumorals. Aquest control, s'exerciria *in utero* principalment durant el període d'implantació (dia 3.5-4 en el ratolí).

En aquest apartat parlarem del llinatge cel.lular de l'embrió de ratolí i del cultiu *in vitro* d'embrions, la qual cosa ens permetrà comprovar que la matriu gestant no és un receptacle passiu de l'embrió, sinó que actua controlant, junt amb l'estat gestacional general, tots els processos del desenvolupament.

LLINATGE CEL·LULAR DE L'EMBRIÓ DE
RATOLI

Per a entendre com l'oòcit fecundat esdevé un individu adult, es van iniciar els estudis del llinatge cel.lular d'animals com l'eriçó de mar o el cap gros de la granota. Més tard, amb la introducció de noves tècniques, s'ha pogut seguir el llinatge d'altres espècies de major complexitat estructural.

Amb la utilització de quimeres intra i interespecífiques, Gardner i Papaioannou (1975) van esbrinar el possible llinatge cel.lular de l'embrió de ratolí primerenc.

Segons aquests autors l'embrió experimentaria una sèrie de diferenciacions cel.lulars que tot seguit passem a explicar.

Després de la fecundació de l'oòcit el zigot, recobert per la zona pel.lúcida, es divideix repetidament fins a formar una mòrula. Quan aquesta està formada es produeix la primera diferenciació cel.lular de l'embrió. Es forma el blastocist que té una capa de cèl.lules externes, el trofoblast, i una capa de cèl.lules internes, la massa cel.lular interna. El trofoblast envolta a les cèl.lules de la massa cel.lular interna i a una cavitat anomenada blastocel.

L'embrió perd la zona pel.lúcida i succeeix la segona diferenciació que es dona a nivell de les cèl.lules de la massa cel.lular interna. Les més externes (vers la cavitat) donen l'endoderma primitiu i les internes l'ectoderma primitiu.

Simultàniament les cèl.lules del trofoblast es diferencien en trofoblast mural (revestint el blastocel) i en trofoblast polar (cobrint la massa cel.lular interna).

Tot seguit l'embrió s'implanta. Les cèl.lules murals deixen de dividir-se però segueixen creixent transformant-se en cèl.lules gegants. Les cèl.lules del trofoblast polar continuen dividint-se i formen el con ectoplacentari (en aquesta regió es desenvoluparà la placenta). Al mateix temps la massa cel.lular interna creix cap al blastocel. L'embrió en aquesta fase rep el nom d'ou cilindre.

L'ou cilindre té l'ectoderma primitiu a l'interior, l'endoderma primitiu a l'exterior trobant-se entre ells el mesoderma. Aquesta disposició invertida de les capes germinatives (típica dels rosegadors) va modificant-se a mesura que es produeixen els moviments morfogènètics del fetus, restaurant-se finalment les relacions habituals.

L'ectoderma primitiu es divideix en dues regions, una embrionària i l'altra extraembrionària. L'endoderma primitiu creix recobrint l'ou cilindre i s'estén sobre tota la superfície interna del trofoblast per a formar una sola capa cel.lular al voltant del blastocel. La part que envolta al blastocel s'anomena endoderma parietal i la que recobreix l'ou cilindre endoderma visceral.

La membrana basal situada entre el trofoblast mural i l'endoderma parietal adquireix un gruix considerable i forma una estructura especialitzada denominada membrana de Reichert.

El trofoblast mural, la membrana de Reichert i l'endoderma parietal formen una estructura que actuarà de placenta (*parietal yolk sac placenta*) abans no hi hagi la placenta còrio-al.lantoica definitiva.

L'any 1979, Dziadek proposà un model alternatiu per a explicar el llinatge cel.lular de l'endoderma visceral i parietal durant l'embriogènesi del ratolí.

Estudià la producció de les cèl.lules endodèrmiques a partir de masses cel.lulars internes isolades i mantingudes en cultiu. Segons aquest treball, les primeres cèl.lules que es formen en la perifèria de la massa cel.lular interna són cèl.lules d'endoderma parietal. Les cèl.lules de l'endoderma visceral es produeixen després des del centre de la massa cel.lular interna de tipus ectodèrmic, i es mouen cap a la superfície de la massa cel.lular interna a través de les cèl.lules d'endoderma parietal. Segons aquest model, les cèl.lules de l'endoderma parietal i visceral no es formen a partir de la mateixa població de cèl.lules soca en l'endoderma primari, però es formen consecutivament des de cèl.lules ectodèrmiques.

CULTIU *IN VITRO* D'EMBRIONS

Per a poder estudiar els esdeveniments que es donen durant l'embriogènesi s'han utilitzat diferents tècniques de cultiu *in vitro*. Els cultius d'embrions durant el període de preimplantació han presentat pocs problemes degut a l'autonomia dels embrions en aquest interval. Els embrions mantinguts *in vitro* fins a la fase de blastocist es desenvolupen normalment si es transfereixen a l'úter d'una mare adoptiva (Mukherjee i Cohen, 1970).

El cultiu d'embrions postimplantats ha permès extreure informació sobre la seva organogènesi. Diferents treballs realitzats han donat resultats força satisfactoris (New, 1973; Steele, 1975; McLaren i Henleigh, 1975; Kochhar, 1975; New et al., 1976) encara que mai s'ha obtingut el desenvolupament a terme d'un embrió.

El problema principal es planteja quan s'intenta cultivar embrions durant la fase de la implantació. En aquest estadi l'embrió estableix els primers contactes amb l'úter matern. Encara que s'han ideat medis de cultiu per a substituir la matriu gestant cap resultat ha estat prou òptim. Els continus fracassos en aquest punt indiquen que la matriu gestant no és sols un substrat que permet l'ancoratge de l'embrió, sinó que té una part activa en el seu desenvolupament.

S'han introduït variacions interessants en els medis de cultiu que han permès millorar els resultats inicials obtinguts al cultivar embrions primerencs en medis de cultiu convencionals. Quan es fan créixer blastocists sobre fibres

transparentes de lent d'ull bovi alguns d'ells s'implanten però acte seguit es desorganitzen. El mateix s'observa quan es cultiven sobre monocapes de fibroblasts (Jenkinson i Wilson, 1970; Hogan, 1977).

Són de destacar els treballs de Hsu, que ha cercat diferents substrats en els quals l'embrió pugui créixer i mantenir la seva organització. Cultivant blastocists i mòrules sobre col.làgena de cua de rata i afegint sèrum de vedella al medi, el 80-95% arriben fins a l'estadi d'ou cilindre. El 5-20% arriba a l'estadi de sac vitel·lí i finalment desenvolupen cèl·lules sanguínies i elements contràctils (Hsu, 1971, 1972). Quan afegeix al medi sèrum de cordó umbilical humà veu que tant els embrions de dues cèl·lules, com els blastocists s'ancoren al substrat i creixen fins a posseir somites. La morfologia d'aquests embrions és idèntica a la dels mantinguts *in utero* (Hsu, 1978, 1979, 1981).

Encara que aquests resultats són encoratjadors, segueix sent necessària la presència d'una matriu gestant per al bon desenvolupament de l'embrió. Durant la implantació, com veurem més endavant, es produeixen molts canvis tant a nivell local com general en l'organisme matern. Tots aquests canvis són, ara per ara, irreproduïbles en una placa de cultiu.

LA COMPACTACIO

L'embrió es desenvolupa lliurement dintre del tracte matern fins al moment de la implantació. Durant la preimplantació el seu creixement és autònom i l'organisme matern actua només sincronitzant els esdeveniments que es produeixen, tant a nivell de l'embrió com del propi organisme matern, per a una bona consecució de la implantació.

Durant la preimplantació, però, hi ha un procés de vital importància per a la continuïtat de la gestació: la compactació embrionària.

Quan l'embrió arriba a l'estadi de vuit cèl.lules es produeix la seva compactació. Aquesta s'acompanya de multitud de canvis en l'estructura de l'embrió.

La compactació és estrictament necessària per a la formació del blastocist i per a la seva subsegüent implantació.

A continuació, estudiarem la compactació embrionària i els possibles mecanismes que regulen la seva consecució i la formació posterior del blastocist.

CANVIS MORFOLOGICS EN L'EMBRIÓ DE
VUIT CEL·LULES

Hi ha dos processos que juguen un paper preponderant en el desenvolupament i la morfogènesi dels vertebrats: la generació i reconeixement d'informació posicional i les interaccions cèl.lula-cèl.lula (Wolpert, 1971; Moscona, 1980).

Quan l'embrió té vuit cèl.lules es dona la compactació. Aquest és un pas clau per a la formació de la mòrula i del blastocist. La compactació està lligada a canvis en les cèl.lules individuals i en les seves interaccions. Per a tots aquests canvis és vital la integritat de les membranes cel.lulars, ja que són les responsables de la relació de les cèl.lules amb el seu entorn.

En l'embrió de vuit blastòmers no s'observa cap tipus de restricció. Tots els blastòmers són morfològicament idèntics i cada un d'ells té capacitat per a donar cèl.lules del trofoblast i de la massa cel.lular interna (Kelly, 1975, 1977; Balakier i Pedersen, 1982).

Per a diferents autors, la compactació genera una informació posicional que permet la determinació dels diferents blastòmers que integren la mòrula. S'ha observat que les cèl.lules de l'interior de la mòrula donen lloc a la massa cel.lular interna, mentre que les situades a l'exterior donen el trofoblast (Mintz, 1965; Tarkowski i Wroblewska, 1967; Johnson et al., 1981).

Si abans de que es produeixi la determinació de les cèl.lules de la mòrula aquestes es canvien de posició s'obté un blastocist normal (Rossant, 1977; Johnson, 1979; Rossant

i Frels, 1981). Aquesta observació fa pensar en una possible autorregulació per part de l'embrió durant aquest període (Johnson et al., 1981).

Durant la compactació es produeixen grans canvis en la morfologia de l'embrió. Els blastòmers esfèrics de l'embrió de vuit cèl.lules adquireixen una estructura polar, que depèn directament del contacte cèl.lula-cèl.lula (Ziomek i Johnson, 1980).

Hi ha molts canvis a nivell d'unions entre cèl.lules. Els espais intercel.lulars es redueixen apareixent diferents tipus d'unions especialitzades, que tenen dues funcions: 1) establir una continuïtat cel.lular entre tots els blastòmers, que s'observa per primera vegada a l'estadi de vuit cèl.lules i es manté fins a estadis posteriors a la implantació (Ducibella et al., 1975; Magnusos et al., 1978; Lo i Gilula, 1979).; 2) formar una tanca permeable entre els espais intercel.lulars al centre de l'embrió i l'espai extern (Calarco i Epstein, 1973; Ducibella et al., 1975; Ducibella, 1977; McLaren i Smith, 1977; Handyside, 1978; Magnuson et al., 1978).

Juntament amb els canvis en les relacions intercel.lulars, es produeix la polarització de les cèl.lules individuals. Al principi de la compactació s'estableix un eix a l'interior de cada cèl.lula donant cèl.lules columnars semblants a cèl.lules epitelials.

Els microvilli i els complexos d'unió (*tight junction*) queden restringits a la cara apical de les cèl.lules, els

microtúbuls es situen paral·lelament a les cares laterals, i els orgànuls formen una columna que s'estén des del nucli fins a la cara apical (Austin i Bishop, 1959; Mazanec i Dvorak, 1963; Izquierdo, 1975; Ducibella i Anderson, 1975; Van Elerkom i Motta, 1979; Reeve, 1981; Reeve i Ziomek, 1981; Maro et al., 1985).

FORMACIO DEL TROFOBLAST I DE LA MASSA
CEL·LULAR INTERNA

Després de la compactació, a l'estadi de setze cèl.lules, s'observa la presència de dos tipus cel.lulars diferents: les cèl.lules superficials, que tenen una estructura polar com l'adquirida pels blastòmers de l'embrió de vuit cèl.lules, i les cèl.lules internes que són apolars i tenen un origen basolateral (Ducibella et al., 1977; Handyside, 1980; Ziomek i Johnson, 1980; Johnson i Ziomek, 1981; Reeve i Ziomek, 1981; Kimber et al., 1982; Fleming i Pickering, 1985; Maro et al., 1985).

Les cèl.lules polars i no polars mantenen aquesta organització en estadis succesius. Les polars, situades a la perifèria de la mòrula, donen lloc al trofoblast, les apolars, situades a l'interior, donen lloc a la massa cel.lular interna (Ducibella et al., 1975; Fleming i Pickering, 1985; Maro et al., 1985).

Des de fa anys, es debat sobre quin és el mecanisme per el qual les cèl.lules de la mòrula reconeixen la seva posició interna o externa. Hi ha, com veurem més endavant, diferents teories per a explicar-ho. Sembla clar però, que el manteniment de la posició relativa de les cèl.lules dintre de la mòrula ve determinat per les propietats adhesives diferents de les cèl.lules polars respecte a les no polars (Ziomek i Johnson, 1981; Kimber et al., 1982; Surani i Barton, 1984).

CONTROL DE LA COMPACTACIO

Els processos que regulen la compactació s'han estudiat utilitzant diverses tècniques arribant-se a dues conclusions:

1) La compactació succeeix en un temps fix després de la fertilització. És independent de la citocinesi, de la relació nucli/citoplasma, del número de cèl.lules presents i de l'estadi de replicació o expressió de l'ADN.

2) Depèn directament de la membrana cel.lular i del citoesquelet.

Per arribar a aquestes conclusions generals ha estat necessari realitzar nombrosos treballs. Tot seguit, parlarem d'alguns d'ells

1. IMPORTANCIA DEL CITOESQUELET

El citoesquelet està format per una xarxa de microtúbuls i microfilaments. Hi ha diverses substàncies, com la citocalasina D o la colcemida, que poden actuar directament sobre el citoesquelet alterant-lo. Per a comprovar la importància de la integritat del citoesquelet per a la compactació, s'han realitzat diversos experiments incubant embrions amb algunes d'aquestes substàncies.

Quan s'incuben embrions amb citocalasina D s'observa un bloqueig de la citocinesi i una inhibició de la compactació. Aquests efectes poden ser o no reversibles dependent de la

durada de la incubació. La citocalasina D actua despolimeritzant l'actina dels microfilaments, és possible que aquesta sigui la causa de la seva acció sobre la compactació (Wesslts, et al., 1971; Surani et al., 1980; Pratt et al., 1982).

Quan es cultiven embrions de dues cèl.lules amb colcemida per períodes superiors a 28h s'atura de forma irreversible la seva citocinesi. Realitzant cultius d'embrions amb citocalasina D i colcemida, s'ha vist que els resultats són aproximadament els mateixos que quan es cultiva únicament amb citocalasina D (Pratt et al., 1982).

Aquests resultats evidencien la importància del citoesquelet en la compactació ja que la seva alteració provoca la desorganització de l'embrió. Si l'acció de les substàncies inhibidores es produeix durant un temps curt l'embrió pot revertir a la normalitat, però en períodes més llargs les alteracions són ja irreversibles.

2. IMPORTANCIA DE LA MEMBRANA CEL·LULAR

La cèl.lula es relaciona amb el seu microambient a través de la membrana citoplasmàtica. La membrana citoplasmàtica està implicada en la captació de nutrients i informació, així com en els moviments cel·lulars. Es també, la responsable de les interaccions cèl.lula-cèl.lula. Per tant, sembla evident que la seva integritat, així com la

seva composició bioquímica, ha de jugar un paper important en tots els processos del desenvolupament.

Uns constituents majoritaris de les membranes cel·lulars són els lípids: fosfolípids i esterols. El seu estudi posa de manifest llur importància durant l'embrionogènesi normal

També formen part de les membranes cel·lulars diferents proteïnes amb propietats bioquímiques i antigèniques característiques. El seu paper durant la compactació s'ha estudiat amb anticossos específics dirigits contra elles. Així mateix s'ha cercat quina és la interacció entre proteïnes estructurals de membrana i ions divalents, com l'ió Ca^{2+} , a l'hora de la compactació.

2.1. FOSFOLÍPIDS I ESTEROLS

Els lípids de membrana han estat estudiats tant amb membranes cel·lulars naturals com artificials. Estudis de bicapes artificials de composició lipídica defenida mostren que els fosfolípids i els esterols interactuen entre ells estabilitzant la bicapa i regulant la seva permeabilitat (Lee, 1975).

Els esterols s'han trobat tant a nivell de les membranes eucariotes com procariotes (Nes, 1974), això indica un paper fonamental d'aquestes molècules en la fisiologia de les membranes cel·lulars. Així modificacions experimentals del contingut de colesterol poden regular la

fluïdesa i la permeabilitat de les membranes, també es pot veure alterat el transport de substàncies a través d'elles (Papahadjopoulos, 1974; Warren et al., 1975; Demel i de Kruijf, 1976; Kimelberg, 1977).

No sols els esterols poden influenciar la fisiologia normal de la membrana cel·lular, sinó que també el contingut de fosfolípids pot alterar o modificar les seves funcions. Sabem que el recanvi de fosfolípids que es produeix en les membranes regula el creixement de les cèl·lules (Pasternak i Friederichs, 1970; Dawson, 1973). Aquest recanvi que implica síntesi de fosfolípids i de noves membranes es posa de manifest per a la incorporació de colina en les bicapes estudiades (Bergeron et al., 1970; Pasternak, 1973; Pratt, 1980).

Tant durant el desenvolupament com durant la vida adulta, hi ha processos que depenen directament de les membranes cel·lulars. Així podem citar la citocinesi, la capacitat de la cèl·lula per a captar i transmetre estímuls i l'adhesivitat cel·lular (Alderson i Green, 1975; Warren et al., 1975; Hope et al., 1977; Pratt et al., 1977; Horwitz et al., 1978).

També durant el desenvolupament es requereix la formació de noves membranes. Les cèl·lules han de dividir-se i creixer, s'han d'establir nous contactes intracel·lulars i s'observa la polarització dels blastòmers de l'embrió primerenc (Calarco i Brown, 1969; Ducibella et al., 1975;

Ducibella et al., 1977; Johnson et al., 1977; Johnson, 1979).

Durant la compactació es produeixen canvis no sols a nivell de les membranes plasmàtiques, sinó també en les intracel.lulars. Hi ha variacions en l'expressió d'antigens de membrana, la morfologia mitocondrial varia i hi ha canvis en el transport de les membranes (Borland i Tasca, 1974; Biggers i Borland, 1976; Edilin, 1976; Biggers et al., 1977).

Quan es cultiven juntes cèl.lules polars i apolars d'embrions primerencs, s'observa que les apolars són envoltades per les polars, mantenint-se les seves posicions relatives. Aquest fet pot explicar-se degut a les propietats diferents de llurs superfícies cel.lulars (Johnson i Ziomek, 1983; Surani i Barton, 1984).

Totes les dades esmentades anteriorment mostren la importància de les membranes cel.lulars durant la compactació i altres fases del desenvolupament, per tant, els lípids de membrana, fosfolípids i esterols, jugaran un paper important en tots aquests processos.

L'embrió pot incorporar lípids del medi i la seva composició bioquímica és de gran importància per al desenvolupament normal. Així cultivant embrions preimplantats amb esterols sintètics s'observa la inhibició de la compactació embrionària (Pratt, 1980; Pratt et al., 1980).

L'embrió primerenc té també la capacitat de sintetitzar esterols i fosfolípids. Aquesta augmenta en l'estadi de vuit cèl.lules i és indispensable per a la compactació cel.lular (Huff i Eik-Ness, 1966; Pratt, 1973; Kane i Headon, 1980; Quin i Whittingham, 1982).

Aquests resultats permeten afirmar que la composició lipídica de les membranes cel.lulars pot actuar regulant la compactació embrionària.

2.2. PAPER DE L'IO CALCI, OVOMORULINA

L'ió Ca^{2+} està implicat en molts processos fisiològics durant l'embriogènesi i la vida adulta. El primer procés dependent del calci en el desenvolupament és la compactació. Quan es realitzen cultius d'embrions de dues cèl.lules en un medi lliure de Ca^{2+} s'observa que aquests es divideixen però no es compacten degut a que no es formen unions intercel.lulars (Ducibella i Anderson, 1975; Pratt et al., 1982).

S'ha proposat un model per a explicar l'actuació del Ca^{2+} a nivell molecular.

Es coneix que el Ca^{2+} pot unir-se a diferents proteïnes canviant, possiblement, la seva conformació. S'observa que aquestes esdevenen resistents a l'acció de la tripsina sempre que els llocs d'unió amb el Ca^{2+} estiguin ocupats (Ho et al., 1975; Blumberg i Tal, 1976; Kretsinger, 1976; Drabikowski et al., 1977).

S'ha demostrat també, l'existència de llocs d'unió a anticossos dependents del Ca^{2+} en la protombina. Els anticossos isolats han permès estudiar les transicions dels llocs d'unió davant de diferents metalls (Furie i Furie, 1979; Tai et al., 1980).

Utilitzant un fragment Fab d'un anticòs anti-carcinoma embrionari s'ha aïllat una glicoproteïna denominada ovomorulina. L'ovomorulina té un pes de 84 Kd i està relacionada amb el reconeixement cèl.lula-cèl.lula durant la compactació (Hyafil et al., 1980).

L'ovomorulina en presència de Ca^{2+} no pot ser atacada per la tripsina. Així mateix l'anticòs monoclonal DE1 tan sols pot unir-se a ella si aquest ió està en el medi (Hyafil et al., 1981).

A partir d'aquestes observacions, s'ha proposat que el Ca^{2+} s'uniria a llocs específics de l'ovomorulina modificant la seva conformació, regulant així la compactació de l'embrió (Hyafil et al., 1981).

2.3. ANTIGENS DE MEMBRANA IMPLICATS EN LA COMPACTACIÓ. ANTIGEN F9.

Les cèl.lules de carcinoma embrionari han estat estudiades per les seves característiques comunes amb les cèl.lules de l'embrió primerenc. Totes les línies de carcinoma embrionari estudiades presenten l'antigen de membrana F9. S'ha trobat també en embrions joves i en

l'espermatozoide humana (Arts et al., 1973; Buc-Caron et al., 1974; Jacob, 1975).

L'antigen F9 és una estructura molt conservada durant l'evolució. Està especificat per l'al·lel $H-2^k$ del locus T (complex T/t) del ratolí (Artz et al., 1974; Kemler et al., 1976).

Quan es tracten embrions de ratolí de dues o vuit cèl·lules amb fragments Fab anti-F9 no es produeix la compactació. Si s'eliminen els fragments Fab es produeixen mòrules compactes que donen lloc a blastocists normals (Kemler et al., 1977).

Resultats semblants s'obtenen utilitzant un antiserum de conill dirigit contra la soca nul·lipotent LS5770 de carcinoma embrionari. En presència d'aquest antiserum no es produeix la compactació embrionària sinó que es dona un agregat de blastòmers sense unions intercel·lulars (Johnson et al., 1979).

Aquests treballs posen de manifest la importància d'algunes proteïnes estructurals de la membrana cel·lular per a la compactació embrionària.

MECANISMES DE LA DETERMINACION
CEL.LULAR

Els diferents autors al llarg dels anys han intentat esbrinar com en l'embrió de vuit cèl.lules es produeixen les restriccions que condueixen a la formació del blastocist. Han proposat varis models per a explicar de quina manera les cèl.lules de la mòrula coneixen la seva posició externa o interna i per tant el camí de citodiferenciació que han de seguir.

Classicament es coneixen dues hipòtesis:

1) Hipòtesi clàssica (*segregation hypothesis*), suposa que cèl.lules diferents hereten substàncies citoplasmàtiques diferents. Els blastòmers, que primer són equipotents, segons la posició que prenguin a l'atzar, seguiran un camí determinat de diferenciació (Dalcq, 1957).

2) Hipòtesi epigenètica (*inside-outside hypothesis*) suposa que els blastòmers esdevenen diferents com a resultat de la seva posició en l'embrió i per tant del seu microambient. La determinació dependrà de factors localitzats de distribució polar. Aquests poden estar en una àrea del citoplasma de l'ou segregant-se durant les divisions següents, o poden tenir un origen exogen (Ducibella, 1977).

Segons la hipòtesi epigenètica els esdeveniments morfogènets de la compactació generen les condicions requerides per a la citodiferenciació. Proposa que les unions intercel.lulars apicals (*zonular tight junctions*) impedeixen el pas lliure de molècules creant-se així un

microambient distintiu per a les cèl.lules. Els canvis del microambient són captats per les cèl.lules que responen donant la massa cel.lular interna.

Diferents autors, consideren que aquesta hipòtesi no és vàlida ja que així ho indiquen diversos resultats (Johnson, 1979; Pedersen i Spindle, 1981). Hi ha però, treballs anteriors que apunten cap a l'existència d'un factor ambiental implicat en la determinació cel.lular dels blastòmers (Tarkowski i Wroblewska, 1967; Wilson et al., 1972; Hillman et al., 1972).

També la hipòtesi clàssica es considera inadequada ja que molts treballs demostren que els blastòmers fins l'estadi de trenta-dues cèl.lules no presenten cap tipus de restricció. Ja Kelly l'any 1975 estudiant tots els blastòmers d'embrions de quatre i vuit cèl.lules va demostrar-ho. Posteriorment, s'ha vist que si es situen experimentalment a la perifèria els blastòmers no polars de l'embrió de setze cèl.lules es polaritzen al contactar amb les cèl.lules asimètriques i donen trofoblast (Ziomek i Johnson, 1982; Johnson i Ziomek, 1983; Johnson, 1986). També s'ha observat que en l'embrió de trenta-dues cèl.lules els blastòmers polars poden generar cèl.lules polars i no polars (Balaquier i Pedersen, 1982; Ziomek i Johnson, 1983; Johnson, 1986).

Ja que cap de les dues teories esmentades sembla encertada, s'ha proposat una tercera hipòtesi anomenada hipòtesi de la polarització (*polarization hypothesis*)

(Johnson, 1979). Segons ella, la polarització dels vuit blastòmers durant la compactació produeix condicions citoplasmàtiques no equivalents. Aquestes condicions no són determinatives fixant el camí a seguir per les cèl.lules, sinó que són diferenciatives guiant el seu destí. La determinació resultaria d'un augment d'esdeveniments diferenciatius.

La hipòtesi de la polarització, igual que la hipòtesi clàssica, apunta cap a l'existència de factors citoplasmàtics diferents. Introdueix, però, una flexibilitat que permet explicar la polarització observada en els blastòmers de vuit, setze i trenta-dues cèl.lules. Segons aquesta hipòtesi, els processos morfogenètics i citodiferenciadors es donarien paral·lelament.

Encara que aquesta hipòtesi s'ajusta a la major part dels resultats experimentals obtinguts, els estudis sobre la determinació cel·lular de l'embrió continuen vigents. Recentment, Fleming (1987) ha proposat que el número de cèl.lules que donen lloc al trofoblast o a la massa cel·lular interna està autorregulat pel propi embrió.

Marcant amb latex fluorescent mòrles de setze cèl.lules ha vist que *in situ* el trofoblast deriva quasi exclusivament (99%) dels blastòmers externs. L'origen de la massa cel·lular interna varia. Un 75% d'aquestes cèl.lules provenen dels blastòmers no polars i la resta dels polars.

L'embrió autorregula la relació trofoblast/massa cel·lular interna. La mida de la població no polar de

l'embrió de setze cèl.lules influencia la quantitat de cèl.lules polars que donaran origen a cèl.lules de la massa cel.lular interna. La proporció de cèl.lules de trofoblast i de massa cel.lular interna es manté dintre d'un marge limitat (Handyside, 1978; Surani i Barton, 1984; Chisholm et al., 1985, Fleming 1987).

Aquest treball indica que la totipotència dels blastòmers polars s'expressa *in situ* però no la dels blastòmers apolars. Aixó podria ser degut a les diferències de la superfície cel.lular d'ambdós tipus de blastòmers. En la mòrula de trenta-dues cèl.lules (blastocist neixent) les cèl.lules precursoras de la massa cel.lular interna es troben totalment encerclades pel trofoblast, aquest aïllament podria ser el causant de la restricció (Fleming et al., 1984).

També observa que les cèl.lules precursoras del trofoblast contribueixen a la formació de la massa cel.lular interna, altres treballs indiquen per altre banda que les cèl.lules totipotents de la massa cel.lular interna formen part del llinatge cel.lular del trofoblast (Cruz i Pedersen, 1985).

Segons Fleming (1987), la determinació de la mòrula per a donar el blastocist vindria regulada per dues fases:

- 1) Establiment de diferències quantitatives entre els blastòmers precursoras dels llinatges cel.lulars (embrions de vuit i setze cèl.lules).

2) Regulació quantitativa del llinatge cel.lular
(embrions des de setze a trenta-dues cèl.lules).

LA IMPLANTACIO

Després del període d'existència lliure que acabem d'estudiar, l'embrió dels mamífers necessita unir-se íntimament als teixits materns per a continuar el seu desenvolupament.

L'embrió un cop ha perdut la seva zona pel·lúcida experimenta diferents canvis morfològics a nivell del trofoblast. Paral·lelament l'epiteli uterí modifica la seva superfície lliure per a establir un millor contacte amb l'embrió. Amb l'adhesió del blastocist a l'epiteli uterí s'inicia el procés de la implantació.

Després que s'han unit el trofoblast i l'epiteli uterí aquest últim es desenganxa de la seva làmina basal i es produeix la penetració del trofoblast cap a l'interior de l'estroma uterí. Conjuntament, l'estroma es modifica profundament donant un teixit especialitzat anomenat teixit decidual. La decidua farà possible la implantació de l'embrió. Posteriorment, després de diversos canvis, s'establirà en aquesta zona la placenta definitiva de l'embrió.

Les hormones esteroides, que són necessàries per al manteniment de la gestació, regulen tots els esdeveniments succeïts durant la implantació.

HORMONES I GESTACIO

Les hormones són substàncies produïdes, generalment, per distintes glàndules endocrines en quantitats minúscules. Actuen com a missatgers químics al ser transportades per la sang fins als seus òrgans efectors. Algunes d'elles poden circular lliurement pel torrent sanguini, mentre que d'altres necessiten unir-se a molècules transportadores.

Les hormones tenen un paper regulador de les activitats fisiològiques i metabòliques en els vertebrats.

1. HORMONES ESTEROIDES

Les hormones esteroides deriven totes elles de la molècula de colesterol. Entre elles s'hi troben els estrògens o hormones sexuals femenines, i la progesterona.

El paper de les hormones esteroides és regular els processos que es produeixen durant la gestació posant ordre en la seqüència d'esdeveniments del desenvolupament. Aquest mecanisme sincronitzador disminueix el risc i augmenta l'eficiència del sistema de reproducció. La sincronització de la maduració del zigot i de l'úter permet que la implantació, la gastrulació i la placentació posterior tinguin èxit (Glasser et al., 1982).

1.1. ELS ESTROGENS

Es paper dels estrògens durant la gestació es coneix de forma incompleta. Generalment es creu que són necessàris per al manteniment de la gestació, però es desconeix la seva acció específica sobre l'úter i el creixement de l'embrió.

Durant la gestació s'han aïllat més de vint estrògens en l'espècie humana. Tots ells són esteriods fenòlics amb un anell aromàtic i divuit àtoms de carboni. Els més importants són el 17 β -estradiol i l'estrona (revisió en Berling, 1982).

En l'espècie humana s'ha vist que els nivells d'estrògens augmenten durant la gestació. Ja en 1962, Diczfalusy va descriure que el fetus i la placenta actuaven coordinadament sintetitzant estrògens. Desenvolupà així el concepte d'unitat fetoplacentària.

En altres espècies s'han realitzat diferents treballs *in vivo* i *in vitro* que han permès entendre millor l'acció d'aquestes hormones. S'ha vist que els estrògens controlen els canvis morfològics i bioquímics durant la implantació i actuen en moltes ocasions coordinadament amb la progesterona.

Estudis *in vitro* han mostrat que el trofoblast d'embrions preimplantats pot sintetitzar 17 β -estradiol a partir de progesterona. Això fa pensar que *in utero*, la progesterona procedent del cos luti pot ser una font endògena per a la producció d'estrogens embrionaris (Heap et al., 1981).

Els estrògens produïts pel trofoblast del blastocist possiblement actuen com un senyal embrionari de l'estat gestacional. Els teixits materns reconeixrien l'estat gestacional a partir d'aquest senyal (Short, 1969; Winteberger-Torres, 1978; Heap et al., 1981).

Durant la preimplantació es produeixen diferents proteïnes intrauterines típiques de la gestació. La seva secreció és dependent dels nivells d'estrògens. Les proteïnes secretades a la llum uterina controlarien el desenvolupament del blastocist, sent aquest un possible mecanisme d'acció de les hormones esteroides (Aitken, 1977; Skipper et al., 1980; Bullock, 1981; Lejeune et al., 1982).

1.2. LA PROGESTERONA

La progesterona és indispensable per al manteniment de la gestació. Es produeix en el cos luti ovàric, en el trofoblast del blastocist i en la placenta.

La progesterona per a poder circular per l'organisme ha d'unir-se a diferents proteïnes específiques com l'albumina (Klopper i Fuchs, 1982).

La secreció de progesterona per part del cos luti és essencial per a l'establiment i el manteniment de l'estat gestacional. La progesterona induïx la diferenciació de l'endometri durant la fase luteal del cicle reproductiu i és indispensable per a la implantació (Psychoyos i Casimiri, 1980).

Per a que es produeixi la decidua els estrògens i la progesterona han d'actuar combinadament. Es necessita una primera dosi d'estrògens seguida d'un increment de progesterona circulant. La progesterona regula la sensibilitat de l'úter per decidualitzar-se i els estrògens els canvis que es produeixen (Nelson i Pfiffner, 1930; Yochim i De Feo, 1962, 1963; Finn i Martin, 1972; Villee et al., 1981).

2. LES PROSTAGLANDINES

Les prostaglandines constitueixen un grup de compostos amb accions semblants a les de les hormones esteroides. A diferència d'aquestes, no es produeixen en glàndules endocrines, encara que es sintetitzen en molts teixits diferents.

Les prostaglandines no poden considerar-se com hormones veritables, però la seva acció, en molts teixits, està íntimament relacionada amb els processos endocrins. Són àcids greixosos insaturats i es basen en l'esquelet de vint carbonis de l'àcid prostanoic (revisió en Fuchs, 1982).

Les prostaglandines, junt amb les hormones esteroides, són necessàries per a la producció del teixit decidual (Saksena et al., 1976). Recentment, s'ha vist que elles soles poden iniciar la reacció decidual quan actuen en

nivells alts sobre cèl.lules uterines humanes (Kennedy, 1986).

Tanbé estan implicades en el control de la vascularització de l'endometri durant la gestació. Just abans de la implantació de l'embrió es produeixen canvis en la vascularització de l'úter gestant (Psychoyos, 1973). Aquests canvis, que són indispensables per a la formació de la decidua estan regulats per les prostaglandines (Kennedy i Armstrong, 1981; Kennedy, 1983).

Les prostaglandines actuarien durant la gestació conjuntament amb les altres hormones per a permetre la implantació del blastocist.

3. LA PROLACTINA HUMANA

La prolactina es coneix des de 1933 en que es va veure que extractes hipofisaris podien induir la secreció làctica de la glàndula mamària (Riddle et al., 1933).

La prolactina és una hormona d'estructura proteica. Té un pes molecular de 20 Kd i el seu punt isoelèctric està entre pH 5.2 i 6.4.

Actua sobre diferents òrgans efectors per sinèrgia amb, o per inhibició, d'altres hormones. Sobre l'ovari pot tenir acció luteolítica o luteotrópica. *In vitro* la producció de progesterona per les cèl.lules de la granulosa requereix una

contribució baixa de prolactina ja que les concentracions altes actuen inhibint-la (Saxena, 1982).

Les cèl.lules de la decidua humana sintetitzen prolactina. *In vitro* aquesta síntesi és dependent de la progesterona (Masler et al., 1986).

Aquestes observacions indiquen un possible sistema coordinat de la progesterona i la prolactina per al manteniment de la gestació.

L'EMBRIO I L'ENDOMETRI EN LA
IMPLANTACIO

El sistema endocrí sincronitza a l'organisme matern i a l'embrió per a que es pugui dur a terme la gestació. La matriu gràvida durant la implantació experimenta una sèrie de canvis estructurals que venen determinats per la presència del blastocist en la llum uterina. El blastocist envia un senyal decidualitzador a la matriu materna iniciant-se així els esdeveniments relacionats amb la implantació.

1. SENYALS DECIDUALITZADORS

La reacció decidual es produeix durant la gestació com a resposta a la presència del blastocist en l'úter matern, però també pot produir-se com a resposta a estímuls artificials.

Els estímuls artificials que provoquen la decidualització poden ser tant de tipus físic com químic. Tots ells produeixen el trencament de les cèl.lules de l'epiteli uterí. Les cèl.lules epitelials destruïdes poden alliberar algun tipus d'estímul que determini la formació de la formació de la decidua (Thibault, 1978; Lundkvist i Nilsson, 1982).

Un d'aquests estímuls artificials és el CO_2 o l'aire ric en ell. L'embrió durant l'inici de la implantació metabolitza grans quantitats de glicosa (Nilsson et al., 1980). El CO_2 resultant d'aquest metabolisme podria ser un

factor implicat en la decidualització durant la gestació (Hetherington, 1973).

El senyal embrionari que pot actuar directament sobre l'endometri provocant la reacció decidua és la producció d'estrògens per part de l'embrió. Dóna suport a aquesta hipòtesi el trobar just abans de la implantació un increment dels receptors per estrògens i progesterona en els llocs on es produirà la implantació (Logeat et al., 1980; Villee et al., 1981).

Encara que no coneguem amb certesa quin és el mecanisme utilitzat per l'embrió per a provocar la decidua, sabem que el seu senyal és més potent que el dels estímuls artificials, ja que embrions que sols tenen un viutè del número normal de cèl.lules s'implanten en l'úter (Rossant, 1976).

Totes les dades apunten cap a la idea de que és el trofoblast l'encarregat d'enviar el primer senyal a l'organisme matern. Vesícules de trofoblast isolat poden provocar la decidua en femelles pseudogestants, mentre que masses cel.lulars internes no donen aquesta reacció (Gardner, 1972). La massa cel.lular interna és únicament necessària per al desenvolupament de les vesícules de trofoblast implantades i la subsegüent formació del con ectoplacentari (Gardner et al., 1973).

2. PRIMERES FASES DE LA IMPLANTACIO

2.1. L'EMBRIO

En les espècies amb ovulacions múltiples els embrions abans d'implantar-se són distribuïts al llarg de la matriu. Es la matriu qui s'encarrega de la distribució dels embrions mitjançant una sèrie de contraccions musculars (Thibault, 1978).

Un cop els embrions han estat distribuïts prenen una posició definitiva dintre de la llum uterina. En aquest lloc iniciarà el contacte amb l'endometri matern i s'implantarà.

L'embrió queda immobilitzat quan encara té la seva zona pel·lúcida la qual cosa indica que l'adopció d'una posició fixa no depèn de l'establiment d'unions intercel·lulars (Enders, 1975). En aquesta fase l'embrió envia a la mare el senyal de decidualització que farà que s'iniciï el procés de la implantació (Lundkvist i Nilsson, 1984).

A continuació l'embrió perd la seva zona pel·lúcida. Aquesta pèrdua resulta de la intervenció conjunta de l'endometri i del blastocist. La contribució de l'endometri és principalment enzimàtica i la de l'embrió principalment mecànica (Thibault, 1978).

Un cop deslliurat de la zona pel·lúcida l'embrió s'adhereix a l'epiteli uterí. Les cèl·lules de trofoblast que presenten petits microvillis canvien la seva morfologia. Les microvellositats desapareixen o s'arrodoneixen. La

mateixa transformació s'observa a nivell de les cèl.lules de l'epiteli uteri. Les dues superfícies cel.lulars contacten intimament observant-se la presència d'estructures semblants a desmosomes (Nilsson, 1967; Psychoyos i Mandon, 1971; Morris et al., 1982).

2.2. ACTIVITAT DE LES CEL.LULES EPITELIALS

Les cèl.lules de l'epiteli uteri durant la preimplantació experimenten diferents canvis morfològics i bioquímics. S'observa activitat pinocitòtica i exocitòtica per part d'aquestes cèl.lules que es fa màxima poc abans de la implantació.

A l'inici de la gestació es dona l'oclusió de la llum uterina degut a que l'estroma uteri esdevé edematós. Aquesta oclusió s'acompanya de la disminució del líquid uteri (Psychoyos, 1973).

L'embrió quan encara té la zona pel.lúcida es immobilitzat dintre de la matriu. S'ha vist que en la zona on s'implanta l'embrió les glàndules uterines s'obren desenvolupant-se una papil·la i omplint-se la llum glandular. Es creu que aquest pot ser un mecanisme per a immobilitzar el blastocist sobre l'epiteli uteri (Guillomot i Guay, 1982).

Durant la preimplantació hi ha vesícules de pinocitosi en l'extrem lliure de la cèl.lula epitelial. L'activitat

pinocitòsica es fa màxima el dia de la implantació. Pot estar associada a les modificacions quantitatives i qualitatives del fluid uterí durant la preimplantació així com amb la nutrició del blastocist (Parr i Parr, 1974, 1977, 1978; Enders, 1976; Guillomot i Guay, 1982).

També en aquest període s'observa exocitosi per part de les cèl.lules epitelials cap a la llum uterina juntament amb una augment de l'activitat glandular. D'aquesta manera la matriu pot lliurar substàncies que controlin el desenvolupament de l'embrió (Given i Enders, 1980).

Les cèl.lules epitelials que s'uniran a l'embrió tenen partícules intermembranoses de mida i número màxims al moment de la implantació (O'Grady i Bell, 1977; Murphy et al., 1982), així com un augment del colesterol en la membrana plasmàtica apical (Murphy i Martin, 1985).

L'endocitosi no sols s'ha descrit a nivell de la membrana apical de la cèl.lula epitelial sinó que durant aquesta fase també hi ha endocitosi an les seves membranes laterals i basal. D'aquesta manera la cèl.lula pot captar substàncies que li arriben per via sanguínia, transportar-les fins l'extrem apical de la cèl.lula i lliurar-les a la llum uterina per exocitosi (Parr, 1980).

Un mecanisme semblant es produiria gràcies a l'acció dels lisosomes epitelials. Durant els primers estadis de la gestació les cèl.lules epitelials tenen lisosomes que el dia de la implantació es fusionen amb vesícules d'endocitosi de la superfície apical de la cèl.lula (Parr i Parr, 1974;

Enders i Given, 1977). La fusió d'aquestes vesícules amb els lisosomes permetria la degradació de macromolècules del fluid de la llum uterina donant compostos de baix pes molecular que serien lliurats de la cèl.lula per exocitosi. Aquests compostos serien utilitzats com a nutrients per l'embrió (Parr i Parr, 1974, 1978).

Tots els processos esmentats posen de manifest la gran activitat de les cèl.lules epitelials de la matriu en el moment de la implantació. Després d'aquesta fase es comporta de manera semblant a com ho fa durant el cicle ovàric normal.

2.3. FORMACIÓ DE LA CAMBRA D'IMPLANTACIÓ

Quan l'embrió pren la seva posició definitiva en l'úter s'observa l'aparició d'una fosseta en la mucosa uterina (Enders, 1975). Aquest és l'inici de la cambra d'implantació.

S'anomena cambra d'implantació al lloc on quedarà implantat l'embrió i tindrà lloc el seu desenvolupament. Prenen part en la formació de la cambra d'implantació les cèl.lules epitelials i estromals de la mucosa uterina.

Al principi de la gestació les cèl.lules de la mucosa uterina formen la cambra d'implantació que conté l'embrió. Les cèl.lules epitelials que delimiten la cambra degeneren i la llum uterina mesometrial a l'embrió s'oblitera fins que

la llum de la matriu esdevé discontinua (Welsh i Enders, 1983).

La formació d'aquests espais ve donada per un creixement diferencial dels teixits uterins. Els vasos sanguinis presents a la cambra d'implantació es troben molt més espaiats que en la resta de la matriu. Això es deu a la hidratació dels teixits i a l'increment de la permeabilitat vascular en aquests llocs (Rogers et al., 1982).

La permeabilitat està regulada, com ja hem vist, per les prostaglandines, la qual cosa fa indispensable la seva participació per a la correcta implantació de l'embrió.

2.4. PERDUA DE L'EPITELI UTERI

Un cop el trofoblast s'ha adherit a l'epiteli les cèl.lules es transformen en deciduais. Després les cèl.lules epitelials que envolten el blastocist es desenganxen de la membrana basal i són fagocitades pel trofoblast (Enders i Schlafke, 1967; Tachi et al., 1970).

En observar que el trofoblast fagocitava les cèl.lules epitelials va sorgir la controvèrsia de si aquesta fagocitosi era la causa de la pèrdua de l'epiteli, o si l'epiteli degenerava i després era fagocitat. Tots els treballs realitzats al respecte donen suport a aquesta última idea.

Les cèl.lules epitelials esdevenen necròtiques i degeneren poc després del contacte amb l'embrió. En

l'interior d'aquestes cèl.lules es troben autofagosomes (Smith i Wilson, 1974; El-Shershaby i Hinchliffe, 1975) així com enzims lisosomals actius (Moulton, 1974; Moulton et al., 1978) que indiquen un procés d'autodigestió.

Un cop s'han desenganxat de la membrana basal les cèl.lules del trofoblast les digereixen, trobant-se restes de cèl.lules epitelials en el seu interior (Mulnard, 1967).

2.5. LES CÈL.LULES ESTROMALS, FORMACIÓ DE LA DECIDUA

Quan l'embrió està envoltat per la zona pel.lúcida s'observen els primers signes de la formació del teixit decidual. Les cèl.lules de l'estroma, com a resposta al senyal decidualitzador de l'embrió, experimenten canvis específics en els seus nuclèols (Lundkvist i Nilsson, 1984). També en aquest moment es produeix un augment en la concentració de receptors nuclears per l'estradiol i la progesterona en els llocs d'implantació (Logeat et al., 1980).

L'embrió perd la zona pel.lúcida i s'adhereix a les cèl.lules epitelials. En aquest moment les cèl.lules estromals que envolten l'embrió es transformen en cèl.lules deciduais constituint-se l'anomenada zona decidual primària (Krehbiel, 1937).

La decidua primària és transitòria i totalment avascular. Està formada per cèl.lules estromals poligonals

unides entre elles per *gap junctions*. Les unions intercel.lulars permeten que els estímuls decidualitzadors i alguns nutrients puguin passar ràpida i homogèniament per aquest teixit (Finn i Lawn, 1967; Kleinfeld et al., 1976; Brökelman i Biggers, 1979; Welsh i Enders, 1985).

Un cop s'ha format la decidua primària es produeix la pèrdua de l'epiteli uteri. La decidua primària, degut a l'absència de capil.lars, és impermeable a molècules d'alt pes molecular no permetent el seu pas des de la sang materna cap a l'epiteli. D'aquesta forma pot actuar isolant l'epiteli i contribuir així a la seva separació de la làmina basal (Rogers et al., 1983). De la mateixa manera, pot tenir una funció protectora per a l'embrió que encara no té ben desenvolupades les seves membranes de protecció com són l'endoderm parietal i la membrana de Reichert (Parr i Parr, 1980).

Després de la pèrdua de l'epiteli, les cèl.lules del trofoblast es situen adjacents a la làmina basal de les cèl.lules epitelials. No s'observa mai cap prolongació del trofoblast que passi a través d'aquesta làmina en direcció a les cèl.lules deciduals. Contràriament, es veu que són les cèl.lules de l'estroma les que trenquen la membrana basal per anar a contactar amb l'embrió. Aquest fet evidencia que el trencament de la làmina basal és independent del contacte de les cèl.lules de la decidua amb el trofoblast i que és un procés d'origen matern (Schlafke et al., 1983; Schlafke et al., 1985; Welsh i Enders, 1987).

La formació del teixit decidua està relacionada amb processos de degradació i de síntesi. Durant la deciduïtzació hi ha activitat lisosomal en els llocs d'implantació que determina la disminució de les fibres de col·làgena en aquesta zona (Fainstat, 1963; Martello i Abrahamsohn, 1980).

En el ratolí el dia de la implantació (dia 4) les escasses fibres de col·làgena existents són substituïdes per fibres llargues i primes que encerclen les cèl·lules deciduales. Aquestes fibres són produïdes per la decidua remodelant-se així el teixit connectiu. Aquesta remodelació és important per a la reorganització de les cèl·lules estromals en teixit decidua i per a la implantació de l'embrió (Martello i Abrahamsohn, 1980).

2.6. INVOLUCIO DE LA DECIDUA PRIMARIA

A mesura que l'embrió va creixent i desenvolupant-se la decidua va transformant-se fins a formar un sistema vascular per a aportar-li els nutrients necessaris.

La decidua primària avascular, que actuava com a filtre de substàncies de la mare cap al fetus, va degenerant i es van formant en aquesta zona petits vasos sanguinis.

La degradació de la decidua primària està relacionada amb l'aparició d'autofagosomes en les cèl·lules deciduales. Les cèl·lules de l'estroma tenen lisosomes que degraden progressivament les fibres de col·làgena que abans havien

sintetitzat per a formar la cambra d'implantació (Simoes et al., 1984; Abrahamsohn, 1983).

Les cèl.lules deciduais després de travessar la membrana basal residual de l'epiteli uterí contacten amb el trofoblast de l'embrió (Tekelioglu-uysal et al., 1975). A continuació les cèl.lules deciduais que estan en contacte amb l'embrió experimenten canvis degeneratius, veient-se en aquesta zona l'absència de fibres (Katz i Abrahamsohn, 1981; Welsh i Enders, 1987).

Hi ha condensació dels continguts citoplasmàtics, fragmentació de les cèl.lules i fagocitosi dels fragments per part del trofoblast (Glass et al, 1983; Welsh i Enders, 1987).

En les primeres fases de la gestació, poc després de la implantació, el trofoblast mural, la membrana de Reichert i l'endoderma parietal, actuen conjuntament com a placenta primerenca (*parietal yolk sac placenta*) (Carpenter, 1980; Jollie, 1986).

S'ha vist que les cèl.lules del trofoblast mural que integren la placenta de l'endoderma parietal, formen una xarxa de canals que distribueixen la sang materna a través d'aquesta placenta cap a l'embrió (Carpenter, 1980; Parr i Parr, 1986). La membrana de Reichert probablement actua com a barrera selectiva al pas de material de la sang materna a través dels espais del trofoblast (Carpenter, 1980).

La formació d'aquesta xarxa de vasos s'ha estudiat recentment. S'ha pogut observar que mentre es produeix la

degradació de la decidua primària algunes cèl.lules deciduais s'interposen entre les cèl.lules endotelials dels vasos materns. El trofoblast té accés als vasos de la mare reemplaçant les cèl.lules deciduais o introduint-se entre les cèl.lules endotelials. Els vasos materns es troben colapsats fins al moment en que el trofoblast hi penetra. La formació de la xarxa de vasos del trofoblast depèn, per tant, de l'organisme matern i de l'embrió (Welsh i Enders, 1987).

Com hem vist, l'organisme matern pren part activa en tots els processos implicats en el desenvolupament embrionari, no únicament durant i després de la implantació, en que és indispensable el seu concurs, sinó inclús abans d'ella sincronitzant els diferents esdeveniments.

Es clar que durant la gestació existeixen mecanismes complexos que controlen el desenvolupament de l'embrió. L'embrió està sotmès a un control epigenètic per part de la mare que guia el seu camí de diferenciació.



TUMORS DE CEL. LULES
GERMINALS

ORIGEN DELS TUMORS TESTICULARS

El tumor que es troba amb més freqüència en un òrgan, deriva normalment de les seves cèl.lules principals parenquimatoses que en el testicle són les cèl.lules germinals. Aquestes cèl.lules es troben en un procés dinàmic de constant maduració (Mostofi i Price, 1973). Això implicaria, en part, la pluralitat dels tumors derivats d'aquestes cèl.lules.

A nivell dels túbuls seminífers hi trobem les cèl.lules de Sertoli i els espermatogonis. Els espermatogonis deriven de les cèl.lules germinals primordials.

L'espermatogoni és una cèl.lula mitòticament activa que està situada sobre la membrana basal del túbul seminífer. Després d'una sèrie de divisions es transforma en espermatòcit i aquest va des de la membrana basal fins a una posició més propera a la llum del túbul on porta a terme les divisions meiòtiques. En la segona divisió meiòtica es formen les espermatides que donaran lloc als espermatozoides sense passar per cap altra divisió cel.lular (Rooij, 1983).

Degut a aquesta dinàmica cel.lular, es fa difícil conèixer l'origen exacte dels tumors derivats de les cèl.lules germinals. La majoria dels treballs però, fan pensar en un origen comú a nivell de la cèl.lula germinal primordial, que reflexa la seva pluripotència en la diversitat de patrons histològics dels tumors (Stevens, 1967a, 1967b; Peckham, 1981; Brown, 1983). Aquesta teoria explica també l'origen dels tumors extragonadals que provindrien d'errors en la migració de les cèl.lules

germinals durant la vida fetal (Packham, 1981; Linder, 1983). Hi ha autors però, que creuen que el seminoma derivaria de les cèl.lules germinals i la resta de tumors tindrien el seu origen en blastòmers desplaçats de les influències reguladores durant el desenvolupament primerenc (Collins i Pugh, 1964; Willis, 1967).

Són de destacar els treballs realitzats per Stevens (1964, 1970) que donen suport a les dues teories a l'obtenir teratocarcinomes mitjançant l'empelt en zones ectòpiques, tant de blastocists com de crestes genitals primitives de ratolí a animals isogènics adults.

Pierce (1966) observa que els seminomes humans presenten cèl.lules de la línia espermatogènica en distints graus de diferenciació i que la ultraestructura de les cèl.lules indiferenciades d'aquest tumor és equivalent a la de la cèl.lula germinal primordial. El seminoma derivaria, per tant, de les cèl.lules germinals primordials ja determinades a diferenciar-se en cèl.lules espermàtiques.

Aquests tumors tenen el seu origen en els túbuls seminífers com ho confirma el fet d'observar nius de cèl.lules de carcinoma embrionari en continuïtat amb l'epiteli germinal del testicle en fetus de ratolins de la soca isogènica 129/Sv, soca que presenta una incidència del 8% de teratomes testiculars espontanis originats durant la fase embrionària. També és consistent amb aquesta idea el fet d'obtenir en un 80-90% dels casos tumors en animals d'aquesta soca quan es transplanten crestes genitals de

ratolí de 12.5 dies a testicle de ratolí adult (Stevens, 1964, 1970).

Juntament, s'ha establert a nivell ultraestructural el paral·lelisme entre les cèl·lules primordials fetals i les cèl·lules embrionàries de ratolí (Pierce i Beals, 1964).

En l'espècie humana s'ha descrit el carcinoma *in situ* dels tumors testiculars com a cèl·lules germinals intratubulars amb canvis compatibles amb la malignitat. Així mateix, s'ha observat que la meitat dels malalts afectats per aquest tumor desenvolupen un tumor germinal invasor (Skakkebaek, 1972, 1975; Peckham, 1981). Aquestes dades confirmen la validesa dels treballs experimentals realitzats sobre l'origen dels tumors testiculars

Encara que no sabem amb certesa quina és la cèl·lula a partir de la què s'originen els tumors de cèl·lules germinals, es pot afirmar que tenen el seu origen en una cèl·lula comuna malgrat la seva diversitat histològica.

CLASSIFICACIO DELS TUMORS DERIVATS DE
LES CEL·LULES GERMINALS

Hi ha diferents classificacions dels tumors de cèl.lules germinals atenent a diversos criteris. En aquest treball seguirem la nomenclatura proposada per la *World Health Organization* (WHO) que es basa únicament en criteris histològics i creu en l'origen comú d'aquests tumors a partir de les cèl.lules germinals (Mostofi i Price, 1973; Mostofi i Sobin, 1977; Mostofi, 1980).

La classificació WHO que exposarem a continuació tracta dels caràcters comuns dels tumors germinals en les diferents espècies estudiades.

Els tumors de cèl.lules germinals es classifiquen com segueix:

A. TUMORS FORMATS PER UN UNIC TIPUS HISTOLÒGIC

A1. Seminoma

Es el tumor de cèl.lules germinals més freqüent. Macroscòpicament, està format per un teixit de color blanquinós homogeni i lobulat. Microscòpicament, està compost per una població uniforme de cèl.lules amb membrana citoplasmàtica evident, citoplasma clar amb grànuls de glucogen en el seu interior. El nucli és de localització central hipercromàtic i arrodonit. L'estroma té graus variables de reacció limfocitària i/o granulomatosa. L'hormona fol.licle estimulant (FSH) pot trobar-se elevada,

però tant l' α -fetoproteïna (AFP) com la gonadotrofina coriònica (HCG) són negatives en el teixit, sèrum i orina.

A2. Seminoma espermatocític

La grandària de les cèl.lules varia des de la d'un limfòcit a la d'una cèl.lula gegant. S'observen abundoses mitosis. Absència de glucogen en el citoplasma que és eosinòfil i envolta a un nucli de forma arrodonida. Les cèl.lules de menor mida recorden espermatides, i molt rarament es troba reacció limfocitària en l'estroma del tumor.

A3. Carcinoma embrionari (CE)

El tumor tallat presenta macroscòpicament un aspecte heterogeni amb zones granulars o llises de color blanc grisós juntament amb àrees de necrosi i hemorràgia. La càpsula és poc evident o absent fent difícil la demarcació del tumor.

Microscòpicament, és un teixit format per cèl.lules epitelials de gran mida i aspecte primitiu amb membrana citoplasmàtica no visible i citoplasma clar, abundós i dens.

Aquestes cèl.lules poden adoptar un patró acinar, tubular, papil·lar o sòlid. Un d'aquests patrons pot predominar en el tumor, però freqüentment se n'observa més d'un.

Les cèl.lules de carcinoma embrionari poden formar estructures pseudoglandulars que delimiten espais de forma irregular. A vegades, en l'interior d'aquests espais en el citoplasma de les cèl.lules que els limiten es troben glòbuls hialins PAS positius i molt rarament, aquests glòbuls tenen reacció positiva per l'AFP en la immunohistoquímica (Nakakuma et al., 1983).

L'estroma del carcinoma embrionari és variable: pot ser escàs, edematós, fibrós, hialinitzat o molt cel.lular adoptant un aspecte sarcomatós. També pot trobar-se en l'estroma mesènquima primitiu neoplàsic, i molt rarament presenta reacció limfocitària

En determinats casos, aquests tumors poden associar-se a una elevació de l'AFP en el sèrum. Alguns carcinomes embrionaris poden contenir cèl.lules sincitrofooblàstiques positives per a l'HCG; si no es troben àrees de còriocarcinoma es classifica al tumor com carcinoma embrionari amb cèl.lules sincitrofooblàstiques.

A4. Tumor del si endodèrmic o mesoblastoma vitel·li (Yolk sac tumor, YST)

La superfície de tall d'aquest tumor és blanca grisosa, d'aspecte mucinós amb àrees quistoses i hemorràgiques. La histologia recorda a la placenta dels rosegadors i mostra un patró característic format per anastomosi d'espais

glandulars envoltats per cèl.lules aplanades, cuboides o columnars que alternen amb àrees més cel.lulars.

Pot trobar-se un patró polivesicular vitel·lí on s'observen vesícules envoltades per cèl.lules mesotelimatoses i cèl.lules columnars altes semblants a les de la membrana de Heuser o membrana exocel·lòmica.

En el tumor de si endodèrmic també poden trobar-se els denominats cossos de Shiller-Duval, formats per un eix fibrovascular envoltat per cèl.lules columnars projectades cap a l'interior d'un espai quistós el contorn intern del qual està format per cèl.lules aplanades. Aquestes estructures semblen glomèruls primitius i són característiques del tumor de si endodèrmic humà.

Les cèl.lules del tumor de si endodèrmic presenten característiques típiques de les cèl.lules de l'endoderma embrionari com són la capacitat per a sintetitzar grans quantitats de membrana basal i produir AFP.

Hi ha certes diferències entre el tumor de si endodèrmic humà i el múrid: Les cèl.lules del tumor de ratolí no formen cossos de Shiller-Duval i no tenen capacitat per a excretar, però sí per a sintetitzar, AFP; per això en els espais extracel·lulars dels tumors múrids no hi ha AFP i sí es troba en els tumors humans (Damjanov, 1973).

A5. Poliembrioma

Tumor format predominantment per cossos embrioids semblants a embrions d'una a dues setmanes de gestació (espècie humana).

Macroscòpicament, és un tumor encapsulat de color marró fosc, sòlid amb petites àrees quistoses. L'anàlisi histològica mostra nombrosos cossos embrioids formats per un disc cel.lular amb una cavitat central ("cavitat àmnica") i una estructura tubular adossada ("cavitat cel.lòmica") de cèl.lules de tipus endodèrmic. Els cossos embrioids estan envoltats per escàs mesènquima on poden observar-se cèl.lules citotrofoblàstiques i sincitrofoblàstiques. El disc pot estar constituït per una o varies capes de cèl.lules epiteloides. La morfologia de les cèl.lules que envolten la "cavitat àmnica" és molt semblant a la de les cèl.lules ectodèrmiques (columnars). Per fora d'aquesta línia cel.lular poden trobar-se cèl.lules de tipus mesodèrmic i d'endoderma extraembrionari.

En aquest tumor pot trobar-se també teixit madur diferenciat però no es troba continuïtat de desenvolupament entre el teixit madur i els cossos embrioids (Takeda et al., 1982).

A6. Coriocarcinoma

El seu aspecte macroscòpic és el d'una massa hemorràgica amb zones de color blanc grisos en la perifèria.

Microscòpicament està format per dos tipus cel·lulars: cèl·lules sincicitrofooblàstiques i citotrofooblàstiques

Es troben àrees que caricaturen vellositats corials amb zones centrals formades per grups de cèl·lules amb citoplasma clar, membrana citoplasmàtica visible i nucli vesiculat (cèl·lules citotrofooblàstiques). Aquestes cèl·lules estan envoltades per cèl·lules gegants multinucleades, amb nuclèol hiper cromàtic i irregular; el citoplasma és eosinòfil amb vacúols de mida variable que contenen un material eosinòfil i a vegades eritròcits (cèl·lules sincicitrofooblàstiques).

En les zones més sòlides del tumor ambdós tipus cel·lulars es troben mesclats.

Es típic d'aquest tumor trobar títols elevats d'HCG en sèrum i orina juntament amb una AFP negativa. En la immunohistoquímica l'HCG pot detectar-se en l'interior de les cèl·lules sincicitrofooblàstiques.

A7. Teratoma

Macroscòpicament, en la superfície de tall es troben nombrosos quists de mida variable plens d'una substància clara, gelatinosa o mucinosa. La microscòpia és característica i revela nombrosos tipus de teixits derivats de les tres capes primigènies (endoderma, mesoderma i ectoderma).

Aquests tumors es divideixen en tres grups:

a) Teratoma madur. Està format únicament per teixits ben diferenciats que poden adoptar una disposició organoide. Els derivats neuroectodèrmics constitueixen un dels teixits diferenciats més freqüents i s'utilitzen com a indicadors de la maduresa del tumor. El que s'observa amb més freqüència és pell, trabècules òssies i masses de teixit glial (Nogales i Aguilar, 1983).

b) Teratoma immadur. Està format per teixits embrionaris que no assoleixen la diferenciació completa. En aquest cas, el teixit neuroectodèrmic és també el predominant però es troba freqüentment teixit cerebral de tipus embrionari consistent en plaques neuroepiteliales que poden formar estructures tubulars semblants a túbuls neurals primerencs, i vesícules cerebrals (Nogales i Aguilar, 1983).

c) Teratoma amb transformació maligna. Pot succeir que algun dels elements madurs del teratoma es torni maligne i dongui un nou tumor.

Tant en el sèrum com en els teixits l'AFP i l'HCG són negatives.

B. TUMORS FORMATS PER MÉS D'UN TIPUS HISTOLÒGIC

B1. Teratocarcinoma

Està format per la combinació de carcinoma embrionari i teratoma. És el tumor mixt més freqüent.

B2. Coriocarcinoma i algun altre tipus tissular

S'han d'especificar els dos tipus tumorals.

En nombrosos tumors malignes de cèl.lules germinals poden observar-se cèl.lules sincitrofoblàstiques aïllades o en grups. Això també es fa constar a l'hora d'anomenar el tumor.

B3. Altres combinacions

MARCADORS DELS TUMORS DE CEL·LULES
GERMINALS

Els dos marcadors més utilitzats per a l'estudi dels tumors malignes de cèl.lules germinals són l' α -fetoproteïna (AFP) i la gonadotrofina coriònica (HCG) (Javadpour, 1980a; Kohn i Raghavan, 1981). Aquests marcadors poden determinar-se en sang mitjançant la tècnica del radioimmunoassaig (RIA) (Waldmann i McIntires, 1974).

Quan els títols del marcador en el sèrum no són prou alts es pot utilitzar la tècnica d'immunohistoquímica directament sobre el teixit (Javadpour, 1980b) per a determinar la presència del marcador.

Els marcadors tumorals, a l'igual que les classificacions de tumors, s'han desenvolupat al voltant de la clínica humana. Actualment però, existeixen multitud de marcadors utilitzats per a estudiar els tumors experimentals. Per a poder detectar les molècules utilitzades com a marcadors s'han obtingut diversos anticossos mono específics o monoclonals dirigits cap a elles. De la mateixa manera, s'utilitzen tincions especials o tècniques enzimàtiques característiques.

1. L'AFP

Es una molècula molt conservada a nivell de l'escala zoològica. S'ha estudiat en diferents espècies com són: l'home, el ratolí o el pollastre. De tota manera, coneixem

millor les seves característiques a nivell de la nostra espècie i per això parlarem de l'AFP humana.

Es una glucoproteïna de pes molecular situat entre 66 i 72 Kd; la seva motilitat electroforètica és igual que la de l' α_1 -globulina. En el fetus es troba normalment en el fetge i en els òrgans derivats de l'endoderma. També en el ratolí es troba en els teixits endodèrmics (Dziadek i Adamson, 1978; Dziadek, 1978).

En l'home el valor normal d'AFP en el sèrum d'un individu adult és d'1 a 16 μ g/l i pot trobar-se un títol superior durant l'embaràs, primera infància, malalties hepàtiques no neoplàsiques, defectes congènits del tub neural, neoplàsies malignes digestives, carcinoma hepatocel.lular i tumors malignes de cèl.lules germinals.

No es coneix exactament la funció de l'AFP durant la vida embrionària però es creu que podria intervenir en diferents processos (Heyderman, 1983):

- homeòstasi, amb una funció semblant a la de l'albúmina. L'AFP actuaria transportant altres molècules proteïques intervenint en l'osmorregulació.
- unió d'hormones estrogèniques maternes protegint així al fetus de l'acció dels estrògens.
- immunosupressió i bloqueig de la reacció de rebuig de la mare contra el fetus.
- control del creixement
- organització tissular actuant com a senyal iniciador de diversos mecanismes durant l'estadi fetal.

En els tumors de cèl.lules germinals l'AFP es troba elevada en el sèrum i és positiva en els teixits que contenen tumor de si endodèrmic, cèl.lules endodèrmiques de teratoma i a vegades en les cèl.lules de carcinoma embrionari que estan disposades en un patró glandular, quistós o trabecular. No es troba en el carcinoma embrionari sòlid. Les cèl.lules de carcinoma embrionari positives per a l'AFP estarien determinades cap a endoderma (Talerma, 1980 Morinaga et al., 1983).

2. L'HCG

Es una hormona glucoproteica sintetitzada normalment per les cèl.lules sincitotrofoblàstiques de la placenta, encara que també poden sintetitzar-la les cèl.lules del citotrofoblast (Pierce, 1963).

L'HCG està formada per dues subunitats: una cadena α comuna amb la de l'FSH i l'LH de 14.9 Kd de pes, i una cadena β de 23 Kd, que li dona l'especificitat biològica (Kohn i Ragavan, 1981; Mann i Karl, 1983).

Aquesta hormona es troba típicament en el sèrum de malalts portadors d'un coriocarcinoma. La immunohistoquímica mostra la localització de l'HCG a l'interior de les cèl.lules gegants sincitotrofoblàstiques.

3, ALTRES MARCADORS

En la clínica humana s'utilitzen altres marcadors per als tumors de cèl.lules germinals:

- CEA (antigen carcinoembrionari).
- HPL (lactogenplacentari).
- Isoenzim de Regan.
- Fosfatasa alcalina placentària.
- β -glucoproteïna.
- Ferritina.
- LDH (lactat deshidrogenasa).

Alguns d'ells són també utilitzats freqüentment en treballs experimentals com és el cas del CEA, de la fosfatasa alcalina o de la ferritina.

ELS TERATOCARCINOMES

Els teratocarcinomes són tumors malignes que estan formats per teixits derivats de les tres capes embrionàries i per cèl.lules pluripotents denominades carcinoma embrionari.

Les cèl.lules de carcinoma embrionari són pluripotents, indiferenciades i són les cèl.lules soca dels tumors. Tenen grans semblances amb les cèl.lules embrionàries d'estadis primerencs, tant a nivell morfològic com bioquímic.

Per a l'obtenció de teratocarcinomes s'han utilitzat diferents soques de ratolí com per exemple la soca 129/Sv. Els teratocarcinomes poden obtenir-se experimentalment empeltant embrions en llocs ectòpics, com el testicle, d'animals adults de la mateixa soca.

El poder obtenir teratocarcinomes experimentals ha permès treballar amb les cèl.lules de carcinoma embrionari que els componen. Amb aquestes cèl.lules s'han realitzat estudis sobre el desenvolupament embrionari, sobre la diferenciació cel.lular i també estudis d'oncologia experimental.

A continuació passem a descriure aquest tipus tumoral.

TERATOCARCINOMES: DEFINICIO

Els teratocarcinomes són tumors sòlids originats en les cèl.lules germinals primitives. Es presenten de forma espontània en diferents espècies de mamífers. Són tumors de baixa incidència i es localitzen preferentment en les gònades (O'Hare, 1978). També es poden trobar en teixits extragonadals, però amb molt més baixa freqüència. Els tumors extragonadals es desenvolupen principalment en la línia mitjana del cos trobant-los principalment en el mediastí (Martini et al., 1954), en l'espai retroperitoneal (Engel et al., 1968), en l'àrea sacro-coccígia del raquis (Miles et al., 1974) en els ventricles cerebrals i la hipòfisi (Wooley et al., 1967). Altres localitzacions menys freqüents són l'òrbita de l'ull (Alkemade, 1976), el fetge (Dische i Gardner, 1978) o el pericardi (Yeoh et al., 1976).

Els teratocarcinomes són tumors mixtes formats per dues poblacions cel.lulars diferents. Una població està formada per derivats madurs i immadurs de les tres capes embrionàries primitives. L'altra població està formada per un grup de cèl.lules homogènies anomenades carcinoma embrionari. Les cèl.lules de carcinoma embrionari són indiferenciades pluripotents i representen les cèl.lules soca del tumor. Tal com ho van demostrar Kleinsmith i Pierce l'any 1964 a l'injectar una única cèl.lula de carcinoma embrionari i veure que donava un tumor multidiferenciat.

Totes les cèl.lules de carcinoma embrionari d'un teratocarcinoma poden diferenciar-se amb la qual cosa obtenim un teratoma (Jami i Ritz, 1974). El tipus i grau de

diferenciació de les cèl.lules de carcinoma embrionari depèn de l'entorn local d'aquestes cèl.lules (Strickland, 1981).

OBTENCIO DELS TERATOCARCINOMES

Els teratocarcinomes han estat estudiats tant en el camp de l'oncologia com en el de l'embriologia. Per a la seva obtenció s'han utilitzat soques múrides amb alta incidència de teratomes tant ovàrics com testiculars. Mitjançant encreuaments selectius s'ha aconseguit augmentar la freqüència espontània d'aquests tumors. De tota manera, la majoria dels teratocarcinomes estudiats s'obtenen, o s'han obtingut, de forma experimental.

1. TUMORS ESPONTANIS

Hí ha factors genètics que poden determinar una incidència elevada de teratocarcinomes, tal és el cas de la soca de ratolins 129/Sv. Els mascles d'aquesta soca presenten teratocarcinomes testiculars congènits amb una freqüència del 7% (Stevens i Little, 1954). A partir de la soca 129 s'ha obtingut una sublinia denominada 129/ter que presenta una incidència de teratocarcinomes testiculars del 32% (Stevens, 1973).

L'alta incidència de teratocarcinomes de la sublinia 129/ter permet estudiar el moment precís en que s'originen aquests tumors durant el desenvolupament embrionari. Stevens (1962) examinant ratolins progressivament més joves va observar que els taratocarcinomes es formen a partir del dia 15 de la gestació. Aquesta dada fou de gran importància ja que va fer pensar en la possibilitat d'obtenir

teratocarcinomes experimentals a partir de crestes genitals embrionàries.

2. TUMORS EXPERIMENTALS

2.1. OBTINGUTS A PARTIR DE CRESTES GENITALS

A partir del dia nou d'evolució, les cèl.lules germinals dels embrions de ratolí han migrat totalment a la seva posició definitiva. Stevens (1964) aïlla les crestes genitals d'embrions de la soca 129 de deu a quinze dies d'evolució i els implanta en diferents òrgans de ratolins adults de la mateixa soca. D'aquesta manera obté teratocarcinomes.

La màxima incidència tumoral (82%) s'obté amb l'empelt de crestes genitals de dotze dies d'evolució al testicle de ratolins adults.

Les crestes genitals en fases posteriors mostren una menor incidència de tumors, el que fa pensar que les cèl.lules germinals es troben en una fase més avançada de maduració a partir del dia tretze de gestació.

També es va observar que els empelts de crestes genitals de dotze dies en ronyó o fetge desenvolupaven un teixit normal que posteriorment podia donar un teratocarcinoma amb una incidència semblant a la que

s'observa en els teratocarcinomes espontanis de la soca 129. Aquesta dada exclou la idea de que l'ambient embrionari sigui imprescindible per a la formació d'aquests tumors.

2.2. OBTINGUTS A PARTIR DE L'EMPELT D'EMBRIONS

Mitjançant l'empelt d'embrions joves de ratolí en zones ectòpiques d'animals isogènics adults també es poden obtenir teratocarcinomes (Damjanov i Solter, 1974).

L'estadi evolutiu dels embrions utilitzats és una dada crítica que determina el tipus de tumor que s'obté. Quan s'utilitzen embrions de dos blastòmers s'obtenen tumors que sols presenten un tipus de diferenciació: la derivada de la línia trofoblàstica. Empeltant blastocists (3 dies d'evolució) o gàstrules (6 a 7 dies d'evolució) s'obté un teratocarcinoma típic. Es a dir, una població de cèl.lules de carcinoma embrionari que acompanya a una gran varietat de teixits derivats de les tres fulles embrionàries (Stevens, 1970; Damjanov et al., 1971).

Quan es repeteix l'experiència utilitzant embrions de vuit o més dies s'obté un teratoma benigne. La no observació de cèl.lules de carcinoma embrionari en els tumors obtinguts coincideix amb la utilització d'embrions que presenten el mesoderma format. A partir d'aquest moment sols les cèl.lules germinals conservarien el caracter d'indiferenciades (Solter et al., 1975).

Posteriorment, es demostrà que la tumorigènesi dels embrions no depenia de la soca d'animals utilitzada, però la presència o absència de cèl.lules de carcinoma embrionari en el si dels tumors era una característica que sí depenia de la soca emprada. Per exemple, l'empelt d'embrions de la soca 129 a adults isogènics dona un teratocarcinoma (Stevens, 1970), mentre que els embrions de ratolí de la soca C57BL/6 donen teratomes benignes quan s'empelten a ratolins adults d'aquesta soca (Solter et al., 1975). Aquest efecte pot venir determinat per les característiques immunològiques, tant de l'embrió com de l'hoste (Gooding i Edidin, 1974).

ELS COSSOS EMBRIOIDS

Els teratocarcinomes tenen una forma ascítica de creixement. A l'injectar cèl.lules de carcinoma embrionari de la soca 129 en la cavitat peritoneal de ratolins isogènics, es desenvolupa al tercer o quart passatge una ascites que té en suspensió unes estructures que reben el nom de cossos embrioids per les seves semblances amb embrions primerencs (Pierce i Dixon, 1959; Stevens, 1959).

Els cossos embrioids poden mantenir-se *in vivo* mitjançant passatges intraperitoneals succesius sense perdre les seves propietats tumorigèniques ja que poden produir tumors multidiferenciats a l'injectar-los subcutàniament (Stevens, 1960).

Els cossos embrioids es van dividir en dos tipus morfològics diferents: els cossos embrioids quistosos semblants a blastocists de ratolí de 3.5 dies d'evolució i els simples semblants a embrions de 5 o 6 dies que no presenten cavitat en el seu interior. Els cossos embrioids estan formats per una població de carcinoma embrionari envoltada per una capa cel.lular de tipus endodèrmic, mentre que els embrions tenen les cèl.lules de la massa cel.lular interna envoltades pel trofoblast.

L'endoderma que envolta a les cèl.lules de carcinoma embrionari dels cossos embrioids té característiques similars a les cèl.lules derivades de la massa cel.lular interna (endoderma i ectoderma) d'embrions de ratolí de 6 dies d'evolució. Però l'endoderma en els cossos embrioids envolta completament a les cèl.lules de carcinoma embrionari

mentre que l'endoderma en els embrions no envolta a l'ectoderma en la seva totalitat. Així mateix en l'embrió l'endoderma és de tipus visceral i en els cossos embrioids poden trobar-se els dos tipus de cèl.lules endodèrmiques (visceral i parietal) (Pierce et al., 1962).

In vitro les cèl.lules de carcinoma embrionari s'adhereixen fortament al substrat i formen nius de cèl.lules epiteloïdes amb un nucli de gran mida amb un o varis nuclèols prominents.

Entre les línies multipotencials de carcinoma embrionari poden trobar-se dos tipus diferents: les cèl.lules emancipades que són les que no precisen créixer sobre una monocapa, i les cèl.lules nodrissa que necessiten d'una monocapa de fibroblasts per a proliferar i mantenir el seu fenotip (Martin i Evans, 1975a).

Algunes línies cel.lulars de carcinoma embrionari poden diferenciar-se *in vitro*. Aquesta dada indica la importància de l'ancoratge de les cèl.lules de carcinoma embrionari al substrat per a la seva diferenciació. Aquest fet es confirma al veure que aquestes cèl.lules cultivades en suspensió, no donen cap tipus de diferenciació (Levine et al., 1974).

S'ha descrit una seqüència específica que descriu les distintes diferenciacions que van apareixent successivament al cultivar els cossos embrioids. La primera diferenciació observada és l'endoderma, la segona és el teixit ectodèrmic i posteriorment toben els derivats mesodèrmics (Nicolas et al., 1975).

Monzó (1984) ha descrit la línia evolutiva que segueixen els cossos embrioids en l'interior del líquid ascític comprovant el paral·lelisme amb les primeres fases evolutives del ratolí. A partir d'una ascites en la que es troba un conjunt heterogeni de cossos embrioids, i mitjançant gradients discontinus de Ficoll, aïlla quatre poblacions de cossos embrioids a les que anomena BC1, BC2, BS1 i BS2. Les poblacions BC1 i BC2 són similars a blastocists de ratolí de 3.5 dies. La població BS1 és similar a embrions de 5 o 6 dies i la quarta població, BS2, presenta signes d'autòlisi.

Els diferents tipus de cossos embrioids no són independents entre ells sinó que segueixen una seqüència evolutiva. A partir de la població BC1 s'obté la BC2 que dona a continuació la població BS1. La població BS1 presenta la particularitat de dividir-se per fissió generant d'aquesta manera les altres dues poblacions anteriors. La població BS2 seria el resultat de la mort dels cossos embrioids de la població BS1.

També Monzó (1984) estudia les potencialitats tumorigèniques de les diferents poblacions de cossos embrioids mitjançant la seva injecció sota la pell d'individus adults de la soca 129/Sv.

Serra (1985) partint dels treballs de Monzó, obté un anti-sèrum mono específic a partir d'una població purificada de cossos embrioids. Utilitzant la tècnica de gradients de flotació separa en l'interior de la població BC1 una

subpoblació formada únicament per vesícules de tipus endodèrmic. A partir d'aquesta població obté en conills Nova Zelanda Albins un antièrum monoespecífic que s'uneix exclusivament a l'endoderma visceral (embrionari i extraembrionari) en embrions de ratolí de 6 dies. En els embrions de 7, 8 i 9 dies observa que el marcatge amb aquest anticòs està restringit a les zones que poseeixen endoderma visceral com el sac vitel·lí. Aquests resultats li permeten establir un paral·lelisme entre els cossos embrioids i les fases evolutives de les cèl·lules endodèrmiques de l'embrió.

LES CELLULES DE CARCINOMA EMBRIONARI

1. SEMBLANCES MORFOLOGIQUES I BIOQUIMIQUES AMB LES CÈL·LULES EMBRIONÀRIES

Les cèl·lules de carcinoma embrionari tenen grans similituds amb les cèl·lules embrionàries indiferenciades. Això ha permès utilitzar-les com a model d'estudi de les primeres fases del desenvolupament embrionari.

Els estudis estructurals mostren que tant les cèl·lules embrionàries com les de carcinoma embrionari poseeixen un elevat número de ribosomes lliures agrupats formant polisomes, reticle endoplasmàtic rugós ben organitzat i un aparell de Golgi poc desenvolupat. També s'han trobat en ambdós tipus cel·lulars partícules virals del tipus A i inclusions cristal·loides associades al nucli (Pierce et al., 1964; Solter et al., 1974).

També existeixen similituds en la configuració proteica d'ambdós tipus cel·lulars. Per exemple existeix una glicoproteïna d'alt pes molecular detectable en l'embrió en l'estadi de mòrula. Aquesta proteïna no es detecta en embrions en fases de postimplantació però sí és detectable en les cèl·lules de carcinoma embrionari. Es creu que aquesta proteïna pot estar relacionada amb l'antigen F9 (Muramatsa et al., 1979).

L'activitat de determinats enzims estaria relacionada amb estadis indiferenciats de les cèl·lules independentment del seu origen. Aquest és el cas de la fosfatasa alcalina detectable en les cèl·lules de carcinoma embrionari però no

en els seus derivats (Martin i Evans, 1975b). De forma similar, en l'embrió sols es detecta l'activitat d'aquest enzim en les cèl.lules totipotents de la massa cel.lular interna del blastocist (Damjanov i Solter, 1975).

2. RELACIONS IMMUNOLOGIQUES AMB LA CEL.LULA EMBRIONARIA

A partir de les cèl.lules de carcinoma embrionari s'han obtingut antisera que marquen antigens propis de l'estat indiferenciat o de determinades fases de la diferenciació. S'ha demostrat que aquests antigens es troben també en les cèl.lules embrionàries i, en alguns casos, en les cèl.lules germinals masculines d'individus adults.

Partint de la línia nul.lipotent de carcinoma embrionari F9 s'ha obtingut un antiserum que reconeix l'antigen F9. Aquest antigen s'ha trobat en totes les cèl.lules de carcinoma embrionari estudiades, en les cèl.lules embrionàries des de l'estadi de dos blastòmers fins a embrions de vuit dies i també es troba en els espermatozoides d'individus adults (Artz et al., 1973).

S'ha vist que l'antigen F9 guarda una relació temporal recíproca amb els antigens H-2, quan es detecta l'F9 no es detecten els antigens H-2 i a la inversa (Jacob, 1977). Aquest antigen no sols s'ha detectat en el ratolí sinó que

també pot trobar-se en altres mamífers com la rata, el conill, el porc, i l'home (Andrews et al., 1982).

Altres anticòs és l'obtingut a partir de la línia de carcinoma embrionari PCC4, aquesta línia es caracteritza per la seva capacitat de desenvolupar tumors pluridiferenciats (Jacob et al., 1973).

L'antigen PCC4, reconegut per aquest anticòs, es troba en les cèl.lules de carcinoma embrionari, tant de la línia PCC4 com de la línia F9 (Gachelin et al., 1977). No es detecta en les cèl.lules de la massa cel.lular interna del blastocist preimplantat, però sí es detecta en les cèl.lules de la massa cel.lular interna de blastocists postimplantats (Jacob et al., 1977). No es troba en cap cèl.lula diferenciada a excepció de l'espermatozoide (Gachelin et al., 1977).

Utilitzant anticòs monoclonals s'han pogut detectar altres antigens comuns entre les cèl.lules de carcinoma embrionari i els estats embrionaris:

- Antigen FA. Es troba en la superfície de les cèl.lules de carcinoma embrionari. En l'embrió es detecta a nivell del trofoblast i de la massa cel.lular interna. També el trobem en l'ectoderma embrionari i en l'endoderma parietal i visceral. En els teixits adults es detecta majoritàriament en el testicle encara que es pot trobar en el ronyó, el cervell i el teixit limfoide (Stern et al., 1978; Willison i Stern, 1978; Stinnakre et al., 1981).

- Antigen SSEA1. Es troba en les cèl.lules de carcinoma embrionari i en els embrions preimplantats. S'expressa també en la massa cel.lular interna i en l'ectoderma primitiu. No es troba en el trofoblast ni en l'endoderma parietal, però sí es detecta en l'endoderma visceral (Solter i Knowles, 1978; Fox et al., 1981). Se l'ha trobat en espermatozoides procedents d'ejaculats (Fox et al., 1982).

- Antigen SSEA3. Es defineix per un monoclonal obtingut en la rata davant d'embrions de ratolí en l'estadi de 4-8 cèl.lules (Shevinsky et al., 1982). Està present en l'oòcit i queda després restringit a la massa cel.lular interna i a l'endoderma primitiu. Tots els embrions preimplantats l'expressen i es va restringint progressivament a les cèl.lules d'endoderma embrionari (Shevinsky et al., 1982). En el ratolí adult l'antigen es troba únicament en els túbuls del ronyó (Fox et al., 1982). Encara que aquest antigen no es troba en cap tumor múrid incluint-hi les cèl.lules de carcinoma embrionari sí reacciona sorprenentment amb línies de carcinoma embrionari humanes (Shevinsky, 1982).

L'existència d'antigens comuns entre les cèl.lules de l'embrió i les cèl.lules de carcinoma embrionari posa novament de manifest la gran similitud entre ambdós tipus cel.lulars. Els anticossos dirigits contra aquests antigens s'han utilitzat per a identificar subpoblacions de cèl.lules embrionàries i per a seguir la possible relació entre el

llinatge cel.lular durant el desenvolupament i l'expressió d'aquests marcadors.

Encara que ara per ara es troben freqüentment discontinuitats entre l'expressió d'aquests antigens i el llinatge cel.lular, s'obra un interessant camí d'estudi a partir dels anticossos monoclonals i monoespecífics.

3. PARTICIPACIÓ DE LES CEL·LULES DE CARCINOMA EMBRIONARI EN EL DESENVOLUPAMENT

Per a demostrar clarament la relació entre la cèl.lula embrionària i la cèl.lula de carcinoma embrionari s'han realitzat quimeres segons el mètode d'injecció (Linn, 1966) amb cèl.lules de carcinoma embrionari i blastocist de ratolí.

Per a obtenir animals quimera s'utilitzen cèl.lules de carcinoma embrionari que tenen marcadors diferents als del blastocist dintre del què s'introdueixen. Això permet comprovar el quimerisme i establir el paral·lelisme entre les cèl.lules de carcinoma embrionari i les de la massa cel.lular interna de l'embrió (Mintz et al., 1975; Illmensee i Mintz, 1976).

Si s'injecten cèl.lules de carcinoma embrionari a prop de les de la massa cel.lular interna del blastocist i aquest es transfereix posteriorment a l'úter de femelles pseudogestants, l'embrió quimera s'implanta i es desenvolupa

normalment fins a l'estat adult (Gardner, 1968). Les cèl.lules de carcinoma embrionari que s'injecten a la cavitat del blastocist poden provindre de teratocarcinomes tant mantinguts *in vivo* com *in vitro* o del nucli de cèl.lules d'un cos embrioid. En tots els casos el desenvolupament és normal, la qual cosa evidencia que aquestes cèl.lules retenen el complement genètic normal i són totipotents (Mintz et al., 1975; Illmensee i Mintz, 1976).

SIMILITUDS ENTRE ELS
SISTEMES EMBRIONARIS I
NEOPLASICS

Ja en el segle passat van sorgir diferents teories sobre l'origen del càncer basant-se en aspectes embriològics. L'any 1829 Lobstein i Recamier van proposar que els tumors s'originaven a partir de paquets de cèl.lules embrionàries detingudes. Cohnheim (1875) formulà una hipòtesi que proposava el segrest de cèl.lules neixents en l'interior dels teixits adults, aquestes cèl.lules no madurarien i així permaneixerien en un estat embrionari. Una reactivació d'aquestes cèl.lules segrestades donaria lloc a un càncer. A principis d'aquest segle, Bread (1902), proposà la teoria trofoblàstica del càncer. Durant anys aquestes teories van quedar oblidades, però la descoberta de les cèl.lules de carcinoma embrionari, amb les seves característiques comunes a les cèl.lules de l'embrió, i la detecció de diferents antigens carcino-embrionaris, lis ha donat credibilitat.

Actualment, són moltes les característiques comunes observades entre els sistemes tumorals i els embrionaris. Les cèl.lules canceroses i les embrionàries tenen una sèrie de trets comuns que afirmen la seva gran similitud.

Aquestes característiques poden resumir-se com segueix (revisió en Sherbet, 1982):

a) Taxa de creixement.

Els tumors tenen generalment elevades taxes de creixement que les diferencien dels teixits normals adults. S'ha observat, però, que diferents teixits embrionaris tenen

taxes de creixement tant elevades com teixits tumorals actius.

b) Activitat proteolítica.

L'activitat proteolítica està associada a una gran varietat de tumors. Es creu que pot facilitar la seva capacitat d'infiltració dintre dels teixits de l'hoste així com afavorir la seva capacitat metastàtica.

Les cèl.lules embrionàries tenen una elevada activitat proteolítica. Així per exemple en el trofoblast de l'embrió s'han descrit diversos enzims proteolítics que podrien estar relacionats amb el procés de la implantació.

c) Capacitat invasiva i migratòria.

La capacitat invasiva és una característica dels tumors malignes, però no és un indicador de la malignitat.

Les cèl.lules embrionàries poseeixen també gran capacitat invasiva. Recordem, per exemple, la invasió de l'endometri per part del blastocist durant la implantació.

La capacitat migratòria tampoc és específica del teixit tumoral cap a metastatitzar, els embrions experimenten migracions cel.lulars al llarg del seu desenvolupament. Per exemple, al moment de formar-se la gàstrula es veuen canvis associats a la migració cel.lular.

Es coneix també que els tumors estarien regulats, de manera anàloga als embrions, per mecanismes epigenètics. La cèl.lula cancerosa, però, s'escaparia o respondria de forma anòmala a aquest control perdent la capacitat de detenir la seva proliferació (pèrdua de la inhibició per contacte i de

la inhibició per densitat) i de diferenciar-se cap a un tipus cel·lular específic (Sachs, 1974; Sherbet, 1982).

No sols durant la vida embrionària l'organisme es troba sota el control epigenètic, també durant la vida adulta hi ha una sèrie de processos sotmesos a aquesta regulació. Les cèl·lules soca (*stem cells*) trobades en la majoria dels teixits de l'organisme són cèl·lules que mantenen grans similituds amb les cèl·lules totipotents de l'embrió. Les cèl·lules soca es mantenen en un estat indiferenciat fins al moment en que s'han de renovar les cèl·lules del teixit al qual pertanyen. Justament, són aquestes cèl·lules les que es poden transformar cap a la malignitat dintre de l'organisme (Satja, 1983; Steel i Stephens, 1983).

Com hem vist en apartats precedents, les cèl·lules de l'embrió conseven la seva totipotència fins a la implantació. De tota manera, aquesta totipotència *in situ* no és expressada. Podriem dir que l'embrió és autònom durant la preimplantació i no té cap restricció però s'autorregula per a que tot aquest ventall de possibilitats s'expressi correctament.

En la implantació i en estadis succeius la vida de l'embrió depèn de les interaccions amb la matriu matern. Atenet als resultats obtinguts en els treballs *in vitro*, és evident que la matriu en aquesta fase no sols aporta nutrients a l'embrió sinó que guia el seu desenvolupament per a que es dongui normalment. Per altra banda, no podem oblidar que tant l'embrió com la matriu gestant es troben en

l'interior d'un organisme, el de la mare. L'organisme matern mitjançant diferents informacions hormonals o d'altre tipus controlaria tots els esdeveniments de la gestació.

Es clar, per tant, que l'embrió durant el seu desenvolupament es troba sota un control epigenètic.

Hem vist també com les cèl·lules de carcinoma embrionari poden ser controlades per diferents ambients. Aquest no és un cas aïllat, ja que d'altres tipus tumorals també poden variar el seu fenotip responnent als estímuls ambientals.

La cèl·lula cancerosa igual que la cèl·lula embrionària conserva un gran nombre de potencialitats i pot adequar la seva expressió al medi en el qual es troba immersa.

A continuació, estudiarem alguns dels mecanismes epigenètics relacionats amb el creixement tumoral.

REGULACIO DEL CREIXEMENT TUMORAL

Els tumors malignes poden créixer per expansió o per mitjà de metàstasis (Chismann et al., 1986). Ambdós processos provoquen la destrucció dels teixits de l'hoste i aquest desenvolupa una sèrie de respostes contra el tumor. Malauradament, el tumor s'escapa en moltes ocasions d'aquest control degut a la seva capacitat d'adoptar diferents expressions fenotípiques.

1. CANVIS FENOTÍPICS DE LA CEL·LULA NEOPLÀSICA

L'evolució d'un tumor depèn dels canvis fenotípiques de les cèl·lules que l'integren. Aquests canvis no sempre condueixen a estadis més malignes sinó que davant de determinats ambients molts tumors poden esdevenir benignes, tal és el cas del teratocarcinoma de ratolí (Pierce, 1974; Mintz i Illmensee, 1975) o del carcinoma escamós múrid (Pierce i Wallace, 1971).

Es parla d'heterogeneïtat cel·lular per a referir-se a l'existència de diferents poblacions cel·lulars en el si d'un tumor (Fidler i Hart, 1982). Les subpoblacions es diferencien pel seu cariotip (Vinderlov et al., 1982) pels seus receptors de membrana (Reading et al., 1980) per la capacitat metastàtica (Hart, 1979) i per la resposta davant d'agents mitogènics (Hershman et al., 1982).

L'evolució dels tumors depèn, justament, de la presència de diferents poblacions de fenotip variable al llarg del temps. Els tumors són d'aquesta manera altament adaptables als canvis ambientals. Les modificacions fenotípiques observades en un gran número de cèl.lules neoplàsiques són totalment equiparables a les observades a l'estudiar línies cel.lulars normals durant la diferenciació (Warnwr et al., 1982).

S'ha demostrat induint químicament la producció de tumors que la coexistència de varis grups cel.lulars en les neoplàsies és independent del seu origen poli o monocel.lular (Reddy i Fialkow, 1980; Iannaccone et al., 1978). El fenotip de les diferents subpoblacions trobades estaria íntimament relacionat amb els factors ambientals i de selecció de l'hoste (Fider i Berendt, 1982).

Per tant el desenvolupament d'un tumor vindria regulat per l'heterogeneïtat cel.lular, la producció constant de línies cel.lulars, la interdependència entre les diferents poblacions i els factors ambientals deguts a l'hoste (Heppner, 1984).

Encara que les cèl.lules tumorals mantinguin gran número de potencialitats biològiques, la majoria d'elles estan aturades en una fase concreta de la línia de diferenciació cel.lular com ho demostra la presència de determinats antigens de superfície característics d'estadis concrets de la diferenciació (Warner et al., 1982).

També alguns teixits normals poseeixen subpoblacions cel.lulars en estadis de diferenciació distints. Tal és el cas dels limfòcits T. No totes les línies cel.lulars de limfòcits T responen a l'estímul mitogènic de l'interferó- γ (factor de creixement específic dels limfòcits T). L'interferó- γ sols provoca l'activació i el creixement de les cèl.lules T amb fenotip característic d'estadis primers de la seva línia evolutiva. Els limfòcits T que expressen marcadors de membrana característics de fases més avançades no tenen resposta mitogènica davant de l'interferó- γ (Schenrich et al., 1985).

L'heterogeneïtat cel.lular no és una característica exclusiva dels tumors, sinó que els teixits normals també poseeixen nombrosos clons fenotípicament diferents. Aquest fet es demostra per les distintes respostes de les cèl.lules d'un teixit als carcinògens (Kakunaga i Crow, 1980), per les diferències en la secreció d'enzims entre les cèl.lules d'un mateix tipus (Griffen et al., 1980) i per les diverses línies hematopoiètiques derivades d'una cèl.lula soca comuna (Till i McCulloch, 1980).

En els teixits neoplàsics les sublínies cel.lulars tendeixen a localitzar-se es determinades zones del tumor (Fidler i Hart, 1982) però no es troben aïllades sinó que aquestes subpoblacions interaccionen i intercanvien informació entre elles, sent aquest un altre mecanisme implicat en la modificació del fenotip cel.lular.

Les característiques d'un clon de cèl.lules canceroses quan creix aïllat són diferents a les que té quan creix juntament amb altres subpoblacions (Heppner et al., 1986). Això posa en evidència la importància de les interaccions cel.lulars per al creixement tumoral a l'igual que succeeix durant el desenvolupament.

Les cèl.lules dels teixits normals també estableixen comunicacions entre elles. (Pitts i Burk, 1976). Es veu que les cèl.lules tumorals són menys selectives en l'establiment d'interaccions cel.lulars (Heppner et al., 1986) encara que la informació que intercanvien és menor que entre cèl.lules normals (Loewenstein, 1979).

Les cèl.lules dels teixits normals estableixen comunicacions entre elles força selectives. Per exemple, les cèl.lules epitelials es comuniquen amb cèl.lules com elles i el mateix fan els fibroblats (Pitt i Burk, 1976). Les cèl.lules tumorals per contra són poc selectives a l'hora d'establir interaccions cel.lulars (Heppner et al., 1986). Aquesta pèrdua de selectivitat, junt amb la capacitat menor que tenen per a captar estímuls inhibidors, pot ser una causa per a la no resposta davant dels senyals controladors del creixement (Fentiman i Taylor-Papadimitrion, 1977; Loewstein, 1979).

Per mitjà de les interaccions cel.lulars els tumors poden modificar l'index de creixement (Miller et al., 1980), la immunogenicitat (Miller i Heppner, 1980), la sensibilitat

als quimioteràpics (Miller et al., 1981) i la capacitat per a metastatitzar (Poste et al., 1981).

La comunicació entre cèl.lules tumorals és pot produir per mitjà d'un factor difusible (Heppner et al, 1980), pel contacte intercel.lular (Miller et al., 1983) o mitjançant la participació de l'hoste (Miller et al., 1980).

Les cèl.lules tumorals poden , per tant, aprofitar certs estadis humorals de l'hoste. Aquestes cèl.lules, degut a la seva versatilitat, s'adapten a les condicions canviants de l'hoste i poden escapar-se al seu control.

2. CANVIS GENOTÍPICS DE LA CÈL.LULA NEOPLÀSICA

Com hem vist anteriorment, la cèl.lula tumoral pot respondre als senyals epigenètics que li envien altres cèl.lules del propi tumor o cèl.lules de l'hoste canviant el seu fenotip. Això es degut a que les cèl.lules tumorals poden experimentar canvis en el seu genoma amb major facilitat que les cèl.lules normals (Cifone i Fidler, 1981; Isaacs et al., 1982). Per a expressar aquest fet es va definir el terme d'instabilitat genètica (Nowell, 1976).

La capacitat per a mutar li dóna a la cèl.lula neoplàsica l'habilitat per adquirir determinades característiques que la facin més invasiva. Per axemple, una cèl.lula tumoral pot mutar de manera que, per una activació

de la transcripció o una ampliació genòmica, s'activen enzims proteolítics que augmentin la seva capacitat metastàtica (Kembel et al., 1976).

Els canvis fenotípics trobats en les cèl.lules es deuen als canvis en el seu genoma, per tant els mecanismes de regulació genòmica seran els responsables de les variacions observades (Chao et al., 1983). L'alteració d'aquests mecanismes dóna lloc a la inestabilitat genètica de les cèl.lules tumorals.

Quan s'estudien els canvis fenotípics de les cèl.lules canceroses es veu que segueixen un ordre en el temps encara que no es troba una correlació estreta entre els tipus de variants que es succeeixen. Aquest fet evidencia que la progressió tumoral seria el resultat de la selecció de successives variants cel.lulars que segueixen un ordre establert (Vaage, 1980), la qual cosa guarda un gran paral.lelisme amb el que s'observa durant el desenvolupament normal.

Els canvis fenotípics, com ja esmentavem, es deuen a canvis en l'expressió del genoma. Aquesta expressió vindrà regulada per factors de tipus epigenètic, tant dependents de l'hoste com del propi tumor, de forma anàloga al que succeeix en el desenvolupament embrionari.

L'expressió genòmica de qualsevol cèl.lula pot variar degut a canvis en l'ADN, en la transcripció d'aquest o en la traducció de les molècules d'ARNm. Poden haver-hi altres processos responsables de la modificació de l'expressió

genòmica com per exemple el processat de l'ARNhn o alteracions en l'ARNt, però no en parlarem en el present treball.

Les alteracions que produeixen canvis en el fenotip de la cèl.lula poden resumir-se en:

a) Canvis en la seqüència de l'ADN deguts a processos de redistribució de bases, alterant-se així les pautes de lectura en l'ARNm (Hendick et al., 1984).

b) Modificacions en la iniciació de la transcripció, per alteració del promotor o de l'enzim ARN polimerasa II que catalitza el procés (Yaniv, 1984).

c) Alteracions en el transport i estabilització de l'ARNm en les cèl.lules malignes (Darnel, 1982).

d) Canvis en la vida mitjana de les proteïnes que determinen canvis a nivell genòmic (Reich et al., 1983).

Altres factors que intervenen en l'alteració de l'expressió genòmica de les cèl.lules neoplàsiques són:

a) Fusions de cèl.lules somàtiques que provoquen l'aparició de variants cel.lulars (Kerbel et al., 1982).

b) Hipometilació de l'ADN de les cèl.lules malignes respecte als teixits normals. Això implica l'activació de determinats gens reprimits (Holliday, 1979; Fost i Kerbel, 1984).

La metilació dels residus de citosina de l'ADN és un mecanisme que intervé en la regulació de l'expressió genòmica. La metilació de la citosina suprimeix la transcripció de l'ADN. La hipometilació determina

l'activació transcripcional del genoma (Mohandas et al., 1981; Doerfler, 1983).

Els patrons de metilació d'un gen són somàticament heretables però no exactament (Kerbel et al., 1984), el que indica que no són característiques inherents del genoma cel.lular.

La metilació de l'ADN no sols està relacionada amb l'expressió de la cèl.lula tumoral sinó que també intervé en l'expressió de les cèl.lules embrionàries dels primers estadis del desenvolupament.

Aquestes cèl.lules tenen l'ADN molt metilat i va desmetilant-se a mesura que es van expressant els gens al llarg de la diferenciació (Singer et al., 1979).

Estudiant la desactivació del cromosoma X durant l'embriogènesi dels mamífers es va veure un augment progressiu en la metilació que provoca un canvi de tipus covalent en l'ADN. Aquests resultats mostren novament que la metilació està relacionada amb la supressió de la transcripció de l'ADN (Mohandas et al., 1981).

La metilació també està relacionada amb els processos de diferenciació cel.lular. Durant la diferenciació cel.lular hi ha una disminució general de l'estat de metilació de la citosina en el genoma endemés d'una variació en els punts de l'ADN que es troben desmetilats (Young i Tilghman, 1984). Es a dir, la hipometilació precedeix a una nova metilació que torna al gen l'estat de no expressió (Frost i Kerbil, 1983).

Introduint retrovirus en cèl.lules d'embrions preimplantats i en cèl.lules de carcinoma embrionari s'ha vist que aquests sols s'expressen en les cèl.lules diferenciades a partir del carcinoma embrionari o de l'embrió (Asche et al., 1984) no expressant-se en les cèl.lules indiferenciades (Teich et al., 1977). Això pot explicar-se d'acord amb l'alt grau de metilació que presenten els virus quan es troben integrats en aquestes cèl.lules indiferenciades (Gausth i Wilson, 1983) la qual cosa reprimitaria l'expressió del genoma. De tota manera, la metilació no és el punt primari del bloqueig sinó que és un mecanisme que estabilitza la inhibició de l'expressió gènica.

Altres estudis realitzats amb cèl.lules de carcinoma embrionari han permès afirmar que la metilació no és la causa fonamental de la regulació gènica durant la diferenciació. Quan les cèl.lules de carcinoma embrionari es diferencien cap a endoderma visceral s'expressen els antígens de l'AFP i de l'albúmina, en aquest moment els gens que codifiquen aquests dos antígens queden desmetilats (Yoming i Tilghman, 1984), però també en aquest moment hi ha la desmetilació d'un gran nombre de gens que no s'expressen (Chapman et al., 1984).

La cèl.lula tumoral degut a la seva inestabilitat genètica té més facilitat per a mutar tant de forma espontània com davant d'un mutàgen. Són moltes les substàncies amb capacitat mutagènica, entre elles es troben

els propis quimioteràpics utilitzats en la clínica. També les radiacions, com els raigs X o els ultraviolats, poden introduir mutacions en les cèl.lules.

Degut a la major susceptibilitat per a mutar de la cèl.lula maligna, s'ha demostrat que la quimioteràpia antineoplàsica pot induir mutacions en les cèl.lules tumorals (Kerbel i Davies, 192) tendint generalment a ampliar el seu comportament maligne (Pauwels et al., 1985).

Seria, per tant, de vital importància conèixer els mecanismes reguladors de l'expressió de la cèl.lula tumoral per a intentar controlar el seu desenvolupament.

MATERIAL I METODES

ANIMALS I OBTENCIO DELS COSSOS EMBRIOIDS

Utilitzem ratolins de la soca isogènica 129/Sv cedits pel Prof. Dr. F. Jacob de l'Institut Pasteur de Paris.

Els cossos embrioids deriven del teratocarcinoma OTT6050 obtingut per L.C. Stevens (1970) a l'implantar un embrió de 6 dies de la soca 129/Sv en el testicle d'un ratolí adult de la mateixa soca.

Injectant l'esmentat tumor triturat a la cavitat peritoneal de ratolins isogènics es desenvolupa al tercer o quart passatge una ascites que conté en suspensió els cossos embrioids.

Mantenim els cossos embrioids *in vivo* mitjançant succesius passatges intraperitoneals a intervals de 15 dies a ratolins adults de la soca 129/Sv.

Els animals són sacrificats mitjançant dislocació cervical i es renta la seva cavitat peritoneal amb sèrum fisiològic. En el líquid de rentat podem observar al microscopi invertit (Leitz Diavert) la presència de cossos embrioids en suspensió. Mitjançant centrifugació a 1500 rpm durant 5 min s'aïlla el *pellet* de cossos embrioids.

AÏLLAMENT DELS COSSOS EMBRIOIDS

En tubs de centrifuga estèrils es prepara un gradient de densitat discontinu de Ficoll-400[®] (Pharmacia Fine Chemicals) a les concentracions (p/v) de 6, 10, 20 i 35% respectivament.

Es centrifuguen els cossos embrioids durant 15 min a 1000 rpm en rotor basculant. Així obtenim quatre tipus morfològics de cossos embrioids als que anomenem BC1, BC2, BS1 i BS2, que sedimenten respectivament en les interfases de 6, 10, 20 i 35%.

Les poblacions BC1 i BC2 són semblants a blastocists de ratolí de 3.5-4 dies. La població BS1 és similar a embrions de 6-7 dies mentre que la població BS2 presenta signes d'autòlisi.

OBTENCIO D'UN ANTICòS ANTI-EB (Serra, 1985)

OBTENCIO DE L'INMUNOGEN

Es realitza un gradient de flotació discontinu de Ficoll a les concentracions (p/v) de 6, 8, 10, 20 i 35%.

La mostra, cossos embrioids (*Embryoid Bodies, EB*) procedents d'una ascites, es coloca en el gradient mesclada amb el Ficoll al 8%, sobre ella es posa el Ficoll al 6% i sobre d'aquest es deposita una petita quantitat de sèrum fisiològic. Es centrifuga durant 15 min a 1000 rpm en centrifuga de rotor basculant, d'aquesta manera els cossos embrioids es reparteixen pel tot el gradient trobant-se en la banda del 6% una població vesiculada de cossos embrioids a la que anomenem població BC1 purificada (BC1p).

OBTENCIO DE L'ANTISERUM

Es sensibilitzen conills Nova Zelanda Albins de 2 Kg de pes injectant-lis via endovenosa una concentració de 16×10^5 cossos embrioids de la població BC1p. La sensibilització s'obté inoculant aquesta dosi tres vegades a intervals de 15 dies.

Als 10 dies de l'última injecció s'extreu sang arterial del conill. El sèrum obtingut postextracció del coàgul es descomplementa per calor a 56°C durant 30 min. Pot emmagatzemar-se a -70°C.

ELECTROFORESI DELS COSSOS EMBRIOIDS

Separem les proteïnes citoplasmàtiques i de membrana presents en els cossos embrioids segons la tècnica d'electroforesi descrita per Laemmli (1970).

OBTENCIO DE LA MOSTRA

Els cossos embrioids són lisats en proporció 1/1 (p/v) en el tampó hipotònic següent:

A 200 ml d'una solució d'NaCl 0.15M/TRIS 10mM se li afegeixen:

- 1mM EDTA com a quelant de Ca^{2+} i Mg^{2+} .
- 40 mg NaN_3 (azida sòdica), inhibidor de la glucòlisi.
- 370 mg Iodeacetamida (IAA) que impedeix la formació de ponts disulfur.
- 4 ml d'una solució de PMSF, inhibidor de les proteases. La solució de PMSF es prepara dissolent 80 mg de PMSF en 10 ml d'etanol, degut a la seva insolubilitat en l'aigua.
- 4 ml de Nonidet P-40 (NP-40) detergent que arrenca les proteïnes de membrana.
- 2 mM Benzamidina tetrahydroclorhidre, com a inhibidor de la tripsina.

Es deixen els cossos embrioids en l'esmentat tampó durant 1h a 4°C. Passat aquest temps es centrifuguen en una centrífuga *microfuge* durant 3 min a 4°C. En el sobrenedant s'hi troben les proteïnes objecte d'estudi. La mostra així obtinguda pot guardar-se a -70°C.

ELECTROFORESI DE LES PROTEÏNES PROBLEMA

Es realitza l'electroforesi vertical dels sobrenedants obtinguts en gels d'acrilamida-SDS al 12% d'1 o 1.5 mm de gruix a amperatge constant (20 mA).

Les solucions emprades són les següents:

- Tampó *Stacking* (pH 6.8).

TRIS 6.06 g

SDS 0.4 g

Aigua destil.lada fins a 100 ml

Guardar a 4°C.

- Tampó *Separating* (ph 8.8).

TRIS 18.17 g

SDS 0.4g

Aigua destil.lada fins a 100 ml

Guardar a 4°C.

- Solució d'Acrilamida.

Acrilamida 43.8 g

Bis-acrilamida 1.2 g

Aigua destil.lada fins a 100 ml

Filtrar i guardar a 4°C en absència de llum.

- Tampó de les cubetes (pH 8.3).

TRIS 3.03 g

Glicina 14.4 g

SDS 1 g

Aigua destil.lada fins a 1l

Pot guardar-se a temperatura ambient.

Els gels d'acrilamida es preparen com s'indica:

- Gel *Separating*.

Tampó *Separating* 8 ml
Solució d'Acrilamida 8.5 ml
Aigua destil.lada 15.5 ml
Persulfat d'amoní 159 µl
TEMED 20 µl

Es fa el buit durant 10 min. Tot seguit es col·loca la solució entre les plaques de vidre fins a la seva polimerització (aproximadament 20 min).

- Gel *Stacking*.

Tampó *Stacking* 2.5 ml
Solució d'Acrilamida 1 ml
Aigua destil.lada 6.5 ml
Persulfat d'amoní 50 µl
TEMED 10 µl

Es fa el buit durant 10 min i es posa la solució sobre el gel *Separating* ja format. Es deixa passar aproximadament 1.5 h fins a la col·locació de les mostres.

Els sobrenedants que contenen les proteïnes problema han de mesclar-se amb un tampó per a que es dongui la migració correcta d'aquestes molècules al llarg dels gels. El tampó és el següent:

- Tampó de les mostres.
Aigua destil.lada 4.2 ml
Tampó *Stacking* 1 ml
Glicerol 0.8 ml
SDS 10% 1.6 ml
2-mercaptoetanol 0.4 ml



El 2-mercaptoetanol crea condicions reductores que trenquen els ponts disulfur que puguin haver entre les proteïnes problema. Per a actuar correctament ha de trobar-se a 100°C. Per a terme mitjà posem 5-15µl de la mostra amb 45µl d'aquest tampó. Ho deixem al bany Maria durant 5 min.

Utilitzem també proteïnes *standard* Bio-Rad d'alt i baix pes molecular. Posem 2µl d'aquestes proteïnes amb 45µl del tampó i també ho deixem al bany Maria.

Per a realitzar *electroblottings* fem gels d'1.5mm de gruix. Les proteïnes problema, en aquest cas, no es barregen amb 2-mercaptoetanol per a evitar les condicions reductores. Fem això per a no trencar els ponts disulfur que donguin una conformació proteica que pugui ser la responsable de la unió amb l'anticòs específic que després utilitzarem. En aquest cas en lloc de 2-mercaptoetanol posem el mateix volum d'aigua destil·lada.

Les electroforesis no utilitzades per a l'*electroblotting* es fan en gels d'1mm de gruix. Els gels es tenyeixen amb una solució de Coomassie brilliant blue formada per: Aigua destil·lada, metanol i àcid acètic a les concentracions (v/v) de 45/45/10 respectivament més 200mg% de coomassie.

Es deixen els gels tota la nit dintre d'aquesta solució, al dia següent es destenyeixen amb una solució d'aigua destil·lada, metanol i àcid acètic a les concentracions (v/v) de 8/3/1 respectivament.

ELECTROBLOTTING

La tècnica de l'*electroblotting* s'utilitza comunament des de fa anys per a l'estudi qualitatiu tant d'àcids nucleics com de proteïnes (Towbin et al., 1979; Bittner et al., 1980; Burnette, 1981; Reinhart i Malamud, 1982; Gershoni i Palade, 1982; De Blas i Cherwinski, 1983; Towbin i Gordon, 1984).

Les proteïnes separades en els gels d'1.5mm de gruix es transfereixen a papers de nitrocel.lulosa segons el mètode descrit per Towbin et al. l'any 1979.

Per a transferir les proteïnes del gel al paper s'estableix una diferència de potencial que arrosega a les proteïnes cap el pol positiu on situem la nitrocel.lulosa. Aquest no és l'únic suport que es coneix però és un dels més emprats per les seves característiques.

Les proteïnes en el gel es troben entremesclades amb la xarxa que forma l'acrilamida, en el paper es queden adherides a la seva superfície. La nitrocel.lulosa reté les proteïnes fortament de manera que no es perden encara que es facin diversos rentats.

Per a posar en contacte la nitrocel.lulosa i el gel es fa un "sandvitx" (Towbin et al., 1979; Bittner et al., 1980) de la forma següent:

- Electrode negatiu.
- 1 Schoch-Brite 3R.
- 2 papers gruixuts marca Guarro.

- Gel amb les proteïnes separades.
- Paper de nitrocel.lulosa.
- 3 papers gruixuts marca Guarro.
- 1 Schoch-Brite 3R.
- Electrode positiu.

El "sandvitx" es submergeix en una cubeta que conté el tampó de transferència format per:

Glicina 0.192M

TRIS 0.025M

Metanol 20%

Enrasar la glicina i el TRIS amb aigua destil.lada fins a un volum de 800ml, després afegir-li 200ml de metanol fins a un volum final d'un litre.

El gel i la nitrocel.lulosa es submergeixen, abans de fer el "sandvitx", durant 25 min en aquest tampó. El metanol del tampó de transferència fa que el gel i el paper es contreguin; durant aquests 25 min ambdues estructures s'estabilitzen de manera que al moment de la transferència proteica ja no es produeixen distorsions.

De la mateixa manera es mullen els papers gruixuts i els Schoch-Brite.

Un cop el "sandvitx" es troba cobert pel tampó es fa circular un corrent electric continu de 12V durant 5h. Passat aquest temps es pot iniciar el processat de la nitrocel.lulosa.

El primer que es fa és retallar la zona de la nitrocel.lulosa en la qual s'hi troben les proteïnes

standard. A continuació, es tenyeix aquesta tira durant 1-2 min amb la solució següent: Negre amido 0.1% en una solució de metanol, àcid acètic i augua destil.lada en proporcions (v/v) 25/10/65 respectivament. Es destenyeix amb la mateixa solució emprada par a l'electroforesi.

D'aquesta forma les proteïnes *standard* es tenyeixen de blau i es pot veure si la transferència al paper s'ha produït correctament. La resta de la nitrocel.lulosa pot guardar-se a 4°C o continuar amb ella l'*electroblotting*.

En aquesta tècnica s'utilitzen anticossos específics dirigits contra determinades proteïnes. La unió antigen-anticòs es detecta amb un segon anticòs conjugat amb peroxidasa, que va dirigit contra l'anticòs específic, i una solució de diaminobencidina (DAB). Així es detecta la presència de determinats antigens en la mostra problema.

Les proteïnes de pes molecular superior a 100 Kd passen amb dificultat, o no passen, del gel al paper degut a que s'entortolliguen fortament amb la xarxa formada per l'acrilamida. Les molècules de menor pes, i per tant menor longitud, són més fàcils d'arrencar.

La nitrocel.lulosa es renta amb PBS (ph 7.2) durant 10 min per a treure l'SDS o les impureces que pugui tenir retingudes. A continuació es procedeix al seu bloqueig.

La nitrocel.lulosa té gran avideça per a qualsevol molècula que s'hi posi en contacte. Les proteïnes problema ocupen un espai en el paper, però gran part d'ell està lliure. Aquest espai s'ha d'ocupar (bloqueig de la

nitrocel.lulosa) ja que a l'incubar amb l'anticòs aquest s'uniria de forma inespecífica al paper.

Per a bloquejar la nitrocel.lulosa s'utilitza una solució d'ovoalbúmina al 5% en PBS. Es renta el paper durant 1h amb aquesta solució amb agitació contínua. Tot seguit s'incuba amb l'anticòs específic.

Es dilueix l'anticòs amb la mateixa solució d'ovoalbúmina fins a una concentració adequada que depèn del títol de l'anticòs.

S'incuba el paper amb l'anticòs durant 1h. Passat aquest temps es fan tres rentats de 20 min amb agitació contínua amb la solució:

TRIS 50 mM

NaCl 0.15 M

Gelatina 0.25%

En aigua destil.lada.

Per a que es disolgui la gelatina cal escalfar la solució fins aproximadament 60°C. Un cop s'ha desfet es deixa refredar i s'equilibra el pH a 7,6.

Amb aquests rentats s'aconsegueix un nuó bloqueig de la nitrocel.lulosa.

El segon anticòs conjugat es dilueix amb aquesta solució de TRIS-sali gelatina. La seva concentració depèn del seu títol.

S'incuba el paper durant 1h amb aquest anticòs. Passat aquest temps es fan tres rentats de 20 min amb la solució TRIS-sali gelatina.

A continuació es renta la nitrocel.lulosa durant 10 min amb PBS. Mentre tant, es prepara una solució de DAB per a revelar l'activitat peroxidàsica.

La solució de DAB conté:

DAB 5 mg

H₂O₂ 30% (Perhydrol Merck) 10 µl

PBS fins a 10 ml

Filtrar i utilitzar immediatament. Resguardar de la llum ja que es degrada ràpidament.

La nitrocel.lulosa s'incuba amb la solució de DAB durant uns minuts. La peroxidasa desdobla l'H₂O₂ en H₂O i O₂. La DAB s'oxida amb l'O₂ lliurat i adopta una coloració marró. D'aquesta manera en els llocs on s'ha unit l'anticòs específic a l'antigen es veu l'aparició d'una banda marró.

OBTENCIO DE FEMELLES GESTANTS

Utilitzem femelles de la soca 129/Sv d'aproximadament tres mesos d'edat.

Les femelles es superovulen segons la següent pauta:

- Injecció intraperitoneal de 7 U.I. d'FSH i 7 U.I. d'LH.
- Passades 24 h s'injecten també intraperitonealment 10 U.I. d'HCG.

A les 12 h es posen amb els mascles.

Després de 4-6 h s'observa la presència de plug vaginal que es considera com a dia zero de la gestació.

TUMORS " IN UTERO "

Extraiem una ascites amb 2 ml de sèrum fisiològic i els posem en un tub d'assaig estèril. Centrifuguem la mostra durant 10 min a 1000 rpm i passat aquest temps tenim un *pellet* de cossos embrioids. Extraiem el sobrenedant (líquid ascític) i el guardem a 4°C.

Agafem 1µl del *pellet* de cossos embrioids (aproximadament 5×10^3 cossos embrioids) i el posem en un tub estèril amb 0.5 ml de DMEM amb 0.1 ml de sèrum fetal boví i amb 0.5 ml del seu propi líquid ascític per a mantenir al màxim les condicions fisiològiques en les quals es troben aquestes estructures.

Despres d'agitar la suspensió amb una xeringa Hamilton s'agafen 10 µl (uns 50 cossos embrioids) i s'injecten a l'interior de la llum uterina d'animals gestants de dos dies prèvia oviductomia.

S'han inoculat també cossos embrioids a l'interior de la cavitat uterina de femelles gestants de dia 3.5 i dia 4.

OVIDUCTOMIES

ANESTESIA

S'injecten a l'interior de la cavitat peritoneal de les femelles gestants 0.04 ml de Valium 10 mg.

Després de 10 min s'injecten per la mateixa via 0.03 ml de Ketolar.

Passats uns 5 min es pot iniciar la intervenció dels animals.

OVIDUCTOMIES

Seccionem l'oviducte dret de femelles gestants de dos dies. En aquest moment els embrions es troben dintre de l'oviducte impedit la seva arribada a l'úter.

Els ratolins tenen l'úter bicorne amb la qual cosa podem mantenir la gestació deixant l'oviducte esquerra intacte i permetent, per tant, que els embrions corresponents s'implantin.

Es col·loca l'animal en posició cúbito-supina sobre la planxa d'operacions subjectat per les quatre extremitats. Després de netejar i rasurar es fa una incisió longitudinal d'uns 2 cm a nivell de la fossa ilíaca dreta .

Es separa el teixit adipós i es retiren les vísceres per a deixar al descobert el corn uterí dret. Tot seguit es fa doble lligadura i secció de l'oviducte.

A continuació es fa una lligadura en la part més distal del corn dret al qual injectarem els cossos embrioids.

Mitjançant una xeringa Hamilton introduïm a l'interior de la llum uterina 10µl de la suspensió de cossos embrioids.

Després de la injecció dels cossos embrioids es fa una sutura contínua amb fil de sutura 6/00.

Els animals es tenen en observació unes hores resguardant-los de les temperatures extremes. Es molt important no sotmetre'ls a temperatures altes per a evitar la mort per deshidratació.

TUMORS SUBCUTANIS

Mantenim els cossos embrioids mitjançant el seu passatge intraperitoneal en animals adults de la soca 129/Sv.

Extraiem l'ascites de la cavitat peritoneal d'un animal portador amb 4 ml de sèrum fisiològic. Injectem la meitat d'aquesta suspensió subcutàniament tant als animals gestants com als animals control. El número aproximat de cossos embrioids inoculats és 2×10^8 .

S'utilitzen femelles gestants des del dia zero de la gestació fins al dia dotze.

IMMUNOHISTOQUIMICA DELS TUMORS

Hem realitzat la immunohistoquímica dels tumors amb un anticòs anti-AFP de ratolí comercial (Miles).

Les mostres un cop extretes de l'animal es renten amb PBS durant 5 min a continuació es fixen amb el fixador de Guy Sainte-Marie (Sainte-Marie, 1962) durant 15-24 h a 4°C.

El fixador conté: 99 volums d'etanol 96° i 1 volum d'àcid acètic glacial.

Després de fixada la mostra s'ha de deshidratar per a poder elaborar el bloc de parafina. Es fan els següents banys a 4°C:

Alcohol absolut 4×45 min

Xilol 3×1 h

L'últim rentat de xilol es fa a temperatura ambient.

Tot seguit es fan 3 banys de 45 min en parafina líquida i es construeix el bloc. El bloc es guarda a 4°C.

Es fan seccions de 8µm que es processen com explicarem a continuació.

Desparafinat: 24 h a 37°C

Xilol 2×5 min a 4°C

Hidratació: Alcohol absolut 5 min

Alcohol de 80 en PBS 5 min

Alcohol de 70 en PBS 5 min

PBS 3×10 min

Tots els rentats a 4°C

Inhibició de la peroxidasa endògena: Els teixits tenen l'enzim peroxidasa que es troba en grans quantitats en la sang. Per a no obtenir una reacció artefactual es procedeix a la seva inhibició.

Els talls es renten durant 45 min a 4°C amb una solució formada per 1.7 ml d'H₂O₂ 0.5% més 100 ml de metanol.

Tot seguit es fan 2 rentats de 10 min amb PBS i s'incuba amb el primer anticòs.

L'anticòs anti-AFP es dilueix en PBS fins a la concentració 1/400. Els talls s'incuben amb ell durant 30 min a temperatura ambient.

Per a rentar l'excés d'anticòs es fan seguidament 2 rentats de 15 min amb PBS i es procedeix a la incubació amb el segon anticòs.

L'anticòs conjugat es dilueix en PBS a la concentració 1/200. Les seccions s'incuben amb ell durant 30 min a temperatura ambient.

Tot seguit es fan 2 rentats de 15 min amb PBS i un últim rentat de 10 min a 4°C.

A continuació s'incuben els talls amb una solució de diaminobencidina (DAB) igual a l'emprada per a l'electroblotting. Passats uns 5 min es renta amb aigua destil·lada per a parar la reacció.

Es fan dos rentats de 10 min amb PBS a 4°C i es contrasten els talls amb una solució d'OsO₄ 1%. Les seccions s'incuben amb aquesta solució durant 10-15 min a temperatura

ambient. Passat aquest temps es renta amb aigua destil·lada per a aturar la reacció.

Després els talls es deshidraten i es monten segons mètodes habituals.

Tant en les immunohistoquímiques com en els *electroblottings* es realitzen dos tipus de blancs:

- S'incuba la mostra únicament amb la solució de DAB detectant-se així la peroxidasa endògena existent.
- S'incuba amb el segon anticòs i la solució de DAB. Es veu així si l'anticòs conjugat s'uneix de forma inespecífica a la mostra.

OBTENCIO DE LES MATRIUS

Hem realitzat una anàlisi morfològica de les matrius gestants de dos dies en comparació amb la morfologia de matrius no gestants.

Les matrius han estat estudiades mitjançant microscòpia òptica i d'escandallatge.

Les femelles es sacrifiquen per dislocació cervical i immediatament es procedeix a l'extracció dels cors uterins.

Les matrius que es processaran per a microscòpia òptica es renten amb sèrum fisiològic i es fixen amb Bouin.

Les mostres destinades a la microscòpia d'escandallatge es congelen i es fan petites seccions que són processades segons el mètode descrit a continuació.

MICROSCOPIA D'ESCANDALLATGE

Es renta la mostra i es fixa amb glutaraldèhid al 2% durant 1h a 4°C. Es renta amb tampó sucrosa durant 1h a 4°C. A continuació es fixa en tetròxid d'osmi a l'1% durant 2.5h a 4°C. Passat aquest temps es renta novament amb tampó durant 1h a 4°C.

La mostra per a continuar el processat s'ha de deshidratar. Per a això s'utilitza una bateria d'acetones en concentració creixent:

Acetona 30% 15 min 4°C.

Acetona 40% 15 min 4°C.

Acetona 50% 15 min 4°C.

Ara es pot deixar en una solució saturada d'acetat d'uranil durant 1h a 4°C per augmentar el contrast.

Es continua la deshidratació amb noves acetones:

Acetona 70% 15 min 4°C.

Acetona 80% 15 min 4°C.

Acetona 90% 20 min 4°C.

Acetona 100% 20 min 4°C.

La mostra deshidratada es conserva en acetat d'isoamil per a la seva posterior desecació, ombrejat i observació amb el microscopi d'escandallatge Mod. JEOL 1893.

La solució fixadora de glutaraldèhid i el tampó sucrosa es preparen com segueix:

a) Tampó cacodilat 0.2M (pH 7.3).

Cacodilat sòdic 10.7 g

HCl 1.75 ml

Aigua destil.lada fins a 250 ml

Guardar a 4°C.

b) Solució fixadora.

Glutaraldèhid 4 ml

Tampó cacodilat 15 ml

Aigua destil.lada 20 ml

Guardar a 4°C.

c) Tampó sucrosa.

Sucrosa 6.84 g

Tampó cacodilat 50 ml

Aigua destil.lada 50 ml

Guardar a 4°C.



ANALISI HISTOLOGICA

Un cop extretes les mostres es fixen amb la solució de Bouin durant 24h i tot seguit es procedeix a elaborar el bloc de parafina segons el mètode habitual.

Es fan seccions de 8µm que són desparafinades com segueix:

- Els portes amb les seccions es deixen 24 h a 37°C.
- Es fan dos banys de 20 min amb xilol a temperatura ambient.

Un cop desparafinats els talls s'han d'hidratar per a poder tenyir-los. La hidratació es realitza passant els talls per una bateria d'alcohols de concentració decreixent:

Alcohol absolut 2×5 min

Alcohol de 70 2×5 min

Aigua destil.lada 2×5 min

Tenyim els talls amb Hematoxilina-Eosina. Es deixen 3 min en hematoxilina i després es fa un rentat amb aigua corrent per a produir el viratge del colorant. A continuació es posen 1.5 min en eosina i passat aquest temps es renta l'excés de colorant amb aigua destil.lada.

El següent és deshidratar la mostra. S'utilitza una bateria d'alcohols de concentració creixent:

Alcohol de 70 2×5 min

Alcohol absolut 2×5 min

Després es fan dos rentats de 5 min amb xilol i es monten els talls amb DPX.

RESULTATS

CARACTERITZACIO DELS
COSSOS EMBRIOIDS I DE LES
MATRIUS GESTANTS

CARACTERITZACIO BIOQUIMICA DELS
COSSOS EMBRIOIDS

Els cossos embrioids són formes estables que poden creixer com a tals en suspensió o donar lloc a tumors sòlids si s'ancoren a un substrat. En el present treball s'obtenen tumors sòlids a partir de la forma ascítica del teratocarcinoma OTT6050.

Monzó (1984) aïllà quatre poblacions de cossos embrioids de l'interior d'una ascites a les que anomenà BC1, BC2, BS1 i BS2. Les poblacions BC1, BC2 i BS1 són respectivament semblants a embrions de 3.5, 4 i 6-7 dies d'evolució. La població BS2 presenta signes de mort cel.lular.

Estudià l'evolució d'aquestes estructures en la cavitat abdominal i demostrà que segueixen una línia evolutiva.

A partir de la injecció subcutània de cada tipus de cos embrioid obtingué diferents tumors característics cada un d'ells de la població injectada. Així comprovà que cada una d'aquestes poblacions poseeix unes potencialitats biològiques determinades.

Tot tumor està format per diferents grups cel.lulars que presenten característiques comunes i diferencials. Els distints clons d'un tumor interactuen entre ells i el seu comporten quan estan junts és diferent que si es troben isolats. El creixement d'un tumor depèn, en part, de les interaccions intercel.lulars que es donen en el seu si.

Les quatre poblacions de cossos embrioids esmentades formen en conjunt un tumor únic. Per a estudiar l'evolució d'aquest tumor davant de la gestació s'ha treballat amb les

quatre poblacions de cossos embrioids juntes. Abans però, s'ha comprovat que els cossos embrioids, malgrat les seves diferències, constitueixen una mostra prou homogènia com per a ser tractada en el seu conjunt.

Tots els cossos embrioids estan formats per una capa de cèl.lules endodèrmiques que envolta a una població major o menor de cèl.lules de carcinoma embrionari (figs. 1 i 2). S'ha realitzat un estudi sobre la comunitat antigènica de les diferents poblacions de cossos embrioids a partir de tres anticossos específics.

Serra (1985) obtingué un anticòs a partir d'una població de cossos embrioids integrada únicament per vesícules de tipus endodèrmic. L'anticòs (anticòs anti-EBp) reconeix cinc proteïnes d'alt pes molecular quan es fa reaccionar amb la població BS1p utilitzada com a immunogen.

S'ha estudiat la presència d'aquests antigens en les quatre poblacions de cossos embrioids mitjançant la tècnica de l'*electroblotting*. Juntament amb l'anticòs anti-EBp s'han utilitzat un anticòs comercial anti-AFP (Miles) i un anticòs comercial anti-Transferrina (Nordic).

Es separen les poblacions de cossos embrioids mitjançant un gradient discontinu de Ficoll i es realitza una electroforesi de cada una d'elles. Les electroforesis mostren unes grans semblances entre els patrons proteics de les quatre poblacions estudiades. No s'observen diferències qualitatives significatives segons aquest mètode (fig. 3).

Quan es realitza l'*electroblotting* amb l'anticòs anti-EBp es pot comprovar que les quatre poblacions expresen les proteïnes responsables de la formació d'aquest anticòs (fig. 4). La reactivitat observada en les poblacions BC1, BC2, BS1 i BS2 és idèntica a la trobada sobre la població que serví d'immunogen.

De la mateixa manera es pot comprovar que tots els cossos embrioids poseïxen AFP i Transferrina (fig. 5).

Aquests resultats posen de manifest les similituds bioquímiques existents entre les diferents poblacions de cossos embrioids i permeten tractar-les en conjunt com una població única suficientment homogènia.

CARACTERITZACIO MORFOLOGICA DE LES
MATRIUS GESTANTS

L'úter dels rosegadors és un òrgan tubular i imparell situat a la línia mitjana de l'hemiabdomen inferior.

Els cos uteri és bicorne i cada un dels seus corns es continua cranialment amb l'oviducte que contacta amb l'ovari respectiu.

Caudalment ambdós corns uterins es fusionen per a formar el cèrvix que es continua amb la vagina que comunica aquest òrgan amb l'exterior.

L'estudi morfològic d'aquest òrgan revela que està format per vèries capes de teixits diferents. Una capa serosa envolta a una capa muscular que delimita, mitjançant una làmina basal, amb la capa mucosa que rep el nom d'endometri (figs. 6 i 7).

L'endometri està format per les cèl.lules de l'estroma que contenen els vasos que irriguen a la mucosa i les glàndules d'excreció d'aquest òrgan (figs. 8-11). L'estroma queda limitat per la seva part interna per una membrana basal sobre la que descansen les cèl.lules de l'epiteli superficial de l'endometri (figs. 12-15).

Com a estudi previ, es caracteritzen les diferències morfològiques que s'observen entre les matrius gestants i no gestants.

Durant la gestació s'observa un edema generalitzat de la paret uterina que es fa més evident a nivell de l'endometri.

En la capa muscular s'observa una dilatació dels capil.lars sense apreciar-se extravasació de cèl.lules

sanguínies. Els signes d'edema que es poden observar en la capa muscular són: turgència del citoplasma de les cèl.lules musculars i un augment de l'espai extracel.lular que posa de manifest la trama reticular que serveix de suport a aquestes cèl.lules (figs. 16 i 17).

L'estroma de l'endometri presenta un alt índex de proliferació demostrat per la presència de nombroses mitosis i per un augment en l'altura de l'endometri (figs. 16 i 17). Les glàndules en l'endometri de les matrius gestants augmenten de mida i presenten dilatació de la llum dels seus conductes. Aquesta dilatació provoca un aplanament de les seves cèl.lules. La llum glandular es troba ocupada per un material mucinós, producte de la secreció de les cèl.lules epitelials que recobreixen aquests conductes (fig. 18).

Els capil.lars de l'estroma augmenten en número i es troben dilatats (figs. 16-18). Aquests canvis en la vascularització són més evidents en la zona de l'estroma que contacta amb la capa muscular.

Les cèl.lules de tipus mesenquimal de l'estroma són més nombroses en l'endometri de matrius gestants i endemés, aquestes es troben separades unes de les altres degut a l'edema existent.

Les cèl.lules estromals de matrius no gestants es troben agrupades i envoltat cada un dels grups per bandes de fibrina i col.làgena. Aquesta xarxa connectiva es trenca en l'endometri durant la gestació i s'observen en l'espai fragments fibril.lars.

Durant la gestació la tarma de reticulina adquireix una disposició diferent i tendeix a envoltar de forma individualitzada a les cèl.lules estromals.

L'epiteli de superfície endometrial està format, en la fase de repós, per una capa de cèl.lules columnars. En la gestació s'observa estratificació d'aquestes cèl.lules, nombroses mitosis i un augment de la longitud de l'eix major d'aquestes cèl.lules (figs. 19 i 20).

Durant la gestació, la llum uterina presenta abundós material mucocaseós que conté detritus cel.lulars i escases cèl.lules inflamatòries (figs. 16 i 17).

TUMORS DE L' INTERIOR DE
LA CAVITAT UTERINA

Quan s'injecten cossos embrioids tant intraperitonealment com subcutàniament el temps d'evolució del tumor depèn, entre altres coses, de la dosi emprada.

Per a mantenir la soca de cossos embrioids *in vivo* es fan passatges intraperitoneals succesius d'una dosi aproximadament constant d'aquestes estructures.

Cada 15 dies es sacrifiquen els animals de passatge mitjançant dislocació cervical. Es renta la seva cavitat peritoneal amb 5ml de sèrum fisiològic. En suspensió es troben uns 4×10^5 cossos embrioids (Monzó, 1984). S'injecta 1ml de la suspensió de cossos embrioids intraperitonealment a individus adults isogènics.

Monzó (1984) injectant a l'interior de la cavitat peritoneal de ratolins adults de la soca 129/Sv 5×10^4 cossos embrioids observà que a partir del setè dia del passatge s'aïlla un número significatiu de cossos embrioids en l'interior del líquid ascític corresponent tots ells a la població BC1 que és morfològicament semblant a blastocists de 3.5 dies.

A partir del dia 20 postinjecció la població predominant de cossos embrioids és la població BS1 que conté estructures semblants a embrions de 6-7 dies d'evolució. Després de 22 dies d'injecció l'ascites esdevé hemorràgica produint-se la mort de l'animal portador entre els dies 25 i 30 postinjecció.

En el present treball utilitzem els cossos embrioids procedents d'una ascites de 15 dies ja que en aquest moment les quatre poblacions estan equiparades.

Per a l'obtenció de tumors *in utero* s'injecten 10 μ l de la solució de cossos embrioids que es descriu a continuació: S'extreu una ascites de 15 dies d'evolució de la cavitat peritoneal d'un animal portador amb 2ml de sèrum fisiològic. Es centrifuga quedant un *pellet* de cossos embrioids del qual se n'agafen 1 μ l. Aquest μ l de pes sec de cossos embrioids es barreja amb 0.5ml de DMEM i 0.5 del líquid ascític obtingut en el sobrenedant. S'inoculen 10 μ l d'aquesta solució que corresponen aproximadament a 50 cossos embrioids.

La solució de cossos embrioids s'injecta a la cavitat uterina de femelles gestants de 2, 3.5 i 4 dies de gestació.

A les femelles gestants de 2 dies se lis practica la lligadura i secció de l'oviducte immediatament abans de la injecció dels cossos embrioids. El segon dia de la gestació els embrions es troben en l'interior de l'oviducte dirigint-se cap a l'úter. Per mitjà de l'oviductomia s'impedeix l'arribada dels embrions al corn uterí corresponent i en el seu lloc s'inoculen els cossos embrioids.

L'úter dels rosegadors és bicorne. En aquest treball s'ha procedit a la secció de l'oviducte dret mantenint intacte l'oviducte esquerra. D'aquesta forma els embrions pertanyents al corn esquerra de la matriu poden arribar a l'úter, implantar-se i continuar el seu desenvolupament. Els embrions que es desenvolupen normalment en l'interior del

corn uteri asseguruen el manteniment de la gestació així com les condicions fisiològiques de la mateixa, la qual cosa permet afirmar que els cossos embrioids es troben sota la influència d'un estat gestacional normal. Aquest mètode permet obviar els inconvenients de treballar amb femelles pseudogestants i assegura que tots els processos de la gestació es produeixen de forma adequada.

Quan s'estudia la morfologia dels tumors obtinguts en l'interior de l'úter també s'estudia la morfologia dels embrions que estan implantats en el corn uteri intacte. Per a estudiar els tumors i els embrions s'extreu el corn uteri corresponent i, després de fixar-lo i fer el bloc de parafina, es tallen seccions seriades transversals de 8µm de gruix, això permet observar tot el diàmetre de la llum uterina i la posició i morfologia dels tumors o els embrions en cada cas.

S'ha pogut comprovar que la formació dels tumors en l'interior de la matriu depèn de la dosi de cossos embrioids emprada. Si es prepara una solució de cossos embrioids amb 1.5µl de pes sec de cossos embrioids junt amb 0.5ml de DMEM i 0.5ml de líquid ascític i s'injecten 10µl d'aquesta solució (uns 75 cossos embrioids) s'observa necrosi de la matriu en la zona on s'han depositat els cossos embrioids.

No sols la dosi de cossos embrioids utilitzada és crítica sinó que també ho és el moment de la gestació en que s'injecten els cossos embrioids. Quan s'injecten cossos embrioids a l'interior de l'úter de femelles gestants de 3.5

i 4 dies (període de periimplantació) no s'observa la producció de tumors.

També s'han injectat cossos embrioids a l'interior de l'úter de femelles no gestants que s'utilitzen com a animals control.

INJECCIO DELS COSSOS EMBRIOIDS A LA
CAVITAT UTERINA D'ANIMALS NO GESTANTS

S'han utilitzat femelles verges adultes a les que s'ha injectat la solució de cossos embrioids descrita.

Per a evitar l'expulsió dels cossos embrioids al ser canulats a l'interior de la matriu es fa una lligadura en l'extrem distal del corn uterí dret.

S'han fet tres grups d'animals que s'han sacrificat en diferents dies post-injecció. Per a cada grup s'han utilitzat 10 femelles.

El primer grup s'ha sacrificat 10 dies després de la injecció dels cossos embrioids; el segon 20 dies post-injecció i el tercer als 30 dies de la injecció d'aquestes estructures.

Els animals es sacrifiquen per dislocació cervical i es procedeix a l'extacció de l'úter. La matriu presenta un aspecte desllustrat i la seva cavitat es troba dilatada i ocupada per un material mucinós fosc.

En l'estudi histològic dels talls transversals seriats del corn uterí inoculat es pot observar:

- La llum uterina es troba ocupada per un material muconeocròtic on hi ha escases cèl.lules inflamatòries del tipus dels polimorfonuclears.

- En l'endometri s'observen signes de necrosi hemorràgica amb molt poques cèl.lules inflamatòries.

- Hi ha dilatació de la llum dels vasos de la capa muscular.

- No s'observa la presència de cèl.lules tumorals.

INJECCIO DELS COSSOS EMBRIDIDS A LA
CAVITAT UTERINA D'ANIMALS GESTANTS DE
DOS DIES

1. COSSOS EMBRIOIDS INJECTATS A L'INTERIOR DE LA LLUM UTERINA

Es fa una oviductomia a femelles gestants en el segon dia de la gestació. S'inoculen els cossos embrioids per la part craneal del corn uterí dret al que s'ha practicat l'esmentada oviductomia. Els cossos embrioids es dispositen a l'interior de la llum de l'úter sense penetrar en la mucosa uterina.

Es sacrifiquen els animals després de 6, 10, 14 i 18 dies de la injecció dels cossos embrioids. Altres animals es deixen arribar a terme i es sacrifiquen els dies 4 i 8 després del part.

La proporció de tumors obtinguts és d'un 30% respecte al número d'animals injectats. S'han estudiat 10 tumors de cada un dels casos presentats.

1.1. ANIMALS SACRIFICATS ABANS DEL PART

La gestació en els ratolins té una durada de 21 dies. Es sacrifiquen els animals després de 6, 10, 14 i 18 dies de la injecció dels cossos embrioids corresponent respectivament als dies 8, 12, 16 i 20 de la gestació.

S'extreu l'uter i es procedeix al seu estudi macroscòpic i microscòpic. S'estudien ambdós corns uterins comprovant la presència o absència de tumor així com la

morfologia i l'estat de desenvolupament dels embrions del corn no injectat.

Per als quatre grups d'animals s'obtenen els mateixos resultats la qual cosa indica una independència respecte al temps d'evolució dels cossos embrioids en l'interior de la cavitat uterina.

Macroscòpicament, la cavitat abdominal és normal així com l'aspecte de la matriu que mostra una dilatació de la seva llum compatible amb la fase evolutiva dels diferents dies de la gestació estudiats.

Microscòpicament s'estudien els tumors obtinguts mitjançant la seva tinció amb hematoxilina-eosina i mitjançant la tècnica de la immunohistoquímica.

1.1.1. ANALISI HISTOLOGICA DELS TUMORS

L'estudi microscòpic s'ha realitzat observant els talls seriats corresponents als dos corns uterins.

El corn uterí no inoculat mostra uns embrions d'aspecte normal sense presentar cap característica morfològica indicativa d'alteració en el seu desenvolupament o en la seva edat gestacional. En els diferents dies d'estudi els embrions es troben correctament implantats i envoltats per les membranes extraembrionàries corresponents.

Els corn uterí inoculat amb els cossos embrioids mostra en tots els casos:

a) La morfologia de l'úter és la corresponent a l'estat gestacional normal no trobant-se signes d'alteració. Es pot observar:

- Augment de la grandària de les cèl.lules i estratificació de l'epiteli de superfície de l'endometri.

- Signes d'edema en l'estroma de l'endometri: turgència de les cèl.lules estromals i augment de l'espai intercel.lular.

- Dilatació de les glàndules endometrials la llum de les quals es troba ocupada per un material mucinós.

- Dilatació dels vasos de tota la mucosa uterina.

b) En la zona mitjana de la cavitat uterina es troba la formació d'una decidua en el si de la qual s'hi troba allotjat un teixit tumoral (figs. 21-54).

Aquest tumor és de forma nodular i la seva grandària no excedeix en cap cas els 0.3 cm. Es troba envoltat per les cèl.lules de l'estroma i aquestes cèl.lules estan separades de la llum uterina per una capa de cèl.lules de l'epiteli superficial.

Les cèl.lules de l'estroma de l'endometri que envolten al tumor es troben unides entre elles mitjançant prolongacions citoplasmàtiques i es disposen de forma estratificada de manera concèntrica al tumor.

El número d'aquests estrats és decreixent des de la muscular cap a la llum.



El número de files de cèl.lules de l'estroma que envolta al pol del tumor més proper a la llum uterina està en relació inversament proporcional amb la mida del tumor.

El tumor mai sobrepassa la làmina basal de l'epiteli superficial ni la làmina basal de la mucosa uterina.

L'anàlisi histològica del tumor mostra una morfologia compatible amb la de carcinoma embrionari, no trobant-se mai cap tipus de teixit diferenciat.

El patró de creixement predominant és de tipus sòlid. Està format per níus cel.lulars amb citoplasma dens i eosinòfil. El nucli es troba en disposició central i és de gran mida, de forma irregular i presenta la cromatina distribuïda irregularment amb un o varis nuclèols prominents.

En les zones més perifèriques del tumor poden trobar-se en alguns casos les cèl.lules de carcinoma embrionari disposades al voltant d'un espai formant pseudoglàndules.

En la zona de la decidua situada entre el tumor i el miometri s'observen nombrosos capil.lars neoformats. Aquests capil.lars presenten una llum dilatada de forma irregular, tapissada de forma incompleta per cèl.lules endotelials, de mida i forma variables. Aquesta xarxa capil.lar té nombroses anastomosis entre els seus vasos i penetra en el si del tumor formant una trama vascular sobre la que es dipositen les cèl.lules de carcinoma embrionari.

El nòdul tumoral es situa en tots els casos estudiats seguint els mateixos eixos de l'espai. Es troba implantat en

la mucosa uterina dirigint-se cap a la llum del corn uterí corresponent. La seva disposició en l'espai és anàloga a la dels embrions implantats.

1.1.2. IMMUNOHISTOQUÍMICA DELS TUMORS

Els tumors obtinguts a l'interior de l'úter s'han estudiat mitjançant la tècnica de la immunohistoquímica amb un anticòs anti-AFP de ratolí obtingut en conill (Miles).

Les seccions seriades dels tumor de 8µm de gruix es processen com s'indica en l'apartat de material i mètodes. Per a la detecció de la unió antígen/anticòs s'utilitza un segon anticòs anti-conill conjugat amb peroxidasa obtingut en cabra (Nordic) i una solució de diaminobencidina.

L'AFP (α -fetoproteïna) és un marcador dels teixits endodèrmics.

Quan els tumors *in utero* s'incuben amb l'anticòs anti-AFP invariablement s'obté una reacció negativa (figs. 55 i 56) la qual cosa confirma el patró de carcinoma embrionari sòlid d'aquests tumors.

Com hem esmentat anteriorment, en alguns d'aquests tumors es presenten estructures pseudoglandulars que poden, en alguns cassos, donar reacció positiva a l'AFP. En els tumors que hem processat per a la immunohistoquímica mai s'ha donat la reacció positiva a aquest marcador.

1.2 ANIMALS SACRIFICATS DESPRES DEL PART

S'estudien dos grups d'animals els dies 4 i 8 després del part. Els resultats són idèntics per ambdós grups.

S'estudia tant la matriu com les cries de les femelles problema.

Les cries, un cop sacrificada la mare, es posen amb una mare adoptiva durant l'època de la lactància. Quan tenen unes tres setmanes, època en la qual ja ha finalitzat la lactància obligatòria, es posen en gàvies separades segons el seu sexe.

Es pot veure que les cries de les femelles operades són totalment normals arribant a l'edat adulta amb capacitat reproductiva.

Quan s'estudia la matriu després del part de les femelles operades es veu que macroscòpicament presenta una morfologia normal a nivell dels dos corns uterins.

L'estudi microscòpic del corn uterí no injectat revela la morfologia corresponent a una matriu normal no havent-hi cap tipus d'alteració.

Microscòpicament, en el corn uterí injectat no s'observa tumor adherit a l'endometri. En la zona on es realitza la lligadura inferior es troba la llum ocupada per un material necròtic. No s'observa teixit tumoral al llarg de tota la llum uterina.

2. COSSOS EMBRIOIDS INJECTATS EN POSICIO SUBMUCOSA

S'estudien els tumors obtinguts a l'injectar cossos embrioids en posició submucosa a l'interior de la matriu de femelles gestants de 2 dies, prèvia oviductomia. Es sacrifiquen els animals 14 dies després de la injecció d'aquestes estructures i 8 dies després del part.

Si s'injecten els cossos embrioids en la zona del miometri propera a l'endometri en tots els casos s'observa l'aparició de un tumor que no és un carcinoma embrionari com en els casos anteriors, sinó que és un teratocarcinoma típic (figs. 57-63).

El tumor creix de forma expansiva i s'observa que entre les cèl.lules de carcinoma embrionari es troben teixits derivats de les tres fulles germinatives en distints graus de maduresa. Però, en la zona del tumor que arriba a contactar amb l'endometri no s'observa la presència de teixits diferenciats i es troba un nòdul de carcinoma embrionari de tipus sòlid.

Abans del part, aquests tumors tenen una mida que sobrepassa uns milímetres els límits del gruix de la paret uterina. Vuit dies després del part el tumor presenta un índex de creixement elevat i envaeix als òrgans veïns. L'autòpsia d'aquests animals revela la presència d'ascites hemorràgica, carcinomatosi pèlvica i una massa tumoral adherida a gran part de les viscères pèlviques.

INJECCIO DELS COSSOS EMBRIDIDS A LA
CAVITAT UTERINA D'ANIMALS GESTANTS
DURANT EL PERIODE DE PERIIMPLANTACIO

La perimplantació pot definir-se com aquell període dintre del qual es produirà la implantació de l'embrió. En el ratolí la periimplantació la podem entendre com l'interval que va des del dia 3.5 al 4 de la gestació.

S'han injectat cossos embrioids a l'interior de la cavitat uterina de femelles gestants de 3.5 i 4 dies. S'han emprat 10 femelles de cada grup.

Les femelles que s'utilitzen per a aquest estudi han estat sotmeses a dues intervencions. S'ha procedit a la secció del seu oviducte dret segons el mètode explicat anteriorment. Passat un mes s'acoplen amb el mascle i el dia del plug vaginal es considera, com en tots els casos anteriors, dia 0 de la gestació.

El corresponent dia de la gestació (dia 3.5 o 4) s'injecta una dosi normal de cossos embrioids al corn uterí dret.

Després de 10 dies d'inocular els cossos embrioids es sacrifiquen els animals i es procedeix a l'estudi del corn uterí injectat així com del corn uterí esquerra en el que s'hi troben embrions implantats.

Els embrions implantats en el corn esquerra presenten una morfologia totalment normal que es correspon amb la fase gestacional estudiada.

De la mateixa forma, el corn esquerra de la matriu presenta totes les característiques pròpies d'una matriu gestant normal. No s'observa en cap cas signes d'alteració.

Quan s'estudien les seccions transversals seriades de 8µm dels corn uterí dret al que s'han injectat els cossos embrioids no es veu l'aparició de tumor.

La morfologia de la matriu és la pròpia d'una matriu gestant, però poden veure's signes de necrosi en el lloc d'injecció dels cossos embrioids.

Aquests resultats són comuns per a les femelles d'ambdós grups.

TUMORS SUBCUTANIS

TEMPS D'EVOLUCIO DELS TUMORS.

Igual que en el cas dels tumors obtinguts a l'interior de la cavitat uterina, s'han utilitzat cossos embrioids procedents d'una ascites de 15 dies d'evolució.

Els cossos embrioids s'injecten subcutàniament a animals gestant de diferens dies i a animals no gestant que s'utilitzen com a control.

En primer lloc es va haver de caracteritzar la dosi de cossos embrioids emprada per a aquest estudi.

Quan s'injecten subcutàniament aproximadament 10^6 cossos embrioids (la quarta part d'una ascites) a un animal adult no gestant apareix un tumor sòlid després de 20-25 dies de la injecció.

Si s'injecta la mateixa quantitat d'aquestes estructures subcutàniament a animals gestants es veu que el tumor apareix després del part, es a dir també transcorren uns 20 dies entre la injecció dels cossos embrioids i l'aparició del tumor. Això no permet diferenciar els tumors obtinguts en animals gestants d'aquells obtinguts en els animals control.

Per a poder comparar el temps d'evolució dels tumors problema i els tumors control es va procedir a doblar la dosi de cossos embrioids emprada.

Es van injectar uns 2×10^6 cossos embrioids subcutàniament a diferents animals. En els animals no gestants passats 8-9 dies de la inoculació dels cossos embrioids s'aprecia l'aparició de tumor sòlid. En els animals gestants, com en el cas anterior, sols s'observa

l'aparició de tumor després del part. Això permet comparar els temps d'evolució dels tumors problema amb els dels tumors control.

Un cop caracteritzada la dosi adequada de cossos embrioids es va procedir a injectar aquestes estructures a femelles en diferents dies de la gestació.

S'han utilitzat femelles gestants des del dia 0 fins al dia 12 de la gestació a les que s'ha injectat 2×10^5 cossos embrioids. Per a cada grup s'han utilitzat 10 femelles.

En tots els casos s'observa l'aparició de tumor entre el dia 3 i 4 postpart.

En la següent taula s'exposen els resultats obtinguts:

DIA D' INJECCIO	DIA D' APARICIO DEL TUMOR	
	DIES POSTPART	DIES POSINJECCIO
0	3	24
1	3	23
2	3	22
3	3	21
4	3	20
5	3	19
6	3	18
7	3	17
8	3	16
9	3	15
10	3	14
11	3	13
12	3	12

Com pot veure's en la taula precedent, el temps d'evolució dels tumors no depèn dels dies de injecció dels cossos embrioids, sinó que guarda relació directa amb l'estat gestacional.

Durant la gestació els cossos embrioids no donen lloc a l'aparició de tumor. Es evident, però, que durant aquest període es manté la seva viabilitat.

Quan durant la gestació s'estudia la zona d'injecció dels cossos embrioids es veu que aquests estan continguts dintre d'un quist format per l'hoste i es mantenen en suspensió fins després del part en que s'ancoren i donen lloc a un tumor sòlid.

En els animals control els tumors apareixen invariablement després de 8-9 dies de la injecció dels cossos embrioids.

Aquests resultats indiquen que fins després del part els cossos embrioids no poden donar lloc a un tumor sòlid i que sols passat aquest moment inicien el seu ancoratge independentment dels dies que portessin sota la influència de l'estat gestacional. Es veu, però, que els tumors tenen una grandaria diferent en tots els cassos i és directament proporcional al temps que han passat aquestes estructures sota la influència de l'estat gestacional.

MIDA DELS TUMORS

La mida dels tumors depèn del temps que han estat els cossos embrioids sota la influència de l'estat gestacional.

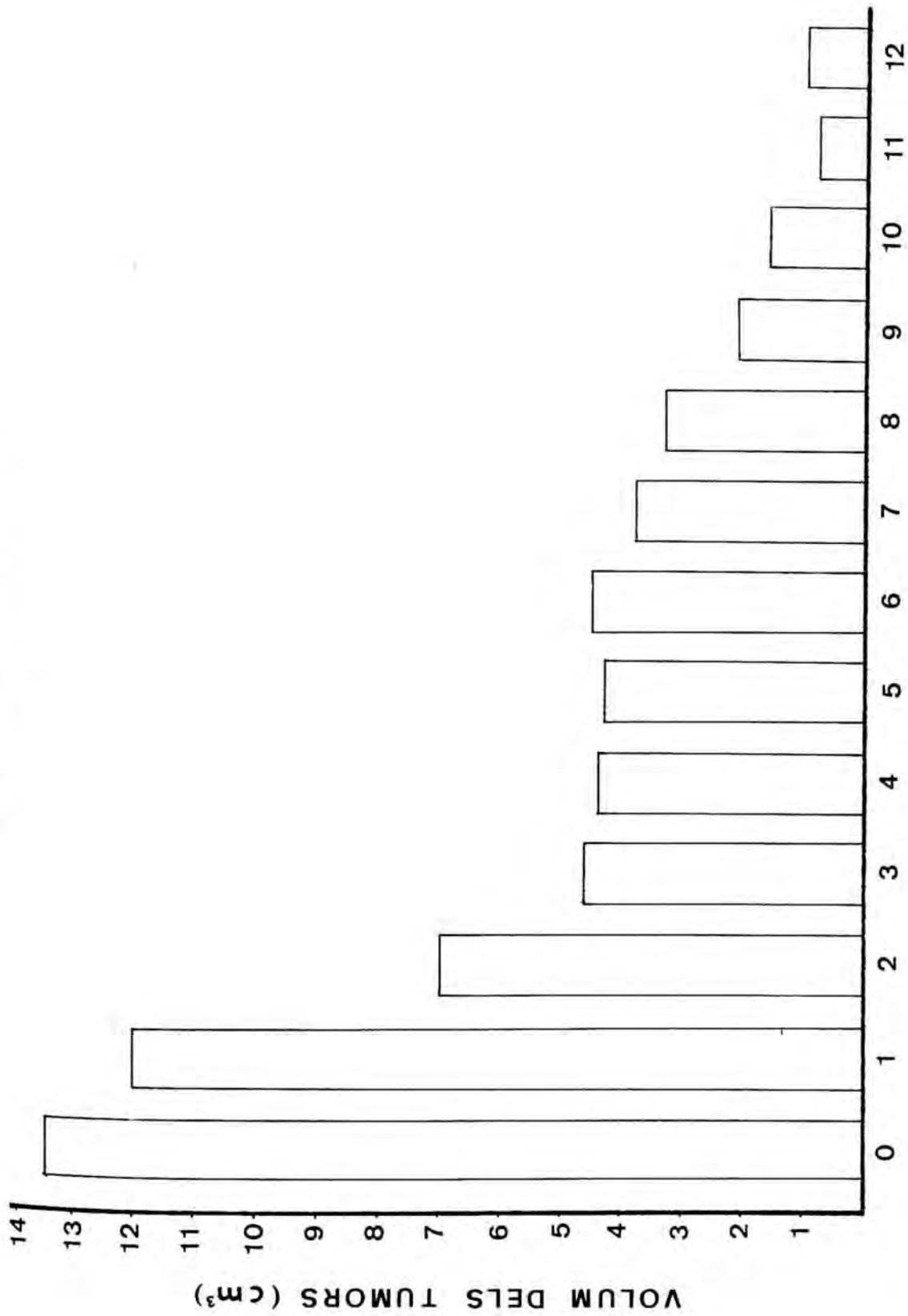
Com citavem anteriorment, tots els tumors apareixen tres dies després del part això indica que els tumors de dia zero tenen únicament quatre dies en el moment del seu estudi; de la mateixa manera, els tumors de dia dotze tenen setze dies quan s'estudien. Aquest fet evidencia que la grandària del tumor no depèn del número de dies des de la seva aparició ni dels dies postpart en que s'estudia.

Quan s'estudien els resultats obtinguts, es pot veure que els volums dels tumors delimiten tres grans grups. Aquest fet es posa clarament de manifest en el gràfic adjunt.

Els tumors obtinguts a l'injectar els cossos embrioids en els dies 0, 1 i 2 tenen un volum superior al dels restants grups. Durant aquest període l'embrió es troba lliure dintre del tracte uterí i no ha assolit encara la seva compactació.

Un segon grup el formen els tumors obtinguts a partir d'animals gestants de 3 a 8 dies. El dia 3 de la gestació es produeix la compactació de la mòrula; entre el dia 3.5 i 4 s'inicia la implantació de l'embrió; fins al dia 8 l'embrió creix envaint els teixits de la mare i es produeixen les primeres diferenciacions cel·lulars; el dia 8 de la gestació s'inicien els primers moviments morfogènics que conduiran a la formació del fetus.

TUMORS SUBCUTANIS



DIA D'INJECCIO DELS
COSSOS EMBRIOIDS

El tercer grup el formen els tumors obtinguts a partir dels dies 9 al 12 de la gestació. Durant aquest període en que els tumors són visiblement menors el fetus continua el seu desenvolupament fins al final de la gestació.

Es pot veure que els grups de volum dels tumors delimiten clarament els moments crucials en la vida de l'embrió. El creixement dels tumors gaurdaria, per tant, relació amb fases embrionàries concretes. Possiblement cada una de les fases per les què passa l'embrió estan íntimament unides a canvis en l'organisme matern que es reflecteixen en la mida que assoleixen els tumors després de la seva aparició.

MORFOLOGIA DELS TUMORS

1. DISTRIBUCIO DELS TEIXITS EN EL SI DEL TUMOR

Es sacrifica als animals mitjançant dislocació cervical i es procedeix a l'extracció del tumor. Es renta el tumor amb sèrum fisiològic per a treure les restes de sang i pel de l'animal portador.

Els tumors un cop rentats es fixen i es procesen per al seu estudi histològic. Per a l'anàlisi histològica es fan talls seriats de 8µm de gruix.

Els tumors obtinguts són teratocarcinomes amb zones de tumor de si endodèrmic (YST).

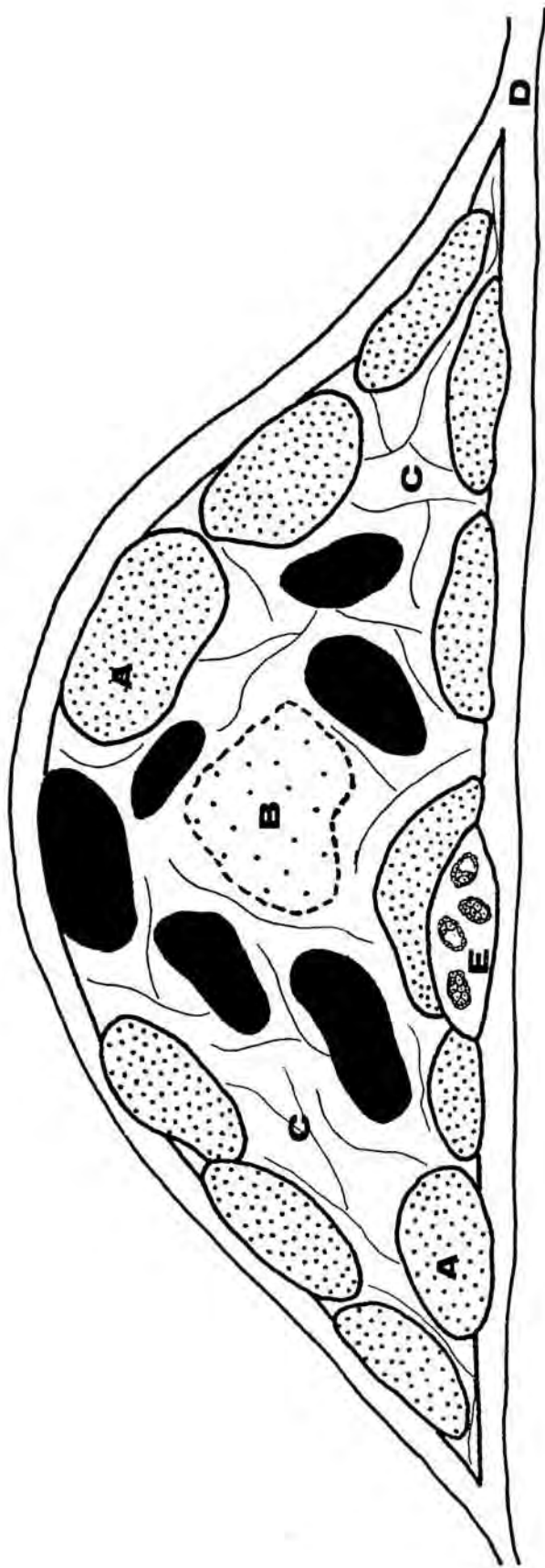
La distribució dels teixits és la mateixa en els tumors problema que en els tumors control. S'han estudiat 120 tumors problema (10 de cada grup d'injecció) i 10 tumors control.

En la zona del tumor corresponent al punt d'injecció dels cossos embrioids s'observa una formació quística on es troben els cossos embrioids en suspensió en número variable (fig. 64).

Pot veure's la següent distribució dels teixits en l'interior del tumor (veure esquema adjunt):

1) La zona central del tumor està ocupada per teixit necròtic. Aquesta zona està envoltada per tumor del si endodèrmic i per fora d'ella, i envoltant al tumor, es troba el carcinoma embrionari que adopta freqüentment un patró de creixement sòlid.

DISTRIBUCIO DELS TEIXITS



A: Carcinoma embrionari; B: Necrosi; C: Si endodèrmic; D: Pell; E: Punt d'injecció amb cossos embrioids; EN NEGRE: Diferenciacions.

2) Entre les zones de carcinoma embrionari i les de tumor de si endodèrmic hi ha diversos teixits derivats de les tres fulles embrionàries primitives en diversos graus de diferenciació.

Els tumors obtinguts en femelles gestants a partir de la injecció dels cossos embrioids en els primers dies de la gestació presenten un percentatge de necrosi superior al dels tumors control. Aquest fet pot deure's al gran volum assolit per aquests tumors la qual cosa pot determinar una irrigació deficient fins al centre del tumor. En els tumors problema de menor volum el grau de necrosi és aproximadament igual al dels tumors control.

En els tumors els patrons histològics es troben seguint la següent distribució:

1) Tumors de femelles gestants injectades els primers dies de la gestació:

Tumor de si endodèrmic 5%

Necrosi 30%

Carcinoma embrionari 35%

Diferenciacions 30%

2) Tumors control:

Tumor de si endodèrmic 5%

Necrosi 20%

Carcinoma embrionari 40%

Diferenciacions 35%

2. HISTOLOGIA DELS TUMORS

Macroscòpicament els tumors estan envoltats per una càpsula i es troben adherits freqüentment a la pell i plànols profunds. Tenen forma més o menys arrodonida i poden formar nòduls satèlit. En alguns casos poden ulcerar la pell de l'animal portador.

La superfície de tall mostra un teixit friable de color blanc grisos, amb àrees quistoses i zones hemorràgiques.

L'anàlisi microscòpica d'aquest tumor es realitza a partir de l'estudi de talls seriats del tumor (8µm de gruix) que es tenyeixen amb hematoxilina-eosina. Poden trobar-se varis patrons histològics diferents (figs. 65-102):

CARCINOMA EMBRIONARI

Aquest teixit està format per cèl.lules anaplàsiques de mida i forma variable però predominantment tenen forma arrodonida amb membrana citoplasmàtica mal definida i citoplasma amfofilic. El nucli és de forma irregular i de gran mida. No s'observa una disposició uniforme de la cromatina i destaquen, en el nucli, un o varis nuclèols prominents. L'índex mitòtic és molt elevat (20-25 mitosis/camp) i poden observar-se formes atípiques de mitosis.

Pot trobar-se superposició de nuclis.

Els carcinoma embrionari pot adoptar diferents patrons de creixement:

1) Patró sòlid.

Es l'observat amb major freqüència. Presenta un aspecte carcinomatós i creix formant nius cel.lulars densos. Aquests nius es troben envoltats per primes fibres connectives. En el centre dels grups de cel.lules de carcinoma embrionari pot veure's la llum d'un capil.lar i les cel.lules tumorals creixen disposant-se al seu voltant. Les cel.lules de la perifèria del niu cel.lular, si aquest és voluminós, poden presentar signes de necrosi. Aquest fet fa pensar que les cel.lules de carcinoma embrionari, degut al seu elevat metabolisme, necessiten un gran aport sanguini per a la seva supervivència. Si el niu cel.lular es poc voluminós les cel.lules de carcinoma embrionari es nodririen per difusió.

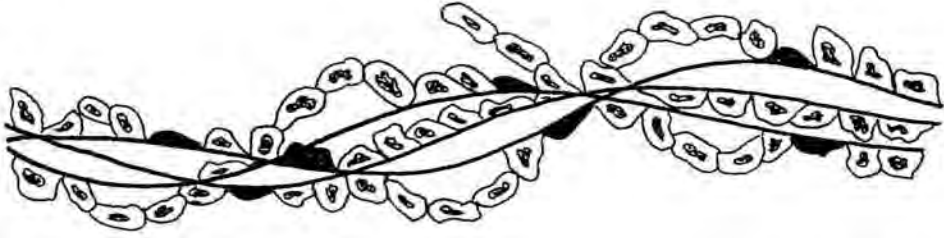
2) Formació d'estructures papil.lars.

En algunes zones del tumor pot observar-se que les cel.lules de carcinoma embrionari es disposen formant unes estructures papil.lars però, al contrari del que succeeix en altres tumors, en la prolongació no hi ha un eix fibroconnectiu (veure esquema adjunt).

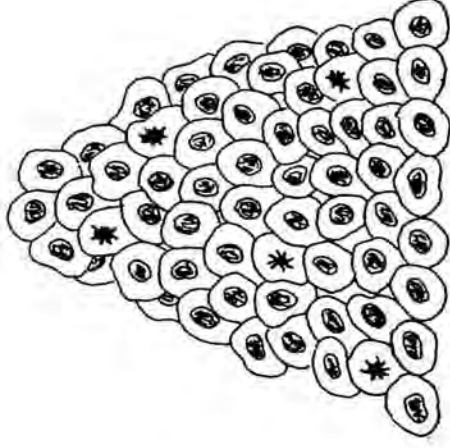
Es poden trobar capil.lars aïllats en ambdós extrems de la papil.la.

Es freqüent observar figures de mitosi com en els altres patrons del carcinoma embrionari.

FORMACIONS PAPIL·LARS



A



B

A: Tumor de si endodèrmic; B: Carcinoma embrionari.

3) Formació d'estructures pseudoglandulars.

En algunes ocasions poden trobar-se estructures pseudoglandulars. Quan el carcinoma embrionari adopta aquest patró, les cèl.lules es disposen al voltant d'una llum i prenen un aspecte més allargat. L'eix major de les cèl.lules segueix els radis de l'espai que envolten. No hi ha membrana basal sobre la que descansin aquestes cèl.lules. Tampoc s'observen productes de secreció en l'interior de la llum delimitada.

Les formacions papil·lars i les pseudoglandulars es troben principalment en la perifèria del tumor i més concretament en la perifèria dels més voluminosos (majors de 3cm de diàmetre).

TUMOR DE SI ENDODERMIC (YST)

Aquest tumor rep el seu nom degut a la semblança morfològica que presenta amb la placenta dels rosegadors. El nom de tumor de si endodèrmic (*yolk-sac tumor*) fou proposat per Pierce l'any 1970.

Està format per cèl.lules d'aspecte epitelial entremesclades en una xarxa connectiva prominent i adopten un patró de tipus organoide.

La forma de les cèl.lules és variable i està determinada, en certa forma, pel tipus de patró que adopta. En aquest tumor poden trobar-se varis tipus de creixements:

1) Tipicament les cèl.lules endodèrmiques són vacuolades. No totes les cèl.lules d'aquest tumor ho són

però un gran número d'elles són de forma arrodonida o poliédrica i presenten un o varis vacúols en l'interior del citoplasma trobant-se el nucli desplaçat cap a la perifèria. Aquests vacúols poden fusionar-se entre ells o amb els de les cèl.lules veïnes formant espais quístosos i donant al teixit un aspecte reticular.

2) Algunes zones de tumor presenten un patró de creixement de tipus glandulo-alveolar. Quan les cèl.lules adopten aquesta disposició, presenten una morfologia cuboidal o columnar amb citoplasma eosinòfil. Les cèl.lules formen estructures tubulars i en el seu centre o base s'hi troba un o varis capil.lars.

3) Les cèl.lules del tumor poden disposar-se al llarg de prolongacions fibroconectives i formar així estructures papil.lars com ja s'ha mencionat anteriorment. La morfologia de les cèl.lules en aquest cas és cuboidal o aplanada.

4) En el tumor poden trobar-se formacions quístoses tapissades per una capa de cèl.lules aplanades que envolten cèl.lules endotelials.

5) A vegades, les cèl.lules es disposen formant cordons cel.lulars i es projecten cap a l'interior d'espais arrodonits de contorns irregulars. En l'interior d'aquests espais, les cèl.lules formen unes prolongacions que donen lloc a unes vesícules. Aquestes vesícules estan compostes per un grup de cèl.lules cuboidals amb nucli basal i els seus citoplasmes formen la part central de la vesícula. Al

conjunt d'aquestes estructures se'l coneix amb el nom de patró polivesicular vitel·lí.

L'estroma pot ser poc cel·lular i tenir un aspecte mixomatós. Altres vegades adopta un aspecte sarcomatós degut a la gran quantitat de cèl·lules fusiformes de morfologia i mida irregular que s'hi troben.

Tant el conjunt epitelial com el mesenquimal del tumor tenen una gran tendència a la formació d'espais vasculars podent arribar a adoptar un aspecte semblant a un angiosarcoma.

El teixit connectiu que dóna suport al component epitelial d'aquests tumors és molt abundós i forma una xarxa fibril·lar prominent. Això impedeix que les cèl·lules es trobin formant nius amb gran densitat cel·lular.

Tant en el citoplasma d'algunes cèl·lules tumorals com en l'espai extracel·lular poden trobar-se glòbuls hialins eosinòfils. Aquests glòbuls són positius per a l'AFP en la immunohistoquímica.

TEIXITS DIFERENCIATS

Ja des del segle passat, a partir dels treballs de Johnson (1856), es classifiquen habitualment els teixits presents en els teratocarcinomes segons la fulla embrionària de la que deriven.

Tant en els tumors de carcinoma embrionari com en els de si endodèrmic poden trobar-se teixits diferenciats

derivats de les tres fulles embrionàries en diferents graus de maduresa.

En els tumors de si endodèrmic s'observa una escasa tendència a la formació de teixits diferenciats especialment els derivats mesodèrmics.

1) Teixits ectodèrmics.

Són els més freqüents en el si dels tumors derivats de les cèl.lules germinals.

a) D'entre els derivats ectodèrmics, els que es troben en major quantitat són les rosetes neurals i el teixit glial.

Les rosetes neurals són formacions ectodèrmiques embrionàries i estan constituïdes per una banda de cèl.lules fusiformes que es tenyeixen intensament sense poder diferenciar-se el nucli del citoplasma. Aquestes cèl.lules descansen sobre una membrana basal i l'eix major de la cèl.lula es disposa de forma perpendicular a aquesta membrana basal també anomenada limitant externa.

Les cèl.lules que formen les rosetes neurals adopten una disposició circular i limiten a un espai en la zona central.

El pol intern d'aquestes cèl.lules no contacta directament amb la llum sinó que està separat d'ella per una segona membrana connectiva que rep el nom de limitant interna.

En alguns casos i atenent al grau de diferenciació cel·lular la morfologia d'aquestes cèl·lules ectodèrmiques de tipus embrionari pot variar tant en la seva forma, mida o grau d'estratificació però, el que permanenceix constant, en les rosetes neurals, és la presència de les dues membranes limitants.

Tant en el tumor de si endodèrmic com en el carcinoma embrionari s'han observat zones de transició cel·lular entre aquests tipus tumorals i les rosetes neurals formades.

b) El teixit glial adult, és el segon derivat ectodèrmic més freqüentment trobat. Aquest teixit es disposa fonamentalment al voltant dels derivats ectodèrmics immadurs.

2) Derivats endodèrmics.

Entre els derivats d'aquesta capa germinativa s'observa principalment la formació d'epitelis en distints graus de maduresa.

Els tipus d'epiteli observats més comunament són l'epiteli respiratori i l'epiteli cúbic monoestratificat.

L'epiteli respiratori és de tipus pseudoestratificat ciliat. Hi ha un únic estrat de cèl·lules però els seus nuclis es disposen en diferents plànols. En ell s'hi poden distingir cèl·lules caliciformes responsables de la secreció de moc. És l'epiteli que revesteix típicament la tràquea i els bronquis.

L'epiteli cúbic monoestratificat o simple es troba típicament a nivell de la superfície de l'ovari.

Tant en el tumor de si endodèrmic com en el carcinoma embrionari s'han observat zones de transició en la morfologia de les cèl.lules tumorals que va canviant gradualment.

3) Derivats mesodèrmics.

Els que es troben amb major freqüència són el múscul llis i estriat i el cartílag. Es difícil trobar teixit òssi però pot observar-se algunes vegades i, en determinades ocasions presenta signes d'hematopoesi.

En escases ocasions es troba teixit adipós. En l'interior de les cèl.lules adiposes s'observa l'espai corresponent a la gota lipídica que contenen. Són cèl.lules aproximadament esfèriques amb un citoplasma escàs degut a la grandària de la gota de lípid. El citoplasma es disposa a forma d'anell al voltant de la gota de greix.

Pot trobar-se teixit mesenquimatós immadur però es fa difícil distingir si els fibroblasts i els vasos neoformats són elements diferenciats procedents de les cèl.lules tumorals o si es tracta del component estromal propi del tumor.

A l'observar els diferents tumors, es pot trobar una relació inversa entre l'aparició de cartílag i la de teixit muscular estriat. En els tumors que presenten grans quantitats de múscul estriat no hi ha cartílag.

El teixit cartilaginós és de tipus hialí. Els condrocits, de forma arrodonida o elíptica, es troben formant grups de fins vuit cèl.lules originades totes elles d'un mateix condroblast. A aquests grups se'ls ha denominat grups isogènics. Degut al processat histològic tant la matriu cartilaginosa com els condrocits experimenten retracció, el que fa que els condrocits adoptin una forma estrellada i s'allunyin de la càpsula.

El teixit muscular estriat presenta, igual que els altres teixits adults presents en el tumor, una morfologia normal. Per mitjà de la dissecció òptica es pot veure en les tincions d'hematoxilina-eosina el patró de bandes d'aquest tipus cel.lular. Les cèl.lules són plurinucleades i es troben formant conjunts fibril.lars en el si dels tumors.

S'observen zones de transició entre les cèl.lules endodèrmiques i les mesodèrmiques. Aquesta transició no és evident entre les cèl.lules de carcinoma embrionari i les mesodèrmiques.

4) Trofoblats.

S'observa la presència de teixit trofoblàstic tant en zones de tumor de si endodèrmic com en zones de carcinoma embrionari.

Les cèl.lules de trofoblast es disposen sempre al voltant de zones hemorràgiques del tumor.

Envoltant a les zones hemorràgiques poden observar-se cèl.lules trofoblàstiques que alternen amb cèl.lules de petita mida semblants a les cèl.lules endotelials.

Les cèl.lules que componen el tumor de si endodèrmic presenten una molt baixa tendència a la diferenciació; en canvi, les que formen el carcinoma embrionari tendeixen a diferenciar-se amb gran facilitat especialment les que es troben en la perifèria dels nòduls que constitueixen aquests tumors.

El patró de criexement del carcinoma embrionari està format per nius cel.lulars densament agrupats envoltats per primis tractes fibril.lars.

A mida que el tumor va desenvolupant-se s'observa la formació de nous nòduls cel.lulars al mateix temps que van augmentant de mida els ja existents. Quan aquests nòduls adquireixen una mida determinada, s'observa l'aparició de necrosi en la seva perifèria o en la seva zona central.

Es en la perifèria d'aquests nòduls on s'observa l'aparició de diferenciacions i aquestes apareixen quan el nòdul assoleix una mida determinada.

Les cèl.lules trofoblàstiques són voluminoses amb un gran nucli central de cromatina clara en el que destaquen un o varis nuclèols prominents.

3. IMMUNOHISTOQUIMICA DELS TUMORS

S'ha estudiat la distribució de l'AFP en els teixits tumorals. Per això s'ha utilitzat, com en els casos precedents un anticòs anti-AFP de ratolí comercial.

Els resultats obtinguts són els següents (figs. 103-116):

- L'AFP és un marcador específic de l'endoderma embrionari. L'anticòs anti-AFP no es fixa als derivats endodèrmics adults.

- S'observa reacció positiva en les cèl.lules que componen el tumor de si endodèrmic.

- Les cèl.lules de carcinoma embrionari que formen el patró de creixement sòlid són invariablement negatives.

- Algunes cèl.lules de carcinoma embrionari poden ser positives a l'AFP. Aquestes cèl.lules es troben formant part del patró pseudoglandular o papil·lar del tumor.

De tota manera, no s'observa reactivat en tota l'estructura pseudoglandular o en tota la papil·la, sinó que sols es troba en algunes de les cèl.lules que formen aquestes estructures.

- En les zones de transició entre carcinoma embrionari i tumor de si endodèrmic, les cèl.lules de carcinoma embrionari que contacten amb les de si endodèrmic són positives abans del canvi de morfologia.

- Les zones de transició entre carcinoma embrionari i els teixits diferenciats de tipus endodèrmic són positives per a l'AFP.

- La majoria de les cèl.lules que envolten als derivats mesodèrmics presenten morfologia de tipus endodèrmic i són positives a l'AFP. Endemés, aquests derivats també es troben envoltats per derivats ectodèrmics en diferents graus de diferenciació.

- Els eritròcits són positius a la immunohistoquímica degut a la gran quantitat de peroxidasa endògena que presenten. Encara que la peroxidasa endògena s'inhibeix abans de fer la immunohistoquímica degut a la gran quantitat d'ella present en els eritròcits mai es pot eliminar del tot la seva reactivitat.

- La necrosi sempre dona reacció positiva en la immunohistoquímica degut a la seva apetència per a qualsevol substància. Es tracta d'una unió inespecífica.

DISCUSSIO

TUMORS A L' INTERIOR DE LA
MATRIU

IMPLANTACIO DELS COSSOS EMBRIOIDS.



La implantació de l'embrió dels mamífers és un tema que ha estat altament estudiat des de fa molts anys. Existeixen encara, però, punts obscurs com per exemple quin és el senyal responsable de l'inici de la decidualització de l'endometri.

El problema de l'estudi de la decidualització de l'endometri és per un costat temporal i per altre nomenclatural.

Sabem que en el ratolí la implantació es produeix entre els dies 3.5 i 4 de la gestació. En diverses ocasions els treballs no defineixen quin és el moment exacte de l'estudi i això fa difícil la comparació de resultats; és per altra banda, difícil definir un temps estàndars d'estudi degut a les desincronitzacions naturals succeïdes durant la gestació.

Com en altres tants camps de la ciència l'embriologia no està exenta dels problemes de la nomenclatura. El teixit decidual s'ha estudiat a partir d'animals gestants; a partir d'animals pseudogestants; amb sistemes d'inducció artificials de la decidualització; i amb combinacions dels sistemes *in vivo* i *in vitro*. S'ha pogut observar que els teixits deciduals artificials i els naturals, malgrat ser molt semblants, presenten diferències substancials. Això ha determinat que alguns autors distingeixin entre "decidua" i "deciduoma", però no sempre és així i es crea una nova confusió a l'hora d'interpretar els fets.

Abans de la implantació es donen una sèrie de processos que s'han descrit en la majoria de les espècies estudiades.

En els rosegadors, que presenten ovulacions múltiples, els embrions segmentats penetren dintre de l'úter el dia 2.5 de la gestació. Fins a la implantació aquests embrions seran repartits al llarg del corn uterí i seran immobilitzats en una posició definitiva.

Tant la repartició com la immobilització dels embrions és un fet dependent de la mare. Però, qui determina ambdós processos i la forma en que ho fa està encara sota discussió.

La distribució dels embrions en l'úter està determinada per contraccions musculars dels corns uterins que separen els blastocists entre ells (O'Grady i Heald, 1969). Aquestes contraccions es produeixen quan la matriu està sota la influència de la progesterona. Es creu que l'embrió pot jugar un paper estimulants les contraccions amb el seu contacte (Böving, 1956).

Se sap però que l'estímul donat al corn uterí no és intraespecífic, ja que ous d'eriçó de mar introduïts en el corn uterí de femelles gestants de conill són distribuïts en paquets al llarg del corn uterí (Markee, 1944).

En el present treball hem pogut observar com els cossos embrioids eren repartits dintre del corn uterí ja que hem trobat en diverses ocasions dos o tres tumors implantats al llarg del corn uterí operat de forma anàloga als embrions durant la gestació normal.

Atenent a aquests resultats creiem que la distribució dels embrions durant la gestació depèn únicament d'un fet mecànic i no es tracta de cap senyal químic determinat. Els embrions, o els cossos embrioids en el present estudi, al contactar físicament amb els teixits materns desencadenarien la contracció muscular de la matriu.

Un cop els embrions són distribuïts el llarg del corn uteri es produeix la seva immobilització en el lloc on posteriorment s'implantaran. La immobilització intrauterina implica un alentiment de les contraccions musculars i una reducció del volum de la llum uterina. Es creu que dependria, a l'igual que la distribució dels embrions, de l'organisme matern.

La immobilització dels embrions no està associada a l'establiment d'unions cel·lulars entre el trofoblast de l'endometri ja que en el ratolí s'ha vist que els embrions són immobilitzats quan encara estan coberts per la seva zona pel·lúcida (Reinius, 1967).

La immobilització dels blastocists en el corn uteri s'acompanya de la formació d'una foseta en la mucosa uterina (Enders, 1975), aquesta foseta es forma també davant d'ous no fecundats (Bloch, 1966) la qual cosa sembla indicar que és un esdeveniment independent de l'embrió.

Si s'atura la distribució dels blastocists bloquejant-los a la part alta dels corns uterins per mitjà d'una lligadura, la distribució sols es donarà si es treu la lligadura abans del període normal de la immobilització.

Després d'aquest temps els blastocists queden definitivament en l'espai on estaven confinats (Dhindsa et al. 1967). Aquest fet indica que existeix una seqüència temporal fixada per als diferents esdeveniments.

Quan s'estudien els cossos embrioids injectats en la cavitat uterina es veu que aquests s'han implantat correctament la qual cosa indica que tant la distribució com la immobilització d'aquestes estructures s'ha produït normalment.

Pensem que la distribució i la immobilització dels embrions durant la gestació són dos fets consecutius programats en l'organisme matern i que aquest programa és desencadena únicament per la presència d'unes estructures lliures en l'interior de la llum uterina durant els dos primers dies de la gestació.

La implantació consegüent dels embrions ha estat estudiada àmpliament però encara ara no està clar quin és el senyal que envia l'embrió a la mare per a que s'iniciï la deciduïtzació ni quan es produeix exactament aquest senyal.

Es coneix la importància de l'ambient hormonal per a la bona consecució de la implantació. La implantació sols es dona si la mare ha rebut un estimul d'estrogens (provinent de la fase fol·licular del cicle ovaric normal) i posteriorment un senyal hormonal de progesterona (produïda en el cos luti de l'ovari a l'inici de la gestació) (Finn, 1978).

Les hormones actuen a nivell del genoma de les cèl.lules efectores alterat la seva expressió gènica (O'Malley i Means, 1974), actuen augmentant la síntesi d'ARN i proteïnes.

Se sap que les hormones esteroides poden entrar en totes les cèl.lules de l'organisme per difusió simple o facilitada. La molècula però es retinguda fortament a nivell de les cèl.lules diana.

Les cèl.lules diana, com les cèl.lules de l'úter, poseeixen un receptor citoplasmàtic per a la hormona d'uns 100-200 Kd. Quan el receptor s'uneix a la molècula d'hormona s'activa i el complex receptor-hormona s'uneix a punts acceptors nuclears (Glasser et al., 1982).

Les hormones farien que augmentés la sensibilitat de les cèl.lules diana d'altres estímuls mitogènics. Es veu, per exemple, que els estrogens *in vivo* controlen la resposta mitogènica de l'endometri mentre *in vitro* no tenen efecte mitogènic sobre aquestes mateixes cèl.lules (Mueller, 1953). Es pot explicar això pensant que els estrògens no són mitògens i, per tant, no tene activitat mitogènica *in vitro*, però tenen la capacitat de crear cèl.lules diana *in vivo* amb capaciat de resposta a altres estímuls mitogènics presents. El condicionament per estrògens pot conferir sensibilitat als mitògens (com els factors de creixement) en un tipus cel.lular específic en un temps determinat (Gospodarowicz et al., 1978a).

Són variis els estudis realitzats per a esbrinar quin és el senyal de decidualització. Es va veure que diferents estímuls artificials produïen tots ells la formació d'un teixit decidual. Abans de la implantació de l'embrió es produeix la destrucció de l'epiteli superficial de la matriu i es va pensar que l'embrió, de la mateixa manera que els agents artificials, produïa la mort de les cèl·lules de l'úter i aquestes lliuraven un estimul inductor de la decidualització (Ljungkvist i Nilson, 1977).

El CO₂ és un agent artificial que produeix la formació de teixits deciduals. Alguns autors han apuntat cap a la possibilitat que el CO₂ procedent de la respiració activa del blastocist sigui l'agent fisiològic responsable de la formació de la decidua. Aquesta idea la reforça l'existència d'una anhidrasa carbònica uterina dependent d'estrogens trobada durant el període de la implantació (Lutwak-Mann, 1954; Hetherington, 1973). El CO₂ actuaria com els estímuls artificials destruint l'epiteli superficial.

Actualment coneixem algunes dades que fan poc consistent la teoria precedent. Els primers senyals de la formació del teixit decidual per part de l'estroma es produeixen quan els embrions estan encara envoltats per la zona pel·lúcida (Lundkvist i Nilsson, 1984). Posteriorment l'embrió perd la zona pel·lúcida i el trofoblast s'adherix a les cèl·lules de l'epiteli, les cèl·lules estromals es transformen en cèl·lules deciduals, donant la decidua primària avascular, i a continuació es dona la separació de

les cèl.lules epitelials de la seva làmina basal (Rogers et al., 1983).

Totes aquestes dades mostren que la formació del teixit decidual és anterior a la destrucció de l'epiteli de superfície la qual cosa indica que el senyal decidualitzador no és el resultat de la mort d'aquestes cèl.lules.

La majoria de treballs apunten cap a la idea que són els estrògens produïts pel trofoblats els responsables de l'inici del processos implicats en la decidualització (Short, 1969; Winteberger-Torres, 1978; Heap et al., 1981).

In vitro s'ha demostrat que el trofoblats pot sintetitzar 17β -estradiol a partir de progesterona, durant la gestació el blastocist podria utilitzar la progesterona procedent del cos luti per a produir els seus estrògens (Heap et al., 1981). També s'ha vist en femelles pseudogestants que vesícules de trofoblats poden induir la formació de decidues mentre que les cèl.lules de la massa cel.lular interna isolades no ho fan (Gardner et al., 1973).

Recentment s'ha vist, com citavem anteriorment, que a l'inici del dia 4 de la gestació quan l'embrió té encara la seva zona pel.lúcida es produeixen els primers senyals indicadors de la resposta decidual. Es veuen canvis a nivell dels nuclèols en les cèl.lules estromals. Aquests canvis depenen clarament de l'embrió ja que no es donen en femelles pseudogestants (Lundkvist i Nilsson, 1984).

Els canvis observats a nivell dels nuclèols no sols es troben en els llocs on es produirà la implantació sinó al

llarg de tota la matriu. Passades unes 12h es donen les alteracions locals en els llocs d'implantació (Lundkvist i Nilsson, 1984).

L'observar canvis a nivell de tot l'úter dóna suport a la idea que el senyal decidualitzador és un senyal bioquímic enviat per l'embrió. Si es fa un tractament amb estradiol a femelles es veuen unes alteracions nucleolars similars a les produïdes davant de l'embrió (Lundkvist, 1978). Això pot indicar que els blastocists secreten una substància promotora del creixement que té efecte directe sobre les cèl.lules estromals.

Després de les modificacions generals de l'estroma, el contacte entre el trofoblast i les cèl.lules de la matriu seria el responsable de la decidualització (Lundkvist et al., 1979). En els llocs d'implantació durant el dia 4 de la gestació s'observa l'augment de receptors nuclears per a l'estradiol i la progesterona (Logeat et al., 1980).

Quan s'estudien decidues artificials no s'observa l'augment de receptors hormonals a nivell de la mucosa uterina (Logeat et al., 1980). També s'ha pogut veure que les decidues artificials presenten signes de mort cel.lular major que les decidues normals (Lundkvist i Nilsson, 1982).

Totes les dades semblen indicar la importància de l'embrió per a la formació d'un teixit decidual correcte, així mateix les dades esmentades fan pensar que la decidua es produiria en dues fases, la primera dependent del lliurament d'estrogens per part de l'embrió i la segona per

un contacte entre el trofoblast i les cèl.lules epitelials que determinaria els canvis puntuals produïts en els llocs d'implantació. Les dades obtingudes en els present estudi són consistents amb aquesta idea i mostren que el contacte entre el trofoblats i les cèl.lules de l'epiteli no és un senyal específic.

En el nostre treball hem injectat cossos embrioids a l'interior del corn uterí dret de femelles gestants de 2 dies. El corn esquerra s'ha deixat intacte permetent la implantació dels seus corresponets embrions.

Els cossos embrioids estan formats externament per cèl.lules de tiupus endodèrmic, parietal i visceral, i contenen en el seu interior un conjunt de cèl.lules de carcinoma embrionari (Pierce i Dixon, 1959; Pierce et al., 1962).

Els cossos embrioids s'implanten correctament a nivell de les matrius gestants presentant-se una decidua morfològicament normal. Creiem que els embrions que es desenvolupen en el corn esquerra de la matriu enviarien a la matriu els estrògens responsables dels canvis nucleolars produïts a l'inici del dia 4 de la gestació. Posteriorment el contacte entre la superfície del cos embrioid i les cèl.lules epitelials seria el responsable dels canvis locals en la mucosa uterina. Això indica que els canvis en els llocs d'implantació no venen determinats específicament pels estrògens del trofoblats en el moment del contacte de les superfícies cel.lulars sinó que estarien ja determinats pel

senyal bioquímic previ i simplement es desencadenarien per un efecte mecànic.

Els estrogens, atenent al seu paper regulador i no mitogènic, prepararien a les cèl.lules deciduals per a respondre al contacte amb l'embrió. El senyal embrionari específic es produiria abans del contacte del blastocist amb els teixits de la mare.

L'augment de receptors per a estrògens i progesterona en els llocs d'implantació guardaria relació amb els canvis posteriors de les cèl.lules estromals en aquestes zones concretes. Com esmentàvem anteriorment, les hormones augmentarien la capacitat de les cèl.lules diana per a respondre a estímuls mitogènics. En els llocs d'implantació en un curt espai de temps es produiran grans canvis, com són la involució de la decidua primària i la formació d'una xarxa de vasos que nodriran l'embrió en creixement. Tots aquests canvis estan possiblement regulats per l'embrió que envia diferents senyals als teixits materns i per tant és necessari que aquestes cèl.lules estiguin preparades per a respondre correcta i ràpidament als estímuls embrionaris.

També les dades morfològiques donen suport aquesta idea. A nivell de les cèl.lules de la decidua primària hi ha un augment en número i extensió de *gap junctions* després de 24h de la decidualització. Aquesta és una evidència morfològica de la propagació dels estímuls inicials per a la decidualització via *gap junctions* (Brokelmann i Biggers, 1979).

Altre punt important de la implantació és com l'embrió s'implanta sense ser atacat pel sistema immunitari de la mare.

L'embrió rep dues dotacions cromosòmiques una procedent de la mare i l'altra del pare. En l'estadi de dues cèl.lules l'embrió ja expressa els antigens d'histocompatibilitat que són diferents als de la mare (Beer i Billingham, 1974).

Els diferents autors han intentat explicar quin és el mecanisme responsable de la protecció de l'embrió.

Es creia que la decidua era un lloc immunològicament privilegiat on la resposta immunitària seria mínima. S'ha vist però, que empelts al·logènics de pell a l'interior de decidues són destruïts pel sistema immunitari (Beer i Billingham, 1974).

S'han fet al·loempelts de trofoblats i s'ha vist que encara que hi ha resposta immune, el trofoblats no és destruït (Simmons i Russell, 1962). De forma anàloga es veu que blastocists implantats ectòpicament (trompa, cavitat abdominal) es desenvolupen fins a estadis avançats arribant en alguns casos a terme. El trofoblats d'aquests embrions envaeix els teixits del voltant i no és necrosat encara que hi ha resposta immunitària per part de la mare (Tourris et al., 1980).

Aquests resultats semblen indicar que el trofoblast és el responsable de la protecció de l'embrió davant de la resposta immune de la mare i que la decidua no és la responsable d'aquesta protecció.

S'ha postulat que el trofoblasts sintetitzaria una substància anomenada fibrinoide que emmascararia els antigens de transplant i podria actuar també repelint els limfòcits de la mare. El fibrinoide seria un material amorf de tipus mucopolisacàrid que envolta al trofoblats. A la formació d'aquesta substància també hi contribuirien els teixits de la decidua (Kirby, 1968; Jones i Kemp, 1969).

En la zona d'implantació hi ha un transit elevat de limfòcits i macròfags. A partir de cèl.lules de carcinoma embrionari i de blastocists s'ha aïllat una substància anomenada "immunorepulsiu" que tindria un efecte antiinflamatori i podria jugar un paper en la no destrucció de l'embrió per part de la mare (Fauve et al., 1974).

Quan els cossos embrioids s'injecten en les matrius gestants es pot veure que la formació de tumor és dosi dependent. Quan s'injecta un excés d'aquestes estructures no es poden implantar i s'observen signes de necrosi a nivell de la matriu. Aquest fet indica que la mare reconeix al teixit tumoral com a estrany. Si la dosi de cossos embrioids emprada és menor, en un 30% dels casos es dona la seva implantació.

Recentment s'ha descrit un factor depenent dels macròfags activats que produeix la necrosi hemorràgica dels teixits tumorals tant *in vivo* com *in vitro*. Aquest factor ha rebut el nom de *tumor necrosis factor* (TNF) i s'ha descrit en el ratolí, la rata, l'home, el conill i el conill

d'Indies (Pennica et al., 1984; Shirai et al., 1985; Urban et al., 1986).

El TNF és una citoquina secretada pels macròfags activats com a defensa per part de l'hoste contra el creixement tumoral. S'ha pogut comprovar que la producció d'aquest factor és el mecanisme més important per a la destrucció de les cèl.lules tumorals.

In vitro s'ha pogut veure que els efectes antiproliferatius del recombinant human tumor necrosis factor- α (rHuTNF- α) i - β poden ser interferits pels factors de creixement epidermal growth factor (EGF) i recombinant human transforming growth factor- α (rHuTGF- α) en una línia cel.lular de carcinoma humà anomenada ME-180 (Sugarman et al., 1987).

Els factors de creixement podrien *in vivo* determinar el creixement tumoral interferint amb els mecanismes efectors normals de la defensa de l'hoste o bé mitjançant l'estimulació autocrina del tumor.

Es coneixen dos factors de creixement el transforming growth factor α i β (TGF- α i TGF- β). El TGF- α està molt relacionat amb l'EGF estructuralment i competeix amb ell per al mateix receptor. TGF- α pot induir la transformació reversible de cèl.lules de rata normals en presència del TGF- β .

El TGF- α es sintetitza durant estadis primers del desenvolupament i, podria ser una versió embrionària de l'EGF (Twardzik et al., 1982). La seva producció en un gran

número de tumors indica que juga un paper important en la transformació cel.lular quan s'expressa de forma incorrecta. El TGF- α com l'EGF quan s'uneix a la seva proteïna receptora produeix la divisió cel.lular.

El TGF- β s'ha detectat com a producte d'excreció d'un gran número de cèl.lules normals i tumorals. Aquest factor de creixement no competeix pel receptor de l'EGF i per a poder fer efectiva la seva capacitat transformadora necessita de la presència de l'EGF o del TGF- α (Anzano et al., 1982).

El TGF- α seria necessari per a l'inducció i formació del tumor, i el TGF- β seria necessari per a mantenir i amplificar el fenotip de malignitat (Anzano et al., 1983).

En les cèl.lules de carcinoma embrionari s'ha descrit la presència de TGF- β però no de TGF- α (Derynck et al., 1987). Se sap però, que les cèl.lules de carcinoma embrionari juntament amb les cèl.lules de la massa cel.lular interna secreten un factor de creixement similar al TGF- α (Rizzino, 1982; Engstrom et al., 1985). Aquest factor estimula la proliferació cel.lular i competeix per al receptor de l'EGF. El TGF- β sintetitzat per les cèl.lules de carcinoma embrionari podria actuar amplificant l'acció del factor de creixement propi d'aquestes cèl.lules.

Com hem vist l'EGF pot contrarestar l'efecte del TNF i impedir així la destrucció del teixit tumoral. El carcinoma embrionari secreta un factor de creixement similar a l'EGF

que competeix amb ell per al mateix receptor. A nivell de la matriu s'ha descrit el receptor per a l'EGF.

Possiblement els cossos embrioids escapin de la resposta immune de l'hoste gràcies a aquest factor. Quan injectem un excés de cossos embrioids en la llum uterina la resposta immunitària és massa elevada com per a poder ser contrarestada i els cossos embrioids són destruïts.

Com ja citavem anteriorment alguns autors han descrit una substància a nivell del carcinoma embrionari i dels blastocist a la que anomenen "immunorepulsiu". Tant en la massa cel.ular interna com en el carcinoma embrionari s'ha descrit el mateix factor de creixement i podria estar relacionat amb aquesta substància.

Atenet a tot l'exposat, i a les grans similituds trobades entre els sistemes embrionaris i els tumorals, podem pensar que l'embrió per a escapar del sistema immunitari de la mare utilitza un sistema anàleg al dels tumors en creixement. Possiblement excreta alguna substància o substàncies que a l'igual que fa l'EGF en els tumors interfereixi els mecanismes de defensa de la mare.

Hem pogut observar que no sols la dosi de cossos embrioids emprada és crítica per a la producció de tumors sinó que també ho és el moment de la injecció. Quan injectem cossos embrioids durant el període de periimplantació observem signes de necrosi i mai es dona la implantació dels cossos embrioids.

Aquests resultats tenen gran paral·lelisme amb els obtinguts amb embrions.

En totes les espècies de mamífers estudiades la supervivència intrauterina i la implantació de l'embrió requereix una sincronització entre el desenvolupament embrionari i l'uterí. Les hormones esteroides estan implicades en aquesta sincronització (Glasser et al., 1982). Com a regla general, la supervivència intrauterina d'ous transferits en varis estats es fa impossible més enllà del temps en que la nidació pot succeir de forma normal.

El quart dia de la gestació o pseudogestació l'endometri no és ja capaç de donar una resposta decidual i l'ambient uteri esdevé nociu pels embrions no implantats. A partir d'aquest moment la matriu es troba dintre de la fase de "no receptivitat" que dura fins al final de la gestació o pseudogestació (Psychoyos i Casimiri, 1981).

Quan es posen embrions de 3 dies en úters gestants de 3 dies durant 24h o es posen embrions de 2 dies en un úter de 3 dies durant 48h es veu que aquests embrions es mantenen normals. Contràriament si embrions de 4 dies es deixen únicament durant 9h en úters de 4 dies es veu que són greument danyats. L'endometri abans de la implantació permet el desenvolupament d'embrions en el seu interior, mentre que a partir del moment de la implantació l'ambient es torna desfavorable per ala supervivència dels embrions (Psychoyos i Casimiri, 1981).

Mitjançant el cultiu d'embrions amb rentats procedents de matrius no receptives s'ha vist que la destrucció d'aquets depèn d'una molècula citotòxica. Aquesta molècula és un polipèptid i s'ha denominat "blastocidina".

Els cossos embrioids situats en matrius no receptives són també destruïts. Això indica que la molècula citotòxica implicada no és específica per als embrions. Possiblement es tracti d'una molècula que reconeix cèl.lules indiferenciades.

La blastocidina podria ser una molècula anàloga al TNF dependent dels macròfags activats. La seva producció es desencadenaria per la presència de cèl.lules indiferenciades en l'interior de la matriu després del període d'implantació.

Passat el moment de la implantació la mucosa uterina no respon als estímuls decidualitzadors i la presència de cèl.lules indiferenciades, siguin les d'embrions o les del cossos embrioids, dona lloc a la producció d'un polipèptid amb propietats citotòxiques.

Atenent als resultats exposats podem afirmar que els cossos embrioids poden escapar del control immunitari de l'hoste sempre i quant la resposta d'aquest no sigui massa elevada.

L'úter pot reconèixer als cossos embrioids com a estranys, malgrat pertanyer a un animal isogènic, degut a que els cossos embrioids expressen diferents antigens carcinoembrionaris (Artzt et al., 1976; Webb, 1980; HYafil

et al., 1980) i s'ha demostrat que aquests antigens poden desencadenar una resposta citotòxica per mediació cel.lular (Hamilton et al., 1976).

Quan s'estudien els tumors després del part no s'observa mai tumor adherit i es veu material necròtic en l'interior de la llum uterina.

Després del part hi ha una fase d'autofagocitosi de les cèl.lules musculars de la matriu. Es veuen macròfags i fibroblast de l'estroma que per endocitosi eliminen les fibres de col.làgena i els fragment cel.lulars (Henell et al., 1983; Inouye et al., 1983a,b).

Com en els casos anteriors els macròfags actius durant aquesta fase d'involució de la matriu poden ser els responsables de la destrucció de la massa tumoral.

EVOLUCIO DEL TUMOR EN L'INTERIOR DE
LA MATRIU. FORMACIO DE VASOS PER PART
DE L'ENDOMETRI

Un cop s'ha format la decidua primària avascular es dona la pèrdua de l'epiteli de superfície de la matriu. Després les cèl.lules del trofoblats es situen adjacents a la làmina basal residual de l'epiteli i les cèl.lules de l'estroma trenquen la làmina basal per anar a contactar amb l'embrió. Aquest procés depèn de la mare i no és dependent del contacte amb l'embrió.

El trencament de la làmina basal així com la pèrdua de l'epiteli també es donen davant dels cossos embrioids. Això sembla indicar que aquests dos processos formarien part del programa de les cèl.lules de la mucosa que possiblement es desencadenaria, com esmentàvem anteriorment, pel contacte físic amb els cossos embrioids o l'embrió.

A mesura que l'embrió es desenvolupa es produeix la involució de la decidua primària i es forma una xarxa de vasos que aporta els nutrients necessaris a l'embrió en creixement.

Després de travessar la làmina basal residual les cèl.lules de la decidua que estan en contacte amb l'embrió experimenten canvis degeneratius. Hi ha condensació dels continguts citoplasmàtics, fragmentació de les cèl.lules i fagocitosi dels fragments per part del trofoblats (Welsh i Enders, 1987).

Els estudis morfològics de la formació de la xarxa de vasos materna indiquen que mentre es produeix la degradació de la decidua primària algunes cèl.lules deciduais s'interposen entre les cèl.lules endotelials dels vasos

materns. El trofoblast té accés als vasos de la mare reemplaçant les cèl.lules deciduals i introduint-se entre les cèl.lules endotelials. Els vasos materns es troben colapsats fins al moment en que el trofoblast hi penetra (Welsh i Enders, 1987).

Quan s'estudia un tumor obtingut a partir de la injecció dels cossos embrioids es pot veure una trama vascular que penetra dintre del tumor. Es veu també com les cel.lules estromals s'interposen entre les cèl.lules de carcinoma donant-les un substrat sobre el qual creixen.

La majoria dels teixits necessiten d'un aport sanguini que els proveeixi nutrients i que tregui els productes dels catabolisme (Wessells, 1977). Degut a això la proliferació cel.lular pot ser controlada per l'accessibilitat de nutrients (Folkman, 1975;1976). Un increment en la densitat capil.lar d'un teixit resulta en un accés incrementat als nutrients per les cèl.lules i pot permetre l'acceleració del creixement. Ja que els capil.lars es formen com a resultat de la proliferació de l'endoteli vascular, els factors mitogènics d'aquestes cèl.lules poden regular indirectament el creixement d'un teixit en el seu conjunt (Gospodarowicz et al., 1978).

Les cèl.lules endotelials tenen gran capacitat per ajustar el seu número i disposició als requeriments locals. La majoria dels teixits deenen de l'aport sanguini i aquests de les cèl.lules endotelials. Si les cèl.lules endotelials

no remodelesin la xarxa de vasos, el creixement i reparació dels teixits seria impossible.

Les cèl.lules endotelials limiten el sistema vascular en la seva totalitat i controlen el pas de materials cap a l'interior o l'exterior de la circulació. Estudiant l'embrió es veu que les artèries i les venes es desenvolupen des de petits vasos formats únicament per cèl.lules endotelials i una membrana basal. Les capes de teixit connectiu i muscular es formen al voltant d'elles quan es requereix (Bloom i Fawcett, 1975).

Les cèl.lules endotelials retenen en l'adult la capacitat de divisió i moviment. Poden reparar l'endoteli de vasos en que aquest s'ha retirat de forma experimental. Poden també crear nous vasos. Per exemple, en l'úter que té cicles recurrents de remodelació de teixits i reconstrucció o en el cas de reparar teixits destruïts (Goss, 1978)

En l'animal en estat normal les cèl.lules endotelials formen nous capil.lars sols quan és necessari per a ell. Així per exemple, quan es produeix una ferida els teixits veïns formen capil.lars. Els irritants locals i les infeccions també causen la proliferació de nous capil.lars. Hi ha evidències que els macròfags, que s'acumulen en els llocs de destrucció i infecció secreten un factor que indueix a les cèl.lules endotelials a formar capil.lars (Folkman, 1980).

In vitro s'ha pogut veure que el FGF té una gran activitat mitogènica sobre les cèl.lules endotelials, mentre

que l'EGF no té activitat. *In vivo* s'ha vists també que el FGF indueix la neovascularització de la còrnea de conill (Gospodarowicz et al ,1978).

Estudiant el creixement tumoral s'ha vist que els teixits poden produir senyals per a l'angiogènesi. Un tumor que creix de forma sòlida es manté petit a menys que es proveeixi de capil.lars. Sense un aport sanguini que s'extengui en el seu interior el tumor s'alimenta per difusió i no pot créixer més enllà d'uns milímetres. Però si les cèl.lules dels tumor poden induir la formació d'una xarxa de capil.lars que envaeixi la massa tumoral, no necessiten tenir un creixement limitat. Hi ha evidència que els tumors que poden tenir un creixement ilimitat excreten una substància, anomenada *tumor angiogenesis factor*, que actua en les cèl.lules endotelials. És possible que les cèl.lules normals deprivades d'oxigen puguin atreure un aport sanguini secretant el mateix factor (Folkman, 1976).

Els tumors obtinguts en l'interior de la matriu presenten un elevat creixement. Dipositant únicament 50 cossos embrioids en l'interior de l'úter s'obté un tumor als 6 dies de la injecció. Per a obtenir un tumor sota la pell en animals control aproximadament en el mateix temps es necessari injectar 2×10^5 cossos embrioids. Aquest fet indica que dintre de la mucosa de la matriu gestant hi ha un fort estimul per al creixement.

Les cèl.lules de carcinoma embrionari que integren el tumor per a poder créixer ràpidament necessiten de l'aport de vasos i indueixen la seva formació per part de la mare.

L'embrió de forma anàloga es desenvolupa ràpidament dintre de l'úter que li proporciona un estímul positiu pel creixement els vasos neoformats per l'endometri li proporcionen els nutrients necessaris. L'embrió podria induir la formació de vasos per mitjà d'un factor bioquímic relacionat amb el FGF o el *tumor angiogenesis factor*.

Hi ha dos sistemes bàsics d'informació intercel.lular: la determinada per factors bioquímics circulants com per exemple els factors de creixement o la mediatitzada pel contacte cèl.lula/cèl.lula.

En els teixits adults el caracter d'una cèl.lula pot canviar quan el seu ambient canvia. Aquestes alteracions del caracter són rarament molt grans. Moltes d'elles poden classificar-se com modulacions de l'estat diferenciat. La modulació pot dependre de la interacció amb les cèl.lules veïnes.

Posant en individus adults fragments d'epidermis procedent d'una zona de l'organisme en contacte amb la dermis d'una zona diferent s'ha observat que la dermis controla les característiques de la epidermis implantada (Billingham i Silvers, 1967).

També s'ha pogut comprovar la importància del contacte intercel.lular estudiant les papil.les gustatives. Les fibres nervioses que hi penetren són les responsables de la

seva morfologia. Si el nervi es talla les papil·les desapareixen. Si el nervi regenera indueix a les cèl·lules epitelials a canviar el seu estat de diferenciació formant noves papil·les (Zalewski, 1974).

S'ha vist també que la interacció entre cèl·lules pot determinar la inhibició del creixement i la seva modulació. Cultivant cèl·lules leucèmiques en agar en presència de cèl·lules mononuclears perifèriques (cèl·lules adherents) s'inhibeix el creixement de la leucèmia. El mecanisme de supressió és degut directament al contacte cel·lular modulador de la taxa de creixement de les cèl·lules tumorals (Spitzer et al., 1985).

Les cèl·lules adherents suprimeixen colònies de granulòcits-macròfags tant leucèmiques com normals. S'ha proposat que les diferents tendències de diferenciació en diferents òrgans, com és la mielopoiesi en la medul·la, l'eritropoiesi en la melsa i la limfopoiesi en els nòduls limfàtics, són degudes a controls negatius o positius exercits per les poblacions de cèl·lules adherents en els diferents òrgans (Spitzer et al., 1985). Aquesta població adherent està probablement formada per monòcits o macròfags. Es ben sabut que aquestes cèl·lules interactuen per contacte cèl·lula/cèl·lula amb els limfòcits i com a conseqüència final regulen la limfopoiesi (Rosenthal et al., 1976).

S'ha pogut veure en treballs *in vitro* que les cèl·lules de carcinoma embrionari tenen pocs receptors per als factors

de crixement, i malgrat tenir aquests receptors, no responen al factors de creixement exògens (Engstrom et al., 1985).

Per tant, es pot pensar que la inducció positiva pel creixement rebuda pels cossos embrioids en l'interior de l'endometri es tractaria d'una informació cèl.lula/cèl.lula.

Els teixits tumorals no sols escapen al control immunitari de l'hoste sinó que poden aprofitar-lo per al seu creixement. Els macròfags que colonitzen els teixits tumorals poden induir, *in vitro*, trencaments a nivell de l'ADN de cèl.lules de mamífers per mecanismes mediatitzats per metabòlits de l'oxigen (Weitberg et al., 1983). La producció endògena d'aquests mutàgens per part d'algunes de les cèl.lules fagocítiques (no totes tenen aquesta capacitat) està en relació amb la fisiopatologia de la inflamació crònica i possiblement amb la iniciació dels processos malignes (Vasiliev i Moizhess, 1982). En aquest mecanisme es troben implicats més d'un tipus de mutàgens (Fulton et al., 1984) que poden estar proporcionats per les diferents subpoblacions de macròfags aïllats en un mateix tumor. Aquestes subpoblacions difereixen en les seves propietats físiques i bioquímiques (Mahoney et al., 1983) així com en el seu estat d'activació (Loveless i Heppner, 1983).

La capacitat mutagènica dels macròfags pot veure's influïda per l'entorn cel.lular (Weitzman i Stossel, 1982) ja que s'ha demostrat una relació directa entre la progressió del tumor i la producció de mutàgens per part

dels macròfags (Fulton et al., 1984). L'activitat mutagènica dels macròfags isolats de les metàstasis és superior a la dels trobats en els tumors primaris (Heppner et al., 1984).

El tumor modificaria als macròfags procedents de la resposta de l'hoste per al seu propi creixement invasiu. Seria aquesta una forma d'escapar a la resposta mediatitzada per macròfags i guardaria relació amb la formació de metàstasis per part del tumor (Nicolson et al., 1985; Russell, 1985).

En els llocs d'implantació hi ha una acumulació transitòria de limfòcits i macròfags, deguts a la reacció immune de la mare contra l'embrió (Howe, 1975).

L'embrió comparteix amb les cèl.lules tumorals la capacitat invasiva; el trofoblats envairà els teixits materns en els llocs d'implantació. De forma anàloga als teixits tumorals l'embrió pot modificar l'expressió dels macròfags procedents de la mare i utilitzar les substàncies secretades per ells per al seu desenvolupament.

La inducció positiva exercida sobre els cossos embrioids vindria donada per la interacció directa amb els macròfags procedents de la mare.

L'embrió, igual que els teixits tumorals, no sols interferiria la resposta citotòxica d'algunes poblacions de macròfags per mitjà de la síntesi d'un factor bioquímic anàleg als factors de creixement, sinó que aprofitaria la resposta de rebuig de la mare activant la producció de

substàncies mitogèniques per part de determinades poblacions de macròfags.

Aquesta idea és consistent amb l'observació de que és el trofoblasts l'encarregat de la protecció de l'embrió en el seu desenvolupament, ja que és justament aquest teixit el que actua envaint els teixits materns i guarda gran relació amb els teixits tumorals invasius. Els macròfags davant d'aquestes cèl.lules produirien diferents mutàgens igual com ho fan quan es troben amb les cèl.lules tumorals en progressió.

Com hem vist hi ha dos tipus bàsics d'estímuls del creixement però en última instància el creixement d'un teixit depen del substrat sobre el qual creix, es a dir, depèn de la matriu extracel.lular.

Les cèl.lules estromals poden sintetitzar la seva pròpia matriu extracel.lular mentre que les cèl.lules de tipus epitelial necessiten que els estromes lis aportin aquest substrat. Això fa que el creixement dels epitelis es pugui regular des dels estromes (Summerhajes i Franks, 1979).

La migració i creixement cel.lulars *in vivo* són el resultat d'un balanç complex entre les informacions cèl.lula/cèl.lula i les interaccions cèl.lula/substrat. Aquestes forces que es combinen modulant la forma cel.lular poden permetre o previndre la proliferació i diferenciació (Maroudas, 1973; Gospodarowicz et al., 1978b). S'ha demostrat que les interaccions cèl.lula/substrat exerceixen

un control en la proliferació cel.lular i la morfogènesi (Wessels, 1964; Grobstein, 1967; Grobstein, 1975).

En el cas de teixits epitelials amb una alta proporció de recanvi, com l'epidermis de l'epiteli corneal, la proliferació cel.lular activa es localitza únicament en la capa basal, composta per cel.lules grans i columnars. Aquestes cèl.lules estan íntimament unides a la làmina basal o matriu extracel.lular. En contrast, les cèl.lules de les capes superiors, que han perdut la seva capacitat de proliferar i gradualment adopten una forma aplanada, no tenen contacte directe amb la matriu extracel.lular. Això implica que el contacte de les cèl.lules amb la matriu extracel.lular té una influència permisiva en la proliferació cel.lular. La matriu extracel.lular modula l'expressió genètica i la citodiferenciació (Sun i Green, 1977; Yang et al., 1979).

El control sobre el creixement es pot exercir mitjançant el canvi d'un únic component de la matriu extracel.lular. Se sap que els epitelis no poden créixer sobre un substrat de fibronectina i requereixen, en canvi, la presència de laminina per poder proliferar. Els estromes es comporten totalment a l'inrevés ja que necessiten de la fibronectina per a proliferar (Murray et al., 1979; Summerhajes i Franks, 1979).

En l'interior de la mucosa uterina es pot veure com l'estroma forma una xarxa connectiva sobre la que creix el tumor. L'estroma aporta al teixit tumoral la matriu

extracel.lular que li permet creixer ràpidament com a resposta als estímuls positius deguts a la interacció cèl.lula/ cèl.lula als que aludiem anteriorment.

Es veu, però, que el tumor mai sobrepassa en el seu creixement l'espai limitat per les làmines basals de l'epiteli de superfície i de la mucosa uterina, podem pensar que a aquest nivell hi ha un canvi en la composició de la matriu extracel.lular que no permet el creixement del tumor.

Durant la gestació l'estroma proporcionaria, endemés d'un aport vascular i un estímulo positiu per al creixement, un substrat adequat per al desenvolupament de l'embrió i regularia la seva grandària per mitjà d'un canvi en la matriu extracel.lular a nivell de les membranes basals.

L'embrió poseeix un programa genètic de desenvolupament que ja li ve donat possiblement pels genomes dels gàmetes paternes. Se sap que l'embrió per a desenvolupar-se necessita posseir la informació d'un pronuclí femení i d'un de masculí. Si es creen embrions que porten dos pronuclis femenins o dos de masculins s'implanten però poc després degeneren (Hoppe i Illmensee, 1982; Surani i Barton, 1983; McGrath i Solter, 1984; Surani et al., 1986). La matriu sols ordenaria aquest programa exercint sobre ell un control positiu i negatiu, així l'expressió del programa genètic de l'embrió es donaria de forma correcta.

Els cossos embrioids, al no tenir un programa de creixement determinat com els embrions, creixerien estimulats per la matriu fins a contactar amb les làmines

basals on el seu creixement és frenat. Com l'embrió es nodririen a partir de l'aport de vasos materns.

Quan els cossos embrioids s'injecten en la musculatura de la matriu gestant els tumors que s'obtenen són teratocarcinomes que poden envair els teixits veïns. De tota manera la seva invasió es veu frenada a nivell de la mucosa uterina. Com en el cas anterior no sobrepassen els límits establerts per les làmines basals i endemés s'observa limitació del creixement lateral per mitjà de la trombosi de les arterioles properes al tumor. Aquest pot ser un mecanisme emprat per a la matriu per a exercir un control de tipus local. A nivell del miometri no s'observa cap tipus de capacitat de control.

Els tumors de l'interior de la mucosa uterina presenten tots ells un patró de carcinoma embrionari sòlid. Els tumors obtinguts a nivell del miometri són teratocarcinomes típics exceptuant aquella part del tumor que envaeix la mucosa uterina que també presenta un patró de carcinoma embrionari sòlid.

La no diferenciació dels tumors trobats en la mucosa uterina pot deure's a dues causes diferents:

- Són tumors de mida molt restringida i és possible que la seva petita grandària faci que es mantinguin sota aquest patró histològic.

- La no diferenciació d'aquests tumors pot deure's també a la seva ràpida evolució ja que les cèl.lules de carcinoma embrionari per a diferenciar-se necessiten d'un

descens ordenat de la velocitat de creixement (Mummary et al., 1984).

Quan estudiem els tumors obtinguts en posició submucosa podem veure que la part del tumor que es troba en la musculatura és un teratocarcinoma típic, mentre que aquella que es troba en l'interior de l'estroma de la mucosa es manté amb un patró de carcinoma embrionari. Aquesta observació ens fa pensar que les cèl.lules de carcinoma embrionari no es diferencien en l'interior de la mucosa uterina degut al ràpid creixement que experimenten com a resultat del contacte directe amb les cèl.lules estimuladores del creixement.

Altre fet a destacar en els tumors obtinguts en l'interior de la mucosa uterina és la seva orientació en l'espai. Els tumors sempre es troben dirigits cap a la llum uterina recordant la disposició que adopten els embrions durant la gestació. Es veu que el tumor en el seu creixement s'orienta seguin la trama conjuntiva que forma l'estroma de l'endometri.

L'estroma de la matriu aporta una trama conjuntiva sobre la que es desenvolupen les cèl.lules de carcinoma embrionari. Aquesta xarxa no sols controla el creixement tumoral sinó que dóna una orientació en l'espai al tumor.

Durant la gestació la matriu seria l'encarregada d'orientar a l'embrió en l'espai.

El tumor en creixement, igual que els embrions no sobrepassa mai la barrera formada per la làmina basal de

l'epiteli de superfície de la llum uterina ni envaeix el miometri. Possiblement la presència de zones limitants del creixement determinaria una informació posicional que seria seguida per l'estroma durant la formació dels vasos i de la trama conjuntiva sobre la que creixeran les cèl.lules embrionàries i dirigiria així la posició espacial de l'embrió durant el seu desenvolupament.

TUMORS SUBCUTANIS

TEMPS D'EVOLUCIO I MIDA DELS TUMORS

Quan s'estudien esls tumors obtinguts subcutàniament en animals gestants destaquen dos fets: 1) els tumors sòlids apareixen únicament després del part i tots ho fan passats tres dies del final de la gestació; 2) la grandària del tumor depèn del temps que han passat els cossos embrioids sota la influència de l'estat gestacional.

Si durant la gestació estudiem la zona d'injecció dels cossos embrioids veiem que aquests estan dintre d'una formació quistosa en suspensió.

Els cossos embrioids per a donar un tumor sòlid han d'ancorar-se i les cèl.lules de carcinoma embrionari envaleixen a través de l'endoderma que les envolta el teixit connectiu de l'hoste (Pierce, 1961).

Passada la gestació els cossos embrioids s'ancoren i en tres dies es dona l'aparició d'un teixit tumoral sòlid.

En l'apartat anterior hem vist la importància del substrat per al creixement de les cèl.lules tant *in vivo* com *in vitro*. Atenent als nostres resultats, pensem que des de l'inici de la gestació es produeix un canvi a nivell de les membranes basals que no permet l'ancoratge dels cossos embrioids.

La matriu extracel.lular està composta per col.làgena, glicosamines i glucoproteïnes. La col.làgena és el component majoritari. Es coneixen tres tipus de col.làgena intersticial (I, II i III), així com dos tipus de col.làgena de les membranes basals (IV i V). Els glicosaminoglicans són polímers de sucre d'alt pes molecular que tendeixen a

formar proteoglicans unint-se a proteïnes. La fibronectina i la laminina són proteoglicans i estan associats a la matriu extracel.lular i estan relacionats amb l'adhesivitat cel.lular al substrat (Gospodarowicz i Vlodawsky, 1985). La laminina es troba a nivell de les membranes basals epitelials.

Un punt central en la biologia dels tumors és entendre les interaccions entre les cèl.lules tumorals i el seu ambient. És interessant estudiar les interaccions entre les cèl.lules tumorals i les matrius extracel.lulars, ja que pot aportar informació sobre la necessitat d'un supot estromal per al creixement tumoral així com els mecanismes del tumor per a reconèixer el seu entorn.

In vitro s'ha vist que les cèl.lules de carcinoma de colon (tumor de tipus epitelial) requereixen estrictament d'una matriu extracel.lular per al seu creixement i no s'adhereixen a les plaques que tenen fibronectina, mentre que el sarcoma d'Ewing (tumor de tipus conjuntiu) s'adhereix i creix sobre una matriu extracel.lular elaborada o simplement sobre un substrat de fibronectina (Gospodarowicz i Vlodawsky, 1985). El canvi d'un únic component de la matriu extracel.lular pot impedir o potenciar el creixement d'un teixit (Summerhajes i Franks, 1979).

En la clínica humana es descriuen tumors que durant la gestació canvien en la seva forma de creixement fen-se més o menys agressius (Lichtenstein i Goldman, 1964; Allen i Nisker, 1986). De forma anàloga als cossos embrioids, els

tumors que pugui fabricar-se el substrat adequat pel seu creixement evolucionaran més ràpidament durant la gestació ja que aprofitaran els estímuls positius de la mateixa, per contra, aquells que depenen de les matrius extracel.lulars de l'hoste veuran frenat el seu creixement.

El canvi en la composició de les membranes basals s'observa des de l'inici de la gestació, també des d'aquest moment l'òocit fecundat inicia el seu descens cap a la matriu on el blastocist s'implantarà.

El canvi general observat a nivell de les matrius extracel.lulars pot funcionar com un mecanisme de seguretat per a la implantació de l'embrió. Per a evitar que de forma accidental l'embrió s'ancori abans d'arribar a la matriu es possible que l'organisme matern canviï les membranes basals que es troben sota dels epitelis; així un trencament de l'epiteli no comportaria l'ancoratge ectòpic de l'embrió.

Això permetria explicar perquè el blastocist no sobrepassa mai la membrana basal residual de l'epiteli de superfície i és l'estroma qui el trenca anant a acollir a l'embrió.

També pot estar relacionat aquest canvi en les membranes basals amb el control de la mida de l'embrió en l'interior de la mucosa uterina. Ja hem descrit com el creixement del tumor intrauterí es veu limitat a nivell de les membranes basals. Llavors sembla que amb un simple canvi de composició bioquímica a nivell d'alguna o algunes

moléculas de l'organisme es pot controlar tota una sèrie d'esdeveniments de la gestació.

La làmina basal dels epitelis està sistetitzada per les cèl.lules estromals. La gestació actuaria sobre les cèl.lules estromals fent que iniciessin la síntesi de noves matrius extracel.lulars i controlaria així el desenvolupament de l'embrió, des de l'inici del seu descens cap a la matriu fins al moment del part en l'interior de la mucosa uterina.

Quan injectem subcutàniament cossos embrioids durant la gestació els tumors obtinguts en femelles gestants apareixen tres dies després del part, es a dir, des del moment en que els cossos embrioids poden ancorar-se passen únicament tres dies fins l'aparició del tumor. En els animals control, amb la mateixa dosi de cossos embrioids, han de passar 8-9 dies fins l'aparició del tumor sòlid.

Per altra banda, els tumors obtinguts en femelles gestants són majors que els obtinguts en els animals control i es veu que la seva mida guarda relació amb el temps de permanència dels cossos embrioids sota l'estat gestacional.

Els tumors obtinguts injectant cossos embrioids durant el dia zero de la gestació són més grans que els obtinguts en els dies següents i juntament amb els obtinguts en animals injectats el dia 1 i 2 de la gestació formen un grup de creixement diferenciat de la resta dels tumors.

Tots aquests fets evidencien que durant la gestació hi ha una informació positiva per al creixement des de l'inici de la mateixa.

El pic hormonal en la gestació es dona el dia 3, abans de la implantació (Watson et al., 1975), per tant podem pensar que la inducció positiva durant l'inici de la gestació depèn d'altres factors, possiblement factors de creixement.

Les hormones no són agents mitogènics sinó que actuen potenciant l'acció dels factors de creixement que són els responsables directes de la mitogènesi. Per tant l'estímul positiu observat al llarg de tota la gestació vindria donat per factors de creixement i no per hormones. Els treballs de Damjanov et al. (1983) a l'obtenir tumors a partir de la injecció ectòpica d'embrions en femelles gestants està d'acord amb els nostres resultats. Aquest autors obtenen a partir d'embrions ectòpics tumors que són majors que els obtinguts en els animals control i veuen que la mida d'aquests tumors no depèn dels nivells hormonals.

Els tumors obtinguts en els animals gestants injectats els tres primers dies de la gestació (dia 0 al 2) són marcadament majors que els obtinguts a partir d'aquest moment. Durant aquesta fase l'embrió es troba lliure en l'interior del tracte uteri i per tant els estímuls observats estan dirigits únicament a la mare.

Les cèl.lules de carcinoma embrionari no responen als factors de creixement exògens però se sap que les cèl.lules

tumorals diferenciades si responen a aquests factors (Moore i Sheridan, 1982). Els cossos embrioids, amb els que treballen, són estructures formades per cèl.lules de carcinoma embrionari envoltades per una capa de cèl.lules endodèrmiques derivades d'aquestes cèl.lules tumorals. L'endoderma captaria la informació externa i la transmetria a les cèl.lules de carcinoma embrionari a través dels nombrosos desmosomes dels cossos embrioids. Així mitjançant la interacció cel.lular, les cèl.lules tumorals captarien la informació humoral exògena que s'acumularia en el seu genoma.

Des de l'inici de la gestació es poden veure els primers canvis a nivell de l'organisme matern. A nivell de l'ovari s'observen ja els primers canvis després de l'ovulació.

El cicle ovàric es pot dividir en dues parts. La fase inicial consisteix en el creixement i maduració dels fol·licles composts d'una caviat central envoltada per múltiples capes de cèl.lules de granulosa i dues capes cel.lulars externes: la teca interna i l'externa ricament vascularitzada. Les cèl.lules de la granulosa separades de les capes superficials del fol·licle per una membrana basal i estan mantingudes en un ambient avascular.

La segona part del cicle ovàric és la formació del cos luti després de l'ovulació. Les capes de cèl.lules granuloses esdevenen vascularitzades degut a la formació de

vasos que penetren la membrana basal. Les cèl.lules irrigades es transformen donant lloc al cos luti.

In vitro s'ha vist que tant l'EGF com el FGF són agents fortament mitogènics sobre les cèl.lules de la granulosa. *In vivo* si s'injecten FGF i EGF a rates es veu que els fol.licles es desenvolupen molt més que en els casos control. Possiblement aquests factors tinguin un important paper en el cos luti durant la gestació (Gospodarowicz et al., 1978a).

Els factors de creixement actuen unit-se a receptors cel.lulars específics que transdueixen el senyal mitogènic per a que un segon missatger el transporti al nucli iniciant-se així la síntesi d'ADN (Heldin i Westermarck, 1984). Les cèl.lules de carcinoma embrionari dels cossos embrioids anirien acumulant la informació a nivell del seu nucli durant la gestació i després d'ella, en que es poden ancorar, l'expressarien.

Els tumors que s'obtenen injectant animals des del dia 3 al 8 de la gestació són menors que els anteriors. Durant aquesta fase la informació mitogènica humoral es menor possiblement degut a que a partir de la implantació els canvis materns són locals trobant-se restringits a la matriu i alguns d'ells depenen directament del contacte entre els teixits de la mare i l'embrió.

Els tumors obtinguts després d'aquesta fase són marcadament menors el que denota que els estímuls mitogènics han disminuït. A partir del dia 8 de la gestació s'inicia la

morfogènesi de l'embrió, és possible que els estímuls humorals generals responguin únicament a la necessitat de mantenir l'estat gestacional.



HISTOLOGIA DELS TUMORS

L'anàlisi histològica dels tumors revela que són teratocarcinomes típics. En ells hi podem trobar major o menor grau de necrosi en el seu interior. La presència de zones de necrosi pot relacionar-se per un costat amb el volum elevat que assoleixen alguns d'aquests tumors i l'aport deficient de sang als seus teixits més interns.

Després del part, en que els cossos embrioids poden ancorar-se amb escasos dies apareix un tumor de grans dimensions, i és possible que degut a la gran velocitat de creixement de les seves cèl.lules no es pugui produir una angiogènesi adequada i el tumor finalitzi necrosant-se.

Quan s'estudien aquests tumors i els de l'interior de la matriu, es poden veure en l'interior de l'estroma del tumor cossos embrioids que serien els responsables de la formació del tumor sòlid. Es veu que la capa externa del cos embrioid s'obra i les cèl.lules de carcinoma embrionari del seu interior surten per a formar el tumor.

En les zones d'injecció els cossos embrioids alguns no poden ancorar-se i es mantenen surant en l'interior d'un quist.

Estudiant aquests tumors amb l'anticòs anti-AFP hem pogut comprovar com les cèl.lules de carcinoma embrionari poden presentar un dèbil marcatge positiu quan adopten l'estructura de pseudoglàndules. Aquestes cèl.lules malgrat mantenir la seva morfologia i característiques de cèl.lula carcinomatosa presenta ja antigens de membrana característics del teixit endodèrmic. Les cèl.lules de

carcinoma embrionari abans de modificar la seva morfologia presentarien ja canvis a nivell de l'expressió dels seus gens.

Quan s'estudien els tumors obtinguts es pot veure com a partir de cèl.lules de carcinoma embrionari es donen cèl.lules trofoblàstiques.

Durant el desenvolupament embrionari a partir de la mòrula es donen els teixits de la massa cel.lular interna i el trofoblast de l'embrió.

Quan es fan embrions quimera depositant una cèl.lula de carcinoma embrionari a l'interior d'un blastocist la cèl.lula tumoral s'integra en l'embrió i s'obté un individu adult (Mintz et al., 1975).

Això ha permès establir un paral·lelisme entre les cèl.lules de carcinoma embrionari i les de la massa cel.lular interna de l'embrió.

El fet de trobar cèl.lules trofoblàstiques procedents de cèl.lules similars a les de la massa cel.lular interna està d'acord amb els treballs de Cruz i Pedersen (1985) que veuen que les cèl.lules totipotents de la massa cel.lular interna formen part del llinatge de les cèl.lules trofoblàstiques.

Estudiant els tumors obtinguts hem vist que també s'obtenen cèl.lules trofoblàstiques a partir de cèl.lules del tumor de si endodèrmic.

Els tumors de si endodèrmic estan formats per cèl.lules d'endoderma visceral que donen reacció positiva a l'AFP.

En l'embrió els teixits endodèrmics derivarien de la massa cel.lular interna en una via paral.lela a la formació del trofoblasts polar i el trofoblast mural a partir del trofoblast del blastocist.

Gardner i Papaioannuo (1975) consideren que hi ha un endoderma primitiu a partir del qual es formarien els endodermes embrionari i extraembrionari, mentre que Dziadek (1979) considera que l'endoderma parietal i visceral no es formen a partir de la mateixa població de cèl.lules soca en l'endoderma primari, però es formen consecutivament des de cèl.lules ectodèrmiques.

Atenent als llinatges cel.lulars dels embrions de ratolí que acabem d'exposar no és possible explicar la procedència de les cèl.lules trofoblàstiques a partir de les cèl.lules endodèrmiques del tumor de si endodèrmic.

S'obtenen tumors de si endodèrmic a partir de fetectomies en les que es deixen en l'interior de la matriu de la mare únicament les membranes extraembrionàries del fetus (Sobis i Vandeputte, 1973; Vandeputte et al., 1973; Sakashita, 1977). Aquests treballs serveixen per a confirmar l'origen extraembrionari d'aquests tumors.

Lo i Gilula (1980a,b,c) descriuen la producció de cèl.lules gegants de morfologia compatible amb trofoblast a partir de cultius de cèl.lules de carcinoma embrionari de la línia PCC4azal. Indueixen la diferenciació d'aquestes cèl.lules i observen que passen per varis estadis de diferenciació. Obtenen en primer lloc cèl.lules de tipus

endodèrmic i a partir d'elles cèl.lules gegants de morfologia estable.

Atenent a aquests resultats i als observats en els tumors estudiats, podem pensar que les cèl.lules endodèrmiques retenen la capacitat de produir cèl.lules trofoblàstiques.

Aquests resultats obtinguts a partir de teixits tumorals poden donar una orientació del paper de determinats teixits durant l'embriogènesi però de tota manera no podem oblidar que es tracta de dos sistemes diferents.

Eltrofoblats sembla que podria derivar per tant de les membranes extraembrionàries.

El trofoblast en els tumors es troba sempre al voltant de zones hemorràgiques i podria actuar a manera d'endoteli canalitzant els nutrients present en la zona de necrosi cap als altres teixits del tumor impedit la seva destrucció.

Les cèl.lules endodèrmiques, malgrat ser cèl.lules diferenciades, es troben a l'inici d'una via de diferenciació i retenen encara moltes de les característiques de les cèl.lules indiferenciades.

De la mateixa forma que el carcinoma embrionari pot retenir la seva morfologia però expressar antigens de l'endoderma, aquest teixit pot mantenir antigens i característiques de la seva cèl.lula precursora.

Se sap també que el trofoblats contribueix al llinatge de les cèl.lules de la massa cel.lular interna (Fleming, 1987). Semblaria per tant que durant les primeres fases de

l'embriogènesi els diferents teixits podrien actuar en vies alternatives per a donar el desenvolupament de l'embrió. Podria tractar-se d'un mecanisme similar al trobat en els teixits adults. Se sap que les cèl.lules sòca dels teixits poden dividir-se donant sols una cèl.lula sòca i una cèl.lula que es diferenciaria o bé donar dues cèl.lules sòca com en el cas de la destrucció de l'epiteli (Watt i Green, 1982). Aquest seria un mecanisme de seguretat emprat pel teixit adult, l'embrió podria utilitzar vies alternatives per a la formació de teixits en cas de necessitat.

CONCLUSIONS

1. Els cossos embrioids es distribueixen i implanten en la matriu gestant de forma anàloga a com ho fan els embrions. La distribució i la immobilització dels embrions durant la gestació vindria donada per l'organisme matern com a resposta a la presència d'unes estructures lliures en la llum uterina.

2. Els cossos embrioids s'implanten com els embrions en la mucosa uterina. Els embrions que es troben a nivell del corn esquerra no operat donen el senyal de decidualització dependent dels estrògens a la matriu. Posteriorment, el contacte entre la superfície del cos embrioid i de l'epiteli de superfície de l'úter és suficient com per a desencadenar els canvis específics del lloc d'implantació.

3. Atenet a l'exposat, la formació del teixit decidual dependria de dos estímuls: un primer estimul bioquímic específic i un segon estimul mecànic inespecífic.

4. Els cossos embrioids desencadenen la resposta immune de l'organisme matern.

5. Quan s'inocula una dosi massa elevada de cossos embrioids aquests són eliminats per l'hoste.

6. Quan es dipositen els cossos embrioids en l'interior d'úters gestants durant el període de periimplantació es produeix la seva destrucció anàlogament al que succeeix amb els embrions introduïts experimentalment en aquesta fase. La matriu sintetitzaria una substància citotòxica, no específica per als embrions, com a resposta a la presència d'estructures indiferenciades en la seva llum durant la fase de no receptivitat.

7. Els cossos embrioids, igual que els embrions, indueixen la formació de vasos per part de l'hoste. Aquesta inducció pot venir donada per algun factor bioquímic lliurat per aquestes estructures.

8. Durant la gestació hi ha a nivell de la mucosa uterina una inducció positiva per al creixement. Aquesta inducció dependria d'una interacció cèl.lula/cèl.lula.

9. Els teixits tumorals en proliferació poden modificar l'expressió gènica de determinades poblacions de macròfags induint-los a excretar substàncies mitogèniques per al seu creixement. Els cossos embrioids podrien modular l'expressió dels macròfags acumulats en els seus llocs d'implantació i ser aquests els responsables de la inducció positiva exercida sobre les cèl.lules de carcinoma embrionari.

10. Les cèl.lules normals i les tumorals necessiten d'un substrat adequat per a créixer. La matriu gestant proporciona al cos embrioid el substrat per a créixer activament com a resposta als estímuls mitogénics.

11. A nivell de les membranes basals de l'epiteli de superfície i de la mucosa uterina es frena el creixement tumoral degut possiblement a un canvi bioquímic en aquesta zona. Aquest possible canvi permet controlar la mida del tumor.

12. Quan s'injecten cossos embrioids a nivell del miometri s'obté un teratocarcinoma típic, exceptuant aquelles parts del tumor que entren en contacte amb la mucosa uterina que es mantenen, com els tumors implantats, amb un patró de carcinoma embrionari sòlid. La no diferenciació de les cèl.lules de carcinoma embrionari en l'interior de la mucosa uterina es deuria a la seva elevada velocitat de divisió en aquesta àrea.

13. Els tumors implantats creixen orientant-se en l'espai seguint els vasos i la trama conjuntiva de l'estroma uterí. Probablement durant la gestació l'orientació de l'embrió depèn de les cèl.lules de la mucosa uterina.

14. Els cossos embrioids injectats subcutàniament mantenen la seva forma ascítica durant la gestació. Aquest fet depèn d'un canvi en l'ambient possiblement a nivell del substrat on s'han d'ancorar aquestes estructures.

15. Durant tota la gestació els cossos embrioids no ancorats estan sotmesos a l'acció d'estímuls mitogènics externs.

16. Els cossos embrioids respondrien a aquests estímuls exògens per mitjà de la seva capa endodèrmica externa que transmetria, a través dels nombrosos desmosomes, el senyal a les cèl·lules de carcinoma embrionari.

17. Els tumors obtinguts quan s'injecten cossos embrioids subcutàniament des del dia zero al dos de la gestació són de major volum que els obtinguts en dies successius. Durant aquests primers dies de la gestació els cossos embrioids han estat sotmesos a un gran nombre d'estímuls positius relacionats possiblement amb els canvis generals de l'organisme matern en aquesta fase.

18. La mida dels tumors obtinguts quan els cossos embrioids s'injecten subcutàniament des del dia tres al vuit de la gestació és menor que en el cas anterior. Durant aquesta fase els cossos embrioids han rebut un menor número d'estímuls inductors del creixement. Aquests estímuls podrien estar implicats en els canvis locals a nivell de la matriu gestant.

19. Els cossos embrioids injectats a partir del dia vuit de la gestació donen tumors de petita grandària. En aquest període els cossos embrioids han rebut menys estímuls inductors positius que en els casos precedents. Els estímuls inductors podrien guardar relació amb el manteniment de l'estat gestacional.

20. Els resultats obtinguts indiquen que davant la gestació el creixement dels cossos embrioids del teratocarcinoma pot veure's controlat. L'estudi dels components de l'ambient gestacional pot ser d'utilitat per a modular experimentalment el creixement de les cèl.lules neoplàsiques.

BIBLIOGRAFIA

ABRAHAMSOHN, P.A. (1983) Ultrastructural study of the mouse antimesometrial decidua. *Anat. Embryol.* 166, 263-267.

AITKEN, R.J. (1977) Embryonic diapause. En: *Development in mammals*. Vol. 1. M.H. Johnson (ed.). North-Holland, Amsterdam. pp. 307-359.

ALDERSON, J.C.E. i GREEN, C. (1975) Enrichment of lymphocytes with cholesterol and its effect on lymphocyte activation. *FEBS Letters*, 52, 208-211.

ALKEMADE, P.P.H. (1976) Congenital teratoma of the orbit. *Ophthalmologica*, 173, 274-285.

ALLEN, H.H. i NISKER, J.A. (1986) *Cancer in pregnancy. Therapeutica guidelines*. Futura Publishing Company Inc. Mount Kisco, New York.

ANDERSON, W., KANG, Y. i DE SOMBRE, E. (1975) Endogenous peroxidase: specific marker enzyme for tissue displaying growth dependency on estrogen. *J. Cell. Biol.* 64, 668-681.

ANDREWS, P.W., GOODFELLOW, L.H., SHEVINSKY, D.L., BRONSON, L. i KNOWLES, B.B. (1982) Cell surface antigens of a clonal human embryonal carcinoma cell lines: Morphological and antigenic differentiation in culture. *Int. J. Cancer*, 29, 523-529.

ANZANO, M.A., ROBERTS, A.B., SMITH, J.M., SPORN, M.B. i DE LARCO, J.E. (1980) Sarcoma growth factor from conditioned medium of virally transformed cells is composed of both type α and type β transforming growth factors. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 80, 6264-6268.

ANZANO, M.A., ROBERTS, A.B., MEYES, C.A., KOMORRMO, A., LAMB, L.C., SMITH, J.M. i SPORN, M.B. (1982) Synergistic interaction of two classes of transforming growth factors from murine sarcoma cells. Cancer Res. 42, 4776-4778.

ARTZT, K., BENNET, D. i JACOB, F. (1974) Primitive teratocarcinoma cells express a differentiation antigen specified by a gene at T-locus in the mouse. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 71, 811-814.

ARTZT, K., HAMBURGER, L., JAKOB, H. i JACOB, F. (1976) Embryonic surface antigens: a "quasi-endodermal" teratoma antigen. Dev. Biol. 51, 152-157.

ARTZT, K., DUBOIS, P., BENNETT, D., CONDAMINE, H., BABINET, C. i JACOB, F. (1973) Surface antigens common to mouse cleavage embryos and primitive teratocarcinoma cells in culture. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 70, 2988-2992.

ASCHE, W., COLLETTA, G., WARNECKE, G., NOBIS, P., PENNIE, S., KING, R.M. i OSTERTAG, W. (1984) Lack of retroviruses

gene expression in somatic cell hybrids of Friend cells and teratocarcinoma cells with a teratocarcinoma phenotype. *Mol. Cell Biol.* 4, 923-930.

AUSTIN, C.R. i BISHOP, M.W.H. (1959) Differential fluorescence in living rat eggs treated with acridine orange. *Exp. Cell Res.* 17, 35-43.

BALAKIER, H. i PEDERSEN, R.A. (1982) Allocation of cells to inner cell mass and trophectoderm lineages in preimplantation mouse embryos. *Dev. Biol.* 90, 352-362.

BEER, A.E. i BILLINGHAM, R.E. (1974) The embryo as a trasplant. *Scientific American*. April. 11-19.

BERGERON, J.J.M., WARMSLEY, A.M.H. i PASTERNAK, C.A. (1970) Phospholipid synthesis and degradation during the life cycle of P815Y mast cells synchronised with excess of thymidine. *Biochem. J.* 119, 489-492.

BERLING, C. (1982) Estrógenos. En: *Endocrinología de la gestación*. F. Fuchs i A. Klopper (eds.) Salvat Editores S.A. Barcelona. pp. 83-107.

BIGGERS, J.D. i BORLAND, R.M. (1976) Physiological aspects of growth and differentiation of the preimplantation mammalian embryo. *Ann. Rev. Physiol.* 38, 95-119.

BIGGERS, J.D., BORLAND, R.M. i POWERS, R.D. (1977) Transport mechanisms in the preimplantation mammalian embryo. En: The freezing of mammalian embryos. Ciba Fdn. Symp. No. 52 (New Series). Elsevier/North-Holland, Amsterdam. pp. 129-146.

BILLINGHAM, R.E. i SILVERS, W.K. (1967) Studies on the conservation of epidermal specificities of skin and certain mucosas in adult mammals. J. Exp. Med. 125, 429-446.

BITTNER, M., KUPFERER, P. i MORRIS, C.F. (1980) Electrophoretic transfer of proteins and nucleic acids from slab gels to diazobenzyloxymethyl cellulose or nitrocellulose sheets. Anal. Biochem. 102, 459-471.

BLOCH, S. (1966) Beobachtungen zur wechselwirkung zwischen keim und uterus bei de ovo-implantation. Acta. Anat. 65, 594-605.

BLOOM, W. i FAWCETT, D.W. (1975) A textbook of histology, 10th ed. Philadelphia: Saunders. pp. 386-426.

BLUMBERG, S. i TAL, N. (1976) Effect of divalent metal ions on the digestability of concavalin A by endopeptidases. Biochem. Biophys. Acta, 453, 357-364.

BORLAND, R.M. i TASCA, R.J. (1974) Activation of a Na⁺-dependent amino acid transport system in preimplantation mouse embryos. Dev. Biol. 36, 169-183.

BÖVING, B.G. (1956) Rabbit blastocyst distribution. Am. J. Anat. 98, 403-434.

BRAWN, P.N. (1983) The origin of germ cell tumors of the testis. Cancer 51, 1610-1614.

BRÖKELMANN, J. i BIGGERS, J.D. (1979) Studies on the development of cell contacts and of the intercellular matrix during decidualization in the rat. Arch. Gynaek. 227, 103-117.

BUC-CARON, M.M., GACHELIN, G., HOFNUNG, M. i JACOB, F. (1974) Presence of mouse embryonic antigen on human spermatozoa. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 71, 1730-1733.

BULLOCK, D.W., KAO, L.W.L. i YOUNG, C.E. (1981) Mechanisms of induction of uterine protein synthesis. Hormonal regulation of uteroglobin. En: Cellular and molecular aspects of implantation. S.R. Glasser i D.W. Bullock (eds.), Plenum Press. New York. pp. 257-268.

BURNETTE, W.N. (1981) "Western Blotting": Electrophoretic transfer of protein from sodium dodecyl sulfate

polyacrilamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal. Biochem.* 112, 195-203.

CALARCO, P.G. i BROWN, E.A. (1969) An ultrastructural and cytological study of preimplantation development of the mouse. *J. exp. Zool.* 171, 253-284.

CALARCO, P.G. i EPSTEIN, C.J. (1973) Cell surface changes during preimplantation development in the mouse. *Dev. Biol.* 32, 208-213.

CARPENTER, S.J. (1980) Placental permeability during early gestation in the hamster. Electron microscopic observations using horseradish peroxidase as a macromolecular tracer. *Anat. rec.* 197, 221-238.

CHAO, M.V., MELCON, P., MANIATIS, T. i AXEL, R. (1983) The regulated expression of β -globin genes introduced into mouse erythroleukaemia cells. *Cell*, 32, 483-493.

CHAPMAN, V., FORESTER, L., SANFORD, J., HOSTIL, N. i ROSSANT, J. (1984) Cell lineage-specific under methylation of mouse repetitive DNA. *Nature*, 307, 284-286.

CHISHOLM, J.C., JOHNSON, M.H., WARREN, P.D., FLEMING, T.P. i PICKERING, S.J. (1985) Developmental variability within and

between mouse expanding blastocysts and their ICMS. *J. Embryol. exp. Morph.* 86, 311-336.

CIFONE, M. i FIDLER, I.J. (1981) Increasing metastatic potential is associated with increasing genetic instability of clones isolated from murine neoplasms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78, 6249-6252.

COLLINS, D.H. i PUGH, R.C.B. (1964) The pathology of testicular tumours. E.S. Livingstone Edinburgh.

CRENSOT, F., ACS, G. i CHRISTENAN, J.K. (1982) Inhibition of DNA methyltransferase and induction of Friend erythroleukemia cell differentiation by 5-azacytidine and 5-aza-2'-deoxy-cytidine. *J. Biol. Chem.* 257, 2041-2048.

CRISSMAN, J.D., HATFIELD, J.S. i HONN, K.V. (1985) Clinical and experimental morphologic parameters predictive of tumor metastasis. En: *Cancer metastasis. Experimental and clinical strategies.* D.R. Welch, B.K. Bhuyan i L.A. Liotta (eds.). Alan. R. Liss, Inc., New York. pp. 251-265.

CRUZ, Y.P. i PEDERSEN, R.A. (1985) Cell fate in the polar trophectoderm of mouse blastocysts as studied by microinjection of cell lineage tracers. *Dev. Biol.* 112, 73-83.



DALCQ, A.M. (1957) Introduction to general embryology. Oxford Univ. Press (Clarendon) London/New York.

DAMJANOV, I. (1983) The pathology of human teratomas. En: The human teratomas experimental and clinical biology. I. Damjanov, B.B. Knowles i D. Solter (eds.), Human Press. Clifton-New Jersey. pp. 23-54.

DAMJANOV, I. i SOLTER, D. (1974) Experimental teratomas. Curr. Top. Pathol. 59, 69-130.

DAMJANOV, I. i SOLTER, D. (1975) Ultrastructure of murine teratocarcinomas. En: Teratomas and differentiation. M.I. Sherman i D. Solter (eds.). Acad. Press. New York. pp. 209-220.

DAMJANOV, I., BAGASRA, O. i SOLTER, D. (1983) Genetic and epigenetic factors regulate the evolving malignancy of embryo-derived teratomas. En: Teratocarcinoma stem cells. L.M. Silver, G.R. Martin i S. Strickland (eds.), Cold Spring Harbor Laboratory.

DAMJANOV, I., SOLTER, D. i SKREB, N. (1971) Teratocarcinogenesis as related to the age of embryos grafted under the kidney capsule. Wilhem Roux'Archiv für Entwick lungs mechanik der Organismen. 167, 288-290.

DARNEL, J.F. (1982) Variety in the level of gene control in eukaryotic cells. *Nature*, 297, 365-371.

DAWSON, R.M.C. (1973) The exchange of phospholipids between cell-membranes. *Subcellular Biochem.* 2, 69-89.

DE BLAS, A.L. i CHERWINSKI, A.P. (1983) Detection of antigens on nitrocellulose paper immunoblots with monoclonal antibodies. *Anal. Biochem.* 133, 214-219.

DEMEL, R.A. i DE KRUYFF, B. (1976) The function of sterols in membranes. *Biochim. Biophys. Acta*, 457, 109-132.

DENKER, H.W. (1983) Cell lineage, determination and differentiation in earliest developmental stages in mammals. *Bibliothca. anal.* 24, 22-58. Karger, Basel.

DERYNCK, R., GOEDEL, D.V., ULLRICH, A., GUTTERMAN, J.U., WILLIAMS, R.D., BRINGMAN, T.S. i BERGER, W.H. (1987) Synthesis of messengers RNAs for transforming growth factors α and β and the epidermal growth factor receptor by human tumors. *Cancer Res.* 47, 707-712.

DHINDSA, D.S., DZIUK, P.J. i NORTON, H.W. (1967) Time of transuterine migration and distribution of embryos in the pig. *Anat. Rec.* 159, 325-330.

DICKMANN, Z., DEY, S.K. i GUPTA, J.S. (1976) A new concept: control of early pregnancy by steroid hormones originating in the preimplantation embryo. *Vita. Horm.* 34, 215-242.

DICZFALUSY, E. (1962) Endocrinology of the foetus. *Acta Obstet. Gynecol. Scand.* (Suppl. 1), 41, 45-48.

DISCHE, M.R. i GARDNER, H.A. (1978) Mixed tumors of the liver and neck in trisomy 13. *Am. J. Clin. Pathol.* 69, 631-637.

DOENFLER, W. (1983) DNA methylation and gene activity. *Annu. rev. Biochem.* 52, 93-124.

DRABIKOWSKI, W., GRABAREK, Z. i BARYLKO, B. (1977) Degradation of TN-C component of troponin by trypsin. *Biochem. Biophys. Acta*, 490, 216-224.

DUCIBELLA, T. (1977) Surface changes in the developing trophoblast cell. En: *Development in mammals*, Vol. 1. M.H. Johnson (ed.). Elsevier/North-Holand, Amsterdam. pp.132-142.

DUCIBELLA, T. i ANDERSON, E. (1975) Cell shape and membrane changes in the 8-cell mouse embryo. Prerequisites for morphogenesis of the blastocyst. *Dev. Biol.* 47, 45-48.

DUCIBELLA, T., ALBERTINI, D.F., ANDERSON, E. i BIGGERS, J.D.
(1975) The preimplantation mammalian embryo: Characterisation of intercellular junctions and their appearance during development. Dev. Biol. 45, 231-250.

DUCIBELLA, T., UKENA, T., KARNOVSKY, M. i ANDERSON, E.
(1977) Changes in cell shape and cortical cytoplasmic organisation during embryogenesis of the preimplantation mouse embryo. J. Cell Biol. 74, 153-167.

DURAN I REYNALS, F. (1929) Introducció a l'estudi del càncer. Monografies Mèdiques 27, primer volum. Barcelona.

DZIADEK, M. (1978) Modulation of alphafoetoprotein in the early postimplantation mouse embryos. J. Embryol. exp. Morph. 46, 135-146.

DZIADEK, M. (1979) Cell differentiation in isolated inner cell masses of mouse blastocysts *in vitro*: onset of specific gene expression. J. Embryol. exp. Morph. 53, 367-379.

DZIADEK, M. i ADAMSON, E. (1978) Localization and synthesis of alphafoetoprotein in post-implantation mouse embryos. J. Embryol. exp. Morph. 43, 289-313.

EDIDIN, M. (1976) The appearance of cell-surface antigens in the development of the mouse embryo: a study of cell surface

differentiation. En: Embryogenesis in mammals. CIBA Fdn. Symp. No. 40 (New Series). Elsevier, Amsterdam. pp. 177-194.

EL-SHERSHABY, A.M. i HINCHIFFE, J.R. (1975) Epithelial autolysis during implantation of the mouse blastocyst: An ultrastructural study. J. Embryol. exp. Morphol. 33, 1067-1080.

ENDERS, A.C. (1975) The implantation chamber, blastocyst and blastocyst imprint of the rat: a scanning electron microscope study. Anat. Rec. 182, 137-150.

ENDERS, A.C. (1976) Anatomical aspects of implantation. J. Reprod. Fert. suppl. 25, 1-15.

ENDERS, A.C. i GIVEN, R.L. (1977) The endometrium of delayed and early implantation. En: Biology of the uterus. R.M. Wynn (ed.) Plenum Press, New York. pp. 203-243.

ENDERS, A.C. i SCHLAFKE, S. (1967) A morphological analysis of the early implantation states in the rat. Am. J. Anat. 120, 185-226.

ENGEL, R.M., ELKINS, R.C. i FLETCHER, B.D. (1968) Retroperitoneal teratoma. Review of the literature and presentation of an unusual case. Cancer, 22, 1068-1073.

ENGSTROM, W., REES, A.R. i HEATH, J.K. (1985) Proliferation of a human embryonal carcinoma-derived cell line in serum-free medium inter-relationship between growth factors requirements and membrane receptor expression. *J. Cell Sci.* 73, 361-373.

FAINSTAT, T. (1963) Extracellular studies of the uterus. I. Disappearance of the discrete collagen bundles in endometrial stroma during various reproductive states in the rat. *Am. J. Anat.* 112, 337-369.

FAUVE, R., HEVIN, B., JACOB, H. i JACOB, F. (1974) Antiinflammatory effect of murine malignant cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 71, 4052-4057.

FENTIMAN, I.J. i TAYLOR-PAPADIMITRION, J. (1977) Cultured human breast cancer cells lose selectivity in direct intercellular communication. *Nature*, 269, 156-158.

FIDLER, I.J. i BERENDT, M.J. (1982) The biological diversity of malignant neoplasms. En: *Biological responses in cancer. Progress toward potential applications.* E. Mihich (ed.). Plenum Press, New York. pp. 269-295.

FIDLER, I.J. i HART, I.R. (1982) Biological diversity in metastatic neoplasms: origins and implications. *Science (Wash D.C.)*, 217, 998-1003.

FIDLER, I.J., GRUYS, E., CIFONE, M.A., BARNES, Z. i BUCANE, C. (1981) Demonstration of multiple phenotypic diversity in a murine melanoma of recent origin. *J. Natl. Cancer Inst.* 67, 947-956.

FINN, C.A. i MARTIN, L. (1972) endocrine control of the timing of endometrial sensitivity to a decidual stimulus. *Biol. Reprod.* 7, 82-88.

FINN, C.A. i LAWN, A.M. (1967) Specialized junctions between decidual cells in the uterus of the pregnant mouse. *J. Ultrastruct. Res.* 20, 321-327.

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. i PICKERING, S.J. (1985) Maturation and polarization of the endocytotic system in outside blastomeres during mouse preimplantation development. *J. Embryol. exp. Morph.* 89, 175-208.

FLEMING, T.P., WARREN, P.D., CHISHOLM, J.C. i JOHNSON, M.H. (1984) Trophoctodermal processes regulate the expression of totipotency within the inner cell mass of the mouse expanding blastocyst. *J. Embryol. exp. Morph.* 84, 63-90.

FOLKMAN, J. (1975) Tumor angiogenesis. En: Cancer: A comprehensive treatise biology of tumors: Cellular biology and growth. Vol. 3. F.F. Becker (ed.). Plenum Press, New York. pp. 355-388.

FOLKMAN, J. (1976) The vascularization of tumors. *Sci. Am.* 234, 59-73.

FROST, P. i KERBEL, R.S. (1983) A possible epigenetic mechanism of tumor progression: the role of DNA hypomethylation. *Cancer Metastasis Rev.* 2, 375-379.

FROST, P. i KERBEL, R.S. (1984) On the possible epigenetic mechanism(s) of tumor cell heterogeneity. *Cancer Metastasis Rev.* 4, 145-149.

FUCHS, A.R. (1982) Prostaglandinas. En: *Endocrinología de la gestación*. F. Fuchs i A. Klopper (eds.). Salvat editores S.A. Barcelona. pp. 329-364.

FULTON, A.M., LOVELESS, S.E. i HEPPNER, G.H. (1984) Mutagenic activity of tumor-associated macrophages in *Salmonella typhimurium* strains TA98 and TA100. *Cancer Res.* 44, 4308-4311.

FURIE, B. i FURIE, B.C. (1979) Conformation specific antibodies as probes of the carboxyglutamic acid-rich region of bovine prothrombin. *J. Biol. Chem.* 254, 9766-9771.

GACHELIN, M., KEMLER, R., KELLY, F. i JACOB, F. (1977) PCC4 a new cell surface antigen common to multipotential embryonal carcinoma cells, spermatozoa and mouse early embryos. *Dev. Biol.* 57, 199-209.

GARDNER, R.L. (1968) Mouse chimaeras obtained by the injection of cells into the blastocyst. *Nature*, 220, 596-597.

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

GARDNER, R.L. i PAPAIOANNOU, V.E. (1975) Differentiation in the trophectoderm and inner cell mass. In: The early development of mammals. M. Balls i A.E. Wild (eds.). Cambridge University Press. London. pp. 107-132.

GARDNER, R.L., PAPAIOANNOU, V.E. i BARTON, S.C. (1973) Origin of the ectoplacental cone and secondary giant cells in mouse blastocysts reconstituted from isolated trophoblast and inner cell mass. *J. Embryol. exp. Morph.* 30, 561-572.

GAUTSCH, J.W. i WILSON, M.C. (1983) Delayed *de novo* methylation in teratocarcinoma suggests additional tissue-specific mechanism for controlling gene expression. *Nature*. 301, 32-37.

GERSHONI, J.M. i PALADE, G.E. (1982) Electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to a positively charged membrane filter. *Anal. Biochem.* 124, 396-405.

GIVEN, R.L. i ENDERS, A.C. (1980) Mouse uterine gland during periimplantation period: fine structure. *Am. J. Anat.* 157, 169-179.

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

GLASSER, S.R., CLARK, J.H., SMITH, R.G. i O'MALLEY, B.W. (1982) Mecanismo de acción de las hormonas esteroideas. En: *Endocrinología de la gestación*. F. Fuchs i A. Klopper (eds.). Salvat Editores S.A. Barcelona. pp. 17-44.

GOODGIN, L.R. i EDIDIN, M. (1974) Cell surface antigens of a mouse testicular teratoma. Identification of an antigen

physically associated with H-2 antigens on tumor cells. J. Exp. Medicine. 140, 61-78.

GOSPODAROWICZ, D., GREENBURG, G. i BIRDWELL, C. (1978) Determination of cellular shape by the extracellular matrix and its correlation with the control of cellular growth. Cancer Res. 38, 4155-4171.

GOSPODAROWICZ, D., MESCHER, A.L. i BIRDWELL, C.R. (1978) Control of cellular proliferation by the fibroblasts and epidermal growth factors. Natl. Cancer Inst. Monogr. 48, 109-130.

GOSS, R.J. (1978) The physiology of growth. Academic Press. New York, pp. 120-137.

GRIFFEN, J.E., ALLMAN, D.R., DURRANT, J.L. i WILSON, J.D. (1981) Variation in steroid 5 α -reductase activity in clonal human skin fibroblasts. J. Biol. Chem. 256, 3662-3666.

GROBSTEIN, C. (1967) Mechanisms of organogenetic tissue interaction. Cancer Inst. Monograph. 26, 279-299.

GROBSTEIN, C. (1975) Developmental role of intercellular matrix: retrospective and prospective. En: Extracellular matrix influences on gene expression. H.C. Slavkin i R.C. Grenlich (eds.). Academic Press, New York, pp. 804-814.

GUILLOMOT, M. i GUAY, P. (1982) Ultrastructural features of the cell surfaces of uterine and trophoblastic epithelia during embryo attachment in the cow. *Anat. Rec.* 204, 315-322.

HAMILTON, M.S., HELLSTRÖM, I. i VAN BELLE, G. (1976) Cell mediated immunity to embryonic antigens of syngeneically and allogeneically mated mice. *Transplantation*, 21, 261-267.

HANDYSIDE, A.H. (1978) Time of commitment of inside cells isolated from preimplantation mouse embryos. *J. Embryol. exp. Morph.* 45, 37-53.

HANDYSIDE, A.H. (1980) Distribution of antibody- and lectin-binding sites on dissociated blastomeres from mouse morulae: Evidence for polarization at compactation. *J. Embryol. exp. Morph.* 60, 99-116.

HART, I.R. (1979) Selection and characterization of an invasive variant of the B16 melanoma. *Am. J. Pathol.* 97, 587-600.

HEAP, R.B., FLINT, A.P.F. i GADSBY, J.E. (1981) Embryonic signals and maternal recognition. En: *Cellular and molecular aspects of implantation*. S.R. Glasser i D.W. Bullock (eds.). Plenum Press, New York. pp. 311-334.

HEDRICK, S.M., COHEN, D.I., NIELSON, E.A. i DAVIES, M.M. (1984) isolation of cDNA clones encoding T cell-specific membrane-associated proteins. *Nature*, 308, 149-153.

HELDIN, C.H. i WESTERMARK, B. (1984) Growth factors: Mechanism of action and relation to oncogenes. *Cell*, 37, 9-20.

HENELL, F., ERICSSON, J.L. i GLAUMANN, H. (1983) An electron microscopic study of the post-partum involution of the rat uterus with a note on apparent crinophagy of collagen. *Virchows Arch. (Cell Pathol.)* 42, 271-287.

HEPPNER, G.H. (1984) Tumor heterogeneity. *Cancer Res.* 44, 2259-2265.

HEPPNER, G.H., YAMASHIDE, K., MILLER, B. i MILLER, F. (1986) Tumor heterogeneity in metastasis. En: *Cancer metastasis experimental and clinical strategies*. D.R. Welch, B.K. Bhuyan i L.A. Liotta (eds.). Alan R. Liss, Inc., New York. pp. 45-55.

HERSCHMAN, H.R., SORRENTINO, J.M., BUTLER-GRALLA, E.R. i CAWLEY, D.B. (1982) Isolation and characterization of variants of 3T3 cells deficient in a proliferative response to specific mitogens. En: *Maturation factors and cancer*. M.A.S. Moore (ed.). Raven Press, New York. pp. 41-55.

HETHERINGTON, C.M. (1973) Carbonic anhydrase activity in the mouse uterus during pregnancy, pseudopregnancy and lactation. *Fertil. Steril.*, 24, 104-106.

HEYDERMAN, E. (1983) Biological markers of human teratomas and related germ cell tumors. En: *The human teratomas. Experimental and clinical biology*. I. Damjanov, B.B. Knowles i D. Solter (eds.). Human Press, Clifton-New Jersey. pp. 191-207.

HILLMAN, N., SHERMAN, M.I. i GRAHAM, C.F. (1972) The effect of spatial arrangement on cell determination during mouse development. *J. Embryol. exp. Morph.* 28, 263-278.

HINCHLIFFE, J.R. i EL-SHERSHABY, A.M. (1975) Epithelial cell death in the oil-induced decidual reaction of pseudopregnant mouse: An ultrastructural study. *J. Reprod. Fertil.* 45, 463-468.

HO, H.C., DESAI, R. i WANG, J.H. (1975) Effect of Ca^{2+} on the stability of the protein activator of cyclic nucleotide phosphodiesterase. *FEBS Letters*, 50, 374-377.

HOGAN, B. (1977) *In vitro* culture and differentiation of normal mouse blastocyst. *Nature*, 256, 626-629.

HOLLIDAY, R. (1979) A new theory of carcinogenesis. Br. J. Cancer 40, 513-522.

HOPE, M.J., BRUCKDORFER, D.R., HART, C.A. i LUCY, J.A. (1977) Membrane cholesterol and cell fusion of hen and guinea-pig erythrocytes. Biochem. J. 166, 255-263.

HOPPE, P.C. i ILLMENSEE, K. (1982) Full-term development after transplantation of parthenogenetic embryonic nuclei into fertilized mouse eggs. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 79, 1912-1916.

HORWITZ, A.F., WIGHT, A., LUDWIG, P. i CORNELL, R. (1978) Interrelated lipid alterations and their influence on the proliferation and fusion of cultured myogenic cells. J. Cell Biol. 77, 334-356.

HOWE, G.N.S. (1975) Lymphocyte during pregnancy. Immunobiology of trophoblast. Cambridge University Press, 149-150.

HSU, Y. (1972) Differentiation *in vitro* of mouse embryos beyond the implantation stage. Nature, 239, 200-202.

HSU, Y. (1973) Differentiation *in vitro* of mouse embryos to the stage of early somite. Dev. Biol. 33, 403-431.

HSU, Y. (1978) *In vitro* development of whole mouse embryos. En: Methods of mammalian reproduction. J. Daniel, Jr. (ed.). Academic Press, New York. pp. 229-245.

HSU, Y. (1979) *In vitro* development of individually cultured whole mouse embryos from blastocyst to early somite stage. Dev. Biol. 68, 453-461.

HSU, Y. (1981) Time-lapse cinematography of mouse embryo development from blastocyst to early somite stage. En: Cellular and molecular aspects of implantation. S.R. Glasser i D.W. Bullock (eds.). Plenum Press, New York. pp. 383-393.

HSU, Y., BASKAR, J., STEVENS, L. i RASH, J. (1974) Development *in vitro* of mouse embryos from the two-cell egg stage to the early somite stage. J. Embryol. exp. Morph. 31, 235-245.

HUFF, R.L. i EIK-NESS, K.B. (1966) Metabolism *in vitro* of acetate and certain steroids by six-day-old rabbit blastocysts. J. Reprod. Fert. 11, 57-63.

HYAFIL, F., BABINET, C. i JACOB, F. (1981) Cell-cell interactions in early embryogenesis: a molecular approach to the role of calcium. Cell, 26, 447-454.

HYAFIL, F., MORELLO, D., BABINET, C. i JACOB, F. (1980) A cell surface glycoprotein involved in the compactation of embryonal carcinoma cells and cleavage stage embryos. *Cell*, 21, 927-934.

IANNACONE, P.M., GARDNER, R.L. i HARRIS, H. (1978) The cellular origin of chemically induced tumors. *J. Cell Sci.* 29, 249-255.

ILLMENSEE, K. i MINTZ, B. (1976) Totipotency and normal differentiation of single teratocarcinoma cell cloned by injection into blastocysts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 73, 549-553.

INOUE, S., IYAMA, K. i USUKU, G. (1983) A freeze-fracture study of two types of collagen-phagocytosis cell in the post-partum rat endometrium. *Virchows Arch. (Cell Pathol.)*, 42, 243-249.

INOUE, S., IYAMA, K., ARAKI, C. i USUKU, G. (1983) Phagocytosis of cytoplasmic blubs deriveds from smooth muscle cells by fibroblast-like cells and macrophages in the post-partum rat uterus. *Virchows Arch. (Cell Pathol.)*, 42, 235-242.

ISAACS, J.T., WAKE, N., COFFEY, D.S. i SANDBERG, A.A. (1982) Genetic instability coupled to clonal selection as a

mechanism for tumor progression in the Dunning R-3327 rat prostatic adenocarcinoma system. *Cancer Res.* 42, 2353-2361.

IZQUIERDO, L. (1977) Cleavage and differentiation. En: *Development in mammals*. Vol. 2. M.H. Johnson (ed.). Elsevier/North-Holland, Amsterdam. pp. 99-118.

JACOB, F. (1975) Mouse teratocarcinoma as a tool for the study of the mouse embryo. En: *The early development of mammals*. M. Balls i A.E. Wild (eds.). Cambridge University Press, London. pp. 233-241.

JACOB, F. (1977) Mouse teratocarcinoma and embryonic antigens. *Immunol. Rev.* 33, 3-32.

JAMI, J. i RITZ, E. (1974) Multipotentiality of single cells of transplantable teratocarcinomas derived from mouse embryo grafts. *J. nat. Cancer Inst.* 52, 1547-1552.

JAVADPOUR, N. (1980a) Tumor markers in urologic cancer. *Urology*, 16, 127-136.

JAVADPOUR, N. (1980b) The role of biologic tumor markers in testicular cancer. *Cancer*, 45, 1755-1761.

JENKINSON, E.J. i WILLSON, I.B. (1970) *In vitro* support system for the study of blastocyst differentiation in the mouse. *Nature*, 228, 776-778.

JOHNSON, M.H. (1979) Intrinsic and extrinsic factors in preimplantation development. *J. Reprod. Fert.* 55, 255-265.

JOHNSON, M.H. (1986) Manipulation of early mammalian development: what does it tell us about cell lineages?. En: *Manipulation of mammalian development*. R.B.L. Gwatkin (ed.). Plenum. New York/London. pp. 277-295.

JOHNSON, M.H. i ZIOMEK, C.A. (1981) The foundation of two distinct cell lineages within the mouse morula. *Cell*, 24, 71-80.

JOHNSON, M.H. i ZIOMEK, C.A. (1983) Cell interactions influence the fate of mouse blastomeres undergoing the transition from the 16- to the 32-cell stage. *Dev. Biol.* 95, 211-218.

JOHNSON, M.H., HANDYSIDE, A.H. i BRAUDE, P.R. (1977) Control mechanisms in early mammalian development. En: *Development in mammals*. Vol. 2. M.H. Johnson (ed.). Elsevier/North-Holand, Amsterdam. pp. 67-97.

JOHNSON, M.H., PRATT, H.P.M. i HANDYSIDE, A.H. (1981) The generation and recognition of positional information in the preimplantation mouse embryo. En: Cellular and molecular aspects of implantation. S.R. Glasser i D.W. Bullock (eds.). Plenum Press, New York. pp. 55-75.

JOHNSON, M.H., CHAKRABORTY, J., HANDYSIDE, A.H., WILLISON, K. i STERN, P. (1979) The effect of prolonged decompaction on the development of the preimplantation mouse embryo. J. Embryol. exp. Morph. 54, 241-261.

JOLLIE, W.P. (1986) Ultrastructural studies of protein transfer across rodent yolk sac. Placenta, 7, 263-281.

JONES, B.M. i KEMP, R.B. (1969) Self-isolation of the foetal trophoblast. Nature, 221, 829-831.

KAKUNAGA, T. i CROW, J.D. (1980) Cell variants showing differential susceptibility to ultraviolet light-induced transformation. Science (Wash. D.C.), 209, 505-507.

KANE, M.T. i HEADON, D.R. (1980) The role of commercial bovine serum albumin preparations in the culture of one-cell rabbit embryos to blastocysts. J. Reprod. Fertil. 60, 469-475.

KATZ, S. i ABRAMSON, P.A. (1981) Ultrastructural observations on the involution of the mouse antimesometrial decidua. Abstracts of the sixth European Anatomical. Congres. Acta anat. 11, 7273-7279.

KELLY, S.J. (1975) Studies of potency of the early cleavage blastomeres of the mouse. En: The early development of mammals. M. Balls i A.E. Wild (eds.). Cambridge University Press. London. pp. 97-105.

KELLY, S.J. (1977) Studies of the developmental potential of 4- and 8-cell stage mouse blastomeres. J. Exp. Zool. 200, 365-376.

KEMLER, R., BABINET, C., EISEN, H. i JACOB, F. (1977) Surface antigen in early differentiation. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 74, 4449-4452.

KEMLER, R., BABINET, C., CONDAMINE, H., GACHELIN, G., GUENET, J.L. i JACOB, F. (1976) Embryonal carcinoma antigen and the T/t locus of the mouse. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 73, 4080-4084.

KENNEDY, T.G. (1983) Embryonic signals and the initiation of blastocyst implantation. Aust. J. Biol. 36, 531-543.

KENNEDY, T.G. (1986) Intrauterine infusion of prostaglandins and decidualization in rats with uteri differentially sensitized for decidual cell reaction. Biol. Rep. 34, 327-335.

KENNEDY, T.G. i ARMSTRONG, D.T. (1981) The role of prostaglandins in endometrial vascular changes at implantation. En: Cellular and molecular aspects of implantation. S.R. Glasser i D.W. Bullock (eds.). Plenum Press. New York. pp. 349-363.

KERBEL, R.S. i DAVIES, A.J.S. (1982) Facilitation of tumor progression by cancer chemotherapy. Lancet, ii, 977-978.

KERBEL, R.S., LITEPLO, R. i FROST, P. (1986) On the possible contibution of DNA hypomethylation to the induction of high frequency and heritable drug-induced alterations in the malignant phenotype. En: Cancer Metastasis. Experimental and clinical strategies. D.R. Welch, B.K. Bhuyan i L.A. Liotta (eds.). Alan R. Liss, Inc., New York. pp. 293-303.

KERBEL, R.S., DENNIS, J.W., LARGARDE, A.E. i FROST, P. (1982) Tumor progression in metastasis: an experimental approach using lectin resistant tumor variants. Cancer Metastasis Rev. 1, 99-140.

KERBEL, R.S., FROST, P., LITEPLO, R., CARLOW, D.A. i ELLIOT, B.E. (1984) Possible epigenetic mechanism of tumor progression: Induction of high-frequency heritable but phenotypically inestable changes in the tumorigenic and metastatic properties of tumor cell populations by 5-azacytidine tractment. J. Cell Physiol. Supp. 3, 87-97.

KERR, J.F.R., WYLLIE, A.H. i CURRIE, A.R. (1972) Apoptosis: A biological phenomenon with wide ranging implications in tissue kinetics. Br. J. Cancer, 26, 239-257.

KIMBER, S.J., SURANI, M.A.H. i BARTON, S.C. (1982) Interactions of blastomeres suggest changes in cell surface adhesiveness during the formation of inner cell mass and trophectoderm in the preimplantation mouse embryo. J. Embryol. exp. Morph. 70, 133-152.

KIMELBERG, H.K. (1977) The influence of membrane fluidity on the activity of membrane bound enzymes. En: Dynamic aspects of cell surface organization. G. Poste i G.L. Nicolson (eds.). Elsevier, North Holland, Biomedical Press. pp. 205-279.

KIRBY, D.R.S. (1968) Transplantation and pregnancy. En: Human transplantation. F.I. Rapaport i J. Dausset (eds.). Grune and Stratton, New York, pp. 565-586.

KLEINFELD, R.G., MORROW, H.A. i DE FEO, V.J. (1976)
Intercellular junctions between decidual cells in the
growing deciduoma of the pseudopregnant uterus. Biol.
Reprod. 15, 593-603.

KLEINSMITH, L.J. i PIERCE, G.B., Jr., (1964)
Multipotentiality of simple embryonal carcinoma cells.
Cancer Res. 24, 1544-1552.

KLOPPER, A. i FUCHS, F. (1982) Progestágenos. En:
Endocrinología de la gestación. F. Fuchs i A. Klopper
(eds.). Salvat editores S.A. Barcelona. pp. 109-134.

KOCHHAR, D.M. (1975) The use of *in vitro* procedures in
teratology. Teratology, 11, 273-287.

KOHN, J. i RAJHAVAN, D. (1981) Tumour markers in malignant
germ-cell tumours. En: The management of testicular tumours.
M. Peckham (ed.). Edward Arnold. London. pp. 50-69.

KREHBIEL, R.H. (1937) Cytological studies of the decidual
reaction in the rat during pregnancy and in the production
of deciduomata. Physiol. Zool. 10, 212-238.

KRETSINGER, R.H. (1976) Calcium-binding proteins. Ann. Rev.
Biochem. 45, 239-266.

LAEMMLI, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-685.

LAJTHA, L.G. (1983) Stem cell concepts. En: Stem cells, their identification and characterisation. C.S. Potten (ed.). Churchill Livingstone, Edinburgh. pp. 1-11.

LEE, A.G. (1975) Functional properties of biological membranes. A physical chemical approach. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 29, 3-56.

LEJEUNE, B., LECOCQ, R., LAMY, F. & LEROY, F. (1982) Changes in the pattern of endometrial protein synthesis during decidualization in the rat. *J. Reprod. Fert.* 66, 519-523.

LEVINE, A.J., TOROSIAN, M., SAROKHAN, A.J. & TERESKY, A.K. (1974) Biochemical criteria for the *in vitro* differentiation of embryoid bodies produced by a transplantable teratoma of mice. The production of acetylcholinesterase and creatine phosphokinase by teratoma cells. *J. Cell Physiol.* 84, 311-317.

LICHTENSTEIN, L. & GOLDMAN, R.L. (1964) The cartilage analogue of fibromatosis: A reinterpretation of the condition called "juvenile aponeurotic fibroma". *Cancer*, 17, 810-816.

LIEDHOLM, D. i ASTEDT, B. (1975) Fibrinolytic activity of the rat ovum, appearance during tubal passage and disappearance at implantation. *Int. J. Fertil.* 20, 24-26.

LIN, T.P. (1966) Microinjection of mouse eggs. *Science*, 151, 333-337.

LINDER, D. (1983) The origin of teratomas. En: The human teratomas. *Experimental and clinical biology*. I. Damjanov, B.B. Knowles i D. Solter (eds.). Humana Press. Clifton-New Jersey. pp. 68-79.

LO, C.W. i GILULA, N.B. (1979) Gap junctional communication in the preimplantation mouse embryo. *Cell*, 18, 339-409.

LO, C.W. i GILULA, N.B. (1980a) PCC4azal teratocarcinoma stem cell differentiation in culture. I. Biochemical studies. *Dev. Biol.* 75, 78-92.

LO, C.W. i GILULA, N.B. (1980b) PCC4azal teratocarcinoma stem cell differentiation. II. Morphological characterization. *Dev. Biol.* 75, 93-111.

LO, C.W. i GILULA, N.B. (1980c) PCC4azal teratocarcinoma stem cell differentiation. III. Cell-to-cell communication properties. *Dev. Biol.* 75, 112-120.

LOEWENSTEIN, W.R. (1979) Junctional intercellular communication and the control of growth. *Biochim. Biophys. Acta*, 560, 1-65.

LOGEAT, F., SARTOR, P., HAI, M.T. i MILGROM, E. (1980) Local effect of the blastocyst on estrogen progesterone receptors in the rat endometrium. *Science*, 207, 1083-1085.

LOVELESS, S.E. i HEPPNER, G.H. (1983) Tumor-associated macrophages of mouse mammary tumors. I. Differential cytotoxicity of macrophages from metastatic and nonmetastatic tumors. *J. Immunol.* 131, 2074-2078.

LUNDKVIST, ö. (1978) Ultrastructural studies of the endometrial stromal cells in rats during estradiol-induced implantation after an experimental delay. *Biol. Reprod.* 18, 306-316.

LUNDKVIST, ö. i NILSSON, B.O. (1982) Endometrial ultrastructure in the early uterine response to blastocysts and artificial decidualogenic stimuli in rats. *Cell Tissue Res.* 225, 355-364.

LUNDKVIST, ö. i NILSSON, B.O. (1984) Ultrastructural studies of the temporal relationship between loss of zona pellucida and appearance of blastocyst-induced stromal changes during normal pregnancy in rats. *Anat. Embryol.* 170, 45-49.

LUNDKVIST, Ö., NILSSON, B.O. i BERGSTRÖM, S. (1979) Studies on the trophoblast-epithelial complex during decidual induction in rats. *Am. J. Anat.* 154, 211-230.

LUTWAK-MANN, C. (1954) The occurrence of carbonic anhydrase in the rabbit uterus. *J. Endocr.* 11, X1 (abstr.).

MAGNUSON, T., JACOBSON, J.B. i STACKPOLE, C.W. (1978) Relationship between intercellular permeability and junction organisation in the preimplantation mouse embryo. *Dev. Biol.* 67, 214-224.

MAHONEY, K.H., FULTON, A.M. i HEPPNER, G.H. (1983) Tumor-associated-macrophages of mouse mammary tumors. II. Differential distribution of macrophages from metastatic and nonmetastatic tumors. *J. Immunol.* 131, 2079-2085.

MANN, K. i KARL, H.J. (1983) Molecular heterogeneity of human chorionic gonadotropin and its subunits in testicular cancer. *Cancer*, 52, 654-660.

MARKEE, J.E. (1944) Intrauterine distribution of ova in the rabbit. *Anat. Rec.* 88, 329-336.

MARO, B., JOHNSON, M.H., PICKERING, S.J. i LOUVARD, D. (1985) Changes in the distribution of membranous organelles

during mouse early development. J. Embryol. exp. Morph. 90, 287-309.

MAROUDAS, N.G. (1973) Chemical and mechanical requirement for fibroblast adhesion. Nature, 244, 353-354.

MARTELLO, E.M.V.G. i ABRAHAMSOHN, P.A. (1986) Collagen distribution in the mouse endometrium during decidualization. Acta anat. 127, 146-150.

MARTIN, G.R. i EVANS, M.J. (1975a) The formation of embryoid bodies *in vitro* by homogeneous embryonal carcinoma cells cultures derived from isolated simple cells. En: Roche Symposium on Teratomas and Differentiation. M.I. Sherman i D. Solter (eds.), Academic Press, New York. pp. 169-187.

MARTIN, G.R. i EVANS, N.J. (1975b) The differentiation of clonal lines of teratocarcinoma cells: formation of embryoid bodies *in vitro*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 72, 1441-1445.

MARTINI, J., GOLBEY, R.M., HAJDU, S.I., WHITMORE, W.F. i BEATTIE, E.J. (1974) Primary mediastinal germ cell tumors. cancer, 33, 763-769.

MASLAR, I.A., POWERS-CRADDOCK, P. i ANSBACHER, R. (1986) Decidua prolactin production by organ cultures of human

endometrium: effects of continuous and intermittent progesterone treatment. Biol. Rep. 34, 741-750.

MAZANEC, K. i DVORAK, M. (1963) On the submicroscopical changes of the segmenting ovum in the albino rat. Cesk. Morfol. 11, 103-108.

McGRATH, J. i SOLTER, D. (1984) Completion of mouse embryogenesis requires both the maternal and paternal genomes. Cell, 37, 179-183.

McLAREN, A. i HENSLEIGH, H.C. (1975) Culture of mammalian embryos over the implantation period. En: The early development of mammals. M. Balls i A.E. Wild (eds.). Cambridge Universiti Press, London. pp. 45-60.

McLAREN, A. i SMITH, R. (1977) Functional test of tight junctions in the mouse blastocyst. Nature, 267, 351-352.

MILES, R.M. i STEWART, (1954) Sacrococcygeal teratomas in adults. Ann. Surg. 179, 676-683.

MILLER, F.R. i HEPPNER, G.H. (1980) Immunological interactions. Proc. Am. Assoc. Cancer Res. 21, 201-209.

MILLER, B.E., MILLER, F.R. i HEPPNER, G.H. (1981) Interactions between tumor subpopulations affecting their

sensitivity to the antineoplastic agents cyclophosphamide and methotrexate. *Cancer Res.* 41, 4378-4381.

MILLER, B.E., MILLER, F.R., LEITH, J. i HEPNER, G.H. (1980)
Growth interaction *in vivo* between tumor subpopulations derived from a simple mouse mammary tumor. *Cancer Res.* 40, 3977-3981.

MINTZ, B. (1965) Experimental genetic mosaicism in the mouse. En: *Preimplantation stages of pregnancy*. G.W. Wolstenholme i M. O'Connor (eds.). Churchill, London. pp. 199-207.

MINTZ, B. i ILMENSEE, K. (1975) Totipotency and normal differentiation of simple teratocarcinoma cells cloned by injection into blastocysts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 73, 549-553.

MINTZ, B., ILMENSEE, K. i GEARHART, J.D. (1979)
Developmental and experimental potentialities of mouse teratocarcinoma cells from embryoid body cores. En: *Teratomas and differentiation*. M.I. Sherman i D. Solter (eds.), Academic Press, New York. pp. 59-82.

MOHANDAS, T., SPARKES, R.S. i SHAPIRO, L.J. (1981)
Reactivation of an inactive human X-chromosome: evidence for inactivation by DNA methylation. *Science*, 211, 393-396.



MONZO, M. (1984) Aislamiento, crecimiento y capacidades de diferenciación de las células de carcinoma embrionario del teratocarcinoma. Tesis Doctoral. Barcelona.

MOORE, M.A.S. i SHERIDAN, A.P. (1982) The role of proliferation and maturation factors in myeloid leukemia. En: Maturation factors and cancer. M.A.S. Moore (ed.). Raven Press, New York. pp. 361-376.

MORINAGA, S., OJIMA, M. i SASANO, N. (1983) Human chorionic gonadotropin and alpha-fetoprotein in testicular germ cell tumors. An immunohistochemical study in comparison with tissue concentrations. *Cancer*, 52, 1281-1289.

MORRIS, J.E., POTTER, S.W. i BUCKLEY, P.M. (1982) Mouse embryos and uterine epithelia show adhesive interactions in culture. *J. Exp. Zool. (USA)*, 222, 195-198.

MOSCONA, A.A. (1980) Embryonic cell recognition: cellular and molecular aspects. *Prog. Clin. Biol. Res.* 42, 171-188.

MOSTOFI, F.K. (1980) Pathology of germ cell tumors of testis. A progress report. *Cancer*, 45, 1735-1754.

MOSTOFI, F.K. i PRICE, E.B. (Jr.) (1973) Tumors of the male genital system. (Fasc. 8) Atlas of tumor pathology. Second

series. Washington D.C., Armed Forces Institute of Pathology.

MOSTOFI, F.K. i SOBIN, L.M. (1977) International Histological Classification of Tumors of Testes (No 16) Geneva, World Health Organization.

MOULTON, B.C. (1974) Ovum implantation and uterine lysosomal enzyme activity. Biol. Reprod. 10, 543-548.

MOULTON, B.C., KOENIG, B.B. i BORKAN, S.C. (1978) Uterine lysosomal enzyme activity during ovum implantation and early decidualization. Biol Reprod. 19, 167-170.

MUKHERJEE, A.B. i COHEN, M.M. (1970) Development of normal mice by *in vitro* fertilization. Nature, 228, 472-473.

MULNARD, J.G. (1967) Les propriétés phagocytaires du trophoblaste au cours des premières phases de l'ovo-implantation chez la souris. Arch. Biol. 78, 575-594.

MUMMERY, C.L., VAN DEN BRINK, C.E., VAN DER LAAG, P.P. i DE LAAT, S.W. (1984) The cell cycle, cell death and morphology during retinoic acid induced differentiation of embryonal carcinoma cells. Dev. Biol. 104, 297-307.

MURAMATSU, T., CONDAMINE, H., GACHELIN, G. i JACOB, F.
(1979) Changes in fucosyl-glucopeptides during early post-
implantation embryogenesis in the mouse. J. Embryol. exp.
Morph. 43, 123-129.

MURPHY, C.R. i MARTIN, B. (1985) Cholesterol in the plasma
membrane of uterine epithelial cells: A freeze-fracture
citochemical study with digitonin. J. Cell. Sci. 78, 163-
172.

MURPHY, C.R., SWIFT, J.G., MUKHERJEE, T.M. i ROGERS, A.W.
(1982) Changes in the fine structure of the apical plasma
membrane of endometrial epithelial cells during implantation
in the rat. J. Cell Sci. 55, 1-12.

MURRAY, J.C., STINGL, G., KLEINMAN, H.K., MARTIN, G.R. i
KIDWEL, W.R. (1979) Epidermal cells adhere preferentially to
type IV (basement membrane) collagen. J. Cell Biol. 80, 197-
202.

NAKAKUMA, K., TASHIRO, S., VEMURA, K. i TAKAYAMA, K. (1983)
Alpha-fetoprotein and human chorionic gonadotropin in
embryonal carcinoma of the ovary. An 8-year survival case.
Cancer, 52, 1470-1472.

NELSON, W.O. i PFIFFNER, J.J. (1930) Experimental production of deciduomata in rat by extract of corpus luteum. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 27, 283-290.

NES, W.R. (1974) Role of sterols in membranes. Lipids, 9, 596-612.

NEW, D.A.T. (1973) Studies on mammalian fetuses *in vitro* during the period of organogenesis. En: The mammalian fetuses *in vitro*. C.R. Austin (ed.). Chapman and Hill, London. pp. 15-65.

NEW, D.A.T., COPPOLA, P.T. i COCKROFT, D.L. (1976) Comparison of growth *in vitro* and *in vivo* of post-implantation rat embryos. J. Embryol. exp. Morph. 36, 133-144.

NICOLAS, J.F., DUBOIS, P., JAKOB, H., GAILLARD, J. i JACOB, F. (1975) Tératocarcinome de la souris: différentiation en culture d'une lignée de cellules primitives à potentialités multiples. Ann. Microbiol. (Inst. Pasteur) 126A, 3-22.

NICOLSON, G.L., READING, C.L. i KLOSTERGAARD, J. (1985) Immunobiology of RAW17 large cell lymphoma. En: Immunity to cancer. A.E. Reif i M.S. Mitchell (eds.). academic Press, Inc. Orlando. pp. 55-68.

NILSSON, O. (1967) Attachment of rat and mouse blastocyst onto uterine epithelium. *Inter. J. Fert.* 12, 5-13.

NILSSON, B.O., MAGNUSSON, C., WIDEHN, S. i HILLENJÖ, T. (1982) Correlation between blastocyst oxigen consumption and trophoblats cytochrome oxidase reaction at initiation of implantation of delayed mouse blastocyst. *J. Embryol. exp. Morph.* 71, 75-82.

NILSSON, B.O., OSTENSSON, C.G., EIDE, S. i HELLERSTROM, C. (1980) Utilization of glucose by the implanting mouse blastocyst activated by oestrogen. *Endokrinologie*, 76, 82-93.

NOGALES, F.F., Jr. i AGUILAR, D. (1983) Neural tissues in human teratomas. En: *The human teratomas. Experimental and clinical biology*. I. Damjanov, B.B. Knowles i D. Solter (eds.). Human Press, Clifton-New Jersey. pp. 179-188.

NOWELL, P.C. (1976) The clonal evolution of tumor cell populations. *Science*, 194, 23-28.

O'GRADY, J.E. i BELL, S.C. (1977) The role of the endometrium in blastocyst implantation. En: *Development in mammals*. Vol. 1. M.H. Johnson (ed.). North-Holland, Amsterdam, pp. 165-243.

O'GRADY, J.E. i HEALD, P.J. (1969) The position and spacing of implantation sites in the uterus of the rat during early pregnancy. J. Reprod. Fert. 20, 407-412.

O'GRADY, J.E., ARMSTRONG, E.M., MOORE, I.A.R. i VASS, M.A. (1974) Effect of tamoxifen (ICI 46,474) on mitosis in the uterus of the rat during the early stages of pregnancy. J. Endocr. 63, 19P.

O'HARE, M.J. (1978) Teratomas, neoplasia and differentiation: a biological overview. I. The nature history of teratomas. Invest. Cell Pathol. 1, 39-63.

O'MALLEY, B.W. i MEANS, A.R. (1974) Female steroid hormones and target cell nuclei. Science, 183, 610-614.

PANWELS, C., REBINSCHUNG, J.L., JASMIN, C. i POUPON, M.F. (1985) Enhanced cloning efficiency of murine rhabdomyosarcoma cells after chlorozotonin treatment: Relationship with enhanced lung metastasis. J. Natl. Cancer Inst. 74, 817-820.

PAPAHADJOPOULOS, D. (1974) Cholesterol and cell membrane function. A hypothesis concerning the etiology of arteriosclerosis. J. theor. Biol. 43, 329-337.

PARR, M.B. (1980) Endocytosis at the basal and lateral membranes of rat uterine epithelial cells during pregnancy. *J. Reprod. Fert.* 60, 95-99.

PARR, M.B. i PARR, E.L. (1974) Uterine luminal epithelium: Protusions mediate endocytosis, not apocrine secretion, in the rat. *Biol. Reprod.* 11, 220-233.

PARR, M.B. i PARR, E.L. (1977) Endocytosis in the uterine epithelium of the mouse. *J. Reprod. Fert.* 50, 151-153.

PARR, M.B. i PARR, E.L. (1978) Uptake and fate of ferritin in the uterine epithelium of the rat during pregnancy. *J. Reprod. Fertil.* 52, 183-188.

PARR, M.B. i PARR, E.L. (1986) Permeability of the primary decidual zone in the rat uterus: Studies using fluorescein-labeled proteins and dextrans. *Biol. Reprod.* 34, 393-403.

PASTERNAK, C.A. (1973) Phospholipid synthesis in cleaving sea urchin eggs: model for specific membrane assembly. *Dev. Biol.* 30, 403-410.

PASTERNAK, C.A. i FRIEDERICHS, B. (1970) Turnover of mammalian phospholipids. Rates of turnover and metabolic heterogeneity in cultured human lymphocytes and in tissues

of healthy, starved and vitamin A deficient rats. *Biochem. J.* 119, 481-488.

PECKHAM, M.J. (1981) General introduction: biological diversity and predisposing factors. En: *The management of testicular tumors*. M.J. Peckham (ed.). Edward Arnold, London. pp. 1-18.

PENNICA, D., NEDWIN, G.E., HAYFLINCK, I.S., SEEBURG, P.H., DERYNCK, R., PALLADINO, M.A., KOHR, W.J., AGGARWALL, B.B. i GOEDDEL, D.V. (1984) Human tumor necrosis factor: precursor structure, expression and homology to lymphotoxin. *Nature*, 312, 724-729.

PIERCE, G.B. (1966) Ultrastructure of human testicular tumors. *Cancer*, 19, 1963-1983.

PIERCE, G.B. (1974) Neoplasms, differentiations and mutations. *Am. J. Pathol.* 77, 103-118.

PIERCE, G.B. Jr. i BEALS, F. (1964) The ultrastructure of primordial germinal cells and fetal testes of embryonal carcinoma cells in mice. *Cancer Res.* 24, 1553-1567.

PIERCE, G.B. i DIXON, F.J. (1959) Testicular teratomas. I. Demonstration of teratogenesis by metamorphosis of multipotential cells. *Cancer*, 12, 573-583.

PIERCE, G.B. i MIDGLEY. A.R. (1963) The origin and function of human syncytiotrofoblastic giant cells. Am. J. Pathol. 43, 153-173.

PIERCE, G.B. i WALLACE, L. (1971) Differentiation of malignant bening cells. Cancer Res. 31, 127-134.

PIERCE, G.B., MIDGLEY, A.R., RAM, J.S. i FELDMAN, J.D. (1962) Parietal yolk sac carcinoma: a clue to the histogenesis of Reichert's membrane of the mouse embryo. Amer. J. Path. 41, 549-566.

PITTS, J.D. i BURK, R.R. (1976) Specificity of junctional communication between animal cells. Nature, 264, 762-764.

POSTE, G., DOLL, J. i FIDLER, I.J. (1981) Interactions among clonal subpopulations affect stability on the metastatic phenotype in polyclonal populations of B16 melanoma cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 78, 6226-6230.

PRATT, H.P.M. (1978) Lipids and transitions in embryos. En: Development in mammals. Vol 3. M.H. Johnson (ed.). Elsevier, North-Holand. pp. 83-129.

PRATT, H.P.M. (1980) Phospholipid synthesis in the preimplantation mouse embryo. J. Reprod. Fert. 58, 237-248.

PRATT, H.P.M., KEITH, J. i CHAKRABORTY, J. (1980) Membrane sterols and the development of the preimplantation mouse embryo. *J. Embryol. exp. Morph.* 60, 303-319.

PRATT, H.P.M., ZIOMEK, C.A., REEVE, J.A. i JOHNSON, M.H. (1982) Compactation of the mouse embryo: an analysis of its components. *J. Embryol. exp. Morph.* 70, 113-132.

PSYCHOYOS, A. (1973) Endocrine control of egg implantation. En: *Handbook of physiology. Sect. 7, Vol. 2, Part. 2.* R.O. Greep, E.G. Astwood i S.R. Geiger (eds.). Bethesda M.D.: American Physiological Society. pp. 187-215.

PSYCHOYOS, A. i CASIMIRI, V. (1980) Factors involved in uterine receptivity and refractoriness. *Prog. Reprod. Biol.* 7, 143-157.

PSYCHOYOS, A. i CASIMIRI, V. (1981) Uterine blastotoxic factors. En: *Cellular and molecular aspects of implantation.* S.R. Glasser i D.W. Bullock (eds.). Plenum Press, New York. pp. 327-334.

PSYCHOYOS, A. i MANDON, P. (1971) Etude de la surface de l'épithélium utérin au microscope électronique à balayage. Observation chez la ratte au 4^e et 5^e jour de la gestation. *C.R. Acad. Sci.* 272, 2723-2725.

QUINN, P. i WHITTINGHAM, D.G. (1982) Effect of fatty acids on fertilization and development of mouse embryos *in vitro*. J. Androl. 3, 440-445.

READING, C.L., BELLONI, D.N. i NICOLSON, G.L. (1980) Selection and *in vivo* properties of lectin-attachment variants of malignant murine lymphosarcoma cell lines. J. Natl. Cancer Ints. 64, 1241-1249.

REEDY, A.L. i FIALKOW, P.J. (1980) Multicellular origin of fibrosarcomas in mice induced by the chemical carcinogen 3-methylcholantrene. J. Exp. Med. 150, 878-886.

REEVE, W.J.D. (1981) Cytoplasmic polarity develops at compactation in rat and mouse embryos. J. Embryol. exp. Morph. 62, 351-367.

REEVE, W.J.D. i ZIOMEK, C.A. (1981) Distribution of microvilli on dissociated blastomeres for mouse embryos: Evidence for surface polarization at compactation. J. Embryol. exp. morph. 62, 339-350.

REICH, N.C., OWEN, M. i LEVINE, A.J. (1983) Two distinct mechanisms regulate the level of a cellular tumour antigen p53. Mol. Cell Biol. 3, 2143-2150.

REINHART, M.D. i MALAMUD, D. (1982) Protein transfer from isoelectric focusing gels: the native blot. Anal. Biochem. 123, 229-235.

RIDDLE, O., BATES, R.W. i DYKSHORN, S.W. (1933) The preparation, identification and assay of prolactin a hormone of the anterior pituitery. Am. J. Physiol. 105, 91-99.

RIZZINO, A. (1982) Embryonal carcinoma cells release factors with transforming growt factor activity. J. Cell Biol. 95, 181-187.

ROGERS, P.A.W., MURPHY, C.R. i GANNON, B.J. (1982) Changes in the spatial organization of the uterine vasculare during implantation in the rat. J. Rep. Fert. 65, 211-214.

ROGERS, P.A.W., MURPHY, C.R., ROGERS, A.W. i GANNON, B.J. (1983) Capillary potency and permeability in the endometrium surrounding the implantation rat blastocyst. Int. J. Microcirc. Clin. Exp. 2, 241-249.

ROOIJ, D.G. (1983) Proliferation and differentiation of indifferntiated spermatogonia in the mammalian testis. En: Stem cells. Their identification and characterisation. C.S. Potten (ed.). Churchil Livingstone Edinburg. pp. 89-117.

ROSENTHAL, A.S., THOMAS-BLACK, J., ELLNER, J.J., GREINER, D.K. i LIPSKY, P.E. (1976) Macrophage function in antigen recognition by T lymphocytes. En: Immunobiology of the macrophages. D.S. Nelson (ed.). Academic Press, New York. pp. 131-160.

ROSSANT, J. (1977) Cell commitment in early rodent development. En: Development in mammals, Vol. 2. M.H. Johnson (ed.). Elsevier/ North-Holland, Amsterdam. pp. 119-150.

ROSSANT, J. i FRELS, W.I. (1981) The origin of trophoblast and its role in implantation. En: Cellular and molecular aspects of implantation. S.R. Glasser i D.W. Bullock (eds.). Plenum Press, New York. pp. 43-55.

RUSSELL, S.W. (1985) Macrophage effector and regulatory functions. En: Immunity to cancer. A.E. Reif i M.S. Mitchell (eds.). Academic Press, Inc. Orlando. pp. 205-216.

SACHS, L. (1974) Regulation of membrane changes, differentiation and malignancy in carcinogenesis. The Harvey Lectures, series 68. Academic Press. New York.

SAINTE-MARIE, G. (1962) A paraffin embedding technique for studies employing immunofluorescence. J. Histochem. Cytochem. 10, 250-256.

SAKASHITA, S., TSUKADA, Y., NAKAMURA, K., TSUJI, I. i HIRAI, H. (1977) Experimental yolk-sac tumors produced by fetectomy without infection in rats. *Int. J. Cancer*, 20, 83-85.

SAKSENA, S.K., LAU, I.F. i CHANG, M.C. (1976) Relationship between strogen, prostaglandin $F_{2\alpha}$ and histamine in delayed implantation in the mouse. *Acta endocrinologica*, 81, 801-807.

SAXENA, B.B. (1982) Prolactina humana. En: *Endocrinología de la gestación*. F. Fuchs i A. Klopper (eds.), Salvat editores, Barcelona. pp. 249-274.

SCHEWRICH, P., ÜCER, V., BARTSCH, H. i PFIZENMAIER, K. (1985) Regulation of human T cell response by gamma interferon (IFN- γ): studies on the binding and biological effects of IFN- γ on distinct T cell subpopulations. En: *Immunity to cancer*. A.E. Reif i M.S. Mitchell (eds.). Academic Press, London. pp. 393-397.

SCHLAFKE, S., WELSH, A.O. i ENDERS, A.C. (1985) Penetration of the uterine luminal epithelium during implantation in the rat. *Anat. Rec.* 212, 47-56.

SERRA, I. (1985) Relaciones antigénicas entre células de teratocarcinoma i células embrionarias de ratón. Tesis Doctoral. Barcelona.

SHERBET, G.V. (1982) The biology of tumor malignancy. Academic Press, London.

SHERMAN, M.I. (1980) Studies on the temporal correlation between secretion of plasminogen activator and stages of early mouse embryogenesis. *Oncodev. Biol. Med.* 1, 7-17.

SHIRAI, T., YAMAGUCHI, H., ITO, H., TODD, C.W. i WALLACE, B. (1985) Cloning and expression in *Escherichia coli* of the gene for human tumor necrosis factor. *Nature*, 313, 803-806.

SHORT, R.V. (1969) Implantation and the maternal recognition of pregnancy. En: Foetal autonomy. G.E.W. Wolstenholme i M. O'Connor (eds.). Ciba Foundation Symposium. Churchill, London. pp. 2-26.

SIMMONS, R.L. i RUSSELL, P.S. (1962) The antigenicity of mouse trophoblast. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 99, 717-732.

SIMOES, M.E., MORA, O.A. i OLIVEIRA-FILHO, R.M. (1984) Resorption of endometrial collagen in oophorectomized rats. *Acta anat*, 120, 142-145.

SINGER, J., ROBERTS-ELEUS, J., LUTHARDT, F.W. i RIGGS, A.D. (1979) Methylation of DNA in mouse early embryos, teratocarcinoma cells and adult tissues of mouse and rabbits. *Nuclei Acids Res.* 7, 2369-2385.

SKAKKEBAEK, N.E. (1972) Possible carcinoma *in situ* of the testis. *Lancet*, 2, 516-517.

SKAKKEBAEK, N.E. (1975) A typical germ cells in the "normal" tissue of testicular tumors. *Acta Pathol. Microbiol. Scand. A*, 83, 127-136.

SKIPPER, J.K., EAKLE, S.D. i HAMILTON, T.H. (1980) Modulation by estrogen of synthesis of specific uterine proteins. *Cell*, 22, 69-78.

SMITH, A.F. i WILSON, I.B. (1974) Cell interaction at the maternal-embryonic interface during implantation in the mouse. *Cell tiss. Res.* 152, 525-542.

SOBIS, H. i VANDEPUTTE, M. (1973) *In utero* tumor induction by murine sarcoma virus (Moloney) in the rat. II. Histological and ultrastructural characteristics. *Int. J. Cancer*, 11, 543-554.

SOLTER, D., BICZYSKO, W. i KOPROWSKI, H. (1974) Host-virus relationship at the embryonic level. En: *Viruse evolution and cancer*. Kuustak-Maromorosh (ed.). Acad. Press, New York. pp. 3-30.

SOLTER, D., DAMJANOV, I. i KOPROWSKI, H. (1975) Embryo-derived teratoma, a model system in developmental and tumor

biology. En: The early development of mammals. M. Balls i A.E. Wild (eds.). Cambridge University Press, London. pp. 243-264.

SPITZER, G., VERNA, D.S. i BERAN, M. (1985) Cell contact modulation by adherent cells to granulopoietic proliferation and differentiation. En: Modulation factors and cancer. M.A.S. Moore (ed.). Raven Press, New York. pp. 335-349.

STEEL, G.G. i STEPHENS, T.C. (1983) Stem cells in tumors. En: Stem cells. Their identification and characterisation. C.S. Potten (ed.). Churchill Livingstone. Edimburg. pp. 271-293.

STEELE, C.E. (1975) The culture of post-implantation mammalian embryos. En: The early development of mammals. M. Balls i A.E. Wild (eds.). Cambridge University Press, London. pp. 61-79.

STEVENS, L.C. (1959) Embryology of testicular teratomas in strain 129 mice. J. Nat. Cancer Inst. 23, 1249-1295.

STEVENS, L.C. (1960) Embryonic potency of embrioid bodies derived from a transplantable testicular teratoma of the mouse. Dev. Biol. 2, 285-297.

STEVENS, L.C. (1962) Testicular teratomas in fetal mice. J. Nat. Cancer Inst. 28, 247-268.

STEVENS, L.C. (1964) Experimental production of testicular teratomas in mice. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 52, 654-661.

STEVENS, L.C. (1967) Origin of testicular teratomas from primordial germ cells in mice. J. Nat. Cancer. Inst. 38, 549-552.

STEVENS, L.C. (1970) The developmnt of transplantable teratocarcinomes from intratesticular grafts of pre- and pos-implantation mouse embryos. Dev. Biol. 21, 364-389.

STEVENS, L.C. (1973) A new imbred subline of mice (129/terSv) with a high incidence of spontaneous congenital testicular teratomas. J. Nat. Cancer Inst. 50, 235-242.

STEVENS, L.C. i LITTLE, C.C. (1954) Spontaneous testicular teratomas in an imbred strain of mice. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 40, 1080-1087.

STRIKLAND, S. (1981) Mouse teratocarcinoma cells. Prospects for the study of embryogenesis and neoplasia. Cell, 24, 277-278.

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

SUGARMAN, B.J., LEWIS, G.D., BESSALU, T.E., AGGARWAL, B.B. i SHEPARD, H.M. (1987) Effects of growth factors on the antiproliferative activity of tumor necrosis factors. *Cancer res.* 47, 780-786.

SUMMERHAJES, I.C. i FRANKS, C.M. (1979) Effects of donor age on neoplastic transformation of adult mouse bladder epithelium *in vitro*. *J. Nat. Cancer Inst.* 62, 1017-1023.

SUN, T.T. i GREEN, H. (1977) Cultured epithelial cells of cornea, conjuntiva and skin: absence of marker intrinsic divergence of their differentiation states. *Nature*, 269, 489-493.

SURANI, M.A.H. i BARTON, S.C. (1983) Development of ginogenetic eggs in the mouse: Implications for parthenogenetic embryos. *Science*, 222, 1034-1036.

SURANI, M.A.H. i BARTON, S.C. (1984) Spatial distribution of blastomeres is dependent on cell dicision order and interactions in mouse morulae. *Dev. Biol.* 102, 335-343.

SURANI, M.A.H., BARTON, S.C. i BURLING, A. (1980) Differentiation of 2-cell and 8-cell mouse embryos arrested by cytoskeletal inhibitors. *Exp. Cell Res.* 125, 275-286.

SURANI, M.A.H., BARTON, S.C. i NORRIS, M.L. (1986) Nuclear transplantation in the mouse: heritable differences between parenteral genomes after activation of the embryonic genome. *cell*, 45, 127-136.

TACHI, S., TACHI, C. i LINDER, N.R. (1970) Ultrastructural features of blastocyst attachment and trophoblastic invasion in rat. *J. Reprod. Fert.* 21, 37-56.

TAI, M.M., FURIE, B.C. i FURIE, B. (1980) Comformation-specific antibodies directed againts bovine prothrombin-calcium complex. *J. Biol. Chem.* 255, 2790-2795.

TAKEDA, A., ISHIZUKA, T., GOTO, T., GOTO, S., OHTE, M., TOMODA, Y. i HOSHINO, M. (1982) Polyembryoma of ovary producing alpha-fetoprotein and HCG: Immunoperoxidase and electron microscopic study. *Cancer*, 49, 1878-1889.

TALERMAN, A. (1980) Endodermal (yolk sac) tumor elements in testicular germ-cell tumors in adults: Comparison of prospective and retrospective studios. *Cancer*, 46, 1213-1217.

TARKOWSKI, A.K. i WROBLEWSKA, J. (1967) Development of blastomeres of mouse egg isolated at the 4- and 8-cell stage. *J. Embryol. exp. Morph.* 18, 155-180.

TEICH, N.M., WEIS, R.A., MARTIN, G.R. i LOWY, P.A. (1977) Virus infection of murine teratocarcinomas stem cell lines. *Cell*, 12, 973-982.

TEKELIOGLU-UYSAL, M., EDWARDS, R.G. i KISNISCII, H.A. (1975) Ultrastructural relationships between decidua, trophoblast and lymphocytes at the beginning of human pregnancy. *J. Reprod. fert.* 42, 431-438.

THIBAUT, C.H. (1978) L'implantation: sa programmation. En: L'implantation de l'oeuf. F. Du Mesnil Du Busson, A. Psychoyos i K. Thomas (eds.). Masson, Paris. pp. 1-19.

TILL, J.E. i McCULLOCH, E.A. (1980) Hemopoietic stem cell differentiation. *Biochim. Biophys. Acta*, 605, 431-459.

TOURRIS, DE, H., HENRION, R. i DELECOUR, M. (1980) Manual ilustrado de ginecologia y obstetricia. 2ª edición. Toray-Masson, S.A. Barcelona.

TOWBIN, H. i GORDON, J. (1984) Immunoblotting and dot immunobinding-current status and outlook. *J. of Immunological Methods*. 72, 313-340.

TOWBIN, H., STAEGELIN, T. i GORDON, J. (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 76, 4350-4354.

TWARDZIK, D.R., RAUCHALIS, J.E. i TODARO, G.J. (1982) Mouse embryonic transforming growth factors related to those isolated from tumor cells. Cancer. Res. 42, 590-593.

URBAN, J.L., SHEPARD, H.M., ROTHSTEIN, J.L., SUGARMAN, B.J. i SCHREIBER, H. (1986) Tumor necrosis factor: a potent effector molecule for tumor cell killing by activated macrophages. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 83, 5233-5237.

VAAGE, J. (1980) Inherent changes in the *in vivo* growth characteristics of C3H/H mammary carcinomas. Cancer Res. 40, 3495-3501.

VAN BLERKOM, J. i MOTTA, P. (1979) The cellular basis of mammalian reproduction. Urban and Schwarzenberg, Munich.

VANDEPUTTE, M., SOBIS, H., BILLIAU, A., VAN DE MAELE, B. i LEYTEN, R. (1973) In utero tumor induction by murine sarcoma virus (Moloney) in the rat. I. Biological characteristics. Int. J. Cancer, 11, 536-542.

VASILIEU, J.M. i MOIZHES, T.G. (1982) Tumorigenicity of sarcoma cells is enhanced by the local environment of implanted foreign body. *Int. J. cancer*. 30, 525-529.

VILLEE, C.A., ARMSTRONG, E.G., Jr., TALLEY, D.J. i HOSHIAI, H. (1981) Decidual cell function. Role of steroid hormones and their receptors. En: *Cellular and molecular aspects of implantation*. S.R. Glasser i D.W. Bullock (eds.). Plenum Press, New York. pp. 241-254.

VINDELON, L.V., HAUSEN, H.M., CHRISTENSEN, I.J. i SPANGTHOMSEN, N.I. (1980) Clonal heterogeneity of small-cell anaplastic carcinoma of the lung demonstrated by flow cytometric DNA analysis. *Cancer Res.* 40, 4295-4300.

VOGELZANG, N.J. (1985) A human embryonal yolk sac carcinoma model system in athymic mice. *Cancer*, 55, 2584-2593.

WALDMANN, T.A. i MCINTIRE, K.R. (1974) The use of a radioimmunoassay for alpha-fetoprotein in the diagnosis of malignancy. *cancer*, 34, 1510-1515.

WARNER, N.L., CHENEY, K., LANIER, C.L., DALEY, M. i WALKER, E. (1982) Differentiation heterogeneity in murine hematopoietic tumors. En: *Maturation factors and cancer*. M.A.S. Moore (ed.). Raven Press, New York. pp. 223-243.

WARREN, G.B., HOUSLAY, M.D., METCALFE, J.C. & BIRDSALL, N.J.M. (1975) Cholesterol is excluded from the phospholipid annulus surrounding an active transport protein. *Nature*, 255, 684-687.

WATSON, J. ANDERSON, F.B., ALAM, M., O'GRADY, J.E. & HEALD, P.J. (1975) Plasma hormones and pituitary luteinising hormone stages of pregnancy and following postcoital treatment with tamoxifen 46, 474. *J. Endocr.* 65, 7-17.

WEBB, C.G. (1980) Characterization of antisera against mouse teratocarcinoma on embryoid bodies, preimplantation embryos and sperm. *Dev. Biol.* 76, 203-214.

WEITBERG, A.B., WEITZMAN, S.A., DESTREMPES, M., LATT, S.A. & STOSSEL, T.P. (1983) Stimulated human phagocytes produce mytogenetic changes in cultured mammalian cells. *N. Engl. J. Med.* 308, 26-30.

WEITZMAN, S.A. & STOSSEL, T.P. (1982) Effects of oxygen radical scavengers and antioxidants of phagocyte-induced mutagenesis. *J. Immunol.* 128, 2770-2772.

WELSH, A.O., ENDERS, A.C. (1983) Occlusion and reformation of the rat uterine lumen during pregnancy. *Am. J. Anat.* 167, 463-477.

WELSH, A.O. i ENDERS, A.C. (1985) Light and electron microscopic examination of the mature decidua cells of the rat with emphasis on the antimesometrial decidua and its degeneration. Anat. Rec. 200, 102-115.

WELSH, A.O. i ENDERS, A.C. (1987) Trophoblast-decidual cell interactions and establishment of maternal blood circulation in the rat. Anat. Rec. 217, 203-219.

WESSELLS, N.K. (1964) Substrate and nutrient effects upon epidermal basal cell orientation and proliferation. Proc. Natl. acad. Sci. USA. 52, 252-259.

WESSELLS, N.K., SPOONER, B.S., ASH, J.F., BRADLEY, M.O., LUDENA, M.A., TAYLOR, E.L., WRENN, J.J. i YAMADA, K.M. (1971) Microfilaments in cellular and developmental processes. science, 271, 135-143.

WILEY, L.M., SPINDLE, A.I. i PEDERSEN, R.A. (1978) Morphology of isolated mouse inner cell masses developing *in vitro*. Dev. Biol. 63, 1-10.

WILLIS, R.A. (1967) Pathology of tumors (4th edition). Appeltan Century-Crofts, New York.

WILSON, I.B., BOLTON, E. I CUTTLER, R.H. (1972) Preimplantation differentiation in the mouse egg as revealed

by micro-injection of vital markers. *J. Embryol. exp. Morph.* 27, 467-479.

WINTENBERGER-TORRES, S. (1978) Role actif de l'embryon avant l'implantation. En: *L'implantation de l'oeuf*. F. Du Mesnil Du Buisson, A. Psychoyos i K. Thomas (eds.). Masson, Paris. pp. 181-192.

WOLPERT, L. (1971) Positional information and pattern formation. *Curr. Top. Devel. Biol.* 6, 183-224.

WOOLEY, M., GINSBURG, S., DICENSO, S., SNYDER, W.H., MIRABAL, V.A. i LANDING, B.H. (1967) Teratomas in infancy and childhood. *Z. Kinderchir.* 4, 289-303.

YANG, J., RICHARDS, J., BOWMAN, P., GUZMAN, R., EHAM, J., McCORMICK, K., HAMAMOTO, S., PITELKA, A. i NANDI, S. (1979) Substained growth and tree-dimensional organization of primary tumor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 76, 3401-3405.

YANIR, M. (1984) Regulation of eukariotic gene expression by trans-activating proteins and cis-activating DNA elements. *Biol. Cell*, 50, 203-216.

YEOH, C.B., HARRIS, P.D., LEFF, E., FERRERA, J. i CHANDRA, N. (1976) Intrapericardial teratoma. *N.Y. State J. Med.* 76, 708-711.

YOCHIM, J.M. i DE FEO, V.J. (1962) Control of decidual growth in the rat by steroid hormones of the ovary. *Endocrinology*, 71, 134-140.

YOCHIM, J.M. i DE FEO, V.J. (1963) Hormonal control of the onset, magnitude and duration of uterine sensitivity in the rat by steroid hormones of the ovary. *Endocrinology*, 72, 317-326.

ZALEWSKI, A.A. (1974) Neuronal and tissue specifications involved in taste bud formation. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 228, 344-349.

ZIOMEK, C.A. i JOHNSON, M.H. (1980) Cell surface interaction induces polarization of mouse 8-cell blastomeres at compactation. *Cell* 21, 935-942.

ZIOMEK, C.A. i JOHNSON, M.H. (1982) The role pf phenotype and position in guiding the fate of 16-cell mouse blastomeres. *Dev. Biol.* 91, 440-447.

