

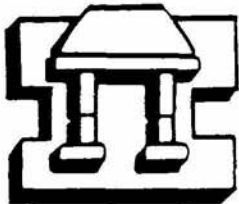


**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

**PARTICIPACION DE LA FIBRONECTINA CELULAR EN
LA IMPLANTACION *IN VITRO* DE BLASTOCISTOS DE
RATON INDUCIDA POR EL SUERO FETAL DE BOVINO.**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADEMICO DE
MAESTRA EN CIENCIAS
(**BIOLOGIA DE LA REPRODUCCION**)
P R E S E N T A
CARMEN ALVAREZ RODRIGUEZ



IZTACALA

DIRECTOR DE TESIS: DR. LU'S ARTURO BAIZA GUTMAN

LOS REYES IZTACALA, EDO. DE MEXICO.

ENERO, 2003.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FES IZTACALA

09 de enero del 2003.

OFICIO: CB/FESI/001/03.

Asunto: Conformación de Jurado para Examen de Grado.

ING. LEOPOLDO SILVA GUTIÉRREZ

Director General de Administración Escolar

Presente.

Por medio de la presente informo a usted de la conformación del Jurado encargado del Examen que la alumna **CARMEN ÁLVAREZ RODRÍGUEZ** con número de cuenta 80031318 y número de expediente 300952023 sustentará con objeto de obtener el grado de Maestro en Biología de la Reproducción

Presidente: Dr. Luis Arturo Baiza Gutman
Vocal: Dr. Juan José Hicks Gómez
Secretario: Dr. Martín Palomar Morales
Suplente: Dr. Felipe Vadillo Ortega
Suplente: Dr. Jesús Chimal Monroy

Sin otro particular por el momento, aprovecho la ocasión para enviarle un cordial saludo

Atentamente

"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"

DRA. TILA MARÍA PÉREZ ORTÍZ

Coordinadora del Posgrado en Ciencias Biológicas

El presente trabajo se realizó en el laboratorio de Biología del desarrollo de la Unidad de Morfología y Función de la FES Iztacala, bajo la dirección del Dr. Luis Arturo Baiza Gutman.

Este trabajo fue apoyado por PAPIIT, DGAPA, UNAM con el No. de proyecto IN212400.

CONTENIDO

IZT.

<i>Lista de figuras</i>	iv
<i>Lista de tablas</i>	v
<i>Lista de abreviaturas</i>	vi
RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	3
<i>I. Desarrollo del embrión de mamífero hasta la etapa de blastocisto</i>	3
<i>II. Implantación embrionaria y cambios endometriales</i>	5
<i>A. Implantación embrionaria</i>	6
<i>B. Fases de la implantación</i>	9
<i>1. Distribución</i>	9
<i>2. Orientación</i>	9
<i>3. Aposición</i>	9
<i>4. Adhesión</i>	9
<i>5. Invasión o penetración</i>	11
<i>C. Modificaciones del endometrio durante la implantación embrionaria</i>	14
<i>1. Cambios epiteliales: receptividad uterina</i>	14
<i>2. Modificaciones estromales</i>	16
<i>3. Eventos tardíos en la invasión del endometrio</i>	18
<i>III. Antecedentes</i>	19
<i>A. Implantación in vitro de blastocistos de ratón</i>	19

B. Cambios bioquímicos y morfológicos del trofotodermo durante su diferenciación <i>in vitro</i>	22
C. Suero fetal de bovin.....	23
1. Fetuina.....	23
2. Fibronectina.....	25
D. Proteínas de matriz extracelular y desarrollo temprano de mamíferos.....	27
IV. Justificación.....	28
V. Planteamiento del problema.....	29
VI. Hipótesis.....	29
OBJETIVO GENERAL.....	30
OBJETIVOS PARTICULARES.....	30
MATERIAL Y METODOS.....	31
I. Animales.....	31
II. Superovulación y apareamiento de ratones.....	31
III. Preparación de SBF deficiente de fibronectina.....	31
IV. Inmuno detección de fibronectina por “ <u>Dot- blot</u> ” en suero deficiente de fibronectina.....	31
V. Medios de cultivo.....	32
A. Biggers.....	32
B. NCTC.....	33
VI. Antibióticos.....	33
VII. Obtención y cultivo de blastocistos.....	33
VIII. Inmunodetección de fibronectina en los medios condicionados.....	34

A. " <u>Dot-blot</u> " método indirecto	35
B. " <u>Western-blotting</u> "	35
1. Electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS	35
2. Electrotransferencia	35
3. Inmunotinción	36
IX. Cuantificación de fibronectina en los medios condicionados por el método de ELISA indirecto	36
X. Análisis estadístico	37
RESULTADOS	38
I. Desarrollo de blastocistos en cultivo con un suplemento de suero	38
II. Desarrollo de blastocistos en medio NCTC con suero deficiente de fibronectina	38
III. Efecto de la fetuina en el desarrollo de blastocisto	40
IV. Efecto de BSA en la implantación embrionaria in vitro de blastocistos inducida por fetuina	41
V. Efecto de los anticuerpos contra fibronectina en la implantación in vitro de blastocistos inducida por fetuina	42
VI. Inmunodetección de fibronectina celular por medio de " <u>western-blotting</u> "	44
VII. Cuantificación de fibronectina por ELISA	44
DISCUSIÓN	57
CONCLUSIONES	63
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	65

Lista de figuras

<i>Figura 1. Desarrollo del embrión de roedor hasta su implantación</i>	4
<i>Figura 2. Patrones de implantación</i>	8
<i>Figura 3. Representación esquemática de la primera adhesión del trofoblasto en los mamíferos</i>	8
<i>Figura 4. Formas de invasión del trofotodermo</i>	14
<i>Figura 5. Detección macroscópica de las zonas de implantación</i>	17
<i>Figura 6. Desarrollo in vitro de blastocistos de ratón</i>	45
<i>Figura 7. Desarrollo in vitro de blastocistos de ratón en medio NCTCc deficiente de fibronectina</i>	46, 47
<i>Figura 8. Efecto de la concentración de fetuina en el desarrollo <u>in vitro</u> de blastocistos de ratón en presencia de BSA</i>	48, 49
<i>Figura 9. Efecto de la BSA en la acción de la fetuina en el desarrollo <u>in vitro</u> de blastocistos de ratón</i>	50, 51
<i>Figura 10. Efecto del anticuerpo contra fibronectina celular en el desarrollo in vitro de blastocistos de ratón sostenida por el suero</i>	52
<i>Figura 11. Efecto del anticuerpo contra fibronectina sérica en el desarrollo <u>in vitro</u> de blastocistos de ratón inducida por fetuina</i>	53, 54
<i>Figura 12. Inmunodetección de fibronectina</i>	55
<i>Figura 13. Curva estándar de fibronectina</i>	56

Lista de tablas

Tabla 1. Desarrollo embrionario preimplantacional en varias especies..... 5

Tabla 2. Funciones de la fetuina 25

Lista de abreviaturas

<i>AntiIgGh</i>	<i>Anticuerpo contra gama globulina de humano</i>
<i>AntiFnC</i>	<i>Anticuerpo contra fibronectina celular</i>
<i>AntiFns</i>	<i>Anticuerpo contra fibronectina sérica</i>
<i>BSA</i>	<i>Albúmina sérica de bovino (fracción V)</i>
<i>cm</i>	<i>Centímetro</i>
<i>4-OH-E₂</i>	<i>4-hidroxiesteroide -17β estradiol</i>
<i>D. E.</i>	<i>Desviación estándar</i>
<i>EGF-HB</i>	<i>factor de crecimiento epidérmico que une heparina</i>
<i>E. E.</i>	<i>Error estándar</i>
<i>ELISA</i>	<i>Análisis inmuno-enzimático</i>
<i>DNA</i>	<i>Ácido desoxirribonucleico</i>
<i>D. O.</i>	<i>Densidad óptica</i>
<i>Fig.</i>	<i>Figura</i>
<i>g</i>	<i>Gramo</i>
<i>hCG</i>	<i>Gonadotropina coriónica humana</i>
<i>HGF</i>	<i>Factor de crecimiento de hepatocitos</i>
<i>HS</i>	<i>Heparan sulfato</i>
<i>h</i>	<i>Horas</i>
<i>IgG</i>	<i>Inmunoglobulina G</i>
<i>LNF-1</i>	<i>Lacto-N-fucopentosa-1</i>
<i>MCI</i>	<i>Masa celular interna</i>
μ g	<i>Microgramo</i>
μ l	<i>Microlitro</i>
μ m	<i>micrometros</i>
<i>MEC</i>	<i>Matriz extracelular</i>
<i>mg</i>	<i>Miligramo</i>
<i>mm</i>	<i>Milimetro</i>
<i>mM</i>	<i>Milimolar</i>

<i>MMP-9</i>	<i>Metaloproteinasa-9</i>
<i>M</i>	<i>Molar</i>
<i>NCTC</i>	<i>Medio NCTC-135</i>
<i>NCTC_c</i>	<i>Medio NCTC-135 suplementado con suero fetal al 10 %</i>
<i>NCTC_f</i>	<i>Medio NCTC suplementado con BSA y fetuina</i>
<i>PBS</i>	<i>Solución salina amortiguadora de fosfatos</i>
<i>PDGF</i>	<i>Factor de crecimiento derivado de plaquetas</i>
<i>PMSG</i>	<i>Gonadotropina de suero de yegua preñada</i>
<i>rpm</i>	<i>Revoluciones por minuto</i>
<i>SDS</i>	<i>Duodecil sulfato de sodio</i>
<i>SBF</i>	<i>Suero fetal de bovino</i>
<i>TE</i>	<i>Trofectodermo</i>
<i>TEM</i>	<i>Trofectodermo mural</i>
<i>TEP</i>	<i>Trofectodermo polar</i>
<i>TGF-α</i>	<i>Factor de crecimiento transformante -α</i>
<i>TGF-β1</i>	<i>Factor de crecimiento transformante -β1</i>
<i>T-PBS</i>	<i>Trirón X-100 al 1% en PBS</i>
<i>T-20-PBS</i>	<i>Tween-20 al 0.05 % en PBS</i>
<i>3βHED</i>	<i>Δ5-3β hidroxiesteroide deshidrogenasa</i>
<i>ZP</i>	<i>Zona pelúcida</i>

RESUMEN

La implantación embrionaria es un proceso complejo, por lo cual, con el fin de entenderlo mejor, se ha implementado su estudio *in vitro*, para analizar la participación del cigoto en ausencia de toda influencia materna. La secuencia del desarrollo de los blastocistos en cultivo es muy similar a la que ocurre *in utero*.

Los blastocistos de roedor en un medio óptimo rompen la zona pelúcida (ZP) entre las 24 y las 48 h de cultivo, colapsan su cavidad gradualmente, se adhieren y extienden entre las 48 y las 96 h de cultivo. Hasta el momento se desconocen muchos de los factores que regulan el proceso de implantación *in vitro* del blastocisto, pero se sabe que el suero de bovino fetal (SBF) es suficiente para sostener la adhesión y extensión del trofoblasto. En este trabajo se pretende conocer, si la fibronectina celular (o embrionaria) participa en dicho proceso y es inducida por factores séricos.

La fetuina es una proteína que se presenta en grandes cantidades en el SBF y se ha observado que blastocistos cultivados en medios desprovistos de SBF, con suplemento de fetuina son capaces de sostener el desarrollo. El proceso de implantación requiere de proteínas de la matriz extracelular (MEC) para que ocurra adhesión y migración celular (extensión del trofoblasto). Aún no se conoce del todo el papel de los factores séricos en la promoción de la implantación *in vitro*.

En este trabajo fueron empleadas la fetuina y/o la albúmina sérica de bovino (BSA) para promover el desarrollo de los blastocistos *in vitro*. Además se utilizaron anticuerpos contra fibronectina celular y sérica para determinar la participación de la fibronectina embrionaria en el cultivo.

Los resultados mostraron que el medio suplementado con SBF estimuló el mayor grado de desarrollo de los blastocistos, la fetuina de 0.5 – 1 mg/ml en el medio NCTC promovió una cinética similar a la estimulada por el suero, pero el grado de extensión (área) fue apenas de un tercio. Los anticuerpos en las diluciones menores afectaron el rompimiento de la ZP, por lo que muchos embriones no llegaron a adherirse ni a extenderse. Los trofoblastos que se extendieron mostraron áreas menores.

Para la cuantificación de la fibronectina en medios condicionados fue implementado el método de ELISA indirecto. La técnica se evaluó cuantificando la fibronectina de suero humano; sin embargo, no se pudo cuantificar la proteína de interés en los medios condicionados, posiblemente por que las cantidades estaban fuera de la sensibilidad del método o quizá por que se degradaba, ya que tampoco se inmunodetectó por “*western-blotting*”.

El mecanismo por el que actúa la fetuina no se logró establecer ya que los resultados indican que la inducción por ésta de la síntesis y liberación de fibronectina embrionaria sólo explica en forma mínima la acción de la fetuina, la posibilidad de que ésta induzca la secreción de otra proteína de la MEC queda abierta a otros estudios. Se confirma que la fibronectina y la fetuina son factores séricos que inducen la implantación *in vitro*.

INTRODUCCION

I. Desarrollo del embrión de mamífero hasta la etapa de blastocisto.

En los mamíferos, uno o varios ovocitos después de ser ovulados son fertilizados en la porción del ámpula oviductal. Como consecuencia, los ovocitos completan su meiosis, se forma el cigoto y se inicia la etapa de segmentación. La división celular continua en el embrión en segmentación y conduce a la formación de un embrión compactado: la compactación corresponde al primer evento morfogénico y en el ratón ocurre después de la tercera segmentación, en la etapa de 8 células. Durante la compactación las superficies de las blastómeras establecen un contacto más íntimo entre sí; las blastómeras superficiales desarrollan uniones estrechas (*tight junctions*) y las internas, uniones de tipo comunicante (*gap junctions*) (Watson, 1992).

El desarrollo prosigue a la etapa de mórula y luego a la de blastocisto. La mórula de ratón contiene 16 células, se forma durante el trayecto del embrión por el oviducto y ya en el útero da lugar al blastocisto (Fig. 1). Inicialmente la mórula no tiene una cavidad; sin embargo, durante el proceso de cavitación, las células epiteliales periféricas secretan un fluido para generar el blastocele; como consecuencia, por el estadio de 64 blastómeras en el ratón, se forman dos grupos de células: la masa celular interna (MCI) rodeada del blastocele y una pared de células, las células del trofotodermo o trofoblasto (TE) que forman un anillo. A partir de la MCI se formará el embrión propiamente. El TE aunque, no formará parte del embrión mismo, si es necesario para que se lleve a cabo la implantación del *conceptus* (se emplea este término para designar a todas las etapas del desarrollo posteriores al blastocisto, contituidas por los derivados de la MCI y del TE) en la pared uterina (Watson, 1992; Gilbert, 1997).

El TE es el primer tejido epitelial que se diferencia en el desarrollo del embrión de los mamíferos, el cual originará al corión, del que se forma el constituyente embrionario de la placenta y establecerá la interacción con los tejidos maternos. El TE que recubre la MCI se conoce como polar (TEP) y el que rodea al blastocisto, como mural (TEM) (ver Fig. 1) (Edwards, 1980; Izquierdo, 1986; Willey y col., 1990).

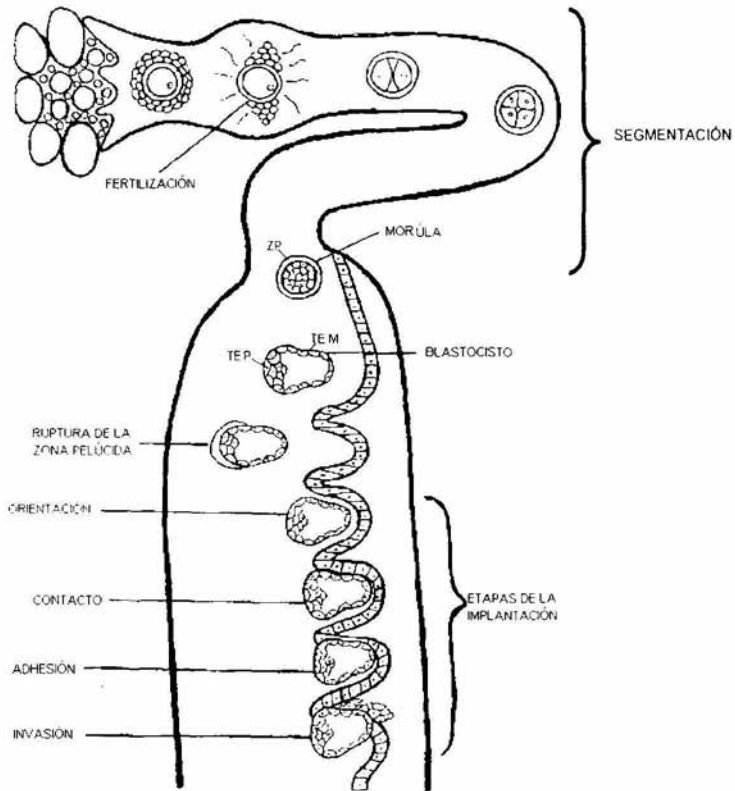


Figura 1. Desarrollo del embrión de roedor hasta su implantación. Muestra desde la fertilización del ovocito, la etapa de segmentación hasta la formación del blastocisto en el oviducto y cuerno uterinos, respectivamente. ZP= zona pelúcida; TEP= trofoblasto polar; TEM= trofoblasto mural (modificada de Flores, 1996).

Durante su trayecto por el oviducto y la formación del blastocisto, el embrión está rodeado por la ZP, una envoltura glicoproteica producto del ovocito, y las células de la granulosa. En el útero, el blastocisto rompe la ZP y una vez fuera, puede establecer contacto directo con el endometrio (Watson, 1992).

Los embriones tienen sus divisiones de segmentación en el oviducto y entran al útero en diferentes estados de la segmentación, según la especie. En los mamíferos poliovitulares, los embriones son transportados de tal manera que quedan equidistantes uno del otro en el tiempo de la implantación (Edwards, 1980; van Tienhoven, 1983) (ver tabla 1).

Tabla 1. Desarrollo embrionario preimplantacional en varias especies (basada en van Tienhoven, 1983).

Especie	Transporte oviductal (días)	Etapas de desarrollo en que entra al útero	Implantación (días post fertilización)	Etapas de desarrollo en la implantación
PRIMATES Mono rhesus (<i>Macaco</i>)	4	Mórula (32 células)	8 - 9	Blastocisto
Humano (<i>Homo</i>)	4 - 5	¿?	6 - 7	Blastocisto
LAGOMORFOS Conejo (<i>Oryctolagus cuniculus</i>)	3 - 3.5	Mórula (20 células)	7	Blastocisto bilaminar
ROEDORES Ratón (<i>Mus musculus</i>)	3 - 3.5	Mórula (16 células)	6	Blastocisto, algo de endodermo
Rata (<i>Rattus norvegicus</i>)	4	Mórula	6	Blastocisto, algo de endodermo
Hamster (<i>Cricetus auratus</i>)	3.5	4 - 8 células	4.33	Blastocisto, algo de endodermo
Cobayo (<i>Cavia porcellus</i>)	3.5	8 células	6	Blastocisto unilaminar
CARNIVOROS Perro (<i>Canis familiaris</i>)	4 - 5	Mórula de 16 células a blastocisto joven	11 - 12	Blastocisto bilaminar
Gato (<i>Felis catus</i>)	6 - 7	Mórula (28 - 30 células)	13 - 14	Blastocisto bilaminar
UNGULADOS Cerdo (<i>Sus scrofa</i>)	2.5 - 3.75	3 a 8 células	11 - 20	Vesícula coriónica alargada con alantoides

II. Implantación embrionaria y cambios endometriales.

La implantación en los mamíferos, es una secuencia compleja de eventos que inicia con la adquisición de una posición fija del embrión dentro del útero como resultado de la adhesión del TE al epitelio uterino, con la subsecuente degradación de este último. A continuación ocurre la invasión del estroma uterino por parte del blastocisto, para que finalmente éste llegue a ser embebido en la pared uterina y en respuesta a las señales embrionarias el estroma experimenta la

reacción decidual, la cual consiste principalmente de modificaciones en la forma, organización y metabolismo de los fibroblastos estromales del endometrio, generando un tejido distinto, la decidua (la capa funcional del endometrio que se transforma y desprende en el momento del parto). Los fibroblastos de este tejido aumentan de tamaño debido a que presentan muy desarrollados los organelos involucrados en la síntesis de macromoléculas y acumulan lípidos, glucógeno y filamentos intermedios. Las células y sus núcleos tienden a adoptar una forma más redondeada y disminuye el espacio extracelular entre las células ya que establecen uniones tipo comunicantes y adherentes (Hamilton y Mossman, 1973; van Tienhoven, 1983; Abrahamson y Zorn, 1993). Sin embargo, en el cerdo, oveja, vaca y yegua, no hay un contacto directo entre el TE y el estroma endometrial y la decidualización estromal no ocurre (van Tienhoven, 1983).

A. Implantación embrionaria

La implantación en algunas especies se limita a la adhesión entre el TE con el epitelio luminal uterino. En los roedores y otros mamíferos que desarrollan placentas hemocoriales o endocoriales (son placentas en donde el corión tiene contacto directo ya con la sangre o con el endotelio vascular del endometrio, respectivamente), esta adhesión es seguida por la invasión del endometrio por parte del embrión (Abrahamson y Zorn, 1993). Sin embargo, la adhesión entre el TE y el epitelio uterino solamente puede iniciarse cuando ambos tejidos se encuentran en estados fisiológicos específicos: en el caso del TE en un "*estado de competencia para la adhesión*" y en el caso del endometrio en un "*estado receptivo*" (Denker, 1993).

Durante el proceso de implantación ocurre la interacción entre dos epitelios: el del endometrio y el del TE embrionario, en donde células genéticamente diferentes (TE y endometrio) interactúan (Roberts y col., 1996) y sus membranas apicales adquieren características adhesivas que coinciden con el período de receptividad uterina (condición fisiológica del útero para permitir la implantación, cuyo tiempo de duración es breve y también se le ha llamado "*ventana de la implantación*" (Paria y col., 1993) y es dependiente de las hormonas esteroides (Guzmán y col., 1993; Denker, 1993).

En la mayoría de las especies, el endometrio completo es receptivo a la implantación. Sin embargo, en algunas de ellas las áreas de receptividad están restringidas y pueden variar desde solamente un cuerno a una pequeña parte del endometrio en un cuerno (van Tienhoven, 1983).

La adquisición de la receptividad del endometrio y la adhesividad del TE dependen de la expresión de moléculas de adhesión (o por la supresión de moléculas que la impidan) en las superficies apicales correspondientes (Denker, 1990) de las cuales se hablará posteriormente. En muchas especies el blastocisto penetra mas profundamente en el endometrio después de la adhesión al epitelio uterino, lo que implica la interacción del TE con la lámina basal (también conocida como membrana basal, representa la superficie de contacto con el tejido conjuntivo formada principalmente por una asociación de la proteína colágeno con glucoproteínas) y posteriormente con la MEC del estroma uterino, la cual consiste de macromoléculas secretadas por las células, como colágena, proteoglicanos, fibronectina, laminina, entre otras (Guzmán y col., 1993; Gilbert, 1997).

En la mayoría de los mamíferos, la implantación del embrión ocurre cuando se ha alcanzado la etapa de blastocisto, excepto en los ungulados, en los cuales una vesícula coriónica alargada con alantoides llega a adherirse al endometrio (tabla 1).

La implantación puede ser clasificada de acuerdo al grado de penetración de la mucosa uterina por el blastocisto, o de acuerdo al punto de la primera adhesión del TE (van Tienhoven, 1983). Acorde al primer criterio, la implantación puede ser: céntrica o superficial, excéntrica, parcialmente intersticial e intersticial (Fig. 2). Si se considera la orientación del blastocisto dentro del útero, tomando en cuenta a la posición del disco germinal. la implantación puede ser: mesometrial con el disco de cara al mesometrio, antimesometrial con el disco mirando desde el mesometrio y lateral con el disco mirando entre las dos posiciones anteriores (Fig. 2). De acuerdo a las zonas de la primera adhesión trofoblástica tenemos: difusa, antimesometrial, mesometrial, lateral, bilateral, circunferencial (o ecuatorial) y cotiledonaria (Fig. 3).

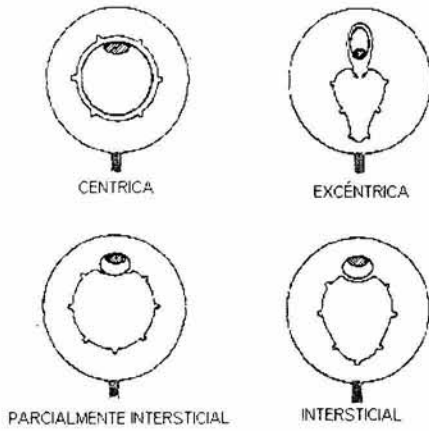


Figura 2. Patrones de implantación. Los cuatro dibujos superiores ilustran los patrones de implantación común observados en mamíferos. Los tres dibujos inferiores ilustran la orientación de la masa celular embrionaria en relación con el mesometrio. El mesometrio (en gris) está dirigido hacia la base en todas las figuras (basado de van Tienhoven, 1983).

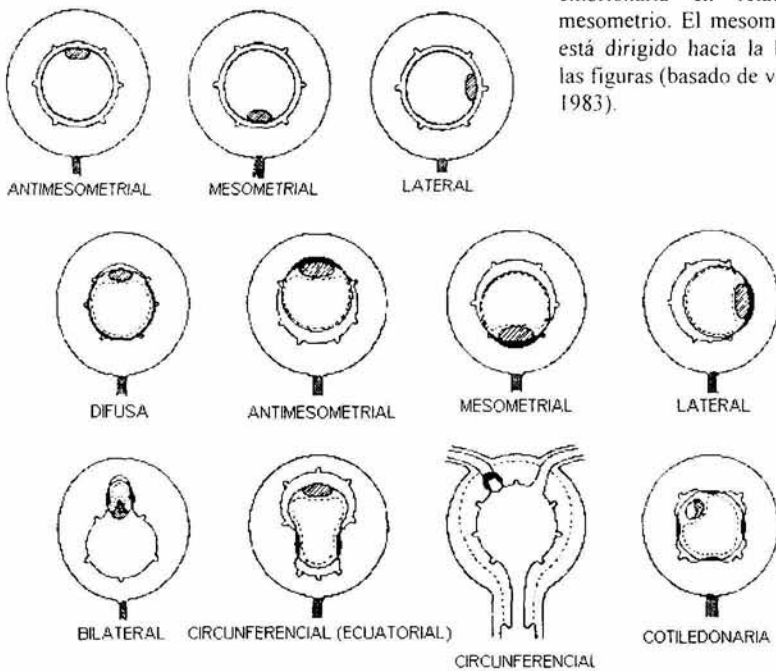


Figura 3. Representación esquemática de la primera adhesión del trofoblasto en los mamíferos. Los primeros puntos de adhesión son indicados por la línea gruesa en el trofoblasto. El mesometrio (en gris) está representado en la base de todas las figuras (basado de van Tienhoven, 1983).

B. Fases de la implantación.

De acuerdo con Enders (1970), durante el período peri-implantacional ocurren los siguientes eventos:

1. Distribución. En las especies politocas (animales que tienen varias crías), los blastocistos deben distribuirse al sitio donde se van a implantar. La distribución de éstos se debe a ondas de contracción muscular desde el oviducto hacia el útero.

2. Orientación. Tanto en las especies monotocas como politocas los blastocistos son ubicados en una porción determinada del útero y son orientados de una manera específica en él. En la rata y el ratón los blastocistos son ubicados del lado antimesometrial uterino y se adhieren por las células del TEM. Durante este proceso ocurre la pérdida de la ZP; cuando el blastocisto llega al útero las células del TEM del ratón producen estrepisina, una proteasa que se encarga de lisar un segmento de la ZP (Yamazaki y Kato, 1989).

3. Aposición. La aposición se considera como la simple yuxtaposición entre el TE y el epitelio luminal.

La aposición puede ocurrir por diversos mecanismos (Psychoyos, 1973; Enders, 1970; Edwards, 1980):

- a) *Por envolvimiento.* El hinchamiento del endometrio uterino causa que los blastocistos queden atrapados entre los repliegues uterinos y se establezca el contacto del TE con el epitelio uterino, como ocurre en la rata y el ratón.
- b) *Por expansión.* Los blastocistos se expanden para llenar la cavidad uterina quedando así en contacto con el endometrio, como en el conejo, cerdo, animales carnívoros y en el mono rhesus.
- c) *Por acercamiento activo.* Se establece por la aproximación del blastocisto a la mucosa uterina, ocurre en el cobayo, el chimpancé y el humano.

4. Adhesión. La adhesión implica la participación de moléculas adhesivas entre ambos epitelio. La aposición y adhesión del embrión al endometrio involucra interacciones entre la superficie

externa del TE y la superficie apical del epitelio luminal del útero. Tanto el blastocisto como la superficie apical del epitelio uterino no son adhesivos previamente. Así ambos tejidos deben de alcanzar un estado de “competencia para la adhesión” para sostener estas interacciones. En el caso del embrión, el estado no adhesivo puede ser considerado parcialmente pasivo en el sentido que, para la mayoría de los periodos de preimplantación, el embrión está encerrado en la ZP no adhesiva; sin embargo, no es el único factor responsable de la falta de adhesividad; ya que la remoción de ésta no es suficiente para que un embrión preimplantacional sea adhesivo.

Los blastocistos adhesivo-competentes tiene la capacidad de unirse a diversos tipos celulares y a componentes de la MEC; por otra parte cuando éstos son transferidos al útero antes de la fase receptiva tardan en implantarse. Esto parece ser debido a diversas razones que incluyen, una inadecuada expresión de moléculas promotoras de adhesión o a la presencia de moléculas que la impidan (Carson y col., 2000). Ha sido considerada la participación de diversas moléculas que facilitan o impiden la adhesión durante la implantación (Carson y col, 2000; Kimber y Spanswick, 2000), entre ellas:

- a) *Las mucinas*, son glicoproteínas que se expresan en la superficie apical del epitelio uterino y representan una barrera física para el ataque enzimático y las infecciones. La mucina mejor estudiada en el aparato reproductor es la *MUC1* (la nomenclatura en el ratón es *Muc-1*). La función que tiene esta molécula es la de inhibir la adhesión célula-célula y célula-matriz extracelular, su expresión parece estar regulada por una variedad de factores de crecimiento, que a su vez son modulados por hormonas esteroides. La remoción o reducción de mucinas favorece la adhesión del embrión al útero en el ratón. En contraste en el conejo y el humano la expresión de las mucinas aumenta durante la fase receptiva y constituyen una barrera que los blastocistos más maduros deben de superar para implantarse.
- b) *Las proteoglicanos de heparan sulfato (HS)* son proteínas que llevan unidas cadenas de glucosaminoglicanos cargadas negativamente, participan en los procesos de adhesión celular; entre ellos el *syndecano* que se expresa durante el estado peri-implantacional en los embriones de ratón. El *perlecano* es encontrado típicamente en la lámina basal de muchos tejidos y se expresa fuertemente en la interfase materno-fetal humana durante la preñez.
- c) *Proteínas que unen HS*; un pequeño número de proteínas de unión a HS han sido detectadas en los sitios de adhesión del embrión como por ejemplo el EGF-HB (factor de crecimiento

epidérmico que une heparina), el cual se presenta elevado en los sitios de implantación y es regulado por hormonas esteroides, se ha demostrado que la unión de este factor de crecimiento al blastocisto no solamente requiere de la presencia de su receptor específico sino también de proteoglicanos de HS.

- d) *Los ligandos de carbohidratos y sus receptores*, algunos oligosacáridos son mediadores de la adhesión embrionaria como la *lacto-N-fucopentosa-I (LNF-I)*, sin embargo, la identidad de los sitios de unión a LNF-I sobre los embriones no se ha determinado.
- e) *Integrinas y ligandos de integrinas*, estas glicoproteínas sirven como receptores para una variedad de ligandos de MEC.
- f) *La trofinina, la tastina y la bistatina*. Son proteínas con actividad promotora de adhesión. La trofinina es detectada en la superficie celular tanto de epitelio uterino como del TE. La trofinina requiere de una segunda proteína citoplásmica, la tastina, para sostener la adhesión, sin embargo, estas proteínas aparentemente no interactúan directamente una con otra, sino que forman parte de un complejo con elementos del citoesqueleto mediados por una tercera proteína llamada bistatina. Las tres proteínas han sido detectadas en el TE y las células decíduales en la interfase materno-fetal humana tan temprano como la sexta semana de gestación y declinan al final del primer trimestre.

5. Invasión o Penetración. En las especies en que la implantación es más profunda en el endometrio, primero se penetra, se desplaza o se asimila al epitelio luminal y después durante la interacción con la membrana basal y los tejidos subyacentes, el TE secreta enzimas como metaloproteinasas y activador de plasminógeno (Strickland y col., 1976; Behrendtsen y col., 1992). Estas enzimas conducen a la degradación de las proteínas de la MEC del tejido uterino para que el blastocisto pueda penetrar a la pared uterina.

Durante la implantación, en algunos mamíferos como el humano, el trofoblasto se diferencia en dos capas: el sincitiotrofoblasto y el citotrofoblasto. El primero es más externo, presenta núcleos voluminosos y el citoplasma de sus células es continuo debido a que durante la división no hubo citocinesis o división citoplásmica, formando una masa citoplasmática multinucleada (sincicio). El citotrofoblasto está formado por una capa irregular de células ovoides (Edwards, 1980).

En otros mamíferos, como el ratón, el TEM inicia la implantación en el día 4.5 de gestación y subsecuentemente se diferencia para formar las células gigantes primarias del trofoblasto (que surgen por duplicación del DNA), las cuales forman una red anastomosada de vasos sanguíneos en la periferia del embrión los cuales facilitan la difusión de los nutrientes y el oxígeno al embrión antes de la formación de la placenta. El TEP se mantiene en un estado proliferativo hasta el momento de la implantación. Después de la implantación ambos tejidos formarán dos estructuras extraembrionarias, el ectodermo extraembrionario y el cono ectoplacentario, este último dará lugar a las células gigantes secundarias del trofoblasto y posteriormente al espongioblasto de la placenta (Parast y col., 2001).

Las células gigantes del trofoblasto presentan expresión de hormonas y factores de crecimiento como, lactogeno placentario y proliferina, así como de metaloproteasas. Este tejido se requiere para mantener la preñez y para la formación y vascularización de la placenta. Además, se encarga de mediar las interacciones con la decidua (Parast y col., 2001).

La invasión del TE puede ser de tres formas (van Tienhoven, 1983; Denker, 1990; Tabibzadeh y Babaknia, 1995; Carson y col., 2000).

- a) *Penetración por desplazamiento* (presente en rata y ratón). La unión del trofoblasto a la membrana apical del epitelio uterino es seguida por la degeneración y descamación de grupos completos de células epiteliales uterinas. Estas células se disocian de sus vecinas y se desprenden de su lámina basal, la cual posteriormente queda expuesta y accesible al avance del trofoblasto (Fig. 4a). La penetración subsecuente a la lámina basal aparentemente no es iniciada por el trofoblasto sino por procesos de células deciduales, las cuales degradan la lámina basal remanente. En los roedores el blastocisto promueve una respuesta decidual del endometrio durante la fase de aposición y éste pierde la ZP subsecuentemente, en el epitelio del área decidual primaria ocurre apoptosis y es fagocitado por el trofoblasto, facilitando la penetración (Carson y col., 2000).
- b) *Penetración por fusión* (presente en el conejo, carnívoros y en rumiantes) la membrana plasmática apical de ciertas partes del TE se fusiona con aquellas del epitelio uterino y forman un sincicio mixto que contiene núcleos de origen embrionario y materno (Fig. 4b). Este sincicio revela en el conejo su comportamiento invasivo verdadero al penetrar a través

de la lámina basal y degradar a los vasos sanguíneos subyacentes para formar el tipo de placenta hemocorial típico de contacto. Además de las especies antes mencionadas, la fusión entre el TE y el epitelio uterino también se ha observado en el humano (Denker, 1990).

El blanco del TE de los carnívoros son las glándulas uterinas, con la formación masiva secundaria de un sinciciotrofoblasto invasivo que destruye el tejido estromal intraglandular. En el conejo la invasión trofoblástica se dirige a capilares subepiteliales, los cuales son el blanco del embrión que invade. En las musarañas del género *Blarina* y *Sorex*, la superficie del epitelio uterino antes de la adhesión del TE muestra la formación de criptas cilíndricas, las cuales forman las rutas de invasión (van Tienhoven, 1983). En rumiantes están involucradas células binucleadas. El sinciciotrofoblasto se fusiona con las células epiteliales superficiales y forman un sincicio que penetra la membrana basal del epitelio superficial (Tabibzadeh y Babaknia, 1995).

- c) *Penetración intrusiva* (presente en el cobayo, hurón, quizá también en carnívoros y mono rhesus). Este tipo de invasión incluye la penetración de procesos del sinciciotrofoblasto entre las células epiteliales superficiales uterinas, lo cual lleva a una pérdida de uniones entre las células epiteliales vecinas y la formación de uniones entre el TE y las células epiteliales.

El TE se interpone entre las células epiteliales y entonces penetra a través de la membrana basal bajo la superficie epitelial (Tabibzadeh y Babaknia, 1995), y se extiende debajo. Pequeñas lengüetas de citoplasma del sinciciotrofoblasto han sido observadas entre las células epiteliales uterinas. Más tarde pueden o no fusionarse con otras simultáneamente y así forma un pequeño sincicio de diferentes grados dependiendo de la especie. Los procesos citoplásmicos del sinciciotrofoblasto obviamente abren uniones intercelulares entre las células epiteliales uterinas (Fig.4c), e inmediatamente después las uniones son aparentemente modificadas entre el TE y las células epiteliales uterinas adyacentes. Así una combinación de estos mecanismos ocurre al menos en algunas especies (mono rhesus y quizá en el humano) (Denker, 1990).

En el cobayo el trofoblasto sincicial envía proyecciones citoplásmicas a través de la ZP para adherirse al epitelio luminal uterino. Los procesos no solamente penetran entre las células epiteliales uterinas sino también en la lámina basal. Así el blastocisto completo se introduce

en el estroma endometrial debajo del epitelio luminal, perdiendo la ZP durante el proceso. Solamente después de que el blastocisto está dentro del endometrio, este último sufre una respuesta decidual similar a la de los roedores múridos (Carson y col., 2000).

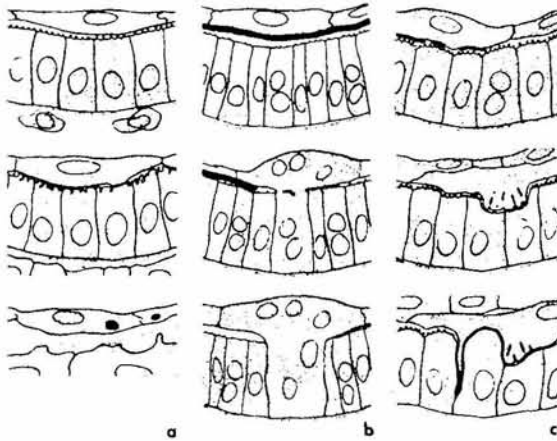


Figura 4. Formas de invasión del Trofoblasto. En a, b y c se muestran los tres tipos de interacción entre el trofoblasto y el epitelio uterino durante la penetración del primero. En a la penetración es por desplazamiento, en b la penetración es por fusión y en c la penetración es intrusiva (ver explicación en el texto). Basada en Denker (1990).

Los tres modos descritos de penetración tienen en común que siempre empiezan con la adhesión de la membrana plasmática del epitelio uterino. Esto es un fenómeno general encontrado no solamente en los tipos invasivos descritos de implantación sino también en el tipo epitelio-corial no invasivo (cerdo, no incluido en la fig. 4) (Denker, 1990, Carson y col., 2000).

C. Modificaciones del endometrio durante la implantación embrionaria.

1. Cambios epiteliales: receptividad uterina. Durante la aparición del estado receptivo, el epitelio uterino presenta tanto cambios morfológicos como funcionales. El glicocáliz, una capa delgada de glucoproteínas, generalmente reviste las células epiteliales en su lado apical, disminuye en cantidad y en carga negativa: normalmente las microvellosidades apicales se retraen, creando una superficie lisa en muchas áreas; se observa la remodelación de las uniones estrechas, uniones adherentes y la actina del citoesqueleto. En muchas, especies la fase receptiva está fuertemente asociada con la generación de proyecciones apicales grandes y anchas descritas como pinópodos,

cuya función no es clara, pero se piensa que forman un sistema de recuperación de los componentes del fluido luminal uterino (Carson y col., 2000).

Comúnmente las células epiteliales están fuertemente polarizadas, pero esta característica cambia durante su tránsito al estado receptivo. Así se ha observado la pérdida o redistribución de varios marcadores de la membrana apical o basolateral, por ejemplo el sindecano, la integrina $\alpha 6$ y de distribución lateral a apila de las cadherinas (Kimber y Spanswick, 2000). El trofoblasto también presenta cambios fenotípicos durante la implantación dando lugar a poblaciones celulares sedentarias y migratorias. Estos cambios en el trofoblasto son caracterizados por modificaciones en la expresión de integrinas y metaloproteasas (Carson y col., 2000). Como resultado de lo antes expuesto, el epitelio uterino receptivo puede exhibir cambios en el comportamiento celular por ejemplo, descamación de las células de su lámina basal (en roedores), o comportarse de una manera semi-invasiva al enviar proyecciones hacia su membrana basal (en el humano y el conejo), para facilitar la invasión del TE (Denker, 1993).

Los experimentos de transferencia de blastocistos y de implantación retardada del ratón han mostrado que el estado de actividad del blastocisto es también un determinante importante en definir la "ventana de la implantación" en el útero receptivo; ya que en ausencia de blastocistos, los úteros receptivos entran en la fase no receptiva (Paria y col., 2000). Los resultados de estas investigaciones sugieren, primero que la ventana de la implantación está fuertemente regulada para que el estado activo del blastocisto coincida con el estado receptivo del útero. Segundo, el estradiol induce rápida, pero transitoriamente, la expresión de uno o varios factores en el útero sensibilizado por la progesterona, que activa a los blastocistos latentes para su implantación en el útero receptivo. Finalmente aunque los blastocistos latentes se activan metabólicamente *in vitro* no llegan a ser competentes para la implantación *in situ* (Carson y col., 2000; Paria y col., 2000).

Se ha mostrado recientemente que el estradiol vía su receptor nuclear induce la receptividad uterina de una manera endocrina, mientras que su metabolito, el 4-hidroxiesteroide-17 β estradiol (4-OH-E2, un catecolestrógeno), producido en el útero a partir de estradiol media la activación del blastocisto de una manera paracrina. Los blastocistos latentes llegan a ser competentes para la implantación *in vitro* cuando son cultivados en presencia de 4-OH-E2 y se implantan

exitosamente al ser transferidos a úteros tratados con progesterona y estrógenos (Paria y col., 2000).

2. Modificaciones estromales.

a) *Aumento de la permeabilidad vascular y proliferación celular.* En los primeros días de preñez, el blastocisto envía señales (como la producción de factores de crecimiento) (Roberts y col., 1996) al endometrio que causan en éste una respuesta, incluso antes de que exista contacto físico con él. En algunas especies (rata, ratón, conejo, cobayo, criceto) aumenta la permeabilidad en los capilares endometriales en las regiones donde ocurre la implantación con la producción de edema y extravasación de proteínas séricas (Psychoyos, 1973; Abrahamson y Zorn, 1993), por ello cuando se inyectan intravenosamente colorantes de alto peso molecular (azul de tripano, azul de pontamina, azul de Geigy, azul de Evans, etc.), éstos forman complejos con la albúmina sérica, se extravasan y se acumulan sólo en las zonas de implantación, formando bandas en el útero después de 30 minutos de la inyección del colorante (Baiza, 1980; Abrahamson y Zorn, 1993). Este es el método usual para encontrar embriones implantados muy tempranamente (Fig. 5), donde no hay evidencia macroscópica de su presencia (por ejemplo en la mañana del 5º día de preñez en el ratón).

La ocurrencia del aumento en la permeabilidad vascular sugiere que puede ser de alguna importancia general en el establecimiento de la preñez. Posiblemente las moléculas que se filtran de la sangre pueden actuar sobre el endometrio para permitir o inducir modificaciones que son necesarias para las interacciones propias con el embrión (Abrahamson y Zorn, 1993). Este incremento de la permeabilidad vascular concide con la reacción de adhesión entre el trofoblasto y el epitelio luminal uterino (Carson y col., 2000).

Entre las modificaciones endometriales durante la implantación se presentan la proliferación del epitelio y de los fibroblastos estromales en el útero. En el ratón adulto, los estrógenos estimulan la proliferación de células epiteliales uterinas, mientras que este proceso en el estroma requiere tanto de progesterona y estrógenos (Paria y col., 2000).

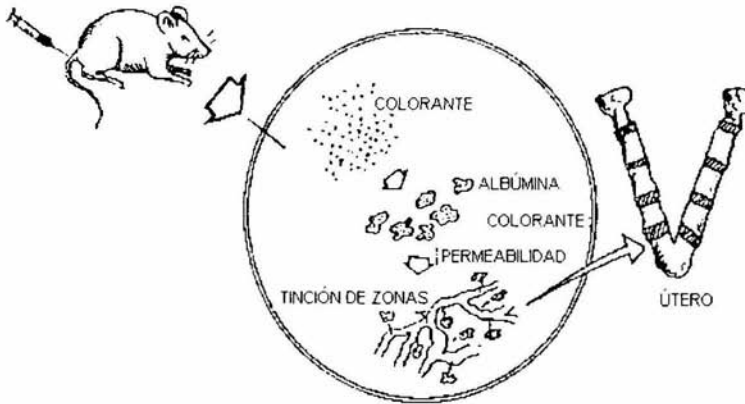


Figura 5. Detección macroscópica de las zonas de implantación. Al administrar por vía intravenosa algún colorante de alto peso molecular (azul de tripano, azul de Evans, etc.) forman complejos con la albúmina sérica, los que atraviesan los capilares y se acumulan en las zonas de implantación en el útero (Modificado de Bates, 1976 por Baiza, 1980).

Por su parte la MEC del útero también es remodelada, los fibroblastos estromales presentan vacuolas que contienen fibras de colágena, que son positivas a fosfatasa ácida, lo que indica que la colágena ha sido fagocitada y está siendo digerida. La fagocitosis de fragmentos de colágena es importante en la remodelación de la MEC del endometrio, por lo que se piensa que esta proteína pudiera presentar cambios durante la decidualización (Abrahamson y Zorn, 1993). Varias modificaciones también han sido observadas en los vasos sanguíneos endometriales durante el período preimplantacional. Es común ver células endoteliales dividirse en los capilares del estroma endometrial. Adicionalmente se ha observado la proliferación de pericitos alrededor de los capilares sanguíneos endometriales (Abrahamson y Zorn, 1993).

b) *Decidualización*. Después de la adhesión las células epiteliales pasan por apoptosis, mientras que las células estromales entran en una proliferación extensiva y se diferencian en células deciduales en el sitio de aposición del blastocisto (Carson y col., 2000).

En respuesta a los estímulos del blastocisto las células estromales se diferencian en células deciduales las cuales son más activas tanto en síntesis de proteínas y ácidos nucleicos

como en el metabolismo energético. La decidualización en los roedores empieza en la región del estromal inmediatamente alrededor de la cripta mucosa donde el embrión está implantado, inicialmente antimesometrial y subepitelial. Las primeras células deciduales están ya presentes cuando el epitelio es desplazado y el TE alcanza la lámina basal. La decidualización entonces se extiende antimesometrialmente hacia el miometrio, y pocos días después, también puede observarse una reacción conspicua en el endometrio mesometrial (Abrahamson y Zorn, 1993).

Entre las funciones de la decidua están la de nutrir al embrión, la separación de los embriones en la preñez política, contribuir a la formación de sistemas vasculares individuales durante el desarrollo de la placenta, la restricción de la invasión trofoblástica, la formación de una zona de “segmentación” para la separación de la placenta de la pared uterina durante el parto, la de secreción y la participación en la repuesta inmunológica en la preñez (Abrahamson y Zorn, 1993).

3. Eventos tardíos en la invasión del endometrio. La laminina y la colágena IV desaparecen de la membrana basal del epitelio luminal antes de que el trofoblasto alcance la superficie basal del epitelio luminal por lo que no están disponibles para la interacción con el trofoblasto. Al inicio de la invasión, sin embargo, las células deciduales tienen una abundante secreción de laminina, entactina, colágena tipo IV y proteoglicanos de heparan sulfato (todos ellos substratos del trofoblasto) y una baja producción de fibronectina. La MEC es rearmada en una capa pericelular alrededor de las células deciduales en el humano, o en parches o manchas en el ratón (Kimber y Spanswick, 2000).

Las moléculas de la MEC están disponibles para la adhesión y migración del trofoblasto y también como una fuente de unión de factores de crecimiento e inducción de la diferenciación. Conforme el trofoblasto de murino se extiende *in vitro*, diversas subunidades de integrinas ($\alpha 1$, $\alpha 6a$ y $\alpha 7$) son expresadas por el trofoblasto. En combinación con la $\beta 1$, estas integrinas forman receptores para laminina y colágena. Estas se expresan durante la invasión *in vivo* sugiriendo un mecanismo de encendido a este grupo de integrinas para esta fase. Anticuerpos neutralizantes contra integrinas $\beta 1$ evitan la adhesión y la extensión del trofoblasto de ratón sobre fibronectina y la adhesión de citotrofoblasto humano a fibronectina o laminina (Kimber y Spanswick, 2000).



III. Antecedentes

A. Implantación *in vitro* de blastocistos de ratón.

Los embriones de ratón han sido usados extensivamente para experimentos de bioquímica y genética. Además, su estructura, tasa de segmentación e implantación son similares a las del embrión humano (Edwards, 1980). La mayor parte del estudio sobre el desarrollo de embriones *in vitro* se ha hecho en esta especie; puesto que sus embriones toleran un extenso intervalo de pH y presión osmótica (Edwards, 1980).

IZT.

Generalmente para obtener un buen número de embriones, las hembras son superovuladas por medio de la administración de gonadotropinas como las provenientes del suero de la yegua preñada (PMSG) y/o la gonadotropina coriónica humana (hCG), las cuales inducen al desarrollo folicular y a la ovulación (Gonda y Hsu, 1980; Tachi, 1992).

Los blastocistos de ratón en medios de cultivo apropiados que contengan suero adquieren numerosas propiedades análogas a aquellas observadas durante el período peri-implantacional *in utero*. Los blastocistos de roedores se expanden y escapan de su ZP. El TEM adquiere propiedades de adhesividad a la superficie de cultivo (de vidrio o plástico), y subsecuentemente propiedades migratorias (extensión) (Edwards, 1980; Sellens y Sherman, 1980). El TEP prolifera situándose entre el trofoblasto y la MCI (Edwards, 1980). Todo este proceso se conoce como implantación *in vitro*.

Partiendo de blastocistos de ratón obtenidos al 4º día de preñez y cultivados en un medio simple con suplemento de SBF (inactivado por calor) al 10%, el rompimiento de la ZP inicia a las 12 h de cultivo y una vez fuera de ella, se adhieren a la cubierta de plástico entre las 24 y 48 h (Gonda y Hsu, 1980). Las células del TEM llegan a extenderse a las 48 h de cultivo y en ocasiones, a las 72 h, ya se formó el cilindro embrionario y comienza la diferenciación de las tres capas germinales. Después de las 96 h de cultivo, la cavidad pro-amniótica puede ser observada en el cilindro embrionario (Tachi, 1992).

Cerca de las 48 h de cultivo, el blastocele ha empezado a colapsarse conforme las células del TEM se transforman en células gigantes durante su extensión en la caja de cultivo.

Aproximadamente a las 72 h, la cavidad del blastocele ha desaparecido debido al agrandamiento de la MCI y la extensión de células del TEM. Conforme la MCI continúa creciendo en circunferencia, su crecimiento hacia abajo es mecánicamente inhibido por la superficie plástica y empieza a migrar hacia arriba atravesando el espacio entre el trofoblasto mural y polar, y eventualmente descansarán sobre una cima de células del TEP las cuales han formado el cono ectoplacentario (Gonda y Hsu, 1980).

El análisis bioquímico indica que los *concepti* (plural de *conceptus*) en desarrollo también expresan varios productos de genes propios de la diferenciación del trofoblasto durante el periodo peri-implantacional tanto *in utero* como *in vitro*. Estos incluyen a la subunidad A de la lactato deshidrogenasa, al activador de plasminógeno y a la $\Delta 5-3\beta$ hidroxisteroide deshidrogenasa (3β HED) (Sellens y Sherman, 1980).

En los primeros estudios de implantación *in vitro* se usaron tiras de endometrio, las que eran colocadas en una superficie de medio con agar nutritivo, lo cual permitía que los blastocistos cultivados se adhirieran al endometrio (Sherman, 1978); sin embargo, estas condiciones son muy complejas, difíciles de observar y los embriones no interactúan con el epitelio uterino sino que se adhieren en zonas en que este tejido había sido dañado (Wilson y Jenkinson, 1974).

Se han establecido las condiciones básicas del cultivo para las distintas fases de la implantación *in vitro*. Para la formación del blastocisto y la ruptura de la ZP se requiere de una solución balanceada de sales, con un suplemento de fuentes de energía como la glucosa, el piruvato, el lactato, además de la presencia de una proteína, por lo general BSA (Baiza, 1994). Sin embargo, para que los procesos de adhesión y diferenciación celular del TE se lleven a cabo, es necesario complementar el medio de cultivo con aminoácidos y SBF, este último puede ser sustituido por el co-cultivo con otras células (Sherman, 1978) o por la adición de proteínas de la matriz extracelular (Armant y col., 1986a, Armant, 1991) o por el empleo de fetuina (Rizzino y Sherman, 1979, Sellens y Sherman, 1980).

Los blastocistos son capaces de implantarse *in vitro* sobre monocapas de diversos tipos celulares, sean o no de tejido uterino (Sherman, 1978, Sherman y Salomon, 1975). En estas condiciones no se observa la interdigitación de microvellosidades entre el TE y las células en cultivo, más bien

las células son desplazadas y el TE se extiende sobre la matriz secretada por ellas (Sherman, 1978; Sherman y Salomon, 1975; Glass y col., 1979).

Los modelos de implantación *in vitro* parecen estar más relacionados con la interacción del blastocisto con la matriz extracelular durante la invasión del endometrio, por lo que el modelo *in vitro* se ha equiparado más con el proceso de invasión del TE (Guzmán y col., 1993).

Dentro de las proteínas de matriz extracelular que se han empleado para sostener la extensión del TE se tiene: colágena tipo I (Wilson y Jenkinson, 1974), laminina, fibronectina y colágena tipo IV (Armant y col., 1986a, Shuterland y col., 1988; Armant, 1991), vitronectina (Armant y col., 1986b) y trombospondina (O'Shea y col., 1990); también puede ser sostenida por glicosaminoglicanos como el ácido hialurónico (Carson y col., 1987).

El mecanismo por el que el suero sostiene la adhesión y extensión del TE sólo ha sido parcialmente dilucidado, es suficiente exponer el área de cultivo al mismo, para que se forme una cubierta capaz de sostener la adhesión y extensión del trofoblasto (Baiza, 1994), lo que sugiere que el suero proporciona un factor de adhesión que recubre la superficie de cultivo que favorece el proceso. El factor es sensible a tripsina y de alto peso molecular. Los factores séricos no se han identificado. En una caracterización parcial de los mismos, se ha encontrado que componentes del suero con un peso molecular de 30 a 100 kDa son capaces de inducir la adhesión e inicio de la extensión del TE, mientras que factores mayores a 100 kDa promueven una mayor extensión del mismo y el inicio del desarrollo de la MCI y de acuerdo con Tachi, (1992), dentro de los primeros podrían estar la fetuina y algunos factores de crecimiento; en los segundos, moléculas de adhesión como la fibronectina o la vitronectina.

La adición de anticuerpos neutralizantes contra fibronectina sérica causa una disminución en el área de extensión del trofoblasto inducida por el suero (Martinez, 1994; Baiza 1994). Sin embargo, la adhesión de los blastocistos no es afectada. Por lo que la fibronectina sérica proporciona un substrato para la extensión del trofoblasto pero deben de existir otros factores séricos implicados.

B. Cambios bioquímicos y morfológicos del TE durante su diferenciación *in vitro*.

El linaje celular del trofoblasto surge antes de la implantación, en la etapa de blastocisto, primero como un simple epitelio (el TE). Antes de este estado, todas las blastómeras son competentes para formar tanto trofoblasto como a las células de la MCI. Sin embargo, dos factores influyen su destino final: 1) la posición de las blastómeras, pues solamente las blastómeras que están colocadas periféricamente en la mórula compactada de 8 células llegarán a ser trofoblasto, mientras que las células internas llegarán a ser parte de la MCI. 2) Pérdida de la expresión del factor de transcripción Oct4. La expresión de Oct4 ocurre en todas las blastómeras tempranamente durante el desarrollo, pero llega a extinguirse en el TE y se mantiene en la MCI. En *conceptus* deficientes de Oct4, todas las células adoptan un destino de trofoblasto independientemente de la posición que tengan en la mórula compactada, lo que indica que Oct4 es crítico para el mantenimiento de la MCI (Cross, 2000).

Uno de los principales destinos del TE en el ratón es la formación de células gigantes del trofoblasto, éstas son poliploides y se forman como resultado de endoduplicación, el proceso donde las células continúan a través de su circuito de síntesis de DNA en ausencia de mitosis. Estas células son homologas a las células de citotrofoblasto de la placenta humana las que también son poliploides aunque en menor magnitud. Además ambos tipos celulares son invasivos e interactúan con los vasos sanguíneos maternos (Cross, 2000).

Las células gigantes del trofoblasto surgen en diferentes tiempos durante el desarrollo del ratón. Las que corresponden al trofoblasto "primario" derivan de la transformación del TEM después de la implantación. Las células gigantes que se forman posteriormente o "secundarias" son derivadas de las células precursoras que residen en el cono ectoplacentario y más tarde de la capa del espongiotrofoblasto (Cross, 2000; Parast y col., 2001).

Los factores que inducen a la formación del TE, la adquisición de su estado adhesivo y su diferenciación posterior a trofoblasto son poco conocidos.

Tales eventos de diferenciación, al igual que el desarrollo del patrón temporal de la expresión de algunos de los parámetros morfológicos y bioquímicos propios de la diferenciación del trofoblasto, tales como formación de células poliploides (Barlow y Sherman, 1972) y expresión

de la β -glucuronidasa (Sellens y Sherman, 1980), del activador de plasminógeno (Strickland y col., 1976), de la 3β HED (Chew y Sherman, 1973), y de la subunidad A de la lactato deshidrogenasa (Sellens y Sherman, 1980), ocurren *in vitro* en forma similar a la natural en el útero, aún en ausencia de suero y factores de origen materno, por lo que se piensa que su surgimiento está intrínsecamente programado durante el desarrollo (Chew y Sherman, 1973; Sherman y Salomon, 1975; Strickland y col., 1976; Sellens y Sherman, 1980).

En los blastocistos que no son capaces de romper la zona pelúcida en cultivo se expresan algunos de los marcadores de diferenciación del trofoblasto como son la formación de células gigantes poliploides (Barlow y Sherman, 1972), y la expresión del activador del plasminógeno (Strickland y col., 1976), sin requerirse para ello ni de la ruptura de la ZP, ni la adhesión, ni extensión del trofoblasto.

C. Suero bovino fetal

El SBF se ha empleado extensivamente como un suplemento en cultivos celulares y de tejidos, entre sus componentes se encuentran proteínas (albúmina, inmunoglobulinas), ferritina, enzimas como la fosfatasa alcalina, la β -N-acetil-D-galactosaminiltransferasa y la β -D-glucuroniltransferasa fetuina, fibronectina, citocinas (factor de crecimiento insulinoide -II) interleucina - 1α . hormonas (insulina, testosterona, progesterona y 17β -estradiol). Además de glucosa, hierro, bicarbonato, magnesio, bilirrubina, fosfatos, potasio, calcio, cloruro, sodio, colesterol, creatinina, triglicéridos y ácido úrico (http://www.atlantabio.com/fetal_bovine_serum.htm.; Fujimoto y Kern, 1991; Hida y col., 1995; Kakuta y col., 1997; Tsuchida y col., 1999; Valenzano y col., 1995).

Dentro de ellos pueden ser importantes para inducir la adhesión y diferenciación celular; la fetuina, la fibronectina, las hormonas y los factores de crecimiento.

1. Fetuina

- a) *Características*: La fetuina fue la primera proteína plasmática que fue descrita, siendo purificada del suero fetal de bovino por Pedersen (1944). Constituye casi el 45 % del total de proteínas del suero (Brown y col., 1992). Las fetuinas son miembros de la superfamilia de las

cistatínas (Brown y col., 1992), son glicoproteínas con residuos de azúcares N- y O- ligados. La porción proteica de la fetuina de bovino fue identificada como una cadena polipeptídica simple de 361 residuos de aminoácidos con seis puentes disulfuro (Nie, 1992). El peso molecular de la fetuina es de alrededor de 68 kDa (Ochieng y col., 1995).

- b) *Sitios de producción*: Originalmente la fetuina fue identificada en el suero de bovino fetal (SBF), aunque su presencia también ha sido observada en los fluidos alantoideo, amniótico y cerebroespinal (Nie, 1992). La fetuina es sintetizada en el hígado. Sin embargo, existen diversos reportes sobre la producción de esta proteína en otros sitios, principalmente en los tejidos y órganos en remodelación.

Durante el desarrollo prenatal de la rata, esta proteína se sintetiza de manera pronunciada en el hígado, y en la zona ventricular y cortical del cerebro. También se ha observado en otras células pero en menor grado como en células epiteliales del intestino, riñón y piel. Coincidiendo el pico de expresión de fetuina en este último grupo de células con el período en el cual éstas están estableciendo su nuevo fenotipo, período que corresponde a la transición entre la organogénesis y la histogénesis (inicial) (Terkelsen y col., 1998). Recientemente ha sido descrita la expresión de fetuina en neuronas de la retina y del cerebelo durante la vida fetal y postnatal (Kitchener y col., 1999).

- c) *Función*: Las fetuinas purificadas han sido ampliamente utilizadas como suplemento en medios de cultivo libres de suero para sostener el crecimiento celular. Las funciones biológicas precisas de estas proteínas no han sido claramente definidas. Sin embargo, éstas se han visto involucradas en una gran variedad de procesos biológicos (Nie, 1992) (tabla 2).

La fetuina aislada del suero de acuerdo a Pedersen (1944) tiene actividades promotoras de proliferación y adhesión celular en una extensa variedad de tipos celulares. Sin embargo, preparados de fetuina altamente purificados por los métodos de Spiro o Deutsch son biológicamente inactivos en la mayoría de los ensayos de crecimiento, por lo que se ha cuestionado si la actividad promotora de crecimiento de tales preparados reside en la fetuina misma o en algunos contaminantes menores (Nie, 1992), encontrados en la fetuina aislada por el método de Pedersen (1944).

En cultivos de blastocistos, el suplemento de BSA y fetuina promueven la adhesión y extensión en cultivos sin suero (Rizzino y Sherman, 1979) así como la producción de fibronectina (Carnegie, 1991).

Por otra parte las funciones ya mencionadas pueden ser complementarias; ya que al menos la adhesión celular puede llevarse a cabo dando un tratamiento especial a las cajas de cultivo con proteínas de matriz extracelular como fibronectina, la cual es capaz de promover la adhesión de músculo cardíaco y esquelético pero la fetuina se requiere adicionalmente para un crecimiento óptimo de estos tipos celulares (Nie, 1992).

Otras acciones biológicas de la fetuina son la inhibición de la actividad de la tripsina y otras proteasas, inhibición de la hemaglutinación causada por el virus de la influenza inactivado por calor, estimulación la captación de uridina en células de embrión de ratón, aumento del transporte de hexosas en fibroblastos 3T3 de ratón, unión específica a lectinas o moléculas parecidas a lectinas, supresión de la respuesta de linfocitos T y B, inhibición de la movilidad del espermatozoide, inhibición del rompimiento de la ZP e inducción de la actividad de la fosfatasa alcalina en la placa de crecimiento epifiseal del cartilago (Nie, 1992).

El mecanismo de acción por el cual la fetuina promueve adhesión, crecimiento y diferenciación celular se desconoce, aunque se han hecho numerosas especulaciones.

Tabla 2. Funciones de la fetuina (Nie, 1992).

Funciones de la fetuina <i>in vitro</i>	Tipo celular
Adhesión	HeLa, fibroblastos
Crecimiento	Adipocitos, epitelios, fibroblastos, células hematopoyéticas, linfocitos, mioblastos, células espermatogénicas
Diferenciación	Blastocistos, espermatogonia A

2. Fibronectina

- a) *Características*: Las fibronectinas se encuentran en los líquidos corporales en concentraciones cercanas a 300 µg/ml en el plasma y en menor cantidad en otros fluidos, en las matrices del tejido conjuntivo y en la mayoría de las membranas basales (Hynes y Yamada, 1982).

Existen dos tipos de fibronectinas, la plasmática y la celular, aunque puede haber múltiples formas de fibronectina celular. Sin embargo, ambos tipos tienen características y propiedades similares (Hynes y Yamada, 1982)

La molécula es asimétrica y consiste de dos subunidades idénticas, con peso molecular de 250 kDa aproximadamente unidas por puentes disulfuro cerca de su carboxilo terminal (Romberger, 1997). Las mediciones biofísicas indican que, aunque la molécula completa es flexible, contiene un dominio globular compacto. Una característica importante de las fibronectinas es que son capaces de interactuar específicamente con una extensa variedad de moléculas, tales como proteínas de la matriz extracelular, gelatina, colágenos, fibrina, transglutaminasa, heparina y proteoglicanos. Además es claro que las fibronectinas interactúan con muchas células (Hynes y Yamada, 1982).

La fibronectina plasmática se presenta como una proteína soluble y se puede encontrar en otros fluidos como plasma seminal, orina, leche, líquido amniótico y saliva (Poulouin y col., 1999); la apariencia típica de la fibronectina celular es una matriz extracelular fibrilar. Las fibras que contienen fibronectina pueden contener colágeno y proteoglicanos (Hynes y Yamada, 1982).

- b) *Funciones:* Numerosos estudios han reportado que la fibronectina promueve la adhesión y/o la extensión de células en una variedad de materiales incluyendo plástico, colágeno, gelatina y fibrina. Las células que sintetizan su propia fibronectina no requieren fibronectina exógena para la adhesión y extensión y muchas células que producen poca o nada, responden a la adición de fibronectina (Hynes y Yamada, 1982).

Experimentos *in vitro* han mostrado que la fibronectina promueve la migración celular en cultivo y puede estimular la quimiotaxis (Hynes y Yamada, 1982). Esto conduce a la posibilidad de que la fibronectina puede promover o guiar la migración celular en embriones. La fibronectina ha sido encontrada en asociación con varias áreas de células en migración en la gástrula de aves, entre las crestas neurales, área vascular y células germinales primordiales, también se presenta en el mesenquima primario del erizo de mar (Gilbert, 1997).

Las fibronectinas son sintetizadas por una gran variedad de células entre las que se encuentran los fibroblastos, las células endoteliales, las células del endometrio uterino, los condrocitos, los hepatocitos, células de piel y tejidos embrionarios tempranos (Ffrench-Constant, 1995).

Estudios recientes indican que la forma celular y plasmática de la fibronectina son estructural y funcionalmente muy similares, pero no son idénticas. Las dos formas son indistinguibles en sus actividades biológicas en ensayos que involucran interacciones celulares con sustratos, o actividad opsónica para macrófagos. Sin embargo, en los ensayos sobre morfología celular y alineamiento de células transformadas y sobre hemaglutinación la fibronectina celular es más activa que la fibronectina sérica.

Estudios bioquímicos han revelado también similitudes y diferencias entre las dos moléculas de fibronectina mencionadas. Las moléculas son muy similares en su composición de aminoácidos, de carbohidratos, y estructura secundaria y terciaria. Además los tipos y organización de campos estructurales específicos son indistinguibles, pero tienen diferentes puntos isoeléctricos, solubilidades, los números de subunidades unidas por puentes disulfuro y hay diferencias en el tamaño aparente de los dominios específicos. Los estudios con anticuerpos monoclonales proveen evidencia adicional de que las dos formas son distintas; ya que algunos anticuerpos se unen preferentemente a la celular. Uno de éstos se une a determinantes localizados cerca del carboxilo terminal pero interno a la unión disulfuro entre las dos cadenas y su unión no parece requerir la presencia de carbohidratos. Esto sugiere la existencia de diferencias en la secuencia primaria. Estos estudios indican que aunque las dos formas de fibronectina son muy similares, son distintas estructural y funcionalmente (Hynes y Yamada, 1982).

D. Proteínas de matriz extracelular y desarrollo temprano de mamíferos.

La MEC está conformada por moléculas secretadas por las células a su medio circundante. Estas moléculas interactúan para formar redes insolubles, que tienen diversas funciones durante el desarrollo, como separar grupos de células adyacentes y evitar algunas interacciones, sirve

además como substrato sobre el cual las células pueden migrar o puede igualmente inducir diferenciación en ciertos tipos celulares (Gilbert, 1997).

La laminina es la primera proteína de matriz extracelular que es sintetizada por el embrión de ratón *in vivo* e *in vitro* desde el estadio de dos células. *in vivo* se ha observado que la laminina incrementa en función de la expansión del blastocisto. En los blastocistos del 4º día de gestación aparece en la MCI (Leivo y col., 1980; Shim y col., 1996) y se localiza en todo el TE. En los blastocistos de 5 días de gestación se localiza entre el ectodemo y el endodermo y en otras partes en la etapa de huevo cilíndrico (Leivo y col. 1980).

La colágena, otra proteína de matriz extracelular se ha localizado en embriones de ratón durante la etapa peri-implantacional (Leivo y col. 1980), se observa en la MCI de blastocistos de 4 días y en blastocistos de 5 días en la parte basal del TE.

La fibronectina se ha detectado débilmente en el blastocisto tardío en el tiempo de la implantación, en la MCI adyacente al blastocele, es decir en aquellas células que formarán el endodermo, aunque también se ha observado en el TE que reviste el blastocele (Wartiovaara y col., 1979), observándose un patrón fibrilar de fibronectina en la cara blastocélica (Thorsteinsdóttir, 1992). En la etapa de huevo cilíndrico, cuando el conceptus ya ha penetrado el epitelio uterino, la fibronectina se localiza entre el ectodemo y el endodermo de la MCI, también se ha detectado en la parte interna del TE que rodea a la cavidad vitelina (Zetter y Martin, 1978; Wartiovaara y col., 1979).

Por otra parte tanto *in vivo* como *in vitro* se ha detectado que las células gigantes del trofoblasto de ratón contienen gran cantidad de fibronectina (Wartiovaara y col., 1979; Baiza, 1994).

La colágena y la laminina son producidas por la MCI, pero se unen y ensamblan bajo el epitelio del TE (Thorsteinsdóttir, 1992).

IV. Justificación

Hay evidencia directa que bajo condiciones de cultivo, la fibronectina presente en el suero o sintetizada por diversas células promueve la adhesión y extensión celular, pero se desconoce en

los blastocistos si la fibronectina sintetizada por el mismo (fibronectina celular), participa en el proceso de implantación y si su secreción puede ser favorecida por factores séricos.

Se ha sugerido que diferentes componentes macromoleculares del suero como la fibronectina y la fetuina favorecen la implantación embrionaria *in vitro*. Además se sabe que los embriones desde etapas tempranas son capaces de sintetizar proteínas de matriz extracelular que podrían ser útiles durante la adhesión y extensión del trofoblasto en la implantación embrionaria. Los factores que modulan la expresión de estas proteínas no se conocen, posiblemente durante la implantación embrionaria *in vitro* algunos factores séricos sean capaces de estimular su producción.

V. Planteamiento del problema

El proceso de implantación embrionaria implica diversos eventos como la adhesión y migración celular y la diferenciación del trofoblasto, cuyo estudio *in vivo* es muy complejo. Aún no se conocen del todo los mecanismos de regulación del proceso de implantación. Los blastocistos de ratón en medios de cultivo que contienen suero adquieren propiedades similares a las observadas durante el periodo peri-implantacional *in utero*, como la capacidad de romper la ZP, la adquisición de una superficie adhesiva y la formación de células gigantes del trofoblasto. El hecho de que los blastocistos experimenten estas propiedades y que su secuencia temporal sea similar a la que ocurre *in vivo*, sugiere que estos eventos son programados o disparados en respuesta a activadores presentes en los medios de cultivo que contienen suero. Durante estos eventos que también se observan durante la implantación *in vitro*, por lo cual es importante conocer la posible participación de la fibronectina celular en el proceso de implantación *in vitro*, dado que esta proteína juega un papel muy importante en estos fenómenos, así como tratar de esclarecer si algún factor sérico como la fetuina es capaz de promover su producción.

VI. Hipótesis

Es posible que la producción de fibronectina proveniente del blastocisto medie la implantación *in vitro* inducida por el suero y que su presencia dependa de factores séricos como la fetuina.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar si la fibronectina producida por el embrión participa en la implantación *in vitro* promovida por el suero y si la fetuina induce su producción y liberación por blastocistos de ratón en cultivo.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Obtener suero sin fibronectina y determinar si es capaz de sostener la implantación embrionaria *in vitro*.
2. Evaluar si los anticuerpos contra fibronectina sérica o celular evitan la implantación embrionaria *in vitro* promovida por el suero.
3. Determinar si el medio de cultivo con fetuina sin suero ni proteínas de matriz extracelular puede sostener la implantación embrionaria *in vitro* y promover la secreción de fibronectina por los blastocistos.
4. Estudiar el efecto de anticuerpos anti-fibronectina sérica o celular sobre la implantación *in vitro* inducida por fetuina.

MATERIAL Y METODOS

I. Animales.

Ratones machos y hembras sanos, de la cepa CD1, fueron proporcionados por el bioterio de la FES-Iztacala. Todos los animales fueron mantenidos en condiciones ambientales controladas, con un fotoperíodo de 14/10 h (luz/obscuridad) y con un abastecimiento de alimento y agua *ad libitum* a una temperatura de $22 \pm 1^\circ$ C.

II. Superovulación y apareamiento de los ratones.

Los ratones hembras vírgenes de la cepa CD1, de aproximadamente 2 meses de edad, fueron inducidos a superovular por medio de una inyección intraperitoneal de 5 UI de gonadotropina de yegua preñada (PMSG) (Foligon, Intervet), seguida 48 h después, de 5 UI de gonadotropina coriónica humana (hCG) (Sigma) por la misma vía. Después de la administración de hCG las hembras fueron apareadas con machos adultos de la misma cepa. Al día siguiente por la mañana se revisó la presencia de tapón vaginal, el cual determina el día 1 de preñez.

III. Preparación de SBF deficiente de fibronectina

Para preparar el suero deficiente de fibronectina se utilizó una columna de gelatina-sefarosa la cual se lavó con NaCl 0.15M (con aproximadamente 350 ml), para lavar la solución conservadora de la columna, luego se pasó el suero por la columna 2 veces y finalmente se recuperó el suero deficiente de fibronectina, el cual se empleó como un suplemento en el medio NCTC.

Posteriormente el suero fue colocado sobre una membrana de nitrocelulosa para la inmunodetección de fibronectina por “*Dot-Blot*”.

IV. Inmunodetección de fibronectina por “*Dot-Blot*” en suero deficiente de fibronectina por el método directo.

El papel de nitrocelulosa, que contenía el suero deficiente de fibronectina, se incubó en solución de bloqueo consistente en leche descremada al 5% en tritón X-100 al 1% en solución

amortiguadora de fosfatos (T-PBS), durante 1 h a 37° C en agitación, posteriormente se lavó 3 veces con T-PBS antes de la incubación en presencia del anticuerpo marcado con peroxidasa (Ig G de conejo contra fibronectina sérica de ratón, ICN Biomedicals, Inc.), el cual se utilizó en una dilución 1:5000 en solución de bloqueo durante 1 h a 37° C en agitación. Se volvió a lavar con T-PBS. luego se realizaron lavados con PBS y con amortiguador de fosfatos 50 mM pH 7.4. El sustrato para la peroxidasa que se empleó fue una solución que contenía 0.5 mg/ml de tetrahidrocloreto de 3,3' -diaminobenzidina, 1 mg/ ml de CoCl₂ y 1 mg/ ml de NiCl₂ y H₂O₂ al 1.5 %. (Sigma). Una vez que ocurrió la reacción el papel se enjuagó con amortiguador de fosfatos 50 mM pH 7.4. con PBS y agua destilada, en esa secuencia.

V. Medios de cultivo.

A. Biggers.

Este medio se empleó con un suplemento BSA (4 mg/ml) para iniciar el cultivo de los embriones; ya que favorece el rompimiento de la ZP (Baiza, 1994). La composición del medio es la siguiente:

	g/100 ml
NaCl	0.55
KCl	0.0356
Lactato de calcio 5H ₂ O	0.0527
KH ₂ PO ₄	0.0162
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.0294
NaHCO ₃	0.2106
Piruvato de sodio	0.0028
Lactato de sodio (60%)	0.2416
Glucosa	0.1
Rojo fenol	0.0005

Una vez pesados todos los componentes del medio se disolvieron en la mitad del volumen, a excepción del bicarbonato, el piruvato de sodio y el rojo fenol, los que se agregaron lentamente. Se aforó al volumen preestablecido. se esterilizó por filtración al vacío a través de una membrana de nitrocelulosa (Sigma) de 0.45 µm de poro. y se almacenó en refrigeración.

B. NCTC.

En el cultivo a largo plazo de blastocistos, se emplea el NCTC 135 (Sigma) con un suplemento de BSA, fetuina o SBF inactivado por calor completo o deficiente de fibronectina.

De la mezcla comercial de NCTC 135, 9.4 g se disolvieron en 900 ml de agua destilada. Se les adicionó 2.2 g de bicarbonato de sodio. Luego se ajustó el pH con NaOH o HCl al 0.1 N, 0.2 unidades por debajo del pH deseado. Finalmente se aforó con agua destilada a un litro. El medio se esterilizó por filtración al vacío utilizando una membrana de nitrocelulosa de 0.45 μm de poro, y se almacenó en refrigeración. Cuando en el medio se usó un suplemento de SBF inactivado por calor se le denominó NCTC completo (NCTCc).

VI. Antibióticos.

Se preparó una solución con 100 U/ ml de penicilina G, 0.1 mg/ml sulfato de estreptomicina y 0.1 mg/ml de kanamicina la cual se esterilizó por filtración al vacío, y se almacenó en refrigeración hasta su uso. Esta solución fue adicionada a los medios con el fin de evitar su contaminación. También se utilizó una solución antibiótica-antimicótica equivalente (Sigma). Se agregaron 10 μl de la solución de antibióticos por ml de medio de cultivo.

Los dos medios de cultivo empleados se colocaron en 5 gotas de 20 μl cubiertas con aceite mineral, para evitar la evaporación, en cajas Falcon de 35 mm mantenidas en una incubadora a 37° C, 5 % de CO₂ y una atmósfera húmeda. Las cajas de cultivo fueron preparadas por lo menos 3 h antes de su utilización.

VII. Obtención y cultivo de blastocistos.

En la tarde (16-18 h) del 4° día de preñez, las hembras fueron sacrificadas para la obtención de blastocistos, los cuales se cultivaron por 17 h en medio de Biggers, colocándolos 10 por cada gota y posteriormente se transfirieron a medio NCTC con diferentes suplementos, como BSA (4mg/ml), fetuina (0.25-1 mg/ml) o SBF (10%) inactivado por calor completo o deficiente de fibronectina.

En algunos cultivos se empleó un anticuerpo neutralizante monoclonal contra fibronectina celular

(Sigma) en dos diluciones (1: 30 y 1: 125) en medio NCTCc o un anticuerpo neutralizante policlonal contra fibronectina (IgG de conejo contra fibronectina sérica de cobayo) obtenida en el laboratorio en NCTC con fetuina en dos diluciones, 1: 125 y 1: 250 correspondientes a las concentraciones 34 y 17 µg/ml. Como control se utilizó un antiIgG de humano (Anti IgGh) de conejo, donado por el Dr. Rafael Jiménez del laboratorio de inmunología de la UMF de la FES-Iztacala en las mismas diluciones o concentraciones de los otros anticuerpos, o azida de sodio en la concentración presente en el antifibronectina celular.

Cada 24 h se observó la cinética del cultivo, evaluando bajo un microscopio estereoscópico (Nikon) el porcentaje de blastocistos que se libera de la ZP; colapsan el blastocelo; se adhieren y/o extienden sobre el sustrato.

En algunos experimentos, el medio condicionado de 96 h de cultivo se utilizó para los ensayos de "western-blotting" y la cuantificación de fibronectina por ELISA.

Después de 96 h de cultivo, fueron evaluadas las áreas de extensión del trofoblasto a través del uso de una plantilla transparente de doble cuadrícula, en la que los cuadros grandes medían 1.2 por 1.2 cm y los cuadros pequeños, 0.3 por 0.3 cm (9 mm²). La plantilla se superpuso a la fotografía y se contó el número de cuadros pequeños que abarcaba el área del trofoblasto. Con este dato se obtuvo el área ocupada por el trofoblasto de acuerdo con el procedimiento de Martínez (1994).

VIII. Inmunodetección de fibronectina en los medios condicionados.

Después de 96 h de cultivo en NCTCc o NCTC con un suplemento de BSA y fetuina al 0.5 mg/ml, los medios condicionados de 3 a 5 gotas con 10 *concepti* cada una, fueron conjuntadas para cada ensayo. Simultáneamente medios de cultivo sin embriones fueron incubados en forma paralela. Todos los medios fueron concentrados a 10 000 rpm a 4° C por 15', en cada ocasión, en tubos de microcentrifuga que contenían un filtro para no dejar pasar moléculas de 5000 Da. En estos medios se hizo la inmunodetección de fibronectina embrionaria por "Dot-Blot" o "Western-Blotting", procedimientos que se presentan a continuación:

A. "Dot-Blot" método indirecto.

Para la detección de fibronectina celular en los medios condicionados, se colocó una muestra en el papel de nitrocelulosa, el cual se incubó en solución de bloqueo (leche descremada al 5% en T-PBS) durante 1h a 37° C en agitación, posteriormente se lavó 3 veces con T-PBS antes de la incubación en el primer anticuerpo (IgG de conejo contra fibronectina sérica de cobayo) en una dilución 1: 2000 en solución de bloqueo durante 1 h a 37° C con agitación. Se vuelve a lavar con T-PBS. Se incubó con el segundo anticuerpo de chivo (un anticuerpo contra IgG de conejo marcado con peroxidasa, INC Biomedicals, Inc.) en una dilución 1:5000 en solución de bloqueo durante 1h a 37° C con agitación. Se empleó el mismo sustrato que por el "Dot-Blot" método directo.

B. "Western-Blotting".

1. Electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS. Los medios condicionados fueron sometidos a un corrimiento electroforético en geles de poliacrilamida al 7% en condiciones reductoras por el método propuesto por Ausubel y col. (1992), a un amperaje constante (17 miliamperes por gel) durante aproximadamente 1-2 h, usando una cámara de electroforesis (Bio-Rad, Modelo Mini protean II). Una vez que terminó el corrimiento electroforético se desmontaron los geles de las placas de vidrio. Se hicieron simultáneamente dos geles, uno se colocó en un recipiente para su tinción con azul de Coomassie R-250 (0.025%) en metanol (40%) y ácido acético (7%) y se dejó toda la noche. Al día siguiente se verificó la tinción de bandas de proteínas por medio de un transiluminador, se lavaron los geles con la solución de destinción (glicerol, ácido acético y metanol al 10%) y se procedió al secado del gel con papel celofán. El otro gel se utilizó para la electrotransferencia a papel de nitrocelulosa.

2. Electrotransferencia. Una vez que terminó el corrimiento electroforético se desmontaron los geles de las placas de vidrio. Uno de los geles a transferir se equilibró en amortiguador de transferencia (trizma base 25mM, glicina 192 mM y metanol al 20%) frío. Se hizo un "sandwich" en el siguiente orden; una placa de acrílico, 2 fibras verdes "Scotch-brite", 4 capas de papel filtro Wathman del No. 1, papel de nitrocelulosa, gel, 4 capas de papel filtro, 2 fibras verdes "Scotch-brite" y una placa de acrílico; todo esto se amarró con ligas. Se insertó el

"sandwich" en la cámara de electrotransferencia, colocando el gel hacia el electrodo negro (cátodo) y el papel hacia el electrodo rojo (ánodo).

Se llenó la cámara con el amortiguador de transferencia y se colocó la tapa de la cámara colocando adecuadamente los electrodos (ánodo y cátodo). La transferencia se hizo a voltaje constante de 35 volts durante toda la noche. Al día siguiente se recuperó la membrana de nitrocelulosa y se tiñó con Rosa de Ponceau al 0.1% en ácido acético al 0.5%. Luego se lavó el papel con agua destilada para hacer la inmunotinción.

3. Inmunotinción. Se siguieron los mismos pasos del "Dot-blot" indirecto.

IX. Cuantificación de fibronectina en los medios condicionados por el método de ELISA indirecto:

Se recubrió la placa de ELISA (Falcon, 3915) con fibronectina (de plasma humano, Boehringer Mannheim) disuelta en amortiguador de carbonatos (0.1M a pH de 9.6) a diferentes concentraciones de proteína de 2-10 µg para la obtención del título del primer anticuerpo. Se dejó la placa cubierta con papel aluminio en refrigeración durante la noche.

La placa se bloqueo con glicina 0.1 M a pH 8.0 por una hora a 37° C y luego se lavó 3 veces con Tween-20 al 0.05% en PBS (Tween-20-PBS). La incubación con el primer anticuerpo (anticuerpo policlonal contra fibronectina sérica de cobayo en conejo), disuelto en Tween-20-PBS, se hace a 37° C por una hora y se vuelve a lavar 3 veces con Tween-20-PBS. Este anticuerpo se utilizó en las siguientes diluciones 1:625, 1:1250, 1:2500, 1:5000, 1:10000. El segundo anticuerpo (anticuerpo contra IgG de conejo en chivo marcado con peroxidasa (ICN Biomedicals, Inc.) disuelto en Tween-20 al 0.05% en PBS se utilizó en una dilución 1:5000 a 37° C por una hora, enseguida se lavó 3 veces con T-20-PBS.

Como sustrato se empleó ortofenilendiamina (0.4 mg/ml) (Sigma) en el amortiguador de fosfato (0.1M)-citrato (0.05 M) a pH de 5 y se le adicionó 1 µl/ml de peróxido de hidrógeno (al 30%) al momento de usar, con el que se incubó por 15 min. La reacción se detuvo con 50 µl de ácido sulfúrico 1.5 M por pozo y se leyó en un lector de ELISA (Bio-Rad, Modelo 450) a 492 nm. En todas las incubaciones se empleó un volumen de 100 µl.

Esta técnica se utilizó para el establecimiento del título del primer anticuerpo. Se utilizó el mismo procedimiento para cuantificar la fibronectina, ahora utilizando los medios condicionados de 24 h y una curva patrón de fibronectina de 0 a 250 ng para evaluar la sensibilidad de la metodología y determinar su intervalo útil. Así mismo, para la cuantificación de esta proteína en los medios condicionados se utilizó una curva patrón de 0 a 40 ng de fibronectina.

X. Análisis estadístico

Los porcentajes obtenidos en las cinéticas de cultivo fueron transformados a arcoseno; para su evaluación por análisis de varianza bifactorial seguida por una prueba de comparaciones múltiples (prueba de Tukey) (Zar, 1984).

RESULTADOS

I. Desarrollo de blastocistos en cultivo con un suplemento de suero.

Los blastocistos de ratón fueron cultivados por 17 h en medio de Biggers para favorecer el rompimiento de la ZP. En estas condiciones todos o la mayoría de los blastocistos se expanden pero aún conservan la ZP (Fig. 6A). De esta forma fueron transferidos a los medios utilizados.

En las distintas condiciones de cultivo que permiten la implantación *in vitro*; los cambios morfológicos experimentados por los blastocistos fueron similares. Dentro de las condiciones señaladas estuvieron: el cultivo en un medio rico en nutrientes, NCTCc, en otros casos el suero fue sustituido por fetuina, fetuina con BSA o BSA.

Todos los blastocistos conservan la ZP al ser transferidos al medio NCTCc u otros suplementos. En presencia de suero la mayoría de los blastocistos se han liberado de la ZP un día después (48 h de cultivo) (Fig. 6B y 6C). A las 72 h de cultivo; alrededor del 95 % de embriones han roto la ZP. Después de la liberación de la ZP el trofoblasto se adhiere y extiende sobre la superficie de cultivo (Fig. 6D) y las células del TEM forman una monocapa, presentando núcleos prominentes y poliploides al formar a las células gigantes del trofoblasto (Fig. 6D).

La masa celular interna permanece en la superficie externa y en algunas ocasiones se une al crecimiento trofoblástico por un grupo de células pequeñas y redondas correspondientes al TEP, a esta estructura se le ha homologado con el cono ectoplacentario (Fig. 6B). A las 72 h de cultivo el mayor porcentaje de embriones ya ha roto y se han liberado de la ZP, lo cual es un requisito para que el trofoblasto se adhiera y se extienda conforme avanza el tiempo de cultivo. En este tiempo la mayoría de los embriones ya colapsaron su blastocele. A las 96 h mas del 80 % se han implantado (Fig. 6D).

II. Desarrollo de blastocistos en medio NCTC con suero deficiente de fibronectina.

Previamente se ha demostrado en este laboratorio mediante el uso de anticuerpos neutralizantes que la fibronectina presente en el SBF, es un factor sérico que ayuda al sostenimiento de la implantación *in vitro* (Martínez, 1994; Baiza, 1994). Para estudiar qué tanto el embrión es capaz

de implantarse sin esta proteína en el suero, se empleó SBF deficiente de fibronectina como un suplemento en los cultivos, aunque no se logró quitar completamente la fibronectina del SBF; ya que se obtuvo una tinción positiva para fibronectina por la técnica de "dot-blotting"; sin embargo, esta tinción fue mucho más débil que la del suero completo.

Como se muestra en la Fig. 7A en el medio con suero deficiente de fibronectina fue menor el porcentaje de embriones que rompen la ZP a las 48 y 72 h. (10 y 63 ± 2.5 %) ($P < 0.05$); sin embargo, a las 96 h, el porcentaje fue similar (82 ± 2 %) a aquel sostenido por el medio NCTCc (95 ± 2.5 %). El medio NCTCc fue más eficaz en sostener el rompimiento de la ZP a las 48 y 72 h; sin embargo, a las 96 h ambas condiciones conducen estadísticamente a la misma proporción de embriones sin ZP. Los embriones en el medio deficiente de fibronectina no presentan pérdida de cavidad durante las 24-72 h ($P > 0.05$) (Fig. 7B) y es hasta las 96 h que disminuye el porcentaje de embriones con cavidad (50 ± 4) ($P < 0.05$). Así como para el rompimiento de ZP, el colapso del blastocelo ocurre más rápidamente en presencia del suero completo. Durante las primeras 72 h el porcentaje de embriones que se adhieren fue más bajo en el medio deficiente de fibronectina (0 a 13 ± 5) (Fig. 7C); sin embargo, a las 96 h aumenta significativamente (65 ± 4 %), sin mostrar diferencias estadísticas con los cultivos en NCTCc. Con respecto a la extensión del trofoblastos se observa en la Fig. 7D que en el medio deficiente de fibronectina los embriones no presenta extensión hasta después de las 72 h, mostrando a las 96 h apenas un 38 ± 2 %, mientras que en el medio con suero completo a las 72 h se alcanza ya un porcentaje significativamente mayor de embriones extendidos (85 ± 5 %) ($P < 0.05$).

Es de señalar que en el medio deficiente de fibronectina prácticamente todos los blastocistos que rompen la ZP se adhieren, pero de estos últimos sólo alrededor del 50 % se extienden.

A pesar de que a las 96 h un alto porcentaje de embriones se adhiere en el medio con suero deficiente de fibronectina, sólo la mitad de estos embriones llegan a extenderse ($p < 0.05$), aunque los que lo hacen llegan a presentar un tamaño similar en sus áreas de extensión al de los embriones cultivados en NCTCc (Fig. 7E). Por lo general cuando se empleó el suero deficiente de fibronectina el desarrollo de los blastocistos fue más lento y se inhibió en algunos embriones la extensión del trofoblasto.

III. Efecto de la fetuina en el desarrollo de los blastocistos.

Para discriminar la participación de la fibronectina exógena, proporcionada por el suero, y la endógena, producida por el *conceptus*; se hicieron experimentos en medio NCTC con BSA sin suero, para estudiar cómo actúa la fibronectina para inducir la extensión del trofoblasto.

Por regla general la cinética del cultivo en todas las concentraciones de fetuina empleadas fue similar entre ellas y con aquellas de los cultivos en NCTCc excepto para el colapso del blastocele.

La cinética mostrada en el rompimiento de ZP fue similar en los medios con las diferentes concentraciones de fetuina y suero, a lo largo del tiempo de cultivo entre las 48 y 96 h, mientras que en el medio carente de fetuina el porcentaje de embriones que rompieron la ZP fue menor (0 y 63 ± 6 %, respectivamente) ($P < 0.05$) (Fig. 8A). Durante las primeras 48 y 72h al parecer no se observan diferencias en la pérdida de blastocele para cada uno de los medios con y sin fetuina (Fig. 8B). A las 72 y 96 h se muestra un porcentaje mayor en la pérdida de blastocele, en los medios con menos del 0.1% de fetuina ($P < 0.05$). La concentración de fetuina parece ser importante en la pérdida de cavidad a las 72 h. A las 48 h el porcentaje de adhesión del trofoblasto es menor (~ 35 %) en los medios con 0.25 $\mu\text{g/ml}$ de fetuina o sin ella, con respecto a los medios con mayores concentraciones de fetuina, que presentaron mayor porcentaje ($\sim 60\%$) ($P < 0.05$) (Fig. 8C). En las 72 h se generó una mayor adhesión para todos los medios de cultivo, excepto para el que no presenta fetuina; aún a las 96 h dicho medio promovió un menor grado de adhesión (56 ± 4 %) al substrato.

Los porcentajes de extensión fueron aumentando de las 24 a las 72 h (Fig. 8D). A las 48 h la extensión alcanzó un 25 %, sin mostrar diferencias entre las distintas condiciones de cultivo ($P > 0.05$). Entre las 72 y 96 h los medios con fetuina promovieron los mayores porcentajes de extensión (por arriba del 60 %) con respecto al control sin fetuina (45 ± 3 %) ($P < 0.05$). Al parecer la fetuina es un factor sérico que promueve la implantación *in vitro*. Las áreas de extensión (Fig. 8E) no muestran diferencia estadística significativa en las concentraciones de fetuina de 0.5, 0.75 y 1 mg/ml ($P < 0.05$); sin fetuina se obtuvo una ligera extensión similar a la concentración de 0.25 mg/ml . Las áreas de extensión alcanzadas por las tres concentraciones mayores de fetuina representan apenas un 25 % del área observada en el medio NCTCc.

IV. Efecto de la BSA en la implantación embrionaria *in vitro* inducida por fetuina.

De acuerdo con los resultados anteriores, el medio NCTC con un suplemento de BSA y fetuina (estos últimos componentes del SBF) favorece el proceso de implantación *in vitro* evaluado a través de los parámetros de rompimiento de la ZP, pérdida de la cavidad del blastocele, adhesión y extensión del trofoblasto. Sin embargo, no se conoce qué tanto estos fenómenos son disparados o estimulados por la fetuina y/o la albúmina. Para saber en qué grado la BSA modifica el efecto de la fetuina, se estudió la cinética de desarrollo bajo la acción de la fetuina (0.5 mg/ml) con y sin suplemento de BSA.

Entre las 48 a las 72 h del cultivo el porcentaje de embriones que se liberan de la ZP, aumenta de un ~50 a un ~80 % ($P < 0.05$) (Fig. 9A). Entre las 72 y las 96 h no hubo diferencias significativas para cada uno de los medios. El medio con fetuina sin BSA promovió el mismo grado de liberación de la ZP que el medio con esta proteína. Como se observa en la Fig. 9B, entre las 72 y 96 h disminuye significativamente el porcentaje de embriones con cavidad en ambos medios ($P < 0.05$). Es hasta las 96 h que se observa el mayor colapso de la cavidad del blastocele en el medio sin BSA, solamente un 40 % conservan la cavidad, mientras que en el medio con albúmina un 80 % conservan el blastocele ($P < 0.05$). Al parecer la pérdida de cavidad inducida por fetuina se ve retardada por la BSA. El comportamiento de adhesión de los embriones (Fig. 9C) en las primeras 48 h muestra un aumento significativo entre un 45-60 % ($P < 0.05$) en el medio con o sin BSA, la fetuina promueve este fenómeno independientemente de la presencia de albúmina. A las 48h de cultivo no se observa diferencia entre los porcentajes de extensión en los dos medios (con y sin fetuina) (Fig. 9D) con respecto al tiempo inicial. Hasta las 72 h se observa un mayor porcentaje de embriones extendidos en los dos medios (~65 %) ($P < 0.05$). En el medio NCTC, el suplemento de fetuina favorece la extensión aún sin BSA.

Las áreas de extensión del trofoblasto no mostraron diferencias estadísticas significativas (Fig. 9E) ($P > 0.05$) en las áreas de extensión, aunque en promedio el trofoblasto en el medio sin BSA parece tener una extensión casi del doble con respecto a aquellos en el medio con BSA, siendo el tamaño de muestra más pequeño en este grupo.

V. Efecto de los anticuerpos contra fibronectina la implantación *in vitro* de blastocistos inducida por fetuina.

Para evaluar si la fibronectina sintetizada y secretada por el embrión (fibronectina celular) participa en el proceso de implantación *in vitro* inducida por el suero, se utilizó un anticuerpo neutralizante contra fibronectina celular en dos diluciones: 1:30 y 1: 125. Este anticuerpo comercialmente contiene como conservador azida de sodio, por lo que se usaron como grupos controles, el medio con las concentraciones de azida de sodio correspondientes a las diluciones del anticuerpo (33 $\mu\text{g/ml}$ y 8 $\mu\text{g/ml}$, respectivamente). Se empleó además un anticuerpo irrelevante (antiIgGh) en la dilución 1: 30 (0.14 mg/ml) como control en la evaluación de las áreas de extensión.

En general no se observó efecto del anticuerpo contra fibronectina celular en la cinética del cultivo con respecto a sus controles que contienen la misma cantidad de azida de sodio.

Sólo en los cultivos en el medio NCTCc con antifibronectina celular en la dilución 1:30 se encontró una menor área de extensión con respecto a su control ($P < 0.05$) (Fig. 10), lo cual podría indicar que el anticuerpo en esta dilución afecta el grado de extensión del trofoblasto.

Debido a que casi no se observó un efecto del anticuerpo contra fibronectina celular en la implantación *in vitro* inducida por el suero se decidió utilizar otro anticuerpo. Ya que en el laboratorio se contaba con un anticuerpo policlonal neutralizante antifibronectina sérica el cual ya se había empleado en los cultivos en presencia de suero, se quiso probar su efecto sobre la implantación *in vitro* en medio NCTC con 0.5 mg/ml de fetuina, partiendo de diluciones probadas previamente en medio NCTCc (Baiza, 1994). Además se buscó eliminar cualquier otro suplemento de fibronectina, por lo que para estos ensayos se empleó en medio únicamente con fetuina y como control, se usó un anticuerpo no relevante (antiIgGh) en las mismas concentraciones (17 y 34 $\mu\text{g/ml}$). Del anticuerpo menos concentrado sólo se muestran los resultados para las áreas de extensión.

En las diferentes concentraciones de antifibronectina sérico (17 y 34 $\mu\text{g/ml}$) el porcentaje de embriones que rompen la ZP (Fig. 11A) es menor y más lento con respecto a los grupos controles durante las 96 h de cultivo ($P < 0.05$), lo cual indica que el anticuerpo antifibronectina

sérica influye en este proceso, ya que a las 96 h sólo ~40 % de los *concepti* rompen la ZP en presencia del anticuerpo, siendo que en el grupo control se alcanza un mayor porcentaje de rompimiento de la ZP de alrededor del 85% ($P < 0.05$).

El anticuerpo, a una concentración de 34 $\mu\text{g/ml}$ en el medio de cultivo, promovió una pérdida de cavidad igual a las 48 y 72 h y finalmente, a las 96 h, solamente un 10% presentan cavidad, en tanto que con anti IgGh (34 $\mu\text{g/ml}$) todos la colapsan ($P < 0.05$) (Fig. 11B). De acuerdo con estos resultados no se puede establecer un efecto del anticuerpo en el colapso del blastocele.

La adhesión de los embriones sigue un comportamiento similar a la ruptura de la ZP: todos aquellos que se liberan de ella se adhieren al sustrato independientemente de la concentración del anticuerpo (Fig. 11C). Al parecer el anticuerpo antifibronectina sérica en la dilución de 34 $\mu\text{g/ml}$ afectó el rompimiento de la ZP, por lo que la adhesión también se observó disminuida durante todo el tiempo de cultivo sin encontrarse un efecto directo sobre ella. A pesar de que fue observada la adhesión con el uso de los anticuerpos contra fibronectina sérica entre las 48 y las 96 h de cultivo; en las primeras 48 h no se observaron embriones extendidos aún en el grupo control con antiIgGh (Fig. 11D).

Entre las 72 y 96 h, en los medios con el anticuerpo antifibronectina en las dos diluciones empleadas, se presentó un menor porcentaje de extensión con respecto a los cultivos en el medio con antiIgGh ($P < 0.05$). La extensión en la dilución 34 $\mu\text{g/ml}$ de antifibronectina fue nula entre las 24 y 72 h, a pesar de que este tiempo, alrededor de un 10 % rompieron la ZP. A las 96 h aumento a alrededor de un 30% ($P < 0.05$), valor que fue similar al de los embriones con rompimiento de la ZP. En la dilución del anticuerpo hasta 17 $\mu\text{g/ml}$ sólo alrededor del 50 % de los embriones que rompieron la ZP y se adhirieron, se extendieron.

Se encontró una acción inhibitoria del anticuerpo sobre la extensión del trofoblasto, idea que se reforzó al encontrar que el anticuerpo antifibronectina sérica a la concentración de 34 $\mu\text{g/ml}$ (Fig. 11E) causa una reducción en el área de extensión del trofoblasto ($P < 0.05$) en comparación al medio con antiIgGh, no así en la concentración 17 $\mu\text{g/ml}$, que no mostró diferencias significativas con el control.

VI. Inmunodetección de fibronectina celular por medio de “western blotting”.

Mediante las técnicas de “dot-blot” y “western-blotting” no se detectó la presencia de fibronectina en los medios acondicionados por 150 embriones cuando estos se cultivaron por 96 h en NCTC con BSA y fetuina al 0.05%. Sin embargo, con esta metodología se pudo inmunolocalizar un estándar de fibronectina humana empleando 2 µg de esta proteína (Fig. 12).

VII. Cuantificación de fibronectina por ELISA

Para la cuantificación de fibronectina se estandarizó el método de ELISA indirecto; utilizando diferentes cantidades de fibronectina humana (2 a 10 µg) y estableciendo la dilución óptima a emplear del primer anticuerpo; para ello se probaron varias diluciones 1: 625, 1: 1250, 1: 2500, 1: 5000, de las cuales se decidió emplear la dilución 1: 1250. En la Fig. 13A se observa el comportamiento de la curva estándar en esta dilución, se observa una relación lineal entre la densidad óptica (D. O.) y la concentración de fibronectina en el intervalo de esta última de 1 a 40 ng (Fig. 13B) y en esta región de la curva se obtuvo por análisis de regresión un coeficiente de regresión de Pearson de 0.995.

La técnica estandarizada de ELISA se usó para la Cuantificación de fibronectina en muestras de suero humano, para ello se emplearon diluciones de suero que daban valores de D. O. en la parte lineal de la curva. La cantidad de fibronectina que se obtuvo en el suero fue de 735.959 ± 67.745 µg/ml, valor similar a los ya establecidos por Poulouin y col. (1999).

En los medios acondicionados en los cultivos en Biggers y NCTC con fetuina después de 96 h de cultivo no se detectó fibronectina por esta metodología. Sólo en el medio NCTC se encontró que se liberaban al medio 559.28 ± 58.09 pg de fibronectina por embrión, este dato corresponde a 5 ensayos.

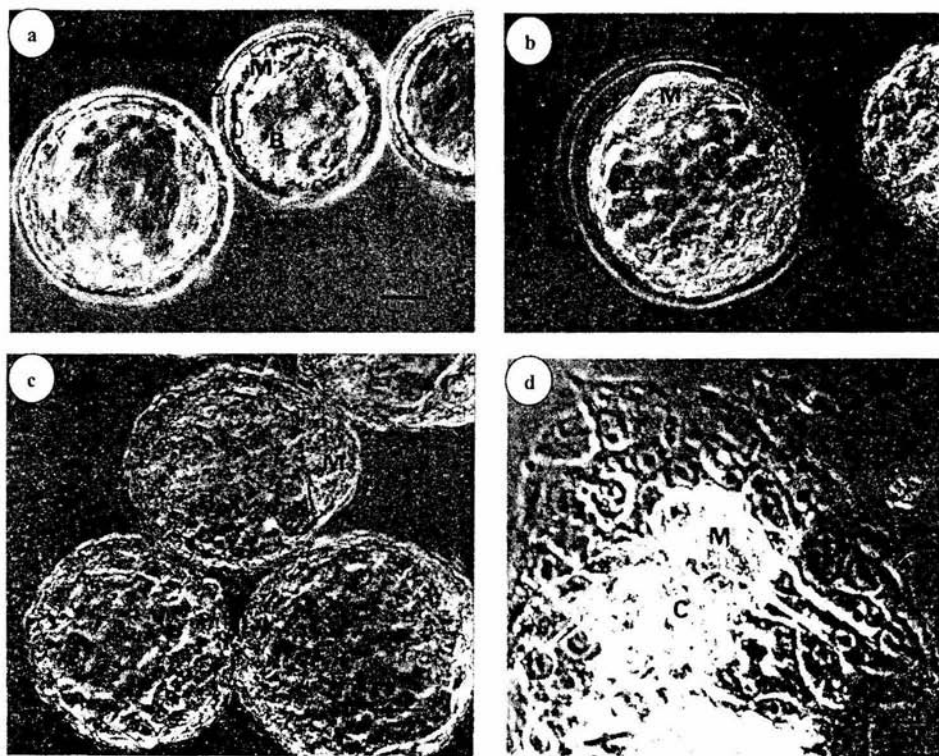


Figura 6. Desarrollo *in vitro* de blastocistos de ratón. Los embriones al 4º día de preñez conservan aún la zona pelúcida, el blastocelo (B) y se distingue la masa celular interna (M) como se observa en (a). Después del primer día de cultivo en medio NCTC la mayoría se liberan de la zona pelúcida (b) y se adhieren al sustrato (c). A las 96 h las células del trofoblasto se han extendido formando células gigantes con núcleos prominentes, en esta etapa ya no se observa el blastocelo, el cual se ha colapsado (d). Z: zona pelúcida, B: blastocelo, M: masa celular interna, T: trofoblasto, C: células del trofoblasto polar que han formado una estructura similar al cono ectoplacentario, G: células gigantes del trofoblasto. Microscopia de contraste de fases. La barra corresponde a 10 μ m.

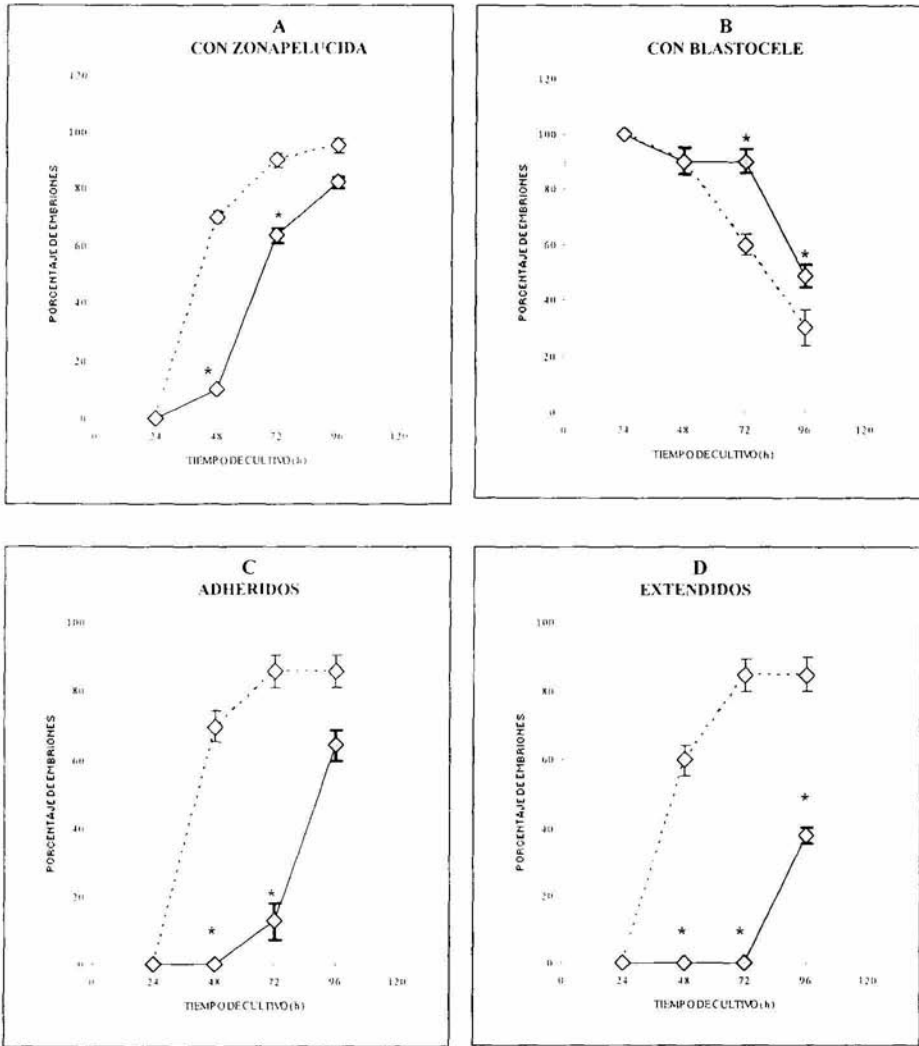


Figura 7. (Ver página siguiente)

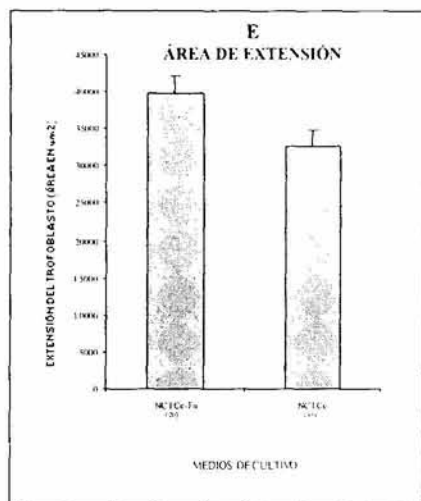


Figura 7. Desarrollo *in vitro* de blastocistos de ratón en medio NCTC deficiente de fibronectina. Los blastocistos obtenidos del 4º día de preñez fueron cultivados en medio de Biggers con BSA y después de 17 h. transferidos a medio NCTC deficiente de fibronectina (NCTC-Fn) (—◇—) o NCTC (· · ◇ · ·). Se muestra el porcentaje de embriones sin ZP (A), con blastocelo (B), adheridos (C) o extendidos sobre el sustrato (D). En (E) se presenta el área de extensión del trofoblasto. Cada punto representa la media \pm error estándar ($\bar{x} \pm E. E.$) y entre paréntesis el número de *concepti* observados de 5 experimentos separados realizados en cultivo de 10 blastocistos. * $P < 0.05$ cuando se compara con cultivos en NCTC. En cuanto a las áreas de extensión no hubo diferencia entre ambos grupos.

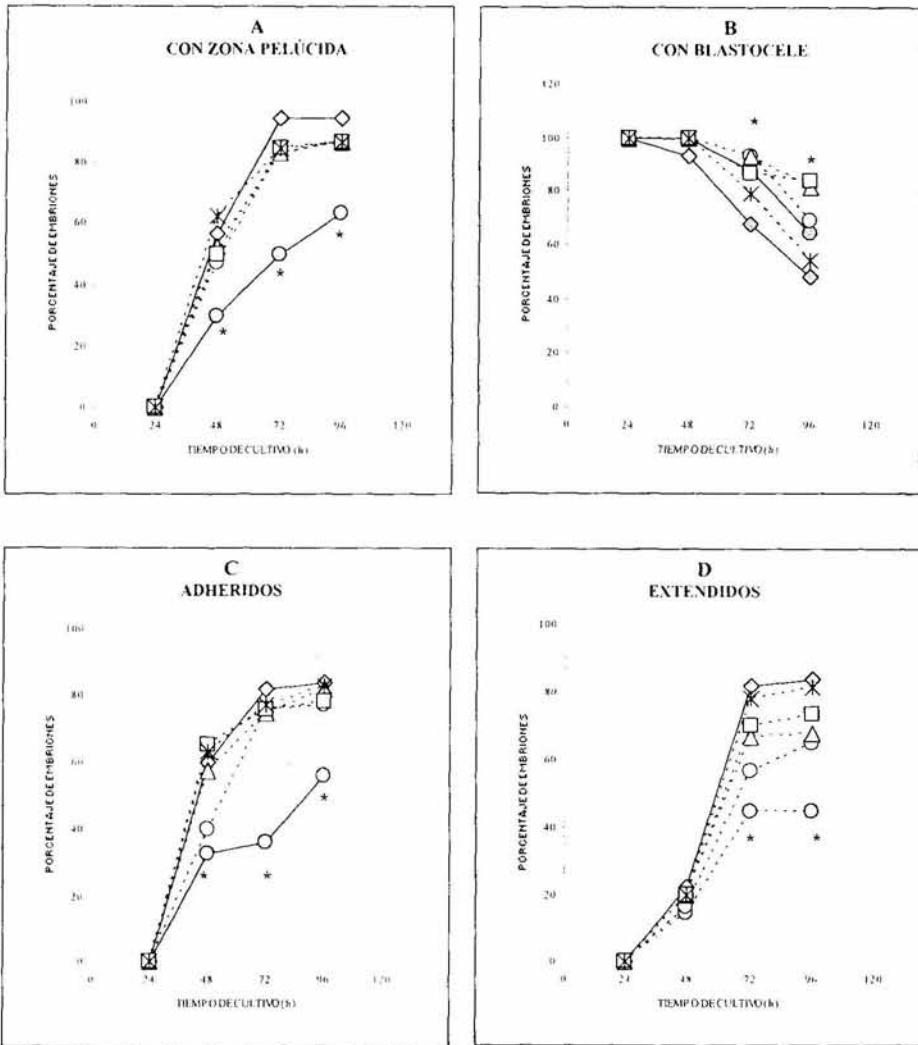


Figura 8. (Ver página siguiente)

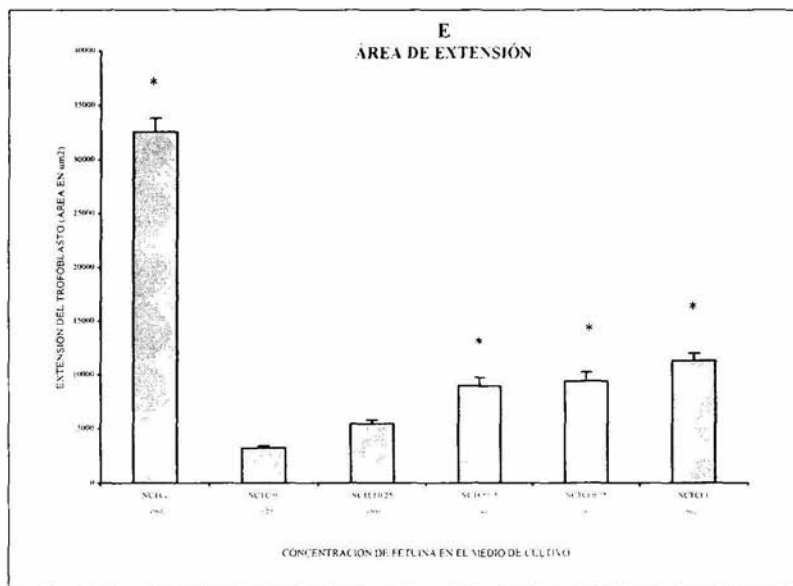


Figura 8. Efecto de la concentración fetal en el desarrollo *in vitro* de blastocistos de ratón en presencia de BSA. Los embriones obtenidos del 4º día de preñez fueron cultivados en medio de Biggers con BSA y después de 17 h, transferidos a medio NCTC con un suplemento de BSA (0.4 mg/ml) y diferentes concentraciones de fetuina (NCTCf) (—○— 0.0, —○— 0.25, —△— 0.5, —□— 0.75, —*— 1 mg/ml). Se utilizó el medio NCTCc (—◇—) como control positivo. Se muestra el porcentaje de embriones sin ZP (A), con blastocele (B), adheridos (C) o extendidos sobre el sustrato (D). En (E) se presenta el área de extensión del trofoblasto. Cada punto representa el \bar{x} y entre paréntesis el número de *concepti* de 5 experimentos separados realizados en cultivo de 10 blastocistos. El E. E. no se representó en las gráficas A-D, siendo menor al 10 % en todos los puntos. En A-D: * $P < 0.05$ cuando se compara con cultivos en NCTCc. En E: Todos los grupos experimentales fueron diferentes con respecto a los cultivos en NCTCc y * $P < 0.05$ cuando se compara con cultivos en medio sin fetuina. En cuanto a las áreas de extensión no hubo diferencia entre ambos grupos.

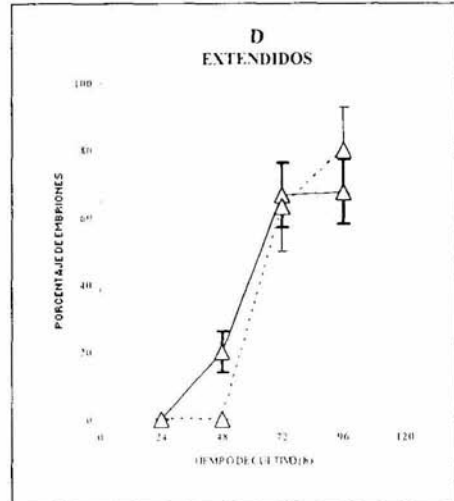
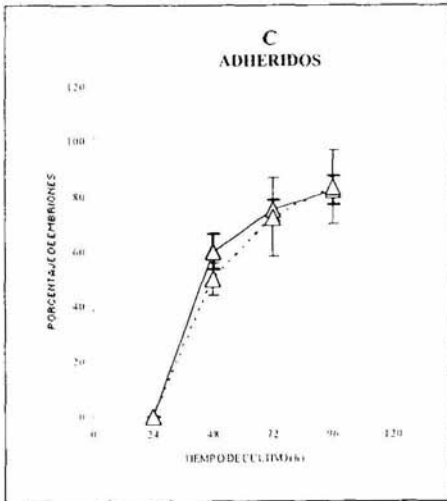
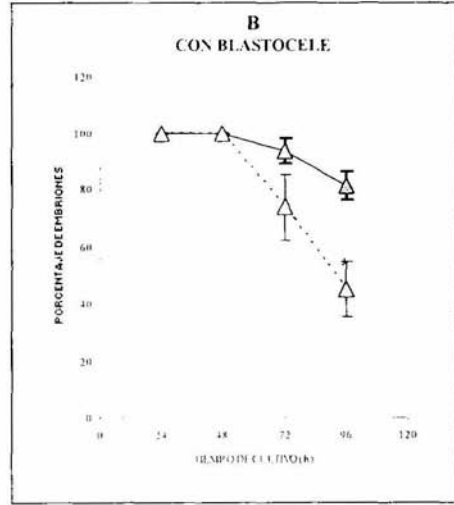


Figura 9. (Ver página siguiente)

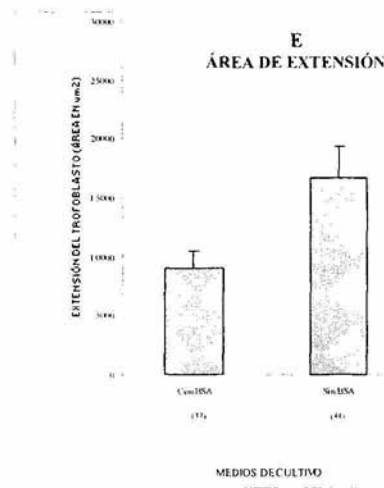


Figura 9. Efecto de la BSA en la acción de la fetuina en el desarrollo *in vitro* de blastocistos de ratón. Los blastocistos obtenidos del 4º día de preñez fueron cultivados en medio de Biggers con BSA y después de 17 h, transferidos a medio NCTC con un suplemento de fetuina (0.5 mg/ml) y BSA (4 mg/ml) (Con BSA) (—Δ—) o el mismo medio sin BSA (Sin BSA) (··Δ··). Se muestra el porcentaje de embriones sin ZP (A), con blastocelo (B), adheridos (C) o extendidos sobre el sustrato (D). En (E) se presenta el área de extensión del trofoblasto. Cada punto representa la $\bar{x} \pm E. E.$, y entre paréntesis el número de *concepti* observados de 5 experimentos separados realizados en cultivo de 10 blastocistos. * $P < 0.05$ cuando se compara con cultivos en NCTC con fetuina. Con respecto a las áreas de extensión no hubo diferencia entre ambos grupos.

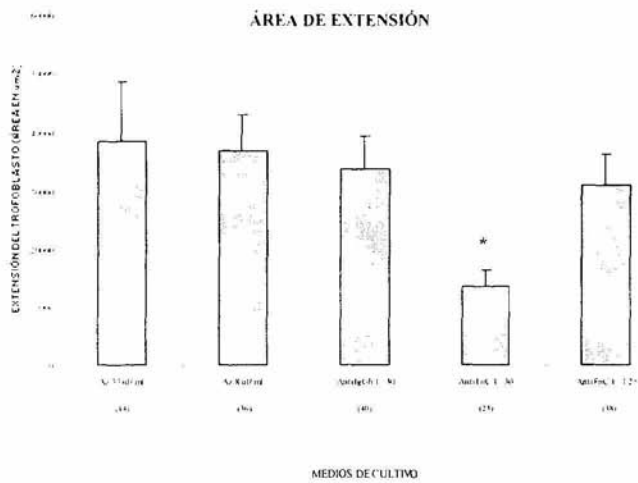


Figura 10. Efecto del anticuerpo contra fibronectina celular en el desarrollo *in vitro* de blastocistos de ratón sostenida por el suero. Los blastocistos obtenidos del 4º día de preñez fueron cultivados en medio de Biggers con BSA y después de 17 h, transferidos a medio NCTC con anticuerpo antifibronectina celular (AntiFnC) en las diluciones de 1: 30, 1: 125 y se usaron como sus controles respectivos los medios con azida de sodio (Az) al 33 µg/ml y 8 µg/ml y NCTC con anticuerpo AntiGh en la dilución 1: 30 (0.14 mg/ml). Se presenta el área de extensión del trofoblasto. Cada punto representa la $\bar{x} \pm E. E.$ y entre paréntesis el número de *concepti* observados de 3 experimentos separados realizados en cultivo de 10 blastocistos. * $P < 0.05$ cuando se compara con su control respectivo.

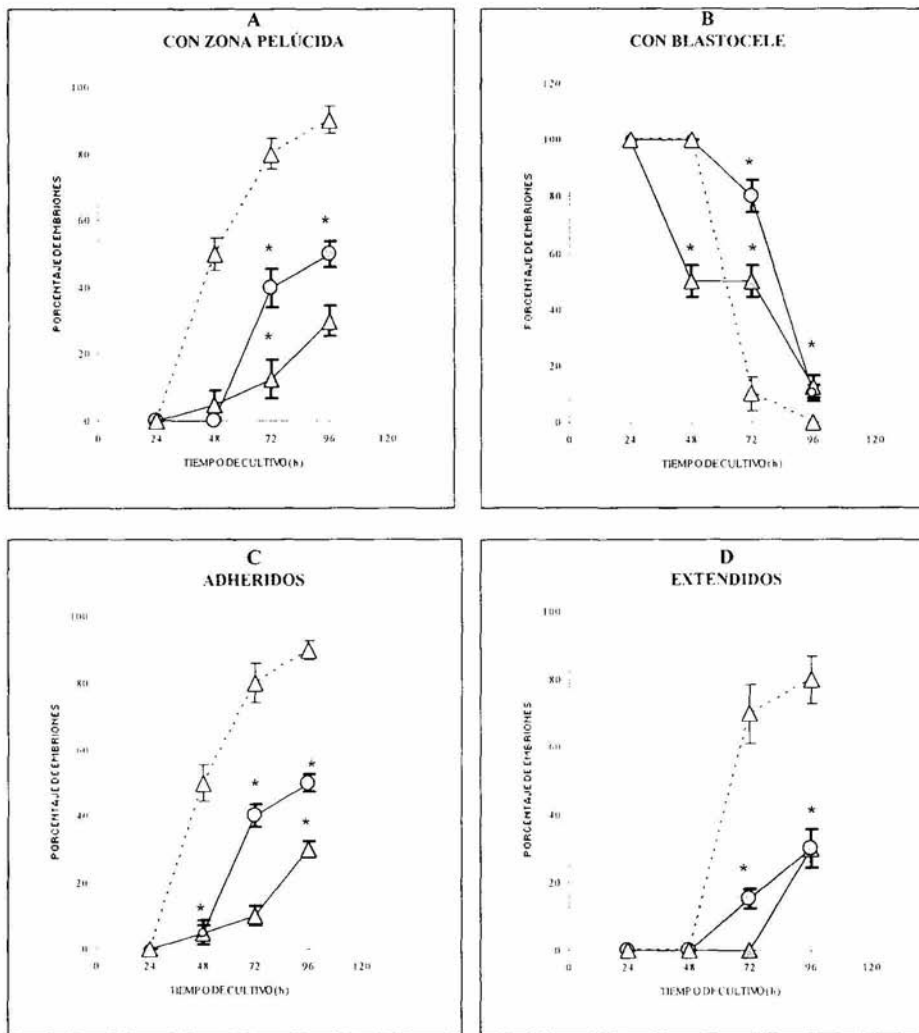


Figura 11. (Ver página siguiente)

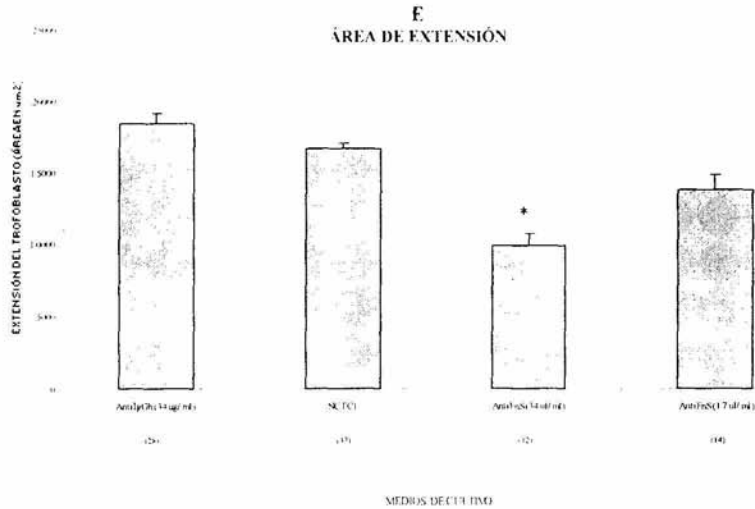


Figura 11. Efecto del anticuerpo contra fibronectina sérica en el desarrollo *in vitro* de blastocistos de ratón inducido por fetuina. Los embriones obtenidos del 4º día de preñez fueron cultivados en medio de Biggers con BSA y después de 17 h, transferidos a medio NCTC con fetuina (NCTCf) (0.5 mg/ml) con anticuerpo antifibronectina sérica (AntiFnS) a distintas concentraciones 34 µg/ml (—Δ—) y 17 µg/ml (—○—). Se usó como control el medio con AntiIgGh 34 µg/ml (—△—). Se muestra el porcentaje de embriones sin ZP (A), con blastocele (B), adheridos (C) o extendidos sobre el sustrato (D). En (E) se presenta el área de extensión del trofoblasto. Cada punto representa la $\bar{x} \pm E. E.$ y entre paréntesis el número de *concepti* observados de 3 experimentos separados realizados en cultivo de 10 blastocistos. Se observó un comportamiento similar del cultivo en presencia de IgGh y el medio con fetuina de A-D. * $P < 0.05$ cuando se compara con el medio control con AntiIgGh (34 µg/ml).

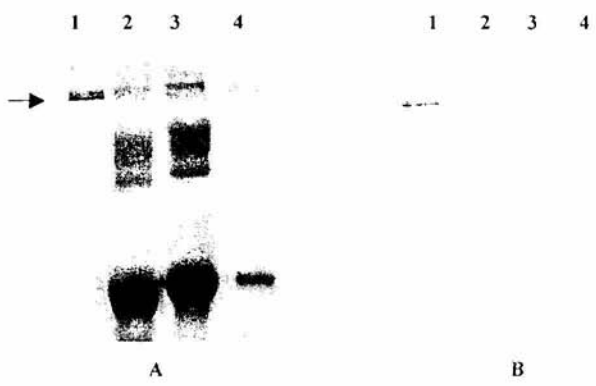


Figura 12. Inmunodetección de fibronectina. En A. Corrimiento electroforético en geles de poliacrilamida al 7 % con SDS de las proteínas en el medio NCTC con un suplemento de BSA (0.4 mg/ml) y fetuina (0.5 mg/ml) después de 96 h de cultivo. En B. *Western-blotting* de los medios acondicionados. En el carril 1, fibronectina comercial (→); en 2, medio sin embriones; en 3, medio con embriones; en 4, BSA comercial.

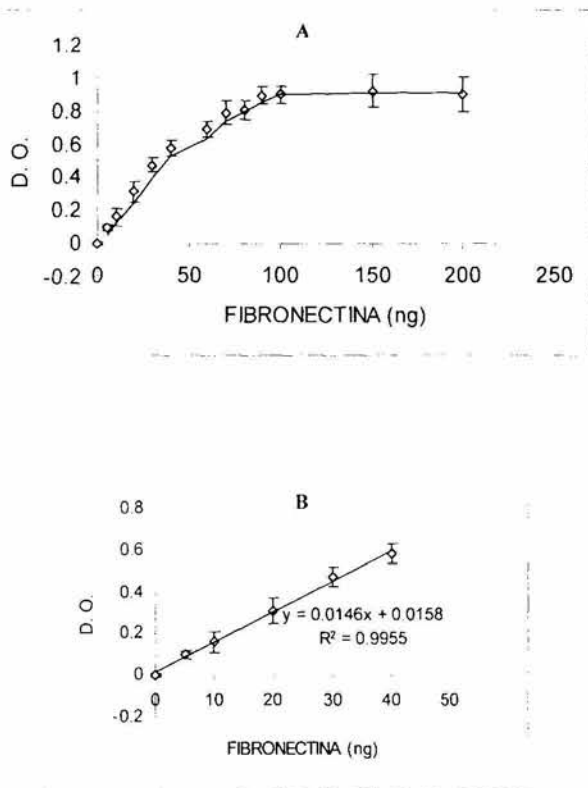


Figura 13. Curva estándar de fibronectina. En **A**, se representa la densidad óptica (D.O.) obtenida a diferentes concentraciones de fibronectina (0-200 ng) por el método de ELISA indirecto. Se empleó una dilución 1: 1250 del anticuerpo antifibronectina sérica. En **B**, se muestra la parte recta de la curva. Se aplicó la regresión lineal a los datos en el intervalo de 1 a 40 ng de fibronectina. Cada punto representa la $\bar{x} \pm$ la D. E. de 15 determinaciones.

DISCUSIÓN

Durante el proceso de implantación embrionaria en mamíferos, el trofoblasto tiene que penetrar hasta la membrana basal y el estroma uterino, donde interactúa con proteínas y componentes tisulares que le van a permitir el desarrollo óptimo y el establecimiento de la placenta.

Las bases moleculares de la implantación embrionaria *in vitro* no se conocen del todo; debido a la complejidad del sistema y su inaccesibilidad a la experimentación controlada. Sin embargo, se han implementado modelos para su estudio *in vitro*.

El empleo de glucosa, ciertos aminoácidos y suero en los medios de cultivo adecuados han permitido considerar una gran variedad de factores de adhesión, proliferación y migración para diferentes substratos artificiales y celulares por parte del blastocisto. Las células del trofoblasto llegan a desarrollar la capacidad de romper la ZP, adherirse y crecer *in vitro*. Estas etapas se han analogado a los eventos que ocurren durante el desarrollo de blastocistos *in utero* (Sutherland y col., 1988).

Es importante señalar que los modelos de implantación embrionaria *in vitro* están más relacionados con la interacción del blastocisto con la MEC uterina durante la etapa de invasión, que con las etapas anteriores de la implantación.

La naturaleza y el papel de los factores séricos en los eventos del desarrollo post-implantación en cultivo no son completamente entendidos. Dentro de éstos los que podrían desempeñar una función relevante, están la fibronectina sérica y la fetuina, ya que éstos han sido empleados para sostener el desarrollo *in vitro* de los blastocistos (Rizzino y Sherman, 1979; Sellens y Sherman, 1980; Armant y col., 1986a; Carnegie, 1991; Martínez, 1994).

En este trabajo se pretendió eliminar la fibronectina exógena, proporcionada por el suero, para luego estudiar la participación de la fibronectina endógena, producida por el *conceptus*, en un medio con un suplemento de fetuina. Sin embargo, no se consiguió eliminar totalmente la fibronectina debido probablemente a que el método empleado no fue eficiente.

Los resultados obtenidos en este trabajo en los cultivos de blastocistos en el medio con suero deficiente de fibronectina apoyan el hecho de que esta proteína sea uno de los principales factores séricos en promover la extensión del trofoblasto, lo cual ya ha sido reportado (Armant y col., 1986a). Sin embargo, existe evidencia de que la fibronectina podría no ser el único factor sérico implicado, ya que una cubierta de fibronectina en las cajas de cultivo, sostiene parcialmente la extensión del trofoblasto y otros factores séricos menores de 100 kDa promueven también este efecto (Tachi, 1992).

Otra proteína presente en el suero es la vitronectina, la cual también sostiene de manera limitada la adhesión y extensión del trofoblasto (Kornobliht y Gutman, 1988; Armant y col., 1986b; Tachi, 1992), tiene un peso molecular de 140 kDa por lo que no corresponde a la fracción del suero propuesta por Tachi (1992).

Entre los componentes del suero con un peso molecular de 30 a 100 kDa, podrían estar la fetuina y algunos factores de crecimiento (Tachi, 1992). Es posible de acuerdo con lo anterior, que la participación de la fibronectina en el proceso de implantación *in vitro* sea no solamente la de proporcionar un sustrato para la extensión del trofoblasto, sino también la de unir otras moléculas como factores de crecimiento, lo cual se ha observado en los cultivos de fibroblastos (Roy y col., 1993).

La fibronectina es una proteína que no solamente está presente en el SBF, sino que también es un componente de la membrana basal y la MEC del epitelio y el estroma, respectivamente, del endometrio (Armant y Kameda, 1994; Gilbert, 1997), con quienes interactúa el trofoblasto durante su diferenciación: el blastocisto presenta sitios receptores (integrinas) a esta proteína, por lo que la fibronectina podría desempeñar una función importante *in situ* (Wartiowaara y col., 1979; Shiokawa y col., 1999).

En este trabajo los resultados indican que la fibronectina sérica es uno de los componentes más importantes para sostener la implantación *in vitro* de los blastocistos de ratón, ya que el medio con suero deficiente de fibronectina redujo significativamente el número de los *concepti* que llegaron a adherirse y a extenderse, lo cual indica que la fibronectina resultó insuficiente para sostener su desarrollo. Sin embargo, de los que llegaron a adherirse sólo un 50% se extendieron y las áreas que generaron no fueron diferentes a las del medio con suero completo, lo que hace

suponer que estos *concepti* fueron capaces, quizá por la participación que algún otro factor sérico o por la producción de alguna sustancia de promover su proliferación y adhesión (extensión) al sustrato.

Por otro lado, se ha observado en otros sistemas que células musculares pueden adherirse y crecer sobre cubiertas de colágena o fibronectina, pero en ausencia de fetuina detienen su crecimiento (Nie y col., 1991). Lo cual apoya la idea de que la fibronectina sérica participa en el proceso de implantación *in vitro* pero, otros factores como la fetuina sostienen el crecimiento.

Es conocido que la fetuina puede participar también en la acción promotora del suero en la implantación *in vitro*. Los datos obtenidos en este trabajo y los encontrados en otros reportes (Rizzino y Sherman, 1979) muestran que la fetuina sostiene la adhesión y extensión del trofoblasto *in vitro* promoviendo un desarrollo similar al del medio de cultivo con suero, lo cual sugiere que este suplemento pudiera ser suficiente para promover dicho efecto; sin embargo, las áreas de extensión conseguidas con fetuina representan apenas un 22% de las generadas con suero completo, por lo que se pensó que algún otro u otros factores del suero, a parte de la fibronectina, se requerían en este proceso.

Los medios con fetuina y un suplemento de albúmina no presentaron cambios en la cinética de los cultivos ni en las áreas de extensión de los *concepti* con respecto a los medios sin esta última proteína. La omisión de albúmina no evita el rompimiento de la ZP, ni la adhesión o la extensión o diferenciación del trofoblasto, pero si puede guiar a la muerte de la MCI. Sin embargo, este efecto puede ser parcialmente generado aumentando la concentración de fetuina hasta un 0.3%, y se ha visto que si se llega a omitir la fetuina algunos blastocistos se adhieren en la caja de cultivo, pero ninguno llega a extenderse (Rizzino y Sherman, 1979). En este caso no fue tan evidente el requerimiento de albúmina y algunos blastocistos si llegaron a extenderse sin la fetuina pero en menor proporción, lo que implica la participación en menor escala de otros factores del suero y/o del *conceptus* para sostener este mínimo grado de desarrollo.

La fetuina podría corresponder a uno de los factores séricos propuestos por Tachi (1992) pues tiene un peso molecular de 68 kDa y es capaz de sostener la adhesión y un crecimiento limitado en extensión del trofoblasto.

IZT.



Aunque la fetuina fue descrita hace más de 50 años (Pedersen, 1944) en el SBF y luego se encontró que presentaba una alta homología con la $\alpha 2$ -macroglobulina presente en el humano (Salomon y col., 1982), su papel en la preñez y el desarrollo fetal se conocen sólo parcialmente. La fetuina ha sido considerada una proteína con efectos múltiples en diversos sistemas biológicos incluyendo a la implantación embrionaria *in vitro* (Rizzino y Sherman, 1979; Sellens y Sherman, 1980; Carnegie, 1991).

El suero contiene alrededor de un 45 % de fetuina, por lo que se ha propuesto que su actividad promotora de crecimiento se debe a la presencia de dicha proteína (Brown y col., 1992), ya que esta proteína empleada en concentraciones de 0.5 a 1 mg/ml promueve un crecimiento óptimo en una extensa variedad de cultivos celulares (Nie, 1992).

Los resultados del cultivo de blastocistos en presencia de fetuina y un anticuerpo neutralizante policlonal contra fibronectina, mostraron que la fibronectina embrionaria podría mediar en parte, la acción de la fetuina, ya que menos del 50% de los embriones rompieron la ZP, se adhirieron y extendieron, en las dos concentraciones empleadas y se redujo significativamente el área de extensión en la mayor concentración del anticuerpo. Lo cual apoya la posibilidad de que la fetuina induce la síntesis y/o liberación de fibronectina u otras proteínas de MEC alrededor del tiempo de la implantación. Si es así, la participación de la fibronectina explica parcialmente la acción de la fetuina, por lo que seguramente otros mecanismos también colaboren en este proceso. Hasta el momento se desconoce por qué el anticuerpo inhibe la ruptura de la ZP, lo cual ya ha sido previamente reportado (Baiza, 1994), quizá el anticuerpo interfiere de alguna manera con la estrepisina, enzima responsable de este proceso.

El papel de la fetuina en la promoción y modulación de la adhesión y el crecimiento celular en la implantación *in vitro* podría ser debido a varias razones. 1) La fetuina podría estimular la síntesis y/o secreción de sustancias que sirvan de sustrato para la adhesión y extensión, como moléculas de MEC, como la fibronectina y/u otras proteínas de MEC, ya que también se ha observado que una fracción de la fetuina estimula la producción de la colágena en las células epiteliales renales y mamarias en rata (Salomon y col., 1982), lo cual apoya la idea de que la fibronectina sérica participa en el proceso de implantación *in vitro* pero, que otros factores séricos como la fetuina de manera indirecta podrían sostener el crecimiento del trofoblasto. Sin embargo,

no se descarta que 2) la proteína *per se*, generará este efecto, ya que la digestión proteolítica de ésta disminuye sus propiedades (Gauthier y col., 1995). 3) La presencia de factores contaminantes en la fetuina, como el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), el cual se ha encontrado en algunos preparados de fetuina (Brown, 1992; Nie, 1992) también se ha pensado que sea el candidato promotor de la proliferación y no tanto de la fetuina misma. 4) Cabe además la posibilidad de que exista una modulación de la actividad de hormonas (insulina), factores de crecimiento (factor de crecimiento de hepatocitos HGF y TGF- β 1) u otras moléculas (metaloproteinasas de MEC) por parte de la fetuina, ya que la ésta interfiere con los receptores de tales moléculas (Ohnishi y col., 1997; Mathews y col., 1997; Forester, 1996; Ochieng y col., 1995); la insulina es un factor sérico la cual también se emplea para promover crecimiento en los cultivos celulares; específicamente el TGF- β 1 estimula la extensión del trofoblasto a través de una proteína relacionada a la hormona paratifoidea (PTHrP) (Nowak y col., 1999) y la metaloproteinasas de matriz extracelular-9 (MMP-9) ha sido localizada en la superficie del trofoblasto del ratón (Martínez y col., 2002) y se ha demostrado que la fetuina puede unirse a ésta y activarla, lo cual tiene un gran significado en los procesos de morfogénesis o remodelación, donde se requiere de la digestión de proteínas (Ochieng y col., 1995). Lo cual podría ser relevante para el proceso de diferenciación del trofoblasto en cuanto a la expresión de su fenotipo invasivo, no solamente en lo referente a su crecimiento.

Por otra parte, ya ha sido demostrada la presencia de fibronectina en embriones desde etapas tempranas como dos células hasta etapas embrionarias peri-implantacionales *in situ*. En el blastocisto se han encontrado en las células de la MCI (Wartiowaara col., 1979). La secreción de fibronectina de blastocistos de ratón en cultivos sin suero, utilizando fetuina, ya ha sido reportada (Carnegie, 1991). Sin embargo, el dato se menciona como preliminar y no fue confirmado posteriormente. De acuerdo con estas evidencias, es factible que la fibronectina sea sintetizada y requiera de algún factor del medio para ser secretada durante el periodo de implantación, con la fetuina, la secreción de la proteína de MEC posiblemente sea mínima e imperceptible por la técnica que se empleo en este trabajo o quizá por que fue degradada, ya que tampoco se inmunodetectó por “*westwrn-blotting*”.

A parte de la fetuina, algún otro factor del suero, podría estimular su liberación hacia el medio de cultivo, ya que en los cultivos con suero sí fue posible cuantificar fibronectina por el método de ELISA.

El mecanismo de acción de la fetuina en los procesos de adhesión y extensión aún no se conocen del todo, los resultados obtenidos guían a la posibilidad de que una de las acciones de esta proteína sea la de promover la síntesis y secreción de fibronectina u otras proteínas de MEC como la colágena, ya sea de forma directa o indirecta.

CONCLUSIONES

1. Se encontró evidencia sobre la participación de la fibronectina sérica como el principal factor sérico que sostiene la implantación *in vitro* de los blastocistos de ratón. La fibronectina sérica es una proteína que comúnmente se ha empleado para promover adhesión y migración en diversos sistemas celulares incluyendo los procesos de adhesión y extensión celular de embriones de ratón.
2. El anticuerpo neutralizante policlonal contra fibronectina disminuye significativamente la proporción de embriones que rompen la ZP, además de evitar la extensión del trofoblasto, disminuir el área de extensión del mismo, sin afectar la adhesión al sustrato. Sin embargo, estos resultados no excluyen que el anticuerpo estuviese actuando evitando la acción de la fibronectina producida por el embrión y señalan la existencia de otros factores séricos promotores de la adhesión del trofoblasto al sustrato y que sostienen en menor grado su extensión.
3. La fetuina puede participar también en la acción promotora de la implantación *in vitro* del SBF. Los datos obtenidos en este trabajo confirman que la fetuina sostiene la implantación *in vitro* ya que promueve un desarrollo similar al del medio con suero, lo cual hace suponer que este suplemento pudiera ser suficiente para promover la implantación embrionaria *in vitro*; sin embargo, las áreas de extensión conseguidas con fetuina representan apenas un 22 % de la generada con suero completo, por lo que seguramente algún otro u otros factores del suero se requieren durante el proceso de implantación *in vitro*.
4. Los experimentos de cultivo de blastocistos en presencia de fetuina y anticuerpo contra fibronectina indican que la fibronectina puede mediar en parte la acción de la fetuina. Por lo que la fetuina es necesaria pero no indispensable para sostener el desarrollo *in vitro* de blastocistos de ratón.
5. No fue posible la cuantificación de fibronectina por medio de ELISA en el medio NCTC con fetuina, pero sí en el suero humano. Es posible que la acción de la fetuina sea a través de la producción mínima de fibronectina y/u otras proteínas de MEC o que además existan otros

factores del suero que promuevan el proceso de adhesión y extensión del trofoblasto a través de fibronectina, ya que esta fue cuantificada en medio NCTC.

6. El mecanismo de acción de la fetuina no se resuelve ya que los resultados de este trabajo indican que la inducción por ésta de la síntesis y liberación de fibronectina embrionaria sólo explican en forma mínima la acción de la fetuina, la posibilidad de que ésta induzca la secreción de otra proteína de la MEC queda abierta.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

Abrahamson, P. A.; Zorn, T. M. T. (1993) Implantation and decidualization in rodents. *J. Exp. Zool.* 266: 603-628.

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

Armant, D. D.; Kameda, S. (1994) Mouse trophoblast cell invasion of extracellular matrix purified from endometrial tissue: A model for peri-implantation development. *J. Exp. Zool.* 269: 146-156.

Armant, D. R.; Kaplan, H. A.; Lennarz, W. J. (1986a) Fibronectin and laminin promote *in vitro* attachment and outgrowth of mouse blastocysts. *Dev. Biol.* 116: 519-523.

Armant, D. R.; Kaplan, H. A.; Mover, W.; Lennarz, W. J. (1986b) The effect of hexapeptides on attachment and outgrowth of mouse blastocysts cultured *in vitro*: evidence for the involvement of the cell recognition tripeptide Arg-Gly-Asp. *Proc. Nat. Acad. Sci. E. U.* 83: 6751-6755.

Ausubel, F. M.; Brent, R.; Kingston, R. E.; Moore D. D.; Seidman, J. G.; Smith, J. A.; Struhul, K. (ed) (1992) Short Protocols in molecular biology. 2^o Ed. John Wiley & Sons. New York. Pp. 10.5 – 10.35.

Baiza, G. L. A. (1980) Concentración de grupos SH en útero de rata durante el ciclo estral. Tesis Profesional. Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM. México.

Baiza, G. L. A. (1994) Síntesis y secreción de proteínas durante la implantación *in vitro* de blastocistos de ratón. Tesis de doctorado. Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM. México.

Barlow, P.; Sherman M. I. (1972) The biochemistry of differentiation of mouse trophoblast: Studies on polyploidy. *J. Embryol. Exp. Morph.* 27: 447-465.

Beherendtsen, O.; Alexander, C. M.; Werb, Z. (1992) Metalloproteinases mediate extracellular matrix degradation by cells from mouse blastocyst outgrowths. *Development* 114: 447-456.

Brown, W. M.; Saunders, N. R.; Mollgard, K.; Dziegielewska, K. M. (1992) Fetuin: an old friend revisited. *Bioessays* 14(11): 749-755.

Carnegie, J. A. (1991) Immunolocalization of fibronectin and laminin within rat blastocysts cultured under serum-free conditions. *J. Reprod. Fert.* 91: 423-434.

Carson, D. D.; Bagchi, I.; Dey, S. K.; Enders, A. C.; Fazleabas, A. T.; Lessey, B. A.; Yoshinaga, K. (2000) Embryo implantation. *Dev. Biol.* 223: 217-237.

- Carson, D. D.; Dutt, A.; Tang, J. P. (1987) Glycoconjugate synthesis during early pregnancy: hyaluronate synthesis and function. *Dev. Biol.* 120: 228-235.
- Chew, N. J.; Sherman M. I. (1973) $\Delta 5$, 3β hydroxysteroid dehydrogenase activity in mouse giant trophoblast cell *in vivo* and *in vitro*. *Biol. Reprod.* 9: 79-84.
- Cross, J. C. (2000) Genetic insights into trophoblast differentiation and placental morphogenesis. *Cell Dev. Biol.* 111: 105-113.
- Denker, H. W. (1990) Trophoblast-endometrial interactions at embryo implantation a cell biological paradox. En:Denker, H.; Aplin, J. (edits.): *Trophoblast research*. Vol. 4. Plenum press; E. U. Pp. 3-29.
- Denker, H. W. (1993) Implantation: A cell biological paradox. *J. Exp. Zool.* 266: 541-558.
- Edwards, R. G. (1980) *Conception in the Human female*. Academic Press London. pp 668-812.
- Enders, A. C.(1970) Fertilization, cleavage and implantation. En:Hafez, E. (Edit.) *Reproduction and breeding techniques for laboratory animals*. Lea & Febiger. Filadelfia. Pp. 137-156.
- Ffrench-Constant, Ch. (1995) Alternative splicing of fibronectin-Many different proteins but few different functions. *Exp. Cell Res.* 221: 261-271.
- Flores, S. M. M. (1996) Actividad de peroxidasa en el útero durante el inicio de la preñez en la rata. Tesis profesional. Facultad de Estudios Superiores Iztacala. UNAM. México p. 23.
- Forestier, M.; Richen, J.; Solos, M. (1996) Application of mRNA differential display to liver cirrhosis: reduced fetuin expression in biliary cirrhosis in the rat. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 225: 377-83.
- Fujimoto, B., Kern D. (1991) Low IgG fetal bovine serum. *Am. Biotechnol. Lab.* 9: 54.
- Gauthier, J. D.; Feig, B.; Vasta G. R. (1995) Effect of fetal bovine serum glycoproteins on the *in vitro* proliferation of the oyster parasite *Perkinsus marinus*: Development of a fully defined medium. *J. Eukaryot. Microbiol.* 42: 307-313.
- Gilbert, S. F. (1997) *Developmental Biology*. 5ª. Ed. Sinauer Associates, Inc. Suderland, Massachussets.
- Glass, R.; Spindle, A. I.; Pederse R. A. (1979) Mouse embryo attachment to substratum and interaction of trophoblast with cultured cells. *J. Exp. Zool.* 208: 327-336.
- Gonda, M. A.; Hsu, Y-Ch. (1980) Correlative scanning electron, transmission electron, and light microscopic studies of the *in vitro* development of mouse embryos on a plastic substrate at the implantation stage. *J. Embryol. Exp. Morph.* 56: 23-39.

Guzmán, G. A. M.; Baiza G. L. A.; Hicks, G. J. J. (1993) Sistemas moleculares en las interacciones celulares II. Implantación embrionaria en mamíferos. Ginec. Obstet. Méx. 61: 22-25.

Hamilton, B. W.; Mossman, H. W. (1973) Embriología Humana. Desarrollo prenatal de la forma y la función. 4ª. Ed. Interamericana. Buenos Aires Pp. 86-120.

Hida, S.; Takeuchi, A.; Hayashi, H.; Yano, T.; Hopkins, S. J.; Onozaki, K. (1995) Ubiquitous interleukin-1 alpha in fetal bovine serum may mislead the experimental results in vitro. Eur. Cytokine Newt. 6: 121-126.

http://www.atlantabio.com/fetal_bovine_serum.htm

Hynes, R. O.; Yamada, K. M. (1982) Fibronectins: Multifunctional Modular Glycoproteins. J. Cell Biol. 95: 369-379.

Izquierdo, L. (1986): Desde la especificación regional de la diferenciación celular en el desarrollo preimplantacional de mamíferos. Arch. Biol. Med. Exp. 19: 279-300.

Kakuta, K.; Orino, K.; Yamamoto, S.; Watanabe, K. (1997) High levels of ferritin and its iron in fetal bovine serum. Comp. Biochem. Physiol. A. Physiol. 118:165-169.

Kimber, S. J.; Spanswick, C. (2000) Blastocyst implantation: the adhesion cascade. Cell Dev. Biol. 11: 77-92.

Kitchener, P. D.; Dziegielewska, K. M.; Hutton, E. J.; Hinrichsen, C. F.; Saunders, N. R. (1999) Fetuin in neurons of the retina and cerebellum during fetal and postnatal development of the rat. Int. J. Dev. Neurosci. 17(1):21-30.

Kornbliht, A. R.; Gutman, A. (1988) Molecular Biology of the extracellular matrix proteins. Biol. Reprod. 63: 465-507.

Leivo, I.; Vaheri, A.; Timpl, R.; Wartiovaara J. (1980) Appearance and distribution of collagen and laminin in the early mouse embryo. Dev. Biol. 76: 100-114.

Martínez, H. M. G. (1994) Participación de la fibronectina como factor sérico durante la implantación *in vitro* de blastocistos de ratón. Tesis de maestría. Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM. México.

Martínez, H. M. G.; Baiza, L. A.; Armant, D. R. (2002) Expression and secretion of metalloproteinase-9 in developing mouse peri-implantation blastocyst. Biol. Reprod. 66 (Suppl. 1): 157.

Mathews, S. T.; Srinivas, P. R.; Leon, M. A.; Grunberge, G. (1997) Bovine fetuin is an inhibitor of insulin receptor tyrosine kinase. Life Sci. 61: 1583-1592.

- Nie, Z. (1992) Fetuin: its enigmatic property of growth promotion. *Am. J. Physiol.* 263 (3 Pt 1): C551-C562.
- Nie, Z.; Jellineck, D.; Ham, R. G. (1991) Separation of growth-promoting activity for human muscle cells from fetuin. *Biochim. Biophys. Res. Com.* 178: 959-966.
- Nowak, R. A.; Haimovici, F.; Biggers, J. D.; Erbach, G. T. (1999) Transforming growth factor- β stimulates mouse blastocyst outgrowth through a mechanism involving parathyroid hormone-related protein. *Biol. Reprod.* 60: 85-93.
- Ochieng, J.; Warfield, P. Y.; Green, B. (1995) Interactions of gelatinases with soluble and immobilized fetuin and asialofetuin. *Arch. Biochem. Biophys.* 322 (1): 250-255.
- Ohnishi, T.; Nakamura, O.; Arakaki, N.; Daikuhara, Y. (1997) Effect of phosphorylated rat fetuin on the growth of hepatocytes in primary culture in the presence of human hepatocyte-growth factor. Evidence that phosphorylated fetuin is a natural modulator of hepatocyte-growth factor. *Eur. J. Biochem.* 243: 753-761.
- O'Shea, K. S.; Lui, L-H; Kinunen, L. H.; Dixit, V. M. (1990) Role of the extracellular matrix protein trombospondin in the early development of the mouse embryo. *J. Cell Biol.* 111: 2713-2723.
- Parast, M. M.; Aeder, S.; Sutherland, A. E. (2001) Trophoblast giant-cell differentiation involves changes in cytoskeleton and cell motility. *Dev. Biology* 230: 43-60.
- Paria, B. C.; Huet-Hudson, Y. M.; Dey, S. K. (1993) Blastocyst state of activity determines the window of implantation in the receptive mouse uterus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 10159-10162.
- Paria, B. C.; Limb, H.; Das, S. K.; Reese, J.; Dey, S. K. (2000) Molecular signaling in uterine receptivity for implantation. *Cell Dev. Biol.* 11: 67-76.
- Pedersen, K. O. (1944) Fetuin, a new globulin isolated from serum. *Nature* 3914: 575.
- Poulouin, L.; Gallet, O.; Rouahi, M.; Imhoff, J. M. (1999) Plasma fibronectin: Three steps to purification and stability. *Protein Expression and Purification* 17: 146- 152.
- Psychoyos, A. (1973) Hormonal control of ovoidimplantation. *Vitam. Horm.* 31: 201-256.
- Rafferty, K. A. (Jr.) (1970) *Methods in experimental embryology of the mouse.* The Hopkins Press, Baltimore. Pp. 1-32.
- Rizzino, A.; Sherman M. I. (1979) Development and differentiation of mouse blastocyst in serum-free medium. *Exp. Cell. Res.* 121: 221-233.
- Roberts, R. M.; Xie, S.; Mathialagan, N. (1996) Maternal recognition of pregnancy. *Biol. Reprod.* 54: 294-302.

- Romberger, D. J. (1997) Fibronectin. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 29: 939-943.
- Roy, F., Deblois, C., Doillon, G. (1993): Extracellular matrix analogs as carriers for growth factors *in vitro* fibroblast behavior. *J. Biomed. Mat. Res.* 27: 389-397.
- Salomon, D. S.; Bano, M; Smith, K. B.; Kidwell, W. R. (1982) Isolation and characterization of a growth factor (embryonin) from bovine fetuin which resembles alpha 2-macroglobulin. *J. Biol. Chem.* 257: 14093-14101.
- Sellens, M. H.; Sherman, M. I. (1980) Effects of culture conditions on the developmental program of mouse blastocysts. *J. Embryol. Exp. Morph.* 56: 1-22.
- Sherman, M. I. (1978) Implantation of mouse blastocyst *in vitro*. En: J. Daniel (Edit) *Methods in Mammalian Reproduction*. Academic Press. New York. Pp. 247-257.
- Sherman, M. I.; Salomon, D. S. (1975) The relationships between the early mouse embryo and its environment En: Market C. L., Papaconstantinou P. (Edits.) *The Developmental Biology of Reproduction*. Academic Press .E. U. pp. 277-309.
- Shim, Ch.; Kwon, H. B.; Kim, K. (1996) Differential expression of laminin chain-specific mRNA transcripts during mouse preimplantation embryo development. *Mol. Reprod. Dev.* 44: 44-55.
- Shiokawa, S.; Yoshimura, Y.; Sawa, H.; Nagamatsu, S.; Hanashi, H.; Sakai, K.; Ando, M.; Nakamura, Y. (1999) Functional role of Arg-Gly-Asp (RGD)-binding sites on $\beta 1$ integrin in embryo implantation using mouse blastocysts and human decidua. *Biol. Reprod.* 60: 1468-1474.
- Sutherland, A. E.; Calarco, P. G.; Damsky, C. H. (1988) Expression and function of cell surface extracellular matrix receptors in mouse blastocyst attachment and outgrowth. *J. Cell Biol.* 106: 1331-1348.
- Strickland, S.; Riech, E.; Sherman, M. Y. (1976) Plasminogen activator in early embryogenesis: Enzyme production by trophoblast and parietal endoderm. *Cell* 9: 231-240.
- Tabibzadeh, S.; Babaknia, A. (1995) The signals and molecular pathways involved in implantation, a symbiotic interaction between blastocyst and endometrium involving adhesion and tissue invasion. *Hum. Reprod.* 10: 1579-1602.
- Tachi, Ch. (1992) Partial characterization of macromolecular components in fetal bovine serum required for development of mouse blastocysts culture *in vitro*. *Develop. Growth Differ.* 34: 69-77.
- Terkelsen, O. B. F.; Jahnen-Dechent, W.; Nielsen, H.; Moos, T.; Fink, E.; Nawratil, P.; Müller-Esterl, W.; Møllgaard, K. (1998) Rat fetuin: Distribution of protein and mRNA in embryonic and neonatal rat tissues. *Anat. Embryol.* 197: 125-133.

Thorsteinsdóttir, S. (1992) Basement membrane and fibronectin matrix are distinct entities in the developing mouse blastocyst. *Anat. Rec.* 232: 141-149.

Tsuchida, K.; Lind, T.; Kitagawa, H.; Lindahl, U.; Sugahara, K.; Lidholt, K. (1999) Purification and characterization of fetal bovine serum beta- N- acetyl-D-galactosaminiltransferasa y beta-D-glucoroniltransferasa involved in chondroitin sulfate biosynthesis. *Eur. J. Biochem.* 264: 461-467.

Valenzano, K. J.; Remmler, J.; Lobel P. (1995) Soluble insulin-like growth factor II/mannose 6-phosphate receptor carries multiple high molecular weight forms of insulin-like growth factor II in fetal bovine serum. *J. Biol. Chem.* 270: 16441-16448.

van Tienhoven, A. (1983) Care of the embryo and fetus. *Reproductive Physiology of Vertebrates*. 2^a. Ed. Cornell University Press. London. Cap. 10, Pp 275-298.

Wartiovaara, J.; Leivo, I.; Vaheri, A. (1979) Expression of the cell surface-associated glycoprotein, fibronectin, in the early mouse embryo. *Dev. Biol.* 69: 247-257.

Watson, A. J. (1992) The cell biology of blastocyst development. *Mol. Reprod. Dev.* 33:492-504.

Wilson, I. B.; Jenkinson J. (1974) Blastocyst differentiation in vitro. *J. Reprod. Fert.* 39: 243-249.

Willey, L. M.; Kidder, G. M.; Watson, A. J. (1990): Cell polarity and development of the first epithelium. *Bioessays* 12: 67-73.

Yamazaki, K.; Kato, Y. (1989) Sites of zone pellucid shedding by mouse embryo other than mural trophoctoderm. *J. Exp. Zool.* 249: 347-349.

Zar, J. H. (1984) *Biostatistical Analysis* 2a. ed. Prentice Hall. New Jersey. Pp 236-2443.

Zetter, B. R.; Martin, G. R. 1978 Expression of a high molecular weight cell surface glycoprotein (LETS protein) by preimplantation mouse embryos and teratocarcinoma stem cells. *Cell Biol.* 75: 2324-2328.