

31960

1
20



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES
IZTACALA

PARTICIPACION DE LA FIBRONECTINA COMO FACTOR SERICO DURANTE LA IMPLANTACION in vitro DE BLASTOCISTOS DE RATON

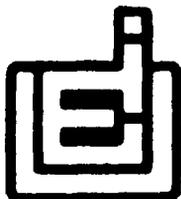
T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS
(BIOLOGIA DE LA REPRODUCCION)

P R E S E N T A

MARIA GUADALUPE MARTINEZ HERNANDEZ

DIRECTOR: M. EN C. LUIS ARTURO BAIZA GUTMAN



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

LOS REYES IZTACALA, MEXICO

1994



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 está 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.

ESTE TRABAJO FUE DESARROLLADO EN EL LABORATORIO
DE BIOLOGIA DEL DESARROLLO DE LA UNIDAD DE MOR-
FOLOGIA Y FUNCION. ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS
PROFESIONALES IZTACALA, BAJO LA DIRECCION DEL
M. en C. LUIS ARTURO BAIZA GUTMAN.
DURANTE UN AÑO Y MEDIO FUI APOYADA POR UNA BECA
DE LA DGAPA-UNAM PARA EL DESARROLLO DE ESTA TESIS..

DEDICATORIA

A la memoria de mi padre Rafael.

A mi mamá Amparo por brindarme el apoyo y confianza durante todos estos años. Permitiendome elegir el camino a seguir libremente gracias.

A mis hermanos Benjamín, Rafael y Manuel por la confianza que han puesto en mí y que ha sido muy estimulante para seguir adelante gracias.

A mi esposo Luis Arturo con todo mi amor y cariño por la confianza y apoyo que me ha brindado, así como su amor que me ha dado y que me ha impulsado para seguir adelante siendo un ejemplo para mí gracias.

A Karis y Rafis con cariño.

A la familia Gutman Vicente por su cariño y amistad gracias.

AGRADECIMIENTOS

Al M. en C. Luis Arturo Baiza Gutman por su acertado asesoramiento al presente trabajo, así como su apoyo y paciencia durante el desarrollo de éste y por lo que me ha enseñado para mi formación académica..

Al M. en C. Enrique Othón Hernández González por su intervención, sus enseñanzas y sugerencias en el transcurso del trabajo.

A los revisores de este trabajo Dr. Juan José Hicks Gómez, M. en C. Alberto Martín Guzmán Grenfell y M. en C. Leticia Moreno Fierro por sus sugerencias para el mejoramiento de este trabajo y enseñanzas.

A la Dra. Adela Mujica del CINVESTAV por haberme permitido montar algunas técnicas en su laboratorio, bajo la asesoría del M. en C. Enrique Othón Hernández González.

A mis amigos y compañeros de Laboratorio Sergio Vaca, Ramón Moreno, Diego Arenas, Elias Piedra, Raúl Gallardo y Selene Pérez, quien me han proporcionado ayuda y momentos agradables.

A mis amigas Martha Urzúa, Maricela Soriano, Lourdes Figueroa, Martha Montesinos, Victoria Herrera, Josefina y Mirna por tener su apoyo y comprensión así como ayuda en todo momento.

Al pentagono de amigos Gloria, Raúl, Jesús, Daleth y Leticia por los momentos inolvidables.

A mi gran amiga de maestría con quien comparti grandes momentos Alba Marquéz.

A todos aquellos que en algún momento han estado conmigo en alguna etapa de mi vida, y que me han apoyado y ayudado cuando moralmente más lo he necesitado, con un agradecimiento eterno...

No hay nada más hermoso que la naturaleza, la cual representa la vida.

Una semilla puede ser el éxito cuando se siembra y se cuida y cuando da sus frutos se siente una gran alegría.

Por eso doy gracias a la vida.

CONTENIDO

	PAGINA
LISTA DE FIGURAS.....	1
LISTA DE TABLAS.....	2
ABREVIATURAS.....	3
I. RESUMEN.....	4
II. INTRODUCCION.....	7
-IMPLANTACION EMBRIONARIA.....	7
-TIPOS DE IMPLANTACION.....	9
-FASES DE LA IMPLANTACION.....	10
-PENETRACION DEL EPITELIO.....	13
-IMPLANTACION <u>in vitro</u> DE BLASTOCISTOS DE RATON....	14
-REQUERIMIENTO DE CULTIVO.....	17
-PROCESO DE ADHESION DURANTE LA IMPLANTACION <u>in vitro</u>	19
-DIFERENCIACION BIOQUIMICA DEL TROFOBLASTO.....	20
-GENERALIDADES DE LA FIBRONECTINA.....	21
-ESTRUCTURA QUIMICA DE LA FIBRONECTINA.....	23
-FUNCIONES DE LA FIBRONECTINA.....	23
-EXPRESION DE FIBRONECTINA AL INICIO DEL DESARROLLO.....	25
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	25
III OBJETIVOS.....	28
A). OBJETIVO GENERAL.....	28
B). OBJETIVOS PARTICULARES.....	28
IV. MATERIALES Y METODOS.....	30
1. REACTIVOS.....	30
2. ANIMALES.....	30
-COMPOSICION Y PREPARACION DE MEDIOS DE CULTIVO Y PBS..	32
a). MEDIO DE BIGGERS.....	32
b). SOLUCION DE ANTIBIOTICOS.....	33
c). MEDIO CNCTC-135.....	34
d). SOLUCION AMORTIGUADA CON FOSFATOS (PBS).....	36

e).	REACTIVOS PARA ELISA.....	37
	1) SOLUCION AMORTIGUADORA DE RECUBRIMIEN- TO.....	37
	2).SOLUCION SALINA AMORTIGUADA CON FOS- FATOS-TWEEN.....	38
	3). SUSTRATO PARA ELISA (ABTS).....	39
f).	REACTIVOS PARA ELECTROFORESIS EN GELES DE PO- LIACRILAMIDA-SDS.....	39
	1) SOLUCION DE ACRILAMIDA-BIS-ACRILAMIDA.	39
	2) PERSULFATO DE AMONIO AL 1.5% p/v.....	40
	3) SDS AL 10% p/v.....	40
	4) AMORTIGUADOR DEL GEL CONCENTRADOR.....	40
	5) AMORTIGUADOR PARA EL GEL SEPARADOR.....	40
	6) AMORTIGUADOR DEL RESERVORIO.....	40
	7) AMORTIGUADOR DE MUESTRA 2X.....	41
g).	PREPARACION DE REACTIVOS PARA ELECTROTRANSFEREN- CIA E INMUNODETECCION PARA FIBRONECTINA.....	41
	1) SOLUCION AMORTIGUADORA DE TRANSFEREN- CIA.....	41
	2) SOLUCION SALINA AMORTIGUADA CON FOSFATO- TOS-TRITON X-100.....	42
	- OBTENCION Y PURIFICACION DE FIBRONECTINA.....	42
	- PREPARACION Y PURIFICACION DE ANTICUERPOS CONTRA- FIBRONECTINA.....	43
B.	METODOS.....	44
	1.-TITULACION DE ANTICUERPOS ANTI-FIBRONECTINA - POR ELISA.....	44
	2.-DETECCION DE FIBRONECTINA EN EL SUERO FETAL DE BOVINO.....	45
	a). SEPARACION ELECTROFORETICA DEL LAS - PROTEINAS DEL SUERO.....	45
	b). ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMI- DA-SDS EN UNA DIMENSION.....	46
	c). ELECTROTRANSFERENCIA DE PROTEINAS A - PAPEL DE NITROCELULOSA E INMUNODETECCION DE FIBRONECTINA.....	47

3.-DETECCION DE FIBRONECTINA POR TINCION INMUNOQUIMI- CA EN LA SUPERFICIE DE CULTIVO EXPUESTA A SUERO.	49
4.-PRODUCCION Y CULTIVO DE EMBRIONES.....	50
a).PREPARACION DE LOS ANIMALES.....	50
b). OBTENCION Y CULTIVO DE EMBRIONES.....	50
5.-CINETICA DEL CULTIVO.....	51
6.-EVALUACION DEL AREA DE EXTENSION DEL TROFOBlasto.	51
7.-EFECTO DEL ANTICUERPO ANTI-FIBRONECTINA SOBRE LA - CINETICA DEL CULTIVO Y EL AREA DE EXTENSION DEL - TROBLASTO.....	52
8.-TINCION INMUNOQUIMICA PARA FIBRONECTINA DE LOS BLAS- TOSTISTOS CULTIVADOS.....	53
9.-ANALISIS ESTADISTICOS.....	54
V. RESULTADOS.....	55
-OBTENCION Y PURIFICACION DE FIBRONECTINA.....	55
-PREPARACION Y PURIFICACION DE ANTICUERPOS ANTI-FI- BRONECTINA.....	55
-DETECCION DE FIBRONECTINA EN EL SUERO DE BOVINO FE- TAL.....	55
-DETECCION DE FIBRONECTINA EN LA SUPERFICIE DE CULTI- VO EXPUESTA A SUERO.....	56
-CONDICIONES OPTIMAS DEL CULTIVO DE BLASTOCISTOS...57	
-DESARROLLO DE LOS BLASTOCISTOS EN CULTIVO.....	58
-EVOLUCION DEL CULTIVO DE BLASTOCISTOS SOBRE LA CU-- BIERTA SERICA.....	59
-EVALUACION CUANTITATIVA DE LAS AREAS DE EXTENSION.	60
-EFECTO DEL ANTICUERPO ANTIFIBRONECTINA SOBRE LA - IMPLANTACION <u>in vitro</u> EN MEDIO cNCTC-135-SUERO....	60
-EFECTO DEL ANTICUEPO CONTRA FIBRONECTINA SOBRE EL - AREA DE EXTENSION DEL TROFOBlasto.....	62
-TINCION INMUNOQUIMICA DE LOS BLASTOCISTOS IMPLANTA- DOS EN LAS DIFERENTES CONDICIONES DE CULTIVO.....	63
VI. DISCUSION.....	91
-DETECCION DE FIBRONECTINA EN EL SUERO DE BOVINO FETAL.....	92

-DETECCION DE FIBRONECTINA EN LA SUPERFICIE DE CULTIVO EXPUESTA AL SUERO.....	92
-CULTIVO PREVIO DE EMBRIONES.....	94
-EVOLUCION DEL CULTIVO SOBRE LA CUBIERTA SERICA....	95
-EFECTO DEL ANTICUERPO ANTI-FIBRONECTINA SOBRE EL - CULTIVO DE BLASTOCISTOS.....	96
-DISTRIBUCION INMUNOQUIMICA DE LA FIBRONECTINA EN LOS EMBRIONES IMPLANTADOS EN PRESENCIA DE ANTICUERPOS CONTRA FIBRONECTINA.....	99
VII. CONCLUSIONES.....	101
VIII. BIBLIOGRAFIA.....	103

LISTA DE FIGURAS

	PAGINA
Figura 1.- Estructura del blastocisto.....	8
Figura 2.- Implantación <u>in vitro</u> de blastocistos.....	15
Figura 3.- Estructura de la fibronectina.....	24
Figura 4.- Electroferograma de la fibronectina purificada de cobayo.....	64
Figura 5.- Demostración de la presencia de fibronectina en el suero fetal de bovino.....	65
Figura 6.- Inmunotinción para fibronectina en una superficie expuesta a suero.....	66
Figura 7.- Desarrollo <u>in vitro</u> de blastocistos de ratón: ruptura y liberación de la zona pelúcida.....	68
Figura 8.- Desarrollo <u>in vitro</u> de blastocistos de ratón: adhesión y extensión sobre el sustrato.....	70
Figura 9.- Efecto de un período inicial de cultivo en medio de Biggers sobre la cinética del cultivo de blastocistos en cNCTC-135-suero.....	72
Figura 10.- Cinética del cultivo de blastocistos sobre la cubierta sérica, de fibronectina y con suero.....	75
Figura 11.- Efecto de la cubierta sérica sobre el área de extensión del trofoblasto.....	78
Figura 12.- Desarrollo <u>in vitro</u> de blastocistos de ratón: efecto del anticuerpo antifibronectina.....	80
Figura 13.- Efecto del anticuerpo contra fibronectina sobre la cinética del cultivo.....	83
Figura 14.- Efecto del anticuerpo contra fibronectina sobre el área de extensión del trofoblasto.....	87
Figura 15.- Efecto del anticuerpo anti-fibronectina sobre la distribución histoquímica de fibronectina...	89

LISTA DE TABLAS

PAGINA

Tabla 1.- Diferenciación bioquímica de la implantación.....	22
Tabla 2.- Detección de fibronectina en la superficie - de cultivo, expuesta a distintas proteínas..	67
Tabla 3.- Efecto de un período inicial de cultivo en - medio de Biggers-BSA sobre la frecuencia de implantación.....	74
Tabla 4.- Tiempo y frecuencia de implantación de blastocistos cultivados sobre una cubierta sérica, de fibronectina y con suero.....	77
Tabla 5.- Efecto del anticuerpo anti-fibronectina sobre la frecuencia de implantación.....	85
Tabla 6.- Efecto del anticuerpo anti-fibronectina sobre el tiempo de implantación.....	86

LISTA DE ABREVIATURAS.

ABTS.....	2',2'	azino-bis	3-etilbenzo
		-tiazolina-6	ácido sulfónico.
BSA.....	Albúmina de suero de bovino (fracción V)		
cm.....	Centímetros.		
DBA.....	3,3' Diaminobencidina.		
D.E.....	Desviación estándar.		
ELISA.....	Análisis inmuno enzimático.		
h.....	Horas.		
hCG.....	Gonadotropina coriónica humana.		
3 β HSD.....	A ⁵ 3 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa.		
kDa.....	Kilodaltones.		
l.....	Litro.		
M.....	Molar.		
MCI.....	Masa celular interna.		
ml.....	Mililitros.		
mRNA.....	Acido ribonucleico mensajero.		
PAGE.....	Electroforesis en gel de poliacrilamida.		
PBS.....	Solución salina amortiguada con fosfatos.		
PMSG.....	Gonadotropina de suero de yegua preñada.		
SBF.....	Suero de bovino fetal.		
SDS.....	Dodecil sulfato de sodio.		
TEMED.....	N,N,N,N, Tetrametiletilendiamina.		
TRIS.....	Tris (hidroximetil)-amino metano.		
ZP.....	Zona pelúcida.		

I.RESUMEN.

Blastocistos de ratón cultivados in vitro experimentan una serie de cambios, similares a los que ocurren durante la implantación embrionaria in vivo; rompen y se liberan de la zona pelúcida, las células del trofoblasto mural se adhieren al sustrato, se extienden sobre él, y se convierten en células gigantes poliploides. Unida a la extensión del trofoblasto ocurren cambios bioquímicos indicadores de su diferenciación.

Para que estos cambios ocurran es necesario el empleo de suero fetal de bovino (SBF), de fetuína ó de proteínas de matriz extracelular como laminina, fibronectina, colágena tipo IV ó de que los blastocistos se cultiven sobre monocapas de células derivadas de distintos tejidos. Hay pocos estudios acerca de los componentes del suero que favorecen la adhesión y extensión del trofoblasto. Tachi en 1992 hizo una caracterización parcial de los factores séricos y encontró que una fracción de peso molecular (PM) entre 30 y 100 KDa es capaz de inducir el inicio de la extensión del trofoblasto y otra fracción mayor a 100 KDa induce una mayor extensión del mismo y un mayor desarrollo de la masa celular interna. Es nuestro objetivo evaluar si la fibronectina es uno de los factores séricos que favorecen la adhesión y extensión del trofoblasto durante la implantación in vitro de blastocistos de ratón.

Hemos obtenido y purificado fibronectina de cobayo por medio de la técnica de cromatografía de afinidad en una columna de sefarosa-gelatina. Con ella se inmunizaron conejos y se obtuvo un suero con anticuerpos contra fibronectina, estos anticuerpos fueron purificados mediante el empleo de una columna de afinidad de sefarosa 4B fibronectina.

Por la técnica de ELISA se detectó que fueron específicos contra fibronectina, ya que no reaccionan con otras proteínas como la albúmina y la laminina.

Hemos detectado una banda proteica de PM aproximado de 220 KDa en el suero fetal de bovino por electroforesis en geles de poliacrilamida SDS al 7.5% que tiene un corrimiento electroforético similar a la fibronectina comercial (Sigma).

La transferencia de las proteínas separadas del suero a papel de nitrocelulosa seguida de la inmunotinción para fibronectina, confirma que dicha banda corresponde a fibronectina.

Asimismo, la exposición de la superficie de cultivo con SBF al 10% por 4 horas es suficiente para dejar una cubierta de fibronectina, la cual se detectó por inmunotinción

El cultivo de los blastocistos obtenidos al cuarto día de preñez de ratonas de la cepa CD1 en un medio de cultivo, empleado para embriones preimplantacionales (medio de Bigger suplementado con albúmina sérica de bovino (BSA)) por 17 horas previo a su transferencia favorece el rompimiento de la zona pelúcida de los embriones lo que mejora su adhesión y extensión con respecto a los blastocistos cultivados directamente en un medio más rico como el cNCTC-135.

Los blastocistos cultivados en cNCTC-135-BSA al 0.4% sobre la cubierta dejada por el suero (SBF) en la superficie de cultivo se adhieren y extienden en una proporción similar a aquellos cultivados en presencia de SBF al 10% por lo que el depósito de fibronectina dejado por el suero favorece la adhesión y extensión de los blastocistos.

La adición de un anticuerpo contra fibronectina al cultivo con suero reduce notablemente la proporción de embriones que se extienden sobre el sustrato y el área de extensión del trofoblasto de los mismo, influyen en su desarrollo y en forma dependiente de la dosis inhiben la ruptura de la zona pelúcida (ZP), sin afectar la adhesión de los blastocistos que la rompen. El efecto es mayor, a medida que aumenta la concentración de anticuerpo, asimismo retardan la desaparición de la cavidad del blastocelo. Lo cual implica una participación importante de la fibronectina sérica ó de la producida por el embrión en la ruptura de la ZP y en la extensión del trofoblasto., apoyando la idea de que el suero favorece la extensión del trofoblasto in vitro por medio de la fibronectina, sin embargo deben de existir otros factores séricos que promuevan la adhesión y extensión del trofoblasto.

En presencia de alta concentración de anticuerpo, después de cuatro días de cultivo la fibronectina se localiza como fibras gruesas en la base del trofoblasto que rodea al blastocelo. A baja concentración de anticuerpo los derivados de la masa celular interna (MCI) están más organizados y contienen fibronectina, además ésta rodea al cono ectoplacentario proveniente del trofodermo polar.

Por tanto, la fibronectina debe de intervenir en la organización tridimensional de distintas estructuras durante el desarrollo del blastocisto.

Se concluye que la fibronectina es uno de los componentes del suero fetal de bovino que contribuyen a la adhesión y extensión del trofoblasto in vitro.

II. INTRODUCCION:

El desarrollo embrionario en el ratón, previo a la implantación culmina 4 días después de la fertilización con la formación del blastocisto.

En esta etapa del desarrollo se pueden distinguir dos tipos celulares: el trofotodermo y la masa celular interna, que rodean una cavidad llena de líquido, el blastocele, todo el conjunto está protegido por una cubierta resistente, la zona pelúcida. El trofotodermo que recubre a la masa celular interna, se conoce como polar y al que rodea al blastocele como mural (53) (figura 1)

En el período de peri-implantación los blastocistos de mamíferos establecen un contacto directo con la madre en el que están involucradas interacciones celulares entre los tejidos embrionarios y maternos, esta interacción ocurre primero entre las células superficiales del embrión y las células epiteliales del endometrio (94).

Las células del trofoblasto son las primeras que se diferencian en los embriones de mamíferos. Por otro lado se han encontrado cambios morfológicos en las células epiteliales uterinas tal vez provocados por el contacto inicial de los blastocistos con la superficie uterina (25, 29).

IMPLANTACION EMBRIONARIA.

La unión estrecha de los blastocistos a la pared uterina recibe el nombre de implantación, éste proceso es característico de la reproducción de mamíferos euterios y metaterios. Según Boving la implantación comprende tres mecanismos principales que son de tipo muscular, de adherencia e invasión (46). Para que la implantación se lleve a cabo se requiere de una interacción coordinada entre el embrión y el útero, el embrión debe de haber alcanzado el estado de blastocisto y en el útero deben de haber ocurrido cambios dependientes de hormonas que lleven al desarrollo de un endometrio receptivo (42, 74, 103).

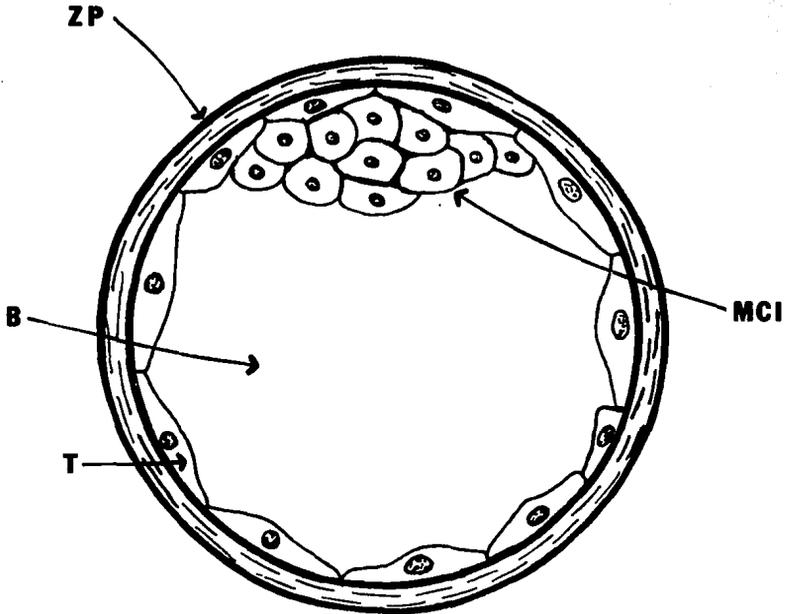


Figura 1.-Estructura del blastocisto del día 4 de preñez. El blastocisto está formado por dos poblaciones celulares, la masa celular interna (MCI) y el trofoblasto (T), ambas rodean a la cavidad del blastocelo (B). En su conjunto está protegido por una cubierta de glicoproteínas, la zona pelúcida (ZP).

Se ha considerado, también a la implantación como una secuencia de interacciones bioquímicas y físicas entre el blastocisto y el útero, llevándose acabo a través de las células del trofoblasto (108) .

En la mayoría de los mamíferos, el blastocisto se une a la superficie del epitelio uterino, y se sitúa en la cavidad del útero.

En algunos de ellos (roedores y muchos primates), el blastocisto penetra más profundamente en la pared uterina y el desarrollo tiene lugar dentro de ella.

TIPOS DE IMPLANTACION.

De acuerdo con la ubicación del blastocisto en el útero, los tipos de implantación se clasifican en tres (46) :

Central: en ella el blastocito permanece en la cavidad uterina, ésta se presenta en artiodáctilos, carnívoros y primates inferiores incluyendo el mono macaco.

-Excéntrica, el blastocito se sitúa en una cripta o receso uterino, este tipo de implantación se presenta en múridos, como en el ratón (46).

-Intersticial, el blastocito se ubica totalmente en el espesor del endometrio, este tipo es característico del cobayo, y de algunos primates, incluyendo al chimpancé y al hombre.

En base a estudios de microscopía electrónica y a la forma en que el trofoblasto invade al endometrio se ha establecido otra clasificación por Schlafke y Enders (1975) que considera tres tipos de implantación a saber:

-Implantación por fusión: Se presenta en el conejo y rumiantes, en ella partes de la membrana apical del trofoblasto y del epitelio uterino se funden formando una mezcla sincicial de origen materno y embrionario (84, 102).

-Implantación por desplazamiento: Este tipo se ha establecido en rata y ratón, inmediatamente después de la adhesión del trofoblasto a la membrana plasmática apical de el epitelio

uterino se presenta la degeneración y desprendimiento de las células epiteliales uterinas lo que facilita la penetración del trofoblasto (84, 102). La degeneración del epitelio ocurre por muerte celular programada o apoptosis y es inhibida por actinomicina D (67).

-Implantación intrusiva: En ella, pequeñas prolongaciones del citoplasma del sinciciotrofoblasto, penetran entre las células epiteliales uterinas, presentándose también eventos de fusión. Este tipo de implantación ocurre en el humano, el hurón y algunos carnívoros (84, 102).

La implantación marca un estado de transición en el proceso de preñez y conduce al establecimiento de una estrecha interacción materno embrionaria.

FASES DE LA IMPLANTACION.

Dentro de los eventos que se presentan en este proceso se encuentran:

1).Ubicación y distribución. En la mayoría de los mamíferos estudiados el transporte del huevo a través del oviducto se lleva a cabo en 3 ó 4 días. Durante el mismo el cigoto se convierte en mórula. Después de entrar la mórula al útero, origina al blastocisto. Estos se distribuyen uniformemente a lo largo de los cuernos uterinos y se sitúan en criptas de la superficie antimesometrial, estando aparentemente libres e inmóviles, esta distribución en la luz uterina es causada por la contracción muscular uterina (24).

2).Orientación. El blastocisto se ubica en la porción específica donde se llevará a cabo la implantación, en la rata y el ratón, el blastocisto se dirige al epitelio antimesometrial del endometrio, perdiendo en este momento la zona pelúcida (24, 73).

Estudios histológicos de las zonas en que ocurrirá la implantación detectados con azul de Evans y azul de pontamina revelan la aproximación de los blastocistos al endometrio, antes del contacto entre ambos (66, 70).

3).Contacto o aposición. El contacto se refiere a la simple yuxtaposición entre el trofoblasto y el epitelio luminal uterino y se lleva a cabo por diversos mecanismos:

a)Por envolvimiento: el endometrio uterino se hincha rodeando al blastocisto y de este modo se establece el contacto de las células del trofotodermo con el epitelio uterino (reacción de ataque epitelial), éste mecanismo se presenta en la rata y el ratón (24, 73).

b)Por expansión: Un aumento en el volumen del blastocisto, causado por la expansión del blastocele hace que este llena la luz uterina y entre en contacto con el endometrio, ocurre en el conejo, el cerdo, carnívoros y algunos monos (73).

c)Por acercamiento activo: se establece por la aproximación del blastocisto al endometrio, ocurre en el cobayo, el chimpancé, y el humano (73).

Diversos estudios han sugerido que una señal del blastocisto, provoca cambios en el endometrio previos a la adhesión (71), entre ellos, hay un incremento local en la permeabilidad vascular, lo que se pone de manifiesto cuando se inyectan intravenosamente colorantes de alto peso molecular, ya que éstos forman complejos con la albúmina sérica, los cuales atraviezan y se acumulan en las zonas de alta permeabilidad, permitiendo distinguir los lugares de implantación. Se desconoce la naturaleza de la señal aunque se han propuesto diversas sustancias, entre otras a los estrógenos (71, 107).

Investigaciones ultraestructurales de los estados iniciales de la implantación en la rata, han demostrado que en etapas preadherentes la superficie trofoblástica esta en contacto con los extremos de las microvellosidades epiteliales, un espacio aproximado de 1 μm , separa al embrión del tejido materno, posteriormente las microvellosidades se aplanan y el contacto entre las células epiteliales y el trofoblasto es más íntimo.

En este momento las proyecciones citoplasmáticas de las células epiteliales se adhieren al blastocisto.

4).Adhesión. Dentro de los primeros eventos que se presentan

en este proceso, se encuentra la asociación entre el blastocisto y el útero, estableciéndose la posición definitiva del blastocisto. Se habla de dos estados dentro de este proceso: un estado inicial debido a la aposición del blastocisto y el epitelio y un subsecuente estado de adhesión más firme en que se establecen uniones intercelulares.

Durante el inicio de la implantación tanto la membrana plasmática apical del trofoblasto y la del epitelio uterino, adquieren propiedades adhesivas, ya que en ellas se redistribuyen y expresan moléculas de adhesión, siendo identificadas en esta fase moléculas de adhesión célula-célula, receptores de matriz extracelular y glicosiltransferasas, entre otras (1, 4, 9, 13).

Este fenómeno se inicia cuando el blastocisto se ha liberado de la zona pelúcida y entra en interacción con los tejidos uterinos. En el caso del ratón y la rata, las células del trofotodermo mural son las primeras en establecer el contacto y adherirse con el epitelio uterino.

5). Invasión o penetración. Durante el proceso invasivo las células del trofoblasto originalmente aplanadas y con núcleo en forma de huso, se vuelven células gigantes, redondas y con núcleo poliploide (rata y ratón) ó se origina el sincicio trofoblasto (humano y cobayo). Mientras tanto, el trofotodermo polar se diferencia en una gran población de células trofoblásticas diploides que forman el cono ectoplacentario.

El estado adhesivo e invasivo del trofoblasto coincide con la propiedad permisiva que presenta el endometrio, condición que esta influenciada por la acción de hormonas sexuales (10B). Sin embargo, si el epitelio es removido, el blastocisto puede implantarse independientemente de cualquier control hormonal (12).

La invasión del trofoblasto al endometrio es un elemento importante en la implantación de muchas especies de mamíferos, incluyendo al hombre. Esta invasión puede ser semejante en muchos aspectos a la que ocurre por un tumor maligno, incluyéndose la destrucción del tejido y neovascularización (19-21).

Muchos de los cambios en la superficie del trofoblasto ocurren en las distintas etapas de la implantación y algunos podrían estar relacionados con la expresión de un fenotipo invasivo. Dentro de estos cambios se encuentran cambios en su carga de superficie, en sus propiedades de unión a lectinas y en la expresión de distintas glicoproteínas de superficie (13, 26, 27).

PENETRACION DEL EPITELIO Y ESTROMA UTERINO.

La penetración del epitelio ocurre, por tres mecanismos: por desplazamiento, fusión ó por intrusión (Ver tipos de implantación).

La membrana basal del epitelio es una barrera temporal de la penetración del embrión dentro del estroma uterino. Esta barrera es abierta por la acción del trofoblasto y de las células deciduales en el ratón.

La penetración de la membrana basal se inicia a lo largo del trofoblasto mural y procede hacia la región polar del blastocisto.

Estudios ultraestructurales de las regiones en las que el trofoblasto está en contacto con la membrana basal han revelado la presencia de abundantes procesos citoplasmáticos que la penetran.

El trofoblasto es uno de los responsables principales de la penetración de la membrana basal del epitelio y del estroma uterino. Esto se basa en la actividad fagocítica natural de las células trofoblásticas observada durante la implantación (84), y a los efectos degradativos del trofoblasto cuando prolifera en sitios ectópicos ó en cultivo de tejidos (33, 82).

Estudios in vitro sobre los mecanismos bioquímicos que se llevan a cabo para la disolución de la membrana basal en los sitios de implantación, han demostrado la producción de enzimas proteolíticas por el tejido trofoblástico, entre otras el activador de plasminógeno y colagenasa (10, 82, 976).

En este proceso deben de ser importantes también las interacciones de la superficie del trofoblasto con diversas

moléculas de la matriz extracelular y con otras células presentes en el estroma del endometrio (42).

Es posible que en esta etapa invasiva intervengan procesos de reconocimiento célula-célula y de las células con la matriz extracelular (95).

Se tienen datos acerca de la expresión de receptores para moléculas de la matriz, en el trofoblasto invasivo (95). Se puede esperar que estos receptores de matriz jueguen un papel funcional durante las fases de invasión después de la penetración del epitelio uterino.

El tejido uterino participa también en la regulación del proceso invasivo, por una parte puede facilitar por la regresión controlada del tejido decidual subyacente al trofoblasto y por otra, evitar que la invasión vaya más allá del estroma por la producción de una gran masa de tejido decidual y de factores químicos que inhiben la invasión del trofoblasto (82).

En el proceso de implantación descrito, son fundamentales, primero la interacción y adhesión entre dos epitelios distintos, el epitelio luminal uterino y las células del trofotodermo del blastocisto y posteriormente, la diferenciación del trofoblasto en células gigates ó en el sinciotrofoblasto y la interacción de éste tejido con la membrana basal, el epitelio y el estroma endometrial durante la penetración del endometrio.

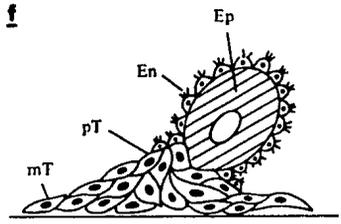
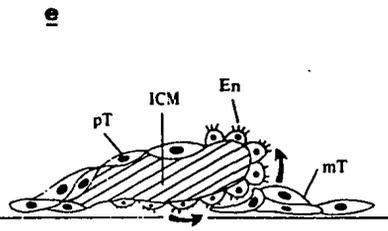
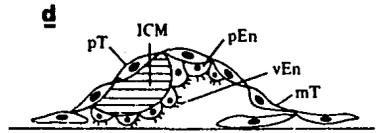
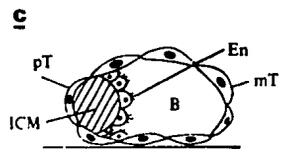
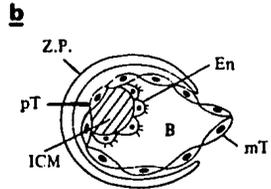
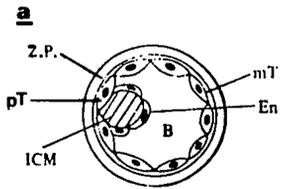
IMPLANTACION in vitro DE BLASTOCISTOS DE RATON.

Los blastocistos de ratón cultivados in vitro experimentan una serie de cambios similares a los cambios embrionarios en el útero en la etapa de la implantación: son capaces de romper y escapar de la zona pelúcida, adherirse a los diferentes sustratos por medio del trofotodermo mural, además, las células trofoblásticas migran y crecen en extensión adoptando una morfología aplanada, En cultivo la masa de células internas queda sobremontada en el centro del crecimiento trofoblástico (39, 54, 55) (figura 2).

Figura 2.- Implantación in vitro de blastocistos. Los blastocistos en cultivo se liberan de la zona pelúcida (b), las células del trofotodermo adquieren un estado adhesivo a la superficie de cultivo (c), creciendo en extensión, migrando sobre el sustrato (d) adoptando una morfología aplanada, formando una monocapa de células (e). Los tejidos derivados de la masa celular interna quedan como un grupo de células sobremontadas (f). Las células trofoblásticas aumentan de tamaño y se convierten en gigantes y poliploides.

ZP, zona pelúcida; pT, trofoblasto polar; ICM, masa celular interna; B, blastocisto; En, endodermo; mT, trofoblasto mural; Ep, epiblasto.

Tomada de Gonda, M; Hsu, Y, 1980.



Durante este proceso las células trofoblásticas se convierten en poliploides por replicación del DNA sin división celular y las células de la masa celular interna experimentan proliferación y diferenciación en ectoblasto e hipoblasto.

Las células del trofoblasto se diferencian in vitro, originando células gigantes poliploides y manifiestan diversos cambios bioquímicos (65, 85).

De esta manera, ocurren cambios citoplasmáticos asociados con la extensión (82), las células periféricas adquieren un gran número de vacuolas, mientras que las del polo embrionario por algún tiempo presentan escasa vacuolización. Posteriormente la vacuolización desaparece y el citoplasma peri-nuclear se vuelve granular y denso.

Dependiendo de las condiciones de cultivo se puede lograr una diferenciación más avanzada de la masa celular interna (MCI). El desarrollo de las cavidades amniótica y ectoplacentaria, en algunos casos (49), depende de la cantidad de suero fetal de ternera y del empleo de suero de cordón umbilical humano (50).

REQUERIMIENTOS DE CULTIVO.

Los primeros estudios de implantación in vitro fueron realizados por Glenister (34-37) usando tiras de endometrio de conejo, estas eran colocadas en una superficie de medio de agar nutritivo, lo cual permitía que los blastocistos cultivados se adhirieran al endometrio, demostrando que el trofoblasto puede interactuar con células uterina in vitro.

Este sistema es sin embargo, complejo y no se puede observar directamente. Posteriormente se han desarrollado cultivos de blastocistos sin el empleo de porciones de útero.

La habilidad de blastocistos de ratón para producir in vitro una capa extendida de trofoblasto fue reportado primeramente por Mintz en 1964, usando una solución balanceada de sales y un suplemento de energía (piruvato, lactato y glucosa), así como suero fetal de ternera al 50% lo que también fue logrado por Cole

y Paul en 1965 usando medio Waymouth suplementado con suero fetal de ternera al 10%.

El análisis llevado a cabo por Gwatkin en 1966 usando Medio Basal de Eagle (BME), revela que es necesario un suplemento macromolecular (suero ó de algunos de sus componentes, como la fetuina) y micromolecular (aminoácidos) para que se lleve a cabo el crecimiento trofoblástico en superficies de plástico.

Los requerimientos de cultivo durante la implantación de los blastocistos de ratón se han establecido dependiendo de las fases de implantación y diferenciación de éste.

Se ha establecido que la arginina, cisteína, histidina, leucina y treonina son necesarios para el crecimiento en extensión del blastocisto de ratón in vitro (43) que la omisión de lisina, metionina, fenilalanina, triptofano y tirosina del medio lo reducen marcadamente sin inhibirlo, mientras que la omisión de isoleucina y valina solo lo reducen ligeramente.

Cultivos sobre colágena, obtenida de cola de rata han demostrado que el trofoblasto se extiende en ausencia de suero, aunque no hay diferenciación de la masa celular interna (104). También se ha establecido que el crecimiento del blastocisto puede ocurrir en un medio definido, sin suero pero suplementado con fetuina (43, 78).

Por otra parte se ha demostrado que proteínas de matriz extracelular (fibronectina, laminina, colágena tipo IV) promueven y favorecen la adhesión y extensión de blastocistos de ratón in vitro aún sin el empleo de suero (4, 95).

De este modo para que la adhesión y extensión del trofoblasto puedan efectuarse in vitro es indispensable la presencia de suero sanguíneo (38, 54, 85, 90) ó de proteínas que faciliten la adhesión y extensión ó que sirvan de sustrato para ello como la fetuina, (78, 85) ó diversas proteínas de matriz extracelular como la fibronectina, la laminina ó la colágena tipo IV. (4, 30, 95).

Muchos sistemas de cultivo in vitro de blastocistos emplean suero o fracciones del suero que favorecen la adhesión y extensión del trofoblasto. Se ha sugerido que diferentes componentes

macromoleculares del suero con peso molecular de 30 a 100 KDa son capaces de inducir la extensión del trofoblasto y que fracciones arriba de 100 KDa incrementan esta extensión y favorecen el desarrollo de la masa celular interna (MCI) (99).

EL PROCESO DE ADHESION DURANTE LA IMPLANTACION in vitro.

Los blastocistos en cultivo, aún en presencia de células uterinas, se adhieren a proteínas de matriz extracelular, por lo que este proceso es similar a la interacción del trofoblasto con la matriz extracelular del endometrio (lámina propia y sustancia intercelular del estroma) (93).

Sin embargo, hay una diferencia significativa entre la adhesión in vitro e in vivo debido a que la interacción inicial adhesiva in vivo involucra las superficies apicales de dos epitelios (84), mientras que en cultivo la adhesión y extensión del trofoblasto ocurre directamente sobre un sustrato de superficie formado por proteínas de matriz extracelular (28, 105).

La adhesividad del trofoblasto al sustrato se adquiere durante el cultivo de los blastocistos y no es la presencia de la zona pelúcida la que evita la adhesión, así blastocistos en etapa temprana a los que se les ha removido la zona pelúcida no muestran afinidad por el sustrato, en cultivos con suero ó sobre una cubierta de colágena (54, 91, 104).

La habilidad de los blastocistos para adherirse y extenderse sugiere la presencia en la superficie celular de receptores específicos. La adhesión y extensión a proteínas de matriz extracelular (fibronectina, laminina y colágena tipo IV) en la membrana del trofoblasto esta asociada a la expresión de integrinas (una superfamilia de glicoproteínas heterodiméricas), que incluye receptores para diversos componentes de la matriz extracelular, que participan en la adhesión y extensión de las células al sustrato. El empleo de anticuerpos contra la subunidad β , de la integrina bloquea la adhesión y extensión del trofoblasto sobre fibronectina, laminina y colágena tipo IV, sugiriendo que

las integrinas implicadas tienen en común la subunidad β_1 , aunque cada una de estas proteínas puede tener distinto receptor (95).

Este receptor de adhesión reconoce e interactúa en algunos sustratos (fibronectina y vitronectina) con un sitio que contiene la secuencia Arg-Gli-Asp, así la extensión del trofoblasto a fibronectina es inhibida reversiblemente por un hexapeptido que contiene esta secuencia (5, 95).

Es posible que la adhesión del trofoblasto a distintos componentes de la matriz extracelular este mediado por más de un tipo de integrina, con especificidad para el ligando, ya que se han mostrado evidencias de que el mecanismo de adhesión del trofoblasto a la laminina es diferente al usado para la fibronectina (2).

Otras moléculas de la superficie del trofoblasto que se han implicado en su interacción con la matriz extracelular son las proteoglicanas de heparan sulfato que actúan en forma concertada con las integrinas, favoreciendo la adhesión del trofoblasto (30).

La adhesión y extensión del trofoblasto in vitro requieren de un período de síntesis de proteínas (9) y de glicoproteínas (98), así mismo, se requiere de la expresión de receptores para proteínas de matriz extracelular en la superficie celular (95).

Investigaciones hechas en células de coriocarcinoma han determinado que hay producción activa de moléculas de matriz, como la laminina y fibronectina igual que en el trofoblasto (68, 76).

DIFERENCIACION BIOQUIMICA DEL TROFOBLASTO.

Tanto el trofocotodermo como el trofoblasto experimentan diversos cambios morfológicos y bioquímicos durante su diferenciación in vitro. Se han establecido una serie de marcadores de la diferenciación del trofoblasto, entre los que, se encuentran estereasas (87, 88), mucopolisacáridos (86) y diversas proteínas.

Durante su adhesión y extensión el trofoblasto se vuelve poliploide (6), ocurre síntesis y secreción de glicoproteínas y aumenta la expresión de diversas proteínas (83), entre otras: del activador de plasminógeno (97), de la subunidad A de la lactato deshidrogenasa (85), de la $\delta 5,3\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa (3 β HSD) (92, 93), y de la β -glucuronidasa (85).

Durante los primeros días de extensión del trofoblasto, aumenta la captación de esterasa F materna (92), la incorporación de L- [³⁵S]-metionina a proteínas (83) y el contenido de proteínas (Tabla 1) (85).

La expresión de estos marcadores de diferenciación requiere en algunos casos de la transcripción (3 β HSD) y en otros depende de mRNA formado previamente en el estado de blastocisto (activador de plasminógeno, β -glucuronidasa) (85).

Debido a nuestro interés en la participación de la fibronectina en el proceso de implantación in vitro describiremos a continuación sus principales características.

GENERALIDADES DE LA FIBRONECTINA

En 1948 Morrison y col., aislaron una fracción parcialmente purificada del plasma humano usando el término de "globulina insoluble en frío", independientemente se han descrito varias proteínas ó factores que se han nombrado de acuerdo a su origen y actividad biológica. Evidencias recientes indican que estas proteínas son una ó tal vez dos a las cuales han llamado: fibronectina de superficie celular y fibronectina del plasma.

La fibronectina de superficie celular es un componente principal de muchas células cultivadas y no cultivadas.

Estas glicoproteínas son también conocidas como proteínas LETS (gran proteína externa sensible a la transformación) ó CSP (proteína de superficie celular). Son proteínas díméricas con peso molecular entre 200 000 a 250 000 daltones (51, 58).

La fibronectina de plasma humano es una glicoproteína dímérica con subunidades polipeptídicas de 200 000 a 220 000

TABLA 1
MARCADORES BIOQUIMICOS DE LA DIFERENCIACION
DEL TROFOBlasto IN SITU E IN VITRO.

MARCADOR	TIEMPO DE APARICION IN SITU EDAD GESTACIONAL (DIAS)	DETECCION EN CULTIVO	REFERENCIA
POLIPLOIDIA	5	+	BARLOW Y SHERMAN 1972.
POSFATASA ALCALINA	5-8	+	SHERMAN 1972a.
ESTERASA A	5-8	+	SHERMAN 1972b.
CAPTACION DE ESTERASA F	5-8	+	SHERMAN Y CHEW 1972.
Δ^5 3 β HIDROXIESTE- ROIDE DESHIDROGENASA	6-12	+	CHEW Y SHERMAN 1973, 1974.
ACTIVADOR DE PLASMI- NOGENO.	5-8	+	STRICKLAND Y COL., 1976. SHERMAN, 1980.
β -GLUCURONIDASA	5-8	+	SELLENS Y SHERMAN 1980.
SUBUNIDAD A DE LACTA- TO DESHIDROGENASA	6-8	+	SELLES Y SHERMAN 1980.
SINTESIS Y SECRECION DE GLICOPROTEINAS	4-8	+	NIEDER Y COL., 1987. NIEDER, 1989, 1990.

daltones. Su concentración en el plasma humano es de 0.3 mg/ml (56, 57).

Se ha sugerido que estas dos formas de fibronectina son muy similares, probablemente no idénticas ya que tal vez son productos de diferentes genes, ó de un gene siendo modificadas post-transcripcionalmente.

Se han presentado evidencias en células fibroblásticas adherentes, de que la fibronectina esta dispuesta en la matriz pericelular, y que esta disposición este determinada tal vez por las uniones de célula-célula y célula sustrato.

ESTRUCTURA QUIMICA DE LA FIBRONECTINA.

La molécula de fibronectina es un dímero el cual esta formado por dos subunidades similares. Cada subunidad tiene un peso molecular de alrededor de 220 000 a 250 000 daltones, las cuales estan unidas por un par de enlaces disulfuro en la parte final.

Cada subunidad tiene una longitud de 60 a 70 nanómetros y 2 a 3 nanómetros de ancho. Pueden dividirse en regiones de acuerdo a las propiedades de unión a otras glicoproteínas como la colágena y la fibrina, entre otras (figura 3). También presentan regiones por las que se pueden unir a la superficie celular (50, 57).

FUNCIONES DE LA FIBRONECTINA.

La fibronectina es un constituyente de la matriz extracelular que interviene en procesos de adhesión e influye en el crecimiento y migración celular, así como en procesos de opsonización (61, 80, 81).

La fibronectina también esta involucrada en una gran variedad de actividades celulares como la agregación de célula-célula, la unión específica a macromoléculas como la heparina y el fibrinógeno. Participa en procesos de diferenciación, embriogénesis, transformación oncogénica, cicatrización de heridas y actividad fagocítica.

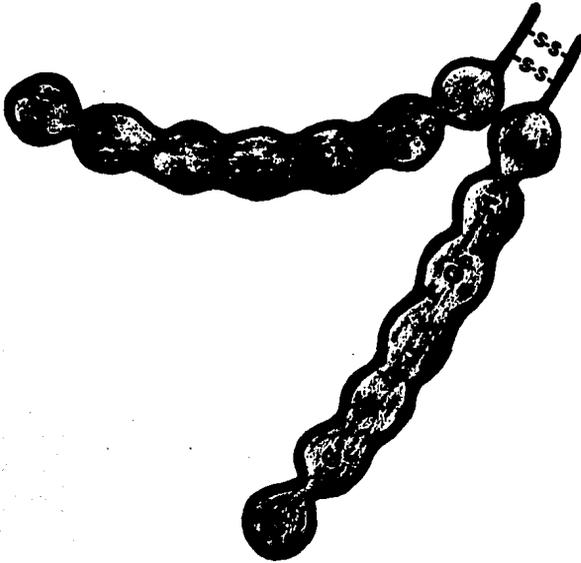


Figura 3.- Estructura de la fibronectina. La fibronectina es un dímero formado por dos subunidades similares con un PM de 220 000 a 250 000 daltones, estas subunidades están unidas en la parte final por un par de enlaces disulfuro, tiene sitios específicos de unión, para moléculas de matriz extracelular ó de la superficie celular como heparina, colágena, fibrinógeno etc.

Tomada de Hynes, Richard. 1986.

Estudios in vitro concluyen que es una proteína de adhesión de célula-célula y de célula-sustrato.

EXPRESION DE FIBRONECTINA AL INICIO DEL DESARROLLO.

La expresión de la fibronectina en los primeros estados de la embriogénesis de el ratón se ha estudiado por métodos de inmunofluorescencia indirecta. En el ratón la expresión de la fibronectina se ha detectado desde el estado de dos células. Watiovaara y col. (1979), demostraron que en las células gigantes trofoblásticas hay una cantidad densa de fibronectina citoplasmática.

Estudios histoquímicos han sugerido que en vivo, el trofoblasto invasivo almacena moléculas de matriz extracelular como la fibronectina y la laminina, las cuales además parecen estar asociadas con su superficie celular, sin embargo no se sabe exactamente el propósito de esta acumulación (11).

Investigaciones ultraestructurales indican que las células del endodermo de el blastocisto tardío presentan cisternas anchas de retículo endoplásmatico y podrían estar activos sintetizando material extracelular (25, 27).

En estudios en cultivo in vitro en medio sin suero se ha determinado la presencia de fibronectina asociada con las células gigantes del trofoblasto extendidas, demostrándose que éstas contienen a la fibronectina organizada como una malla granular (11).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

Es escasa la información que se tiene acerca de los factores que modulan la diferenciación del trofoblasto durante el desarrollo pre-implantacional.

Se piensa que entre los factores que regulan el metabolismo embrionario, la adhesión y diferenciación del trofoblasto se encuentran las secreciones uterinas y del trofoblasto, (32, 77, 103) y algunos factores séricos, de ahí el interés de éste trabajo

de estudiar a la fibronectina como un factor sérico que favorece la adhesión y extensión de blastocistos cultivados in vitro.

Se ha establecido que para que la adhesión y extensión del trofoblasto ocurra es necesaria la presencia de suero fetal de bovino, de fetuina ó de proteínas de matriz extracelular, como laminina, fibronectina, colágena tipo IV, ó de que los blastocistos se cultiven sobre monocapas de células derivadas de distintos tejidos. Se desconoce el mecanismo por el que actúa la fetuina e incluso, su acción puede deberse a un contaminante de la misma (77).

Las proteínas de matriz extracelular proporcionan un sustrato para la adhesión y extensión, y las células cocultivadas con los blastocistos parecen ser desplazadas y la interacción del trofoblasto, presumiblemente es con sustancias producidas por ellas y depositadas en la superficie de cultivo (81), posiblemente proteínas de matriz extracelular.

Hay pocos estudios acerca de los componentes del suero que favorecen la adhesión y extensión del trofoblasto. Se ha encontrado que es suficiente preexponer la superficie de cultivo con suero para que se forme una cubierta capaz de sostener la adhesión y extensión del trofoblasto (3), que el factor es sensible a tripsina y la mayor actividad se encuentra en una fracción de PM arriba de 200 KDa (3).

La fibronectina podría servir como un factor sérico que favorece la adhesión y extensión del trofoblasto in vitro. Debido a que es un constituyente del suero de diversas especies, incluyendo al hombre (50) y es un factible componente del suero de bovino fetal.

Tachi en 1992 hizo una caracterización parcial de los factores séricos y encontró que una fracción de peso molecular entre 30 y 100 KDa es capaz de inducir el inicio de la extensión del trofoblasto y otra fracción mayor a 100 KDa induce una mayor extensión y desarrollo de la masa celular interna.

Además, se ha determinado que las fibronectinas son un grupo de glicoproteínas de superficie celular importante en las

interacciones célula-célula y en el control de la forma celular (106), que promueven la adhesión celular a sustratos como colágena desnaturalizada.

Se ha reportado en otros modelos que la adhesión y extensión de células de riñón de criceto recién nacido requiere la presencia de componentes del suero que se absorben a la superficie del sustrato. En base a esto nos hemos planteado los siguientes objetivos.

III. OBJETIVOS.

A). OBJETIVO GENERAL:

Analizar si la fibronectina es uno de los factores séricos que favorecen la adhesión y extensión durante la implantación in vitro de blastocistos de ratón.

B). OBJETIVOS PARTICULARES:

1. -Detectar la presencia de fibronectina en el suero de bovino fetal, utilizado en el medio de cultivo para blastocistos.
2. -Evaluar si se forma una cubierta en la superficie de cultivo, cuando ésta se expone al suero que contenga fibronectina.
3. -Evaluar si la cubierta dejada sobre la superficie de cultivo es capaz de sostener la implantación in vitro de blastocistos de ratón en forma similar al suero ó a una cubierta de fibronectina.
4. -Estudiar el efecto del anticuerpo anti-fibronectina sobre la implantación in vitro de blastocistos de ratón. Estudiando como se modifica la proporción de blastocistos que rompen la zona pelúcida, que se adhieren, extienden ó pierden el blastocelo a distintos tiempos de cultivo.

5. -Estudiar el efecto de los anticuerpos contra fibronectina sobre el área de extensión del trofoblasto después de 96 h de cultivo.

6. -Estudiar el efecto de los anticuerpos contra fibronectina sobre la distribución de fibronectina en los blastocistos implantados.

IV. MATERIALES Y METODOS.

MATERIALES.

1. REACTIVOS:

Los siguientes reactivos fueron obtenidos de Sigma Chemical Co. (St. Louis, Mo.): L-glutamina, estuche de proteínas preteñidas estándares de peso molecular conocido (estuche MWND-50), fibronectina (F-1141), laminina (L-2020) fracción V de la albúmina sérica de bovino (BSA), sefarosa 4B, acrilamida N'N'-metilen-bis-acrilamida (M-7256), TEMED, dodecil sulfato de sodio (SDS), Tris-HCl, adyuvante completo e incompleto de Freund, glicina, azul de bromofenol, azul brillante de Coomassie, rosa de Ponceau, Tritón X-100 (T-6878), 3,3'-diaminobencidina (D-5637), NiCl (N-5756), aceite mineral (M-3516), sulfato de kanamicina, sulfato de estreptomicina, penicilina G (S-6501), agarosa (A9539), mezcla de sales para preparar solución salina amortiguada con fosfatos de Dulbecco (PBS) cNCTC-135.

El suero de bovino fetal inactivado por calor fue de GIBCO, la gonadotropina de suero de yegua preñada (PMSG) fue de Intervet (Folligon), la gonadotropina coriónica humana de Serono (Profasi 5000).

El anticuerpo anti-IgG de conejo marcado con peroxidasa y obtenido en cabra fue de HyClone (anti-IgG de conejo-HRP).

Proteínas marcadoras de pesos moleculares fueron de Bio-Rad, así como el papel de nitrocelulosa.

Los filtros de acetato de celulosa con poro de 0.22µm fueron de MFS.

Los demás reactivos usados fueron grado analítico y de la más alta calidad disponible (por lo general Baker ó Merck).

2. ANIMALES:

Fueron empleadas ratonas de la cepa CDI para la obtención de blastocistos.

Se utilizó sangre de cobayo para la obtención y purificación

de fibronectina.

Se utilizó un conejo de la raza Nueva Zelanda, hembra de 3 kg para inmunizarlo contra fibronectina y la obtención de suero conteniendo anticuerpos anti-fibronectina.

Todos los animales fueron mantenidos en condiciones ambientales controladas, con un ciclo de luz-oscuridad de 14-10 h, con provisión de alimento y agua ad libitum.

Debido a que la implantación de los embriones de mamíferos es un proceso muy complejo in vivo e inaccesible para el control experimental, se han establecido modelos para el estudio del desarrollo del blastocisto in vitro.

3). COMPOSICION Y PREPARACION DE SOLUCIONES Y REACTIVOS.

I.-COMPOSICION Y PREPARACION DE MEDIOS DE CULTIVO Y PBS

Medio de Biggers

Este medio se emplea para la recuperación de estadios de desarrollo previos a la implantación. Suplementado con albúmina se emplea para el cultivo de la etapa de dos células a blastocisto.

a).Composición:

<u>Sustancia</u>	<u>Concentración</u>
	g/100 ml
NaCl	0.554
KCl	0.356
Lactato de calcio . $5H_2O$	0.0527
KH_2PO_4	0.0162
$Mg_2SO_4 \cdot 7H_2O$	0.0294
Na HCO_3	0.2106
Piruvato de sodio	0.0028
Lactato de sodio al 60%	0.2416
Glucosa	0.1
Antibióticos:	
Estreptomycin	0.005
Penicilina G	0.00625
Kanamicina	0.005
Rojo fenol	0.0005

b).Preparación:

Se disolvieron todos los componentes en la mitad del volumen deseado, excepto el bicarbonato, el piruvato de sodio, el rojo fenol y los antibióticos.

Se agregaron lentamente el bicarbonato y el piruvato de sodio, el rojo fenol y los antibióticos y se aforó a la cantidad deseada, se esterilizó por filtración al vacío a través de un filtro de acetato de celulosa con poros de 0.22 μm .

Antes de emplearlo, cuando así se requirió, se agregó la albúmina sérica de bovino (BSA), 0.4 g por cada 100 ml y se esterilizó de nuevo por filtración al vacío.

Solución de antibióticos

Esta solución fue empleada como suplemento en los medios de cultivo, con el objeto de evitar contaminación.

a). Composición:

<u>Sustancia</u>	<u>Cantidad</u>
Penicilina G	10 000 U/ml
Sulfato de estreptomicina	10 mg/ml
Kanamicina	10 mg/ml

b). Preparación:

Se disolvieron 62.8 mg de penicilina G (Sigma 25 000 000 U en 15.7 gr), 100 mg de sulfato de estreptomicina y 100 mg de kanamicina en 10 ml de agua destilada estéril, se esterilizó por filtración al vacío, a través de una membrana de acetato de celulosa con poros de 0.22 μm .

Se almacenó en refrigeración hasta su uso.

Se agregaron 100 μl de esta solución por cada 10 ml de medio de cultivo.

Medio cNCTC-135

Este medio es utilizado para el mantenimiento de células en cultivo. Fue empleado como medio de cultivo de los blastocistos.

a). Composición:

<u>Sustancia</u>	<u>Concentración</u>
	g/l
L-Alanina	0.03148
Acido L- α -amino-N-butírico	0.00551
L-Arginina . HCl	0.03116
L-Aspargina . H ₂ O	0.00919
Acido L-aspártico	0.00991
L-Cistina . 2HCl	0.01368
D (+)-glucosamina	0.00385
Acido L-glutámico	0.00826
L-Glutamina	0.13573
Glicina	0.01351
L-Histidina . HCl .H ₂ O	0.02665
Trans-4-hidroxy-L-prolina	0.00409
L-Isoleucina	0.01804
L-Leucina	0.02044
L-Lisina . HCl	0.03843
L-Metionina	0.00444
L-Ornitina . HCl	0.00941
L-Fenilalanina	0.01653
L-Prolina	0.00613
L-Serina	0.01075
Taurina	0.00418
L-Treonina	0.01893
L-Triptofano	0.0175
L-Tirosina 2Na .2H ₂ O	0.0237
L-Valina	0.025
Acido ascórbico.Na	0.05

D-Biotina	0.000025
Cloruro de colina	0.00125
Cocarboxilasa	0.001
Coenzima A . Na	0.0025
2'-desoxiadenosina	0.01
2'-desoxiguanosina	0.01
2'-desoxicitidina . HCl	0.01
Ergocalciferol	0.00025
FAD . 2Na	0.001
Acido fólico	0.000025
Acido D-glucurónico . Na	0.0018
Lactona del ácido D-glucurónico.....	0.0018
Glutación .2Na	0.02
Mio-inositol	0.000125
Menadiona. bisulfito de sodio	0.00004
5-metilcitosina HCl	0.0001
β -NADP .Na	0.001
β -NAD	0.007
Niacinamida	0.0000625
Acido nicotínico	0.0000625
Acido p-amino benzóico	0.000125
Acido D-pantoténico . 1/2 Ca	0.000025
Piridoxal. HCl	0.0000625
Piridoxina . HCl	0.0000625
Acetato de retinol	0.00025
Riboflavina	0.000025
Tiamina. HCl	0.000025
Timidina	0.01
Tween 80	0.0125
Fosfato de tocoferol .2Na	0.000025
UTP . Na	0.001
Vitamina B ₁₂	0.01
Cloruro de calcio .2H ₂ O	0.265
Sulfato de magnesio (anhidro)	0.1
Cloruro de potasip	0.400

Acetato de sodio	0.03
Cloruro de sodio	6.800
Fosfato de sodio monobásico anhidro	0.122
D-glucosa	1.000
Rojo fenol . Na	0.02

b).Preparación:

Se disolvieron 9.4 g de la mezcla comercial de medio cNCTC-135 con L-glutamina, sin bicarbonato de sodio (N5138) en 900 ml de agua destilada y desionizada, se disolvieron con agitación.

Se adicionó al medio, 2.2 g de bicarbonato de sodio/litro.

Se ajustó el pH a 7.2 usando HCl ó NaOH 1N (0.2 unidades abajo del pH deseado).

Se aforó con agua destilada a un litro y se esterilizó por filtración al vacío, usando una membrana de acetato de celulosa con poros de 0.22 μ m.

Se guardó en forma aséptica entre 2-6°C y en oscuridad hasta su uso.

Cuando se requirió suplementado con suero fetal de bovino, antes de emplearlo, por cada 9 ml de medio se agregaron, 1 ml de SBF y 100 μ l de la solución de antibióticos. Se esterilizó por filtración al vacío.

En otras ocasiones se suplemento con BSA al 0.4 %, en lugar del suero.

Solución salina amortiguada con fosfatos de Dulbecco (PBS).

Esta solución fue utilizada para el lavado de las columnas para cromatografía de afinidad, para hacer diluciones y en el lavado de los tejidos durante las inmunotinciones.

a). Composición:

<u>Sustancias</u>	<u>Concentración</u>
	g/l
Cloruro de magnesio . 6H ₂ O	0.100
Cloruro de potasio	0.200
Fosfato de potasio monobásico	0.200
Cloruro de sodio	8.000
Fosfato de sodio dibásico	1.150

b). Preparación:

Se preparó a partir de una mezcla comercial de las sales que lo componen (D5773 de Sigma).

Se disolvió el contenido del paquete para preparar un litro de PBS en 900 ml de H₂O destilada estéril, agitando hasta su disolución.

Se ajustó el pH a 7.2 (0.2 unidades abajo del deseado), con el empleo de HCl 1N.

Se aforó al volumen final (1 litro).

Se esterilizó por filtración al vacío, a través de un filtro de 0.22 µm de poro.

Se almacenó en frascos estériles a 4°C hasta su uso.

II.-PREPARACION DE REACTIVOS PARA ELISA.

Solución amortiguadora de recubrimiento.

Fue utilizada para el recubrimiento de la placa para ELISA con la solución de fibronectina, durante 16 horas a 4°C.

a). Composición:

<u>Sustancia</u>	<u>Cantidad</u>
Na ₂ CO ₃	1.59 g

NaHCO ₃	2.93 g
NaN ₃	0.2 g
H ₂ O, aforar a	1 l

b). Preparación:

Se disolvieron las sustancias indicadas y se ajustó el pH a 9.6 con NaOH 1M y se aforó a un litro con agua destilada, se almacenó a temperatura ambiente por no más de dos semanas.

Solución salina amortiguada con fosfatos-Tween

Se utilizó para el lavado de las muestras y para hacer diluciones de los anticuerpos durante la prueba de ELISA.

a). Composición:

<u>Sustancias</u>		<u>Cantidad</u>
NaCl	8 g
KCl	0.2 g
KH ₂ PO ₄	0.2 g
NaHPO ₄	1.5 g
Tween 20	0.5 ml
H ₂ O	1 l

b). Preparación:

Esta solución se preparó en el momento de ser utilizada, se disolvieron todas las sustancias, excepto el Tween 20 en 900 ml de H₂O destilada estéril, agitando hasta su disolución.

Se ajustó el pH a 7.2 (0.2 unidades abajo del deseado), con el empleo de HCl 1N.

Se aforó al volumen final (1 litro).

Se agregó el Tween 20, agitando hasta su disolución.

Sustrato para ELISA (ABTS)

Se utilizó como sustrato durante la prueba de ELISA.

a).Composición:

Solución amortiguadora de fosfato-citrato

<u>Sustancia</u>	<u>Concentración</u>
Acido cítrico 0.06 M	12.61 g/l
Na ₂ HPO ₄ 0.09 M	24.12 g/l
H ₂ O, aforar a	1 l

Sustrato de ABTS

2',2'-Azino-bis 3-etilbenzo-tiazolina-6-ácido sulfónico (sal de diamonio) (ABTS)	137 mg
Amortiguador de fosfato-citrato	250 ml
H ₂ O ₂ al 30 %	0.015 ml/5ml

b).Preparación:

Este sustrato se preparó en el momento de usarse, el amortiguador de fosfato-citrato debe de estar a un pH de 4.2.

III.-PREPARACION DE REACTIVOS PARA ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA-SDS.

Solución de acrilamida-bis-acrilamida (30:0.8)

Se disolvieron 30 g de acrilamida y 0.8 g de bis-acrilamida en 50 ml de agua destilada, posteriormente se aforó a 100 ml y se filtró en papel Whatman No. 1. Se guardó a 4°C en un frasco ámbar hasta un mes.

Persulfato de amonio al 1.5% p/v.

Se disolvieron 0.15 g de persulfato de amonio en 10 ml de agua destilada, siempre se preparó antes de usar.

SDS al 10% p/v

Se disolvieron 10 g de SDS en 70 ml de agua destilada, mezclando con un agitador magnético hasta la obtención de una solución clara, posteriormente se aforó a 100 ml con agua destilada, esta solución es estable a temperatura ambiente.

Amortiguador del gel concentrador (Tris-HCl 0.5 M, pH 6.8)

Se disolvieron 6 g de Tris en 40 ml de agua, se tituló a pH 6.8 con HCl 1M, después se ajustó a 100 ml, se filtró en papel Whatman No. 1 y se almacenó a 4°C hasta su uso.

Amortiguador para el gel separador (Tris-HCl 3M, pH 8.8).

Se disolvieron 36.3 de Tris en 48 ml de HCl 1M, se ajustó el pH a 8.8 con HCl 1M y se aforó a 100 ml con agua destilada. Se filtró en papel filtro Whatman del No. 1 y se almacenó a 4°C hasta su uso.

Amortiguador del reservorio.

a). Solución madre (Tris 0.25 M, glicina 1.92 M, SDS 1% pH 8.3).

Se disolvieron 30.3 g de Tris, 144 g de glicina y 10 g de SDS en 800 ml de agua destilada, se ajustó el pH a 8.3 con HCl 1M y se aforó a 1 litro con agua destilada, se almacenó a 4°C hasta su uso.

b). Solución de trabajo.

Se diluyó la solución madre 1:10. Se puede reutilizar hasta cinco veces.

Amortiguador de muestra 2X.

Se mezclaron los siguientes reactivos:

Tris-HCl 0.5 M pH 6.8.....	2.5 ml
SDS al 10%.....	4.0 ml
glicerol.....	2.0 ml
β -mercaptoetanol.....	1.0 ml
H ₂ O.....	0.5 ml
Azul de bromofenol.....	una pizca.

Se separó en alícuotas y se guardó a -20°C hasta su empleo.

IV.-PREPARACION DE REACTIVOS PARA ELECTROTRANSFERENCIA E INMUNODETECCION

Solución amortiguadora de transferencia.

Esta solución fue utilizada para el lavado de los geles con el objeto de equilibrarlos y como amortiguador durante la electrotransferencia de las proteínas.

a). Composición:

<u>Sustancias</u>	<u>Cantidad</u>
Trisma base	3.03 g
Glicina	14.4 g
Metanol al 20%	200 ml
H ₂ O aforar a	1 l

b). Preparación:

Se preparó al momento de usarse, disolviendo todas las

sustancias y aforando a un litro con agua destilada. Esta solución puede ser reusada hasta 2 veces se guardó en refrigeración.

Solución salina amortiguada con fosfatos-Tritón X-100

Fue utilizada para el lavado del papel de nitrocelulosa así como diluyente de la leche sveltos en la técnica de inmunodetección.

a).Composición:

<u>Sustancia</u>	<u>Cantidad</u>
NaCl8 g
KCl0.2 g
KH_2PO_40.2 g
Tritón X-100 al 0.1%.....10 g
H_2O1 l

b).Preparación:

Esta solución se preparó en el momento de ser utilizada, se disolvieron todas las sustancias, excepto el Tritón X-100, en 90 ml de H_2O destilada estéril, agitando hasta su disolución.

Se ajustó el pH a 7.2 (0.2 unidades abajo del deseado), con el empleo de HCl 1N.

Se aforó al volumen final (100 ml).

Se agregó el Tritón X-100 al 0.1% agitando hasta su disolución.

4).OBTENCIÓN Y PURIFICACION DE FIBRONECTINA.

La fibronectina se purificó por el método de cromatografía de afinidad en gelatina-séfarosa. Para lo cual se colectó sangre

fresca de cobayo, en citrato de sodio al 5%, conteniendo floruro de fenil-metil-sulfonilo (PMSF) 0.1 mM disuelto en isopropanol, se centrifugó a 3,000 rpm durante un período de 15 minutos, el plasma recuperado, se centrifugó nuevamente a 11,000 rpm durante 30 min. El plasma libre de material particulado se pasó a través de una columna de afinidad de gelatina-sefarosa 4B a 4°C. La columna se lavó secuencialmente con NaCl 0.5 M, NaCl 1.0 M y urea 1.0 M en Tris-HCl 0.05 M, pH 7.4. La fibronectina unida se eluyó con Tris-HCl 0.05 M, pH 7.4 conteniendo urea 4.0 M. Todos los amortiguadores contenan PMSF 0.1 mM.

Se colectaron fracciones de 3 ml en tubos de ensayo que contenan 100 µl del amortiguador Tris-HCl 1.0 M pH 8.6, para neutralizar inmediatamente el pH. Posteriormente se determinó la presencia de fibronectina leyendo la absorbencia a 280 nm. Las fracciones correspondientes al pico principal se juntaron y se sometieron a diálisis contra Tris-HCl 0.05 M, NaCl 0.15 M, pH 7.4, posteriormente la muestra se dividió en alícuotas y se almacenó a -70°C.

Para determinar la pureza de la proteína aislada se realizó la separación electroforética de la proteína purificada por electroforesis unidimensional en gel de poliacrilamida-SDS al 7.5%, acorde al método de Laemli (59).

5).PREPARACION Y PURIFICACION DE ANTICUERPOS CONTRA FIBRONECTINA

Antisueros contra fibronectina de cobayo fueron obtenidos en conejos, hembras de 3 Kg de la raza Nueva Zelanda; para ello la fibronectina purificada del plasma, se utilizó como inmunógeno. Se inyectaron cuatro dosis de fibronectina, las dos primeras a una concentración de 150 µg de la proteína en 300 µl de PBS y 150 µl de adyuvante completo de Freund, se aplicaron por vía intramuscular, con intervalo de una semana; 15 días después de la segunda dosis, se aplicó una tercera, la cual contenía 500 µg de proteína en PBS y 500 µl de adyuvante incompleto de Freund, se

aplicó por vía intramuscular en diferentes zonas del cuerpo. Una semana después se administró la última dosis, en este caso fueron 300 µg de la proteína sin adyuvante y por vía intravenosa. Se dejó descansar al animal durante 7 días y se procedió al sangrado total del mismo.

Los anticuerpos contra fibronectina fueron purificados por cromatografía de afinidad en una columna de fibronectina sefarosa 4B, para ello, el suero libre de material particulado, se pasó a través de ella a 4°C; la columna se lavó con amortiguador de fosfatos 0.1 M, pH 7.2 hasta que ya no se detectaron proteínas en el eluido a 280 nm. Los anticuerpos se eluyeron de la columna con glicina 0.2 M, pH 2.8 y se colectaron fracciones de 500 µl en tubos de ensayo que contenían 100 µl del amortiguador Tris-HCl 1.0 M, pH 8.6 para neutralizar inmediatamente el pH. Posteriormente se determinó la presencia de proteína en las fracciones, midiendo la absorbencia a 280 nm. Las fracciones que contenían el anticuerpo se juntaron y se dializaron contra PBS a 4°C, posteriormente se diluyó 1:2 con glicerol, se separó en alícuotas que se almacenaron a -70°C. La concentración de proteínas en la solución del anticuerpo se determinó por el método de Lowry (60).

B. METODOS.

1). TITULACION DE ANTICUERPOS ANTI-FIBRONECTINA POR ELISA.

Los anticuerpos obtenidos fueron titulados por ELISA, para ello se recubrió cada pozo de la placa de poliestireno para ELISA con 100 µl de la solución de fibronectina (10 µg/ml) con el amortiguador de recubrimiento (carbonato-bicarbonato 0.01 M a pH 9.6). Se incubó por 16 horas a 4°C. Posteriormente se hicieron tres lavados con TWEEN 20 al 0.05% en PBS. Se bloquearon los sitios de unión no específicos por la adición de 100 µl de BSA al 1% por pozo, incubando durante una hora a 37°C y se realizaron tres lavados con PBS-TWEEN 20.

Se hicieron diferentes diluciones del anticuerpo obtenido en PBS-TWEEN 20, todas se hicieron por duplicado, comprendidas entre 1:10 a 1:10 000, se colocaron 100 μ l de las diluciones en cada pozo y se incubó por una hora a 37°C, posteriormente se hicieron 3 lavados con PBS-TWEEN.

Se adicionaron 100 μ l por pozo del conjugado IgG de chivo anti IgG de conejo-peroxidasa diluido (1:10 000) en PBS-TWEEN 20. Se incubó a 37°C por una hora, se hicieron 3 lavados con PBS-TWEEN 20. Se agregó la mezcla de sustrato 100 μ l/pozo, empleando como tal, ABTS 1 mM (2,2' Azino-bis 3-etil-benzo-tiazolina-6 ácido sulfónico) y H_2O_2 al 0.1% disueltos en amortiguador de citrato-fosfato. Se incubó por 15 min. Para detener la reacción se adicionaron 25 μ l por pozo de H_2SO_4 1.5 M ó SDS al 20% y se leyó la absorbencia a 492 nm.

2) DETECCION DE FIBRONECTINA EN EL SUERO FETAL DE BOVINO.

a). SEPARACION ELECTROFORETICA DE LAS PROTEINAS DEL SUERO.

La concentración de proteínas en el SBF fue determinada por el método de Lowry (60).

El suero diluido en agua destilada se mezcló 1:1 con amortiguador de muestra concentrado 2 veces, de modo que quedaran 100 μ g de proteínas en 20 μ l, la mezcla tenía una concentración final de Tris-HCl 0.625 pH 6.8, SDS 2%, 2-mercaptoetanol 5%, glicerol 10% y azul de bromofenol 0.002% y se almacenó a -20°C hasta su uso.

Muestras de suero conteniendo 25, 50, 75 y 100 μ g de proteínas fueron separadas por electroforesis unidimensional en geles de poliacrilamida con SDS de acuerdo al procedimiento de Laemmli (59), el gel concentrador fue al 3.75% y el separador al 7.5%, se corrieron simultáneamente proteínas estándares preteñidas de peso molecular conocido (estuche MWND-50 de Sigma), como referencia. Unos geles fueron teñidos con azul brillante de Coomassie, se fijaron y se secaron, entre papel celofán dulce para

su observación y otros se procesaron para la detección de fibronectina por inmunoblot.

b). ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA-SDS EN UNA DIMENSION.

Se realizaron por el método de Laemli (59) como se describió por Hames y Rickwood (45).

Para ello, se sobremontaron las placas de vidrio (bien lavadas), colocando entre ellas 3 separadores de 0.75 mm de grosor, sujetando con pinzas. Se sellaron los bordes externos de los separadores con las placas de vidrio con agarosa al 2% calentada en un baño María.

Se preparó la mezcla del gel separador, acorde a la concentración de acrilamida deseada (7.5% o 10%), mezclando las siguientes soluciones:

	CONCENTRACION DEL GEL	
	7.5%	10%
Solución de acrilamida -		
bis-acrilamida (30:08).....	2.5 ml	3.33 ml
Amortiguador para el gel separador....	1.25 ml	1.25 ml
SDS al 10%.....	0.1 ml	0.1 ml
Persulfato de amonio al 5%.....	0.5 ml	0.5 ml
Agua destilada.....	5.65 ml	4.82 ml

Se desgasificó por un minuto con una bomba de vacío, se agregaron 5 µl de TEMED, se agitó y la mezcla se vació entre las placas de vidrio colocados en posición vertical.

Se dejaron 3.5 cm en el extremo de las placas y se colocó con una jeringa, en la superficie del gel, el amortiguador empleado para hacerlo, después de que el gel polimerizó, se retiró la capa de amortiguador.

Se preparó el gel concentrador al 3.7% mezclando los siguientes reactivos:

Solución de acrilamida-bis-acrilamida (30:08).....0.6250 ml

Amortiguador del gel concentrador.....1.25 ml
SDS al 10%.....50 μ l
Persulfato de amonio al 1.5%.....0.25 ml
Agua destilada.....2.82 ml

Se desgasificó con una bomba de vacío y se le agregaron 5 μ l de TEMED.

Se lavó la superficie del gel separador con el gel concentrador, se terminó de llenar el espacio entre las placas de vidrio con gel concentrador y se insertó la peineta, evitando dejar burbujas de aire.

Se dejó polimerizar, se retiró la peineta, se lavaron las pozas con amortiguador de reservorio y se llenaron con el.

Se removió el separador de la base y se colocó el gel junto con las placas de vidrio en la cámara de electroforesis.

Se agregó el amortiguador de reservorio al recipiente inferior de la cámara y se removieron las burbujas del gel.

Se llenó el recipiente superior con el mismo amortiguador. Se cargaron las muestras en las pozas usando una microjeringa Hamilton.

Se conectaron los electrodos, el ánodo al recipiente inferior y el cátodo al reservorio superior, se corrió la electroforesis a voltaje constante, aplicando 125 V durante 15 min mientras las proteínas atraviezan al gel concentrador, posteriormente se elevó el voltaje a 200 V.

c). ELECTROTRANSFERENCIA DE PROTEINAS A PAPEL DE NITROCELULOSA E INMUNODETECCION DE FIBRONECTINA.

Para detectar si una de las bandas de proteínas séricas separadas en el gel de poliacrilamida corresponde a fibronectina, las proteínas del gel fueron transferidas a papel de nitrocelulosa y la reacción de la banda correspondiente a fibronectina con el anticuerpo contra ella fue visualizada por la técnica de inmunoblot acorde a Towbin (1979), como se detalla a continuación.

Los geles a transferir se equilibraron en el amortiguador de

transferencia (Trisma-base 25 mM, glicina 192 mM, 20% metanol) durante 30 minutos, éste amortiguador fue previamente enfriado a 4°C por un período de 24 horas.

Se hizo un sandwich en el siguiente orden; fibra Scotch-Brite, varias capas papel filtro Watman de No. 1, papel de nitrocelulosa, gel, varias capas de papel filtro y fibra de Scotch-Brite. Se insertó éste sistema dentro de la cámara de electrotransferencia, colocando el gel hacia el cátodo y el papel de nitrocelulosa hacia el ánodo, después se, adicionó el amortiguador de transferencia. La electrotransferencia se llevó a cabo a 35 V durante toda la noche.

Posteriormente se removió el papel de nitrocelulosa y se tiñó con rosa de Ponceau al 0.2% en agua destilada. Después de observar que la transferencia fue buena, se lavó con PBS-Tritón X-100 al 0.1% para eliminar el colorante y se llevó a cabo la inmunodetección de fibronectina, como sigue:

El papel de nitrocelulosa recién transferido, se colocó en un recipiente con 15 ml de una solución de BSA al 3% en amortiguador PBS Tritón X-100 (1%), se incubó a 37°C con agitación, durante 1 h. Después la membrana se incubó en 10 ml de una solución de albúmina sérica bovina al 1% en PBS Tritón X-100 (1%), conteniendo el anticuerpo (anti-fibronectina) en una dilución de 1:2000, durante 3 horas. El exceso de anticuerpo se lavó con amortiguador PBS Tritón X-100 durante 30 min, realizando 3 cambios del amortiguador y se incubó durante 1 horas en 10 ml de BSA al 1% en amortiguador PBS tritón X-100 (1 %), conteniendo el segundo anticuerpo (anti-γ globulina de conejo, obtenido de cabra, conjugado con la peroxidasa (HyClone) en una dilución 1:5000.

Se hicieron tres lavados con amortiguador de PBS tritón X-100 (1%), tres con PBS (0.15 M) y tres con amortiguador de fosfatos 50 mM pH 7.4. Posteriormente se reveló la actividad de peroxidasa empleando como sustratos H_2O_2 y 3, 3' diaminobencidina (DAB), intensificando la reacción con NiCl y CoCl de la siguiente manera; el papel de nitrocelulosa, se incubó en una solución de DAB 5 mg/ml, NiCl 1 mg/ml y CoCl 1 mg/ml en amortiguador de fosfatos 50

mM pH 7.4 durante 10 minutos. Posteriormente se incubó otros 10 minutos en la misma solución a la que se agregó H_2O_2 al 1%, se lavó en agua destilada y se secó para su observación.

3). DETECCION DE FIBRONECTINA EN LA SUPERFICIE DE CULTIVO EXPUESTA A SUERO POR TINCION INMUNOQUIMICA.

Cajas de cultivo de plástico Falcon (3001) de 35 mm, se expusieron a gotas de 20 μ l de las siguientes soluciones de proteínas: suero de bovino fetal al 10 % en cNCTC-135, fibronectina 50 μ g/ml, laminina 100 μ g/ml y BSA al 4%, las tres últimas se disolvieron en PBS 0.15 M pH 7.4, se incubaron durante 4 h a 37°C, en una atmósfera húmeda con 5% de CO_2 ; las gotas estaban cubiertas con aceite mineral. Posteriormente la superficie se lavó cinco veces durante 10 minutos con PBS 0.15 M pH 7.4 y se procedió después a la detección de fibronectina acorde al siguiente procedimiento.

Las superficies expuestas se fijaron con formaldehído al 1.5% en PBS durante 30 min, se lavaron tres veces con PBS por 5 min. Posteriormente se incubaron 15 min con NH_4Cl 50 mM diluido en PBS, y se hicieron tres lavados con PBS de 5 min cada uno.

Se incubó con el anticuerpo anti-fibronectina diluido 1:2000 en PBS conteniendo albúmina al 3 % durante 1 h a 37°C, se hicieron tres lavados con PBS de 10 min cada uno. Se llevó a cabo la incubación con el anticuerpo de cabra contra γ -globulina de conejo marcado con peroxidasa (HyClone) diluido 1:5000 en PBS-albúmina al 3 %. Se lavó con tres cambios de PBS de 10 min cada uno y dos en una solución amortiguadora de fosfatos 50 mM pH 7.4.

Las muestras fueron incubadas en una solución que contenía diaminobencidina (DAB) 5 mg/ml, $NiCl$ 1 mg/ml, $CoCl$ 1 mg/ml en amortiguador de fosfatos 50 mM pH 7.4. Durante 10 min.

Posteriormente se incubaron 15 min en la misma solución, pero conteniendo H_2O_2 a una concentración de 1%.

Se lavó 4 veces con el amortiguador de fosfatos 50 mM a pH 7.4 por 5 min cada uno y se llevó a cabo su observación. Se realizaron controles en los que se omitió el primer anticuerpo.

4). PRODUCCION Y CULTIVO DE EMBRIONES

a). Preparación de los animales:

Se utilizaron ratones hembras vírgenes de la cepa CD1 de 2-3 meses de edad, a las que se les indujo a superovular por medio de la inyección intraperitoneal de 5 UI de gonadotropina de suero de yegua preñada (PMSG), y después de un período de 45 horas, la administración de 5 UI de gonadotropina coriónica humana (hCG). Posteriormente se hizo el apareamiento con machos fértiles, de la misma cepa, haciendo la revisión del tapón vaginal al día siguiente, la presencia de éste indicó primer día de preñez.

b). Obtención y cultivo de embriones.

La colección de blastocitos se llevó a cabo al 4o. día de preñez, entre las 12 y 14 horas, para ello se hizo el lavado de los cuernos uterinos con medio de Biggers sin albúmina (8). Los embriones fueron cultivados bajo aceite mineral en gotas de 20 μ l de medio de Biggers suplementado con albúmina (4 mg/ml) y antibióticos (penicilina G 100 U, estreptomycin 100 μ g/ml y kanamicina 100 μ g/ml) durante un período de 17 h (9). Posteriormente los blastocistos se transfirieron en grupos de 10 a diferentes medios y condiciones de cultivo:

a) Medio cNCTC 135 (Sigma) suplementado con suero de bovino fetal al 10% (inactivado con calor) y antibióticos (penicilina G 100 U, estreptomycin 100 μ g/ml y kanamicina 100 μ g/ml) (90).

b) Medio cNCTC-135 sin suero, suplementado con BSA al 0.4% sobre una superficie que fue expuesta por 4 horas a suero de bovino fetal al 10% en cNCTC-135 y lavada previamente con cinco cambios de PBS.

c) Medio cNCTC sin suero, suplementado con BSA al 0.4% sobre una superficie que fue expuesta a fibronectina 50 μ g/ml en PBS por 4 horas y lavada previamente con PBS.

En todos los casos se cultivaron 10 blastocistos en gotas de

20 μ l de medio bajo aceite mineral (Sigma) en cajas de cultivo de plástico Falcon (3001) de 35 mm. Se incubaron a 37°C en una atmósfera humidificada y con 5% de CO₂, 95% de aire, en una incubadora de CO₂ de flujo continuo NARCO.

5). CINETICA DEL CULTIVO Y EVALUACION DEL CRECIMIENTO TROFOBLASTICO.

Los cultivos fueron observados cada 24 horas durante un periodo de 4 días, a través de un microscopio invertido con contraste de fase Karl Zeiss para establecer la proporción de blastocistos con ruptura de la zona pelúcida, que se han adherido y extendido sobre el sustrato ó que conservan la cavidad del blastocele (37, 41).

A las 96 horas de incubación se tomaron fotografías con un microscopio invertido a través de una cámara Contax RTS, para posteriormente evaluar el área de extensión de los embriones implantados. Siempre se empleo un objetivo de 25X, un ocular de 10X, y un aumento de la foto 4X.

6). EVALUACION CUANTITATIVA DEL AREA DE EXTENSION.

Se evaluó el área de extensión en forma cuantitativa usando las fotografías de los implantes tomadas a las 96 horas de cultivo, utilizando una plantilla de doble cuadrícula: cuadros grandes de 1.2 X 1.2 cm y cuadros chicos de 0.3 X 0.3 cm = 9 mm².

La plantilla se sobrepuso a la fotografía y se contó el número de puntos localizados en el centro de cada unidad de área de muestreo (9 mm²) que quedaban incluidas dentro del crecimiento trofoblástico. De ello se estimó el área ocupada por el trofoblasto en la fotografía (A_F).

Para la obtención del área de extensión se empleo la siguiente fórmula (Doggenweiler, 1990):

$$A_T = A_F/a^2$$

Donde: A_T = área de extensión del trofoblasto en el cultivo.

A_F = área de extensión del trofoblasto en la fotografía.

a^2 = cuadrado del número de aumentos.

7).EFECTO DEL ANTICUERPO ANTI-FIBRONECTINA SOBRE LA CINETICA DEL CULTIVO Y EL AREA DE EXTENSION DEL TROFOBLASTO.

Para evaluar el efecto del anticuerpo anti-fibronectina se manejaron dos grupos uno control y otro problema, en el grupo problema se agregó anticuerpo (anti-fibronectina) en diferentes diluciones 1:1000, 1:500, 1:250, 1:125 si se expresan como la concentración de la proteína equivalen a 0.0044, 0.0088, 0.0176, 0.0352 mg/ml respectivamente) en medio cNCTC-135 suplementado con suero de bovino fetal al 10% (inactivado por calor) y con antibióticos (penicilina G 100 U, estreptomycin 100 µg/ml y kanamicina 100 µg/ml). El grupo control se hizo con el solvente del anticuerpo TRIS 1M-Glicerol 1:1 diluido 1:125 en medio cNCTC-135 suplementado con suero de bovino fetal y antibióticos.

Se colocaron gotas de 20 µl de los medios control y problema en cajas de cultivo de plástico Falcon (3001) de 35 mm. bajo aceite mineral (Sigma) en ellas se cultivaron los blastocistos cultivados previamente por 17 h en medio de Biggers-BSA, posteriormente se transfirieron a las diferentes condiciones en grupos de 10 durante un periodo de 79 horas a 37°C. Se siguió la cinética de los cultivos durante los 4 días de incubación como se indicó. Evaluando los porcentajes de blastocistos adheridos y extendidos, con ruptura de la zona pelúcida, y con cavidad blastocélica. Se tomaron fotografías a las 96 horas de

incubación, para hacer una valoración cuantitativa de las áreas de extensión del trofoblasto. Las fotografías siempre se tomaron empleando objetivos de 25 X y un ocular de 10 X con una cámara Contax RTS adaptada al microscopio. Se procedió a evaluar el área de extensión de los implantes siguiendo la metodología mencionada para este objetivo.

8). TINCION INMUNOQUIMICA PARA FIBRONECTINA DE LOS BLASTOCISTOS CULTIVADOS

Después de los 4 días de cultivo los embriones cultivados en medio cNCTC-135 suero con diversas diluciones del anticuerpo se procesaron para la detección inmunohistoquímica de fibronectina.

La tinción se realizó sobre la superficie de cultivo, en gotas, bajo aceite mineral, los embriones se lavaron 3 veces durante 10 minutos con PBS 0.15 M pH 7.4. Se fijaron con formaldehído al 1.5% en PBS durante 30 minutos, se lavó tres veces con la PBS por 5 minutos. Posteriormente se incubó 15 minutos con NH_4Cl 50 mM diluido en PBS, para apagar los aldehídos presentes, lavando tres veces con PBS durante de 5 minutos cada uno.

Se llevó a cabo la permeabilización de las muestras con metanol a -4°C durante 15 minutos, inmediatamente se lavó con amortiguador de fosfatos 50 mM pH 7.4, realizando cambios de 5 minutos.

La incubación con el primer y segundo anticuerpo y la detección de la actividad de peroxidasa se realizó como se describió para la detección de fibronectina en la superficie de cultivo. Por otra parte también se inactivó la peroxidasa endógena.

Una vez concluida la tinción, se removió el aceite mineral y los tejidos fueron lavados extensivamente con PBS, las bases de las cajas de cultivo fueron cortadas con una navaja de bisturí

calentada a la flama y sobre los tejidos se monto un cubreobjetos con PBS-glicerol 1:1, sellando los bordes con esmalte transparente de uñas.

Se tiñeron simultáneamente controles en que se omitió al anticuerpo contra fibronectina.

Los tejidos fueron observados y fotografiados en un fotomicroscopio Zeiss FOMIT III.

9). ANALISIS ESTADISTICOS.

Por lo general los resultados se analizaron por la prueba de análisis de varianza (ANOVA) de un factor, seguida por la prueba de comparaciones multiples de Scheffe (17), los datos de porcentaje fueron convertidos previamente a su arcoseno.

En relación a las cinéticas de los cultivos en presencia de distintas concentraciones del anticuerpo anti-fibronectina, se llevó a cabo el análisis de varianza (ANOVA) de dos factores, seguida por la prueba de comparaciones multiples de Scheffe. Aquí se tomaron como factores, el tiempo de cultivo y la concentración de anticuerpo.

Se empleó el análisis de t de Student para muestras independientes para comparar las áreas de extensión de los blastocistos a las 96 horas de cultivo en cNCTC-suero con los cultivados sobre la cubierta dejada por el suero.

V. RESULTADOS

OBTENCION Y PURIFICACION DE FIBRONECTINA.

Para determinar la pureza de la fibronectina obtenida se llevó a cabo el corrimiento en geles de poliacrilamida-SDS en una dimensión al 7.5 %, en la figura 2 se presenta el patrón electroforético de la muestra de fibronectina purificada.

Se observa únicamente una doble banda con peso molecular de 220 KDa, peso correspondiente a las unidades monoméricas de la fibronectina. Prácticamente no se observan otras bandas por lo que la proteína que obtuvimos tiene un buen grado de pureza.

Se comprobó que era fibroectina por la técnica de inmunoblot.

PREPARACION Y PURIFICACION DE ANTICUERPOS ANTI-FIBRONECTINA.

Se obtuvo un suero anti-fibronectina en conejo. Para purificar al anticuerpo, el suero libre de material particulado se paso a través de una columna de afinidad de sefarosa 4B-fibronectina.

Se obtuvo una concentración de proteínas de 4.4 mg/ml en la solución obtenida de anticuerpos.

Los anticuerpos anti-fibronectina aislados reaccionaron con fibronectina, por la prueba de ELISA. La dilución de anticuerpo, que indico el titulo de éste fue de 1:5000 donde la absorbencia fue de 1.

DETECCION DE FIBRONECTINA EN EL SUERO DE BOVINO FETAL.

En el suero se encontró una concentración de proteínas de 40.88 mg/ml.

Se realizó el corrimiento electroforético de las proteínas del SBF en geles de poliacrilamida-SDS al 7.5% en una dimensión, cargando de 25-100 µg de proteína por carril, simultáneamente se llevó a cabo el corrimiento de proteínas preteñidas de peso molecular conocido y de una muestra de fibronectina comercial, en

este caso se cargó 1 µg de muestra. En el patrón electroforético del SBF se encontraron diversas bandas de proteínas (figura 5, carril C), siendo la más notable la correspondiente a la albúmina con un peso molecular cercano a 66 KDa, también se presenta una banda con peso molecular semejante a la fibronectina comercial de 220 KDa. La fibronectina comercial empleada presenta cierto grado de degradación, ocurrido durante su transporte, por lo que presenta varias bandas, todas cercanas a 220 KDa, la de PM más alto puede corresponder a la fibronectina sin degradar.

Para determinar con exactitud la presencia de fibronectina en el suero de bovino fetal, se llevó a cabo la detección de fibronectina por western-immunoblot. Las proteínas séricas separadas en el gel de acrilamida fueron transferidas a papel de nitro celulosa, una vez realizada la transferencia se llevó a cabo la inmunotinción para la detección de fibronectina. Para lo cual se empleo el anticuerpo anti-fibronectina, previamente aislado por nosotros, agregando posteriormente un segundo anticuerpo (anti-γ-globulina de conejo) conjugado con peroxidasa, revelando la actividad de la peroxidasa con H₂O₂, diaminobencidina, NiCl y CoCl.

De las proteínas séricas sólo la banda correspondiente a un peso molecular de 220 KDa dió una tinción positiva (figura 5 carril E).

Se demostró así la presencia de fibronectina en el suero de bovino fetal. Por otra parte se comprobó la especificidad de nuestro anticuerpo contra fibronectina ya que no reconoció otra banda de proteína presente en el suero.

DETECCION DE FIBRONECTINA EN LA SUPERFICIE DE CULTIVO EXPUESTA A SUERO.

Para analizar si la fibronectina del suero se deposita en la superficie de cultivo, se expusieron las cajas de cultivo a medio cNCTC-135-SBF al 10%, albúmina sérica de bovino al 0.4 %, fibronectina 50 µg/ml y laminina 50 µg/ml durante 4 horas a 37°C,

lavando posteriormente con cNCTC-135-BSA y realizando la inmunotinción para fibronectina, utilizando el anticuerpo contra fibronectina en una dilución 1:2000 y como segundo anticuerpo el anticuerpo de cabra anti- γ -globulina de conejo marcado con peroxidasa (1:5000). Se hicieron grupos control en todos los casos omitiendo el primer anticuerpo.

La reacción de detección para fibronectina fue positiva en la superficie expuesta a suero de bovino fetal al 10 % en cNCTC-135 (figura 6), lo cual demuestra que la incubación por 4 horas es suficiente para que la fibronectina que esta presente en el medio de cultivo empleado, se pueda depositar en la superficie de cultivo, esta reacción fue también positiva, en la superficie expuesta a fibronectina (tabla 2) y negativa cuando la caja de cultivo se expuso a laminina y albúmina séria de bovino al 0.4% (tabla 2) ó en todos los casos cuando se omitió al primer anticuerpo (figura 6, tabla 2).

CONDICIONES OPTIMAS DEL CULTIVO DE BLASTOCISTOS.

En vista de que al cultivar blastocistos obtenidos de ratonas de la cepa CD1 al cuarto día de preñez directamente en el medio cNCTC-135 conteniendo suero, ni el 50% de ellos alcanzan a romper la zona pelúcida, adherirse y extenderse. Para mejorar la eficiencia de los cultivos decidimos probar cultivarlos previamente por 17 h en un medio más simple, utilizado para el cultivo de embriones preimplantacionales (medio de Biggers suplementado con BSA 4 mg/ml). Antes de transferirlos a un medio rico en aminoácidos y otros nutrientes con suero (cNCTC-135-suero) ó sobre la cubierta de suero.

Cuando se lleva a cabo el cultivo previo por 17 h en medio más simple se mejora la adhesión y extensión del trofoblasto así como liberación de la zona pelúcida, cuando los blastocistos se cultivan después en cNCTC-135-suero ó sobre la cubierta dejada por el suero (figura 9, tabla 3).

Estadísticamente sé observa que hay diferencias significativas con una $P \leq 0.01$ entre estas condiciones de cultivo figura 9.

DESARROLLO DE LOS BLASTOCISTOS EN CULTIVO.

En 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 nutriente (CNCTC-135) con la adición de SBF al 10%, en otros casos el suero fue sustituido por BSA y una cubierta de fibronectina ó el depósito dejado por el suero en la superficie de cultivo.

En términos generales, los blastocistos durante los primeros 2 días de cultivo se expanden, rompen la zona pelúcida haciendole una pequeña muesca y se liberan de ella (figura 7).

Posteriormente, entre el segundo y tercer día de cultivo los blastocistos se adhieren al sustrato (figura 8a) y permanecen pegados a la superficie, cuando se agita la caja de cultivo ó se les aplica una corriente de medio de cultivo. Durante este proceso en la mayoría de los blastocistos la cavidad del blastocéle tiende a colapsarse (figura 8a). Del segundo al cuarto día de cultivo, las células del trofoblasto mural se extienden sobre el sustrato formando una monocapa de células, no refringentes y con núcleos prominentes (células gigantes del trofoblasto). La masa celular interna permanece en su superficie externa, en muchas ocasiones esta unida al crecimiento trofoblástico por un grupo de células pequeñas y redondeadas correspondientes al trofoblasto polar, ha esta estructura se ha homologado con el cono ectoplacentario (figura 8b).

Sólo en pocos casos observamos la diferenciación de la masa celular interna en epiblasto e hipoblasto.

EVOLUCION DEL CULTIVO DE BLASTOCISTOS SOBRE LA CUBIERTA SERICA.

Con el fin de comprobar si la cubierta sérica era capaz de sostener la adhesión y extensión del trofoblasto después de las 17 horas de cultivo en medio de Biggers-BSA, los blastocistos fueron transferidos a diferentes condiciones de cultivo en grupos de 10 como se indicó en materiales y métodos.

En el medio cNCTC-135 con suero, a las 24 horas de cultivo el 20% de los blastocistos se presentaba sin zona pelúcida (figura 10 C) y a las 48 horas el 30% de ellos ya están adheridos y extendidos, logrando a las 96 horas un porcentaje total de blastocistos implantados de $94.44 \pm 1.6 \%$.

La evolución del cultivo sobre la cubierta de suero y de fibronectina es similar. A las 48 horas los blastocistos se han implantado en un 30% sobre la cubierta de fibronectina (figura 10) y en un 20% sobre la cubierta de suero (figura 10), logrando a las 96 horas un porcentaje total de blastocistos implantados de $96.62 \pm 0.05 \%$ en el segundo caso y de $92.22 \pm 2.7 \%$ en el primer caso.

Esto se aprecia mejor cuando se compara el tiempo en que el 50% de los blastocistos se han adherido, extendido, perdido la cavidad blastocélica ó han roto la zona pelúcida, referido como T_{50} (tabla 4) así la T_{50} para la adhesión en cNCTC-135-suero fue de 57.6 ± 1.0 h; sobre la cubierta de suero de 58.2 ± 0.7 h y sobre la cubierta de fibronectina de 54.4 ± 2.2 h.

Comparando las T_{50} para estas tres condiciones de cultivo por análisis de varianza (ANOVA) de un factor, seguida por la prueba de comparaciones múltiples de Sheffe, podemos apreciar que el T_{50} de adhesión, extensión y de ruptura de la zona pelúcida fueron significativamente menores en los cultivos sobre la cubierta de fibronectina respecto a las otras dos condiciones de cultivo ($P \leq 0.05$) (tabla 4). Sin encontrar diferencias entre los cultivos con suero y aquellos sobre la cubierta sérica ($P > 0.05$).

Con respecto a la pérdida de la cavidad blastocélica, no hay

diferencias significativas en las tres condiciones ($P > 0.05$).

Cuando se compara la frecuencia máxima de implantación observamos diferencias significativas entre los cultivos sobre la cubierta de fibronectina con respecto a los de cubierta de suero ($P \leq 0.05$). Pero entre cNCTC-135 suero y la cubierta de suero la frecuencia máxima de implantación es similar (tabla 4).

EVALUACION CUANTITATIVA DE LAS AREAS DE EXTENSION

A las 96 horas de cultivo de los blastocistos sobre la cubierta de suero y el cNCTC-135 suero, se evaluó el área de extensión del trofoblasto de los blastocistos implantados.

En el análisis estadístico de *t* de Student revela que no hay diferencias significativas entre ambas condiciones ($P > 0.05$), por lo que el grado de extensión del trofoblasto en estas condiciones es igual (figura 11).

Con lo anterior se demuestra que la cubierta sérica en la superficie de cultivo es capaz de sostener la adhesión y extensión del trofoblasto, de manera similar al suero.

EFEECTO DEL ANTICUERPO ANTI-FIBRONECTINA SOBRE LA IMPLANTACION *in vitro* EN MEDIO cNCTC-135.

Para estudiar la participación de la fibronectina en el desarrollo *in vitro* de los blastocistos de ratón de la cepa CDI, se realizaron cultivos en medio cNCTC-135 suero al que se le agregaron cantidades crecientes de anticuerpo contra fibronectina, lo anterior después de un periodo inicial de cultivo por 17 h en medio de Biggers-BSA. En ellos se estudio la cinética del cultivo y se evaluó a las 96 h el área de extensión del trofoblasto, como se indicó en materiales y métodos.

El anticuerpo tuvo un efecto sobre el desarrollo de los blastocistos en cultivo, el cual fue más pronunciado a las concentraciones más altas de anticuerpo empleadas.

Después de 96 h de cultivo en el grupo control la mayoría de los blastocistos se han adherido y el trofoblasto se ha extendido formando una capa de células gigantes (figura 12 a), a las concentraciones más altas de anticuerpo muchos blastocistos no rompen la zona pelúcida, otros se adhieren sin extenderse (figura 12 b), en otros la extensión es más reducida (figura 12 c y d) ó la cavidad del blastocele se conserva, incluso expandida, aún cuando las células del trofoblasto se extiendan (figura 12 b, c y d).

Se detectó que hay un efecto del anticuerpo sobre la cinética de los cultivos que es dependiente de la dosis.

En el grupo control (sin anticuerpo), el porcentaje total de blastocistos que se libera de la zona pelúcida es del 90.19%, el 98% de ellos ha perdido la cavidad blastocélica y el 89.21% se han adherido y extendido después de 96 h de cultivo (figura 13). Mientras que cuando se agrega el anticuerpo a diferentes concentraciones (0.0044, 0.0088, 0.0176, 0.0353 mg/ml) la proporción de embriones que se adhieren va disminuyendo conforme aumenta la dosis. Siendo del 51.72% en la concentración más alta de anticuerpo (0.0353 mg/ml), mientras que sólo el 29.88% se extienden y solamente el 52.87% se ha liberado de la zona pelúcida. Es de señalar que a la concentración más alta de anticuerpo un mayor porcentaje de los blastocistos mantienen la cavidad blastocélica (52.87%) (figura 13), mientras que en el grupo control se observa que a las 96 horas el 98% de ellos ha perdido la cavidad blastocélica.

A la concentración más baja de anticuerpo 0.0044 mg/ml, el cultivo presenta un comportamiento similar al control con respecto a la pérdida de la zona pelúcida, ya que su T_{50} se alcanza a las 51.6 ± 2.9 horas (tabla 6) y a las 96 horas el 94.2% de los blastocistos cultivados ha perdido la cavidad blastocélica. En relación a la adhesión y extensión hay un aumento en el tiempo para que el 50 % de los blastocistos se implante, para la adhesión es de 10 horas más y para la extensión de 20 horas más , ya que hasta las 82.6 ± 1.8 horas el 50% de los blastocistos se han extendido (tabla 6).

Estadísticamente el análisis de varianza (ANOVA) de dos factores (concentración de anticuerpo y tiempo), indica que hay un efecto significativo del anticuerpo con un $P \leq 0.01$. El porcentaje de blastocistos que se adhieren, extienden y rompen la zona pelúcida es menor, a medida que aumenta la concentración de anticuerpo (tabla 5) (figura 13). Demostrándose que hay un efecto del anticuerpo sobre la ruptura de la zona pelúcida, la adhesión y extensión de los blastocistos, estos parámetros son inhibidos en forma dependiente a la concentración de anticuerpo.

Con respecto a la cavidad blastocélica, se observa un efecto inverso, ya que a medida que aumenta la concentración de anticuerpo se mantiene ésta por más tiempo, y muchos de los blastocistos a la concentración más alta de anticuerpo, a las 96 horas de cultivo, la siguen manteniendo (figura 12). Habiendo diferencias significativas a las concentraciones de anticuerpo de 0.0088, 0.0176, 0.0352 mg/ml con respecto al control con una $P \leq 0.01$, y en relación a la concentración de anticuerpo 0.0044 mg/ml no hay diferencias significativas con respecto al control ($P > 0.05$).

EFECTO DEL ANTICUERPO CONTRA FIBRONECTINA SOBRE EL AREA DE EXTENSION DEL TROFOBlasto

Comparando el área de extensión del trofoblasto de los blastocistos del grupo control con el área de los cultivados con anticuerpo a las concentraciones de 0.0176 y 0.0352 mg/ml, a las 96 horas de cultivo, se encontró que hay diferencias significativas del control con respecto a la concentración más alta de anticuerpo (0.0352 mg/ml) con una $P \leq 0.01$ (figura 14). Demostrándose que a la concentración de anticuerpo 0.0352 mg/ml se reduce el área de extensión del trofoblasto.

En relación a la concentración de anticuerpo 0.0176 mg/ml, con respecto al control no se observan diferencias significativas ($P > 0.05$). El área de extensión media de los blastocistos en estas condiciones es similar. Sin embargo la dispersión de los

datos es más alta, habiendo una mayor heterogeneidad de los datos.

TINCIÓN INMUNOQUÍMICA DE LOS BLASTOCISTOS IMPLANTADOS EN LAS
DIFERENTES CONDICIONES DE CULTIVO.

Para determinar la presencia de fibronectina en los blastocistos cultivados en cNCTC-135-suero y con anticuerpo se llevo a cabo la tinción inmunoquímica a las 96 horas de cultivo.

En los cultivos en cNCTC-135-suero no detectamos fibronectina en los embriones (figura 15) mientras que en presencia de anticuerpo la tinción fue positiva, localizandose la fibronectina en forma de fibras gruesas en la masa celular interna ó rodeando al cono ectoplacentario. Cuando se mantiene la cavidad del blastocele la fibronectina se dispone bajo el trofoblasto, rodeando esta cavidad (figura 15).

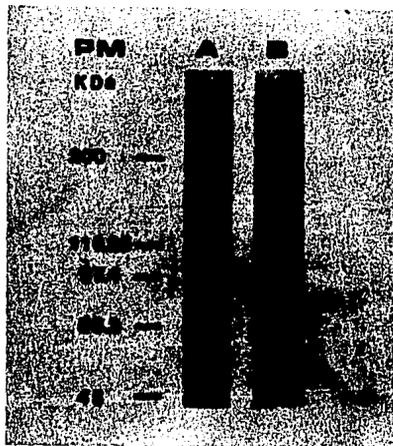


Figura 4.- Electroferograma de la fibronectina purificada de suero de cobayo. La fibronectina de suero de cobayo purificado por cromatografía de afinidad en una columna de gelatina-sefarosa 4B de 3 ml, fue analizada por electroforesis en geles de PAGE-SDS al 7.5% en una dimensión. En el carril (B) se presenta una doble banda con peso molecular de 220 000 daltones que correspondería a las subunidades de fibronectina. En el carril (A) se presenta un estándar de proteínas de peso molecular (PM) conocido: miosina (200 KDa), β -galactosidasa (116.25 KDa), fosforilasa B (97.4 KDa), albúmina de suero de bovino (66.2 KDa) y ovoalbúmina (45 KDa).

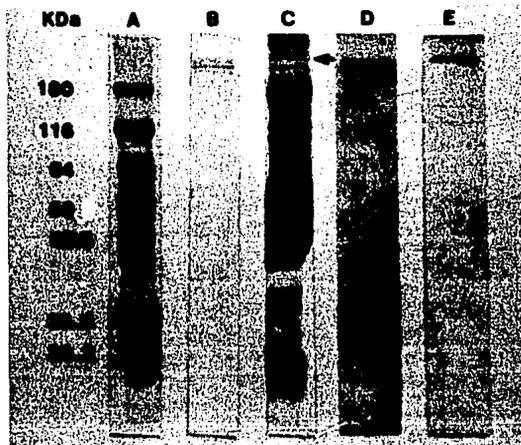


Figura 5.- Demostración de la presencia de fibronectina en el suero fetal de bovino. Por la separación electroforética en geles unidimensionales de poliacrilamida-SDS al 7.5 % de las proteínas del suero de bovino fetal carril (C), donde se aprecia una banda (flecha) de proteína con peso molecular similar a la fibronectina comercial carril (B). En el carril (A) se observa el corrimiento de proteínas estándares de PM conocido: α macroglobulina (180 KDa), β -galactosidasa (116 KDa), fructosa-6-fosfato cinasa (84 KDa), piruvato cinasa (58 KDa), fumarasa (48.5 KDa), deshidrogenasa lactica (36.5 KDa) y triosafosfato isomerasa (26.6 KDa).

Después de la transferencia de las proteínas de los geles a papel de nitrocelulosa, se tiñeron inmuniquímicamente para fibronectina del suero de bovino fetal carril (E); fibronectina comercial carril (D). Se detecta en el suero una banda que se tiñe para fibronectina.

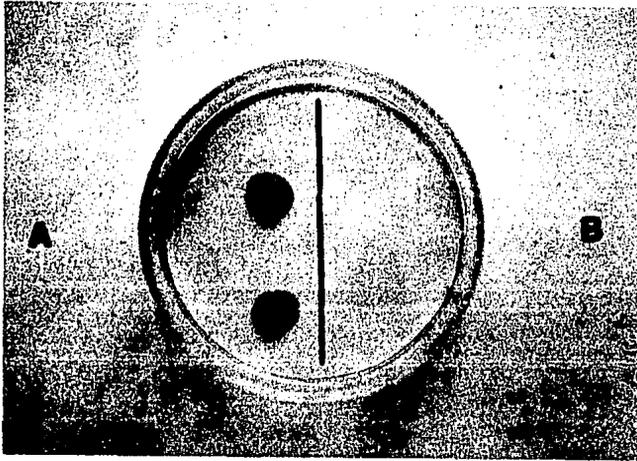


Figura 6.- Inmunotinción para fibronectina en una superficie expuesta a suero. Se expusieron pequeñas áreas de la superficie de cultivo a suero fetal de bovino al 10% en medio cNCTC-135 durante 4 horas a 37°C. Se lavaron con PBS varias veces y se hizo la tinción inmunquímica. En (A) la reacción fue positiva (suero de bovino fetal), en (B) se omitió el primer anticuerpo contra fibronectina como control, siendo la reacción negativa.

TABLA 2

**DETECCION DE FIBRONECTINA EN LA SUPERFICIE DE CULTIVO EXPUESTA
A DISTINTAS PROTEINAS**

EXPOSICION A:	TINCION PARA FIBRONECTINA *
FIBRONECTINA 50 μ g/ml	+
CNCTC-135-SDF AL 10 %	+
LAMININA 50 μ g/ml	-
ALBUMINA SERICA DE BOVINO AL 0.4%	-

La superficie de cultivo fue expuesta a gotas de 20 μ l del medio de cultivo ó soluciones de las distintas proteínas por 4 h a 37°C. Después fueron lavadas varias veces con PBS e inmunotizadas para fibronectina. En todos los casos la reacción fue negativa cuando se omitió al anticuerpo - contra fibronectina.

Figura 7.- Desarrollo in vitro de blastocistos de ratón: ruptura y liberación de la zona pelúcida. Blastocistos obtenidos de ratonas de la cepa CD1 al cuarto día de preñez, conservan aún la zona pelúcida (a) después del primer día de cultivo muchos la han roto (b) y se liberan de ella entre el primero y segundo día de cultivo (c).

B. blastocele; M, masa celular interna; T, trofoblasto.
Microscopía de contraste de fases. Barra: 10 μ m.

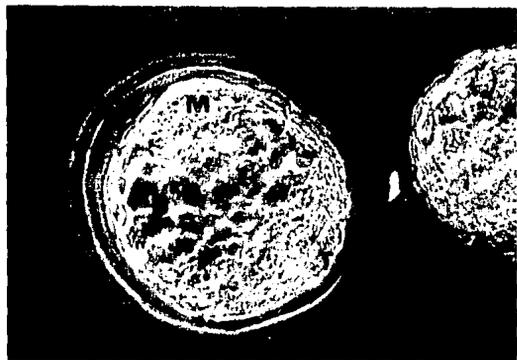
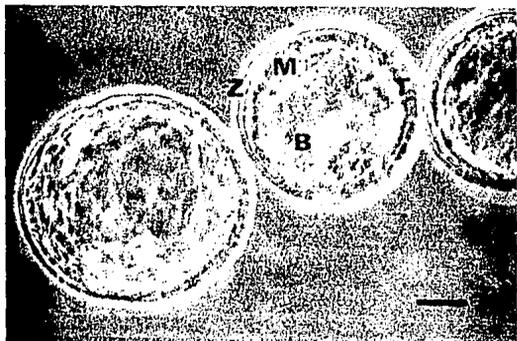


Figura B.- Desarrollo in vitro de blastocistos de ratón: adhesión y extensión sobre el sustrato. Blastocistos de ratón obtenidos al cuarto día de preñez y cultivados en medio cNCTC-135-suero, al segundo día de cultivo se han adherido al sustrato (a) y al cuarto día las células del trofoblasto se han extendido formando células gigantes con núcleo prominente. C, células del trofoblasto polar que han formado una estructura similar al cono ectoplacentario; M, masa celular interna; B, capa de células trofoblásticas gigantes. Microscopía de contraste de fases. Barra igual a 10 μ m.

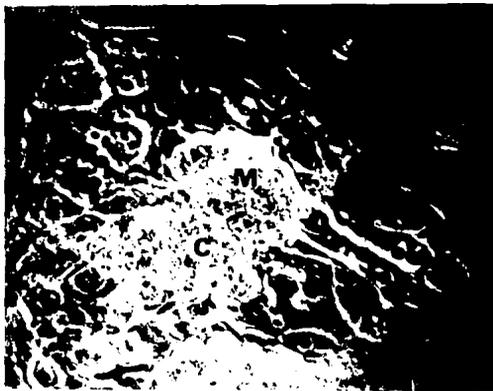
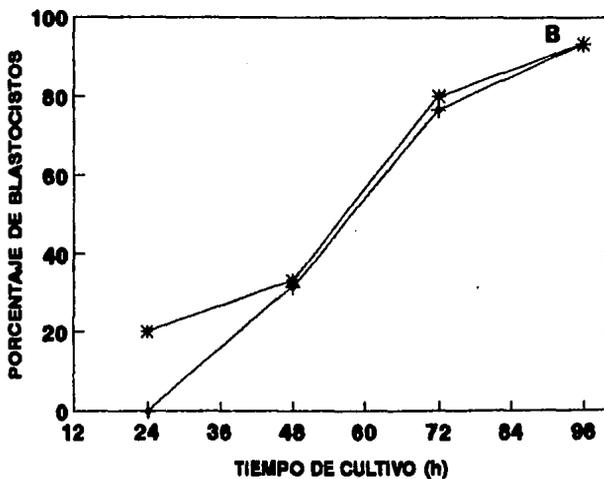
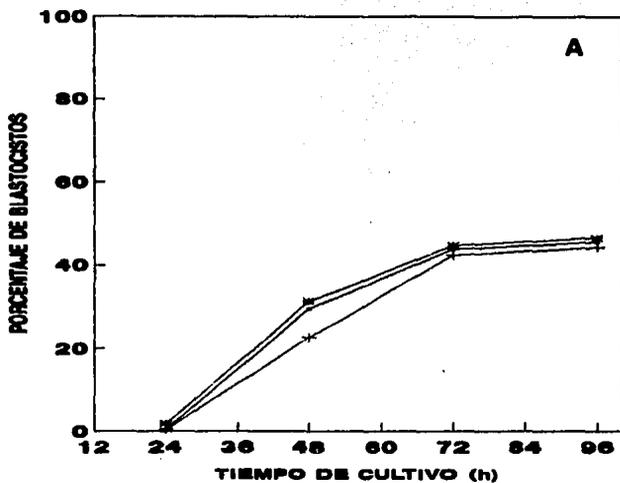


Figura 9.-Efecto de un período inicial de cultivo en medio de Biggers sobre la cinética del cultivo de blastocistos en cNCTC-135 suero. Blastocistos obtenidos al cuarto día de preñez de ratonas de la cepa CD1 fueron cultivados directamente en medio cNCTC-135-suero (A) ó después de el cultivo inicial por 17 h en medio de Biggers-BSA (B). Evaluando a distintos tiempos de cultivo el porcentaje de embriones con ruptura de la zona pelúcida, con adhesión y extensión al sustrato.

Se encontraron diferencias significativas ($P \leq 0.01$) en estas condiciones. La gráfica representa datos agrupados de 5 experimentos separados, realizados por duplicado con 10 embriones cada uno.



→ ADHERIDOS + EXTENDIDOS * SIN ZONA PELUCIDA

TABLA 3

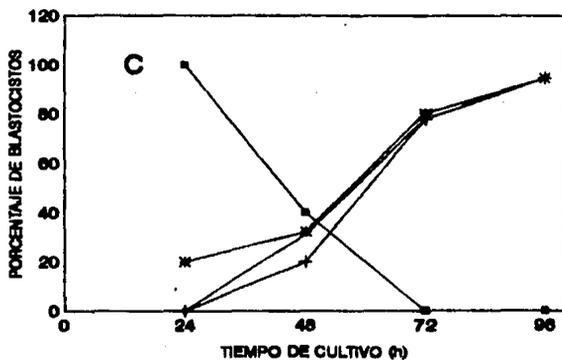
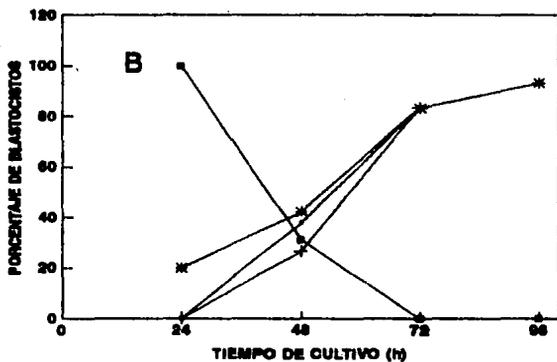
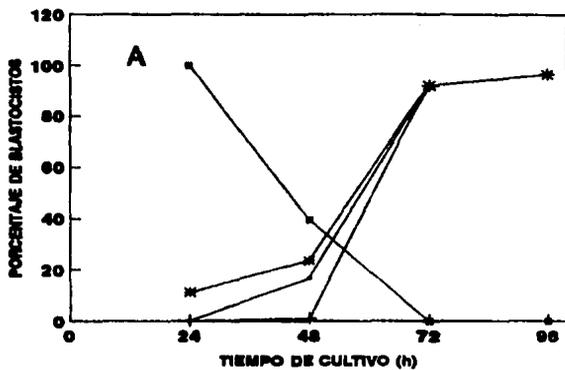
**EFEECTO DE UN PERIODO INICIAL DE CULTIVO EN MEDIO DE BIGGERS-BSA
SOBRE LA FRECUENCIA DE IMPLANTACION.**

CONDICION DEL CULTIVO	PORCENTAJE DE EMBRIONES IMPLANTADOS
cMCTC-135-SUERO	44.2 ± 1.2
BIGGERS-BSA cMCTC-135-SUERO	93.3 ± 0.9
cMCTC-135-BSA CUBIERTA DE SUERO	49.6 ± 0.7
BIGGERS-BSA cMCTC-135-BSA CUBIERTA DE SUERO	95.2 ± 1.5

En la tabla se compara el porcentaje de embriones implantados, obtenidos a las 96 h. de cultivo. Todos los blastocistos fueron de ratonas de la cepa C31. Observamos que hay diferencias significativas con una ($P \leq 0.01$), cuando se cultivan los embriones por 17 h en medio de Biggers-BSA, con respecto a los cultivados directamente en medio cMCTC-135 con suero ó sobre cubierta sérica. Se presenta la media y la desviación estándar de 5 experimentos realizados por duplicado cada uno con 10 embriones ($\bar{X} \pm D.E.$).

Figura 10.- Cinética del cultivo de blastocistos sobre la cubierta sérica, de fibronectina y con suero. Blastocistos obtenidos de ratonas de la cepa CD1 el día cuarto de preñez, fueron cultivados por 17 h en medio de Biggers-BSA y posteriormente en cNCTC-135-BSA sobre una cubierta sérica (A) ó de fibronectina (B); otros se cultivaron en cNCTC-135-suero (C).

Se evaluó a distintos tiempos porcentaje de blastocistos sin zona pelúcida, adheridos, extendidos ó con cavidad del blastocele. Se representan datos agrupados de 5 experimentos separados realizados por duplicado.



+ ADHERIDOS + EXTENDIDOS * SIN Z.P. ◆ CON CAV.

TABLA 4

TIEMPO Y FRECUENCIA DE IMPLANTACION DE BLASTOCISTOS CULTIVADOS SOBRE UNA CUBIERTA SERICA, DE FIBRONECTINA O CON SUERO.

CONDICION DE CULTIVO	T ₅₀ (HORAS)				PORCENTAJE DE EMBRIONES IMPLANTADOS
	PERDIDA DE ZONA PELUCIDA	ADHESION	EXTENSION	PERDIDA DE LA CAVIDAD	
cMTC-135 SUERO	a 57.3 ± 0.6	ab 57.6 ± 0.9	ab 60.6 ± 0.6	44.4 ± 1.95	ab 94.44 ± 1.5
PRECUBIERTA DE SUERO	a 57.6 ± 0.9	a 58.2 ± 0.6	a 61.5 ± 0.6	44.1 ± 3.7	a 96.62 ± 0.85
PRECUBIERTA DE FIBRONECTINA	b 52.8 ± 3.4	b 54.4 ± 2.2	b 58.2 ± 1.9	41.2 ± 1.2	b 92.22 ± 2.7

En la tabla se comparan los tiempos en que el 50% de los embriones cultivados (T₅₀), se liberan de la zona pelúcida, se adhieren, extienden ó pierden la cavidad del blastocelo, así como el porcentaje total de blastocistos implantados, después de 96 h. de cultivo. Todos los blastocistos fueron de ratonas de la cepa CD1, fueron cultivados por 17 h. en medio de Biggers-BSA y posteriormente en los medios indicados.

Se presenta la media y desviación estandar de 5 experimentos realizados por duplicado con 10 embriones cada uno ($\bar{x} \pm D.E.$).

Los grupos homogéneos de datos se indican con las distintas letras ($P \leq 0.05$).

Figura 11.- Efecto de la cubierta sérica sobre el área de extensión del trofoblasto. Blastocistos obtenidos de ratonas de la cepa CD1 al cuarto día de preñez se cultivaron por 17 h en medio de Biggers-BSA, después por otras 72 h en cNCTC-135-BSA sobre una cubierta sérica ó en cNCTC-135-suero. Se evaluó el área de extensión del trofoblasto como se indica en materiales y métodos. Las mediciones se realizaron en 3 experimentos separados, y con una N de 18 por cada condición experimental.

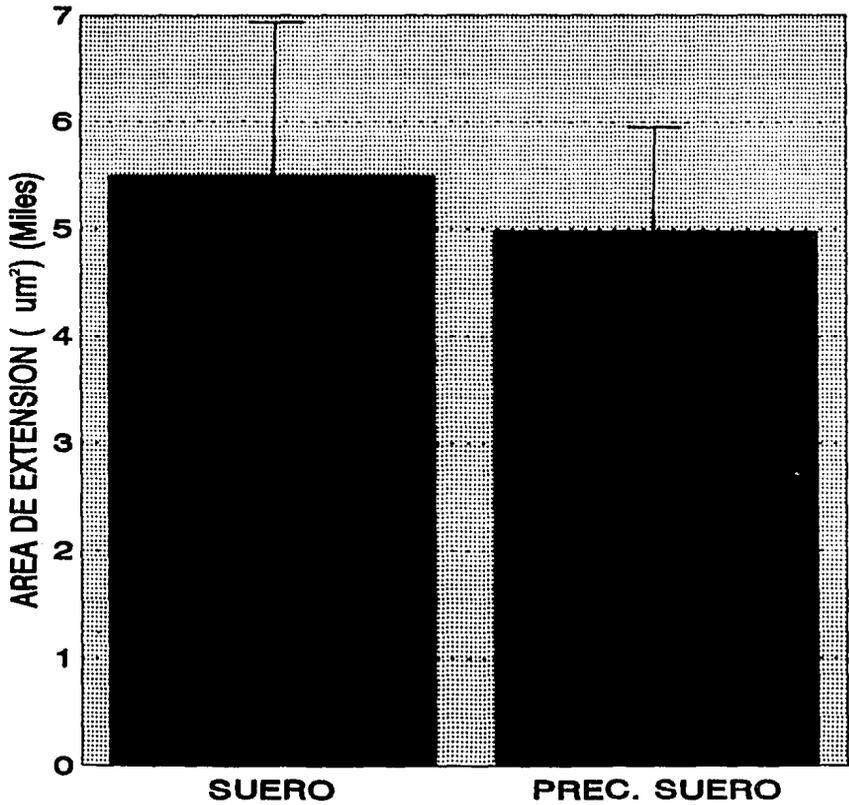
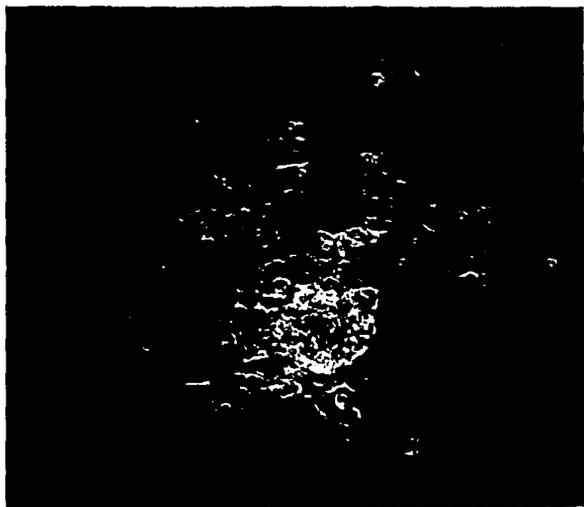


Figura 12.- Desarrollo in vitro de blastocistos de ratón: efecto del anticuerpo antifibronectina. Blastocistos de la cepa CD1, fueron cultivados por 17 h en medio de Biggers-BSA, posteriormente por 72 h más en medio cNCTC-135-suero expuesta a distintas concentraciones de anticuerpo contra fibronectina: 0.00 (a), 0.035 (b y c) y 0.0176 (d) mg/ml. M, masa celular interna; G, crecimiento trofoblástico; Z, zona pelúcida; B, blastocelo. Microscopía de contraste de fases. La barra indica 10 μ m.



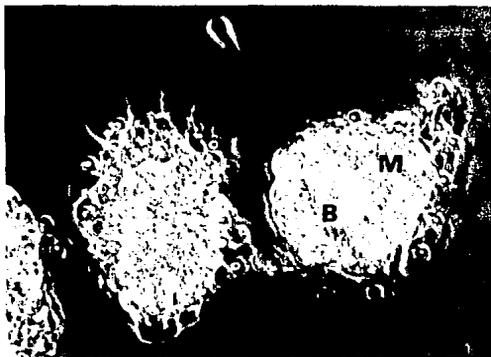
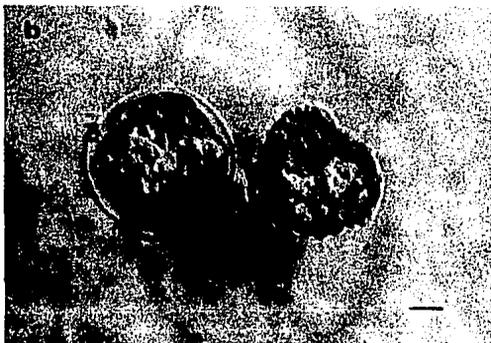
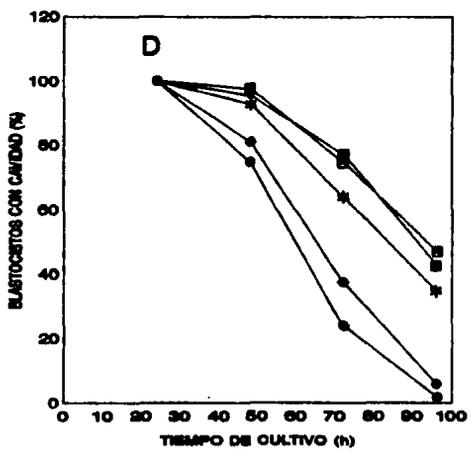
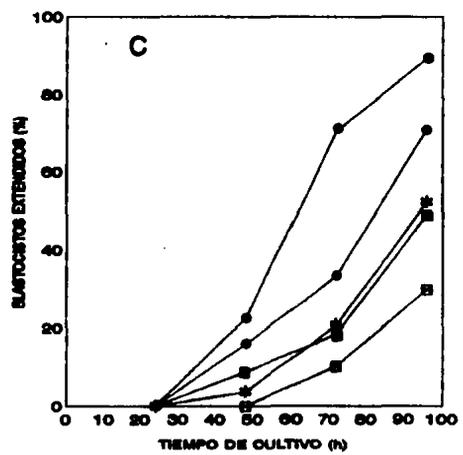
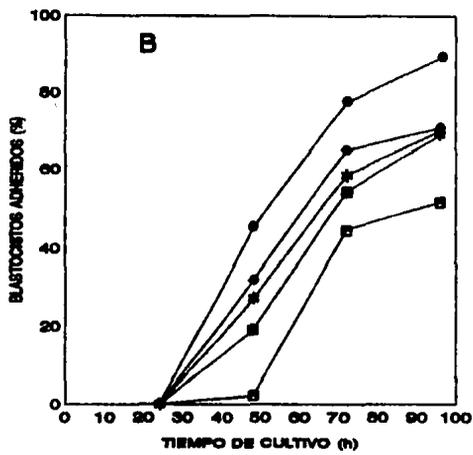
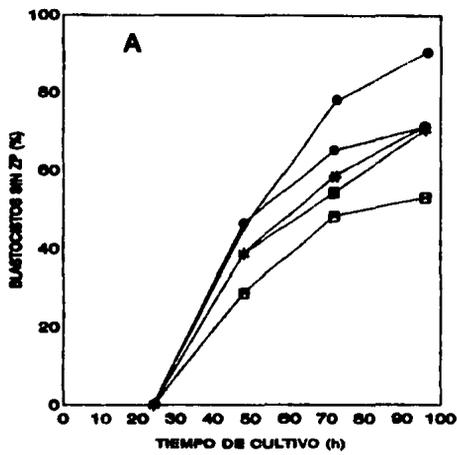


Figura 13.- Efecto del anticuerpo contra fibronectina sobre la cinética del cultivo. Blastocistos de la cepa CD1 obtenidos el cuarto día de preñez se cultivaron por 17 h en medio de Biggers-BSA, posteriormente en cNCTC-135-suero expuesto a diferentes diluciones de anticuerpos contra fibronectina: sin anticuerpo control 0.00, 1:1000, 1:500, 1:250, 1:125. A distintos tiempos de cultivo se evaluó el porcentaje de embriones sin zona pelúcida (A), adheridos (B), extendidos (C) ó con cavidad blastocélica (E). En las gráficas se presentan datos agrupados de 8 experimentos independientes, realizados por duplicado, cada uno con 10 blastocistos.

La prueba de ANOVA de dos factores indica que todos los parámetros estudiados fueron dependientes de la concentración de anticuerpo y el tiempo de cultivo ($P \leq 0.01$).



← CONTROL; ANTICUERPO: ← 1:1000 ← 1:500
 ← 1:250 ← 1:125

TABLA 5

EFECTO DEL ANTICUERPO ANTI-FIBRONECTINA SOBRE LA FRECUENCIA DE INPLANTACION.

CONCENTRACION DE ANTICUERPO ng/ml	PORCIENTO DE EMBRIONES			
	ADHERIDOS	EXTENDIDOS	SIN CAVIDAD	SIN ZONA PELUCIDA
0.00	90.7 ± 9.4 ^a	90.7 ± 9.4 ^a	90.3 ± 2.8 ^a	91.5 ± 8.0 ^a
0.0044	70.9 ± 5.5 ^b	70.9 ± 5.5 ^b	94.5 ± 6.5 ^a	70.9 ± 5.5 ^a
0.0088	69.0 ± 4.7 ^b	52.4 ± 4.3 ^{b,c}	63.7 ± 2.1 ^b	70.7 ± 5.8 ^b
0.0176	68.6 ± 7.9 ^b	40.3 ± 6.5 ^{b,c}	57.0 ± 4.6 ^b	69.4 ± 8.9 ^b
0.0352	50.9 ± 3.9 ^b	20.3 ± 8.7 ^c	53 ± 5.0 ^b	52.9 ± 2.8 ^b

Se compara el porcentaje de blastocistos que se adhieren, extienden, pierden la cavidad ó se han liberado de la zona pelúcida después de 96 h de cultivo. Blastocistos de ratonas de la cepa C31 fueron cultivados por 17 h en medio de Biggers-RSA y posteriormente en medio mNCTC-135-suero expuesto a distintas concentraciones de anticuerpo. Las letras distintas indican grupos de datos homogéneos a una $P \leq 0.01$. Se hicieron 8 experimentos independientes ($\bar{X} \pm D.E.$).

TABLA 6

EFECTO DEL ANTICUERPO ANTI-FIBRONECTINA SOBRE EL TIEMPO DE IMPLANTACION

CONCENTRACION DE ANTICUERPO ng/ml	T_{50} (Horas)			
	PERDIDA DE ZONA PELUCIDA	ADHESION	EXTENSION	PERDIDA DE LA CAVIDAD
0.00	51.4 ± 7.4	51.4 ± 7.4	62.0 ± 3.6	61.0 ± 8.8
0.0044	51.6 ± 2.9	61.1 ± 1.9 ^a	82.6 ± 1.8 ^b	65.2 ± 1.8
0.0088	62.0 ± 6.2 ^a	66.5 ± 4.8 ^a	93.4 ± 2.1 ^b	85.4 ± 7.2 ^b
0.0176	64.9 ± 6.2 ^a	69.4 ± 3.8 ^a	94.5 ± 1.9 ^b	91.6 ± 3.1 ^b
0.0352	76.2 ± 10.6 ^b	81.6 ± 10.3 ^b	✱	92.5 ± 3.3 ^b

Se comparan los tiempos en que el 50% de los embriones cultivados (T_{50}), se liberan de la zona pelúcida, se adhieren, extienden ó pierden la cavidad blastocélica, después de 96 horas de cultivo. Blastocistos de ratonas de la cepa CD1 fueron cultivados por 17 h. en medio de Biggers-BSA y posteriormente en medio mCTC-135-suero - expuesto a distintas concentraciones de anticuerpo. a y b indican diferencias estadísticamente significativas respecto al grupo control (sin anticuerpo) con una $P \leq 0.05$ y ≤ 0.01 respectivamente. Se hicieron 8 experimentos independientes.

✱ indica que no se alcanza la T_{50} de extensión durante el cultivo.

T_{50} de extensión durante el cultivo.

Figura 14.- Efecto del anticuerpo contra fibronectina sobre el área de extensión del trofoblasto. Blastocistos obtenidos de ratonas de la cepa CD1 al cuarto día de preñez fueron cultivados por 17 h en medio de Biggers-BSA y posteriormente por 72 h más en medio cNCTC-135-suero expuesto a distintas concentraciones de anticuerpo contra fibronectina: 0.00 (control), 0.0176 (dilución 1:250) y 0.035 (dilución 1:125) mg/ml. Al final del cultivo se evaluó el área de extensión del trofoblasto como se indicó en materiales y métodos. La mediciones se hicieron en 3 experimentos independientes con una N de 25, 17 y 12; siguiendo el mismo orden de las concentraciones de anticuerpo.

Las áreas de extensión a la dilución de anticuerpo 1:125 son diferentes significativamente a las del grupo control ($P \leq 0.01$).

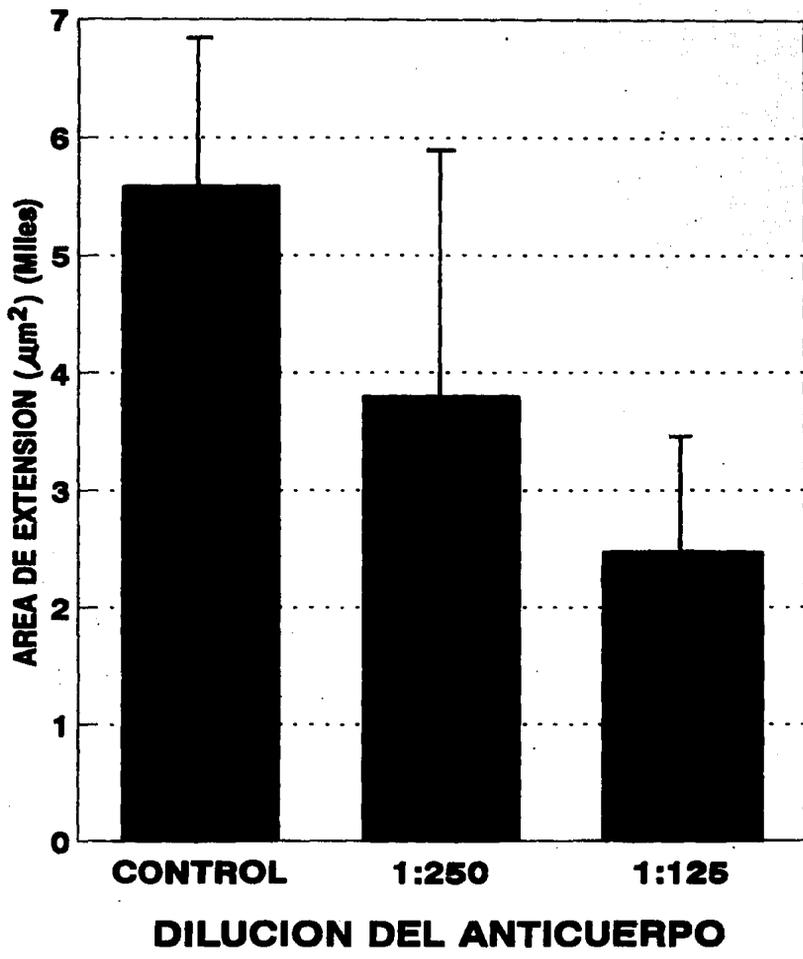
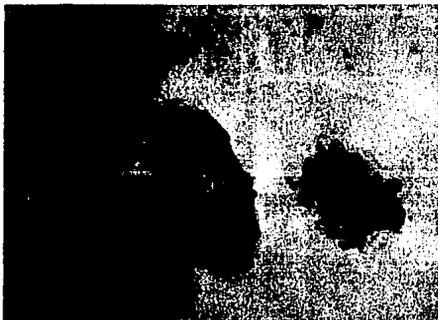
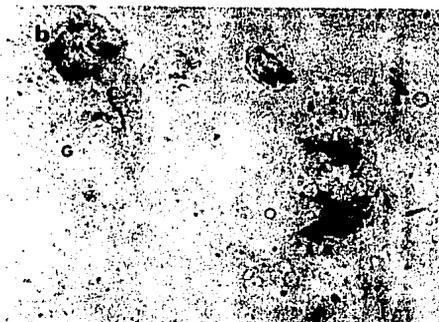


Figura 15.- Efecto del anticuerpo anti-fibronectina sobre la distribución histoquímica de fibronectina. Blastocistos de ratonas de la cepa CD1 obtenidos al cuarto día de preñez fueron cultivados por 17 h en medio de Biggers-BSA y posteriormente por 72 h en medio cNCTC-135 sin (a) ó con distintas concentraciones de anticuerpo contra fibronectina 0.0088 (b) y 0.035 (c) mg/ml, después se tiñeron para fibronectina como se indica en materiales y métodos.

En (a) no se observa tinción debido a la ausencia del anticuerpo contra fibronectina no se detecta ésta, en presencia de anticuerpo (b) esta se localiza en la masa celular interna, en (c) y (d) la fibronectina se localiza en la membrana trofotodermal, así como manchones en la masa celular interna.

M, masa celular interna; C, cono ectoplacentario; G, crecimiento trofoblástico; B, cavidad del blastocele. La barra indica 10 μ m.



VI. DISCUSION

Debido a que la implantación de los embriones de mamíferos es un proceso muy complejo in vivo e inaccesible para el control experimental se han establecido modelos para el estudio del desarrollo del blastocisto in vitro.

Sin embargo, el estudio in vitro adolece de algunos defectos propios de este tipo de técnicas. El principal es que se pierde la interacción con una estructura tridimensional, como ocurre en el útero, por lo que el blastocisto interactúa más bien con una superficie plana bidimensional, lo que a su vez conduce a un cambio en la arquitectura propia del embrión en desarrollo, perdiendo éste su forma esférica y aplanándose sobre la superficie de cultivo. Quizá en parte a esto ó a la falta de factores maternos, in vitro por lo general la masa celular interna casi no se desarrolla y predomina el desarrollo del trofoblasto.

Blastocistos de ratón cultivados en un medio apropiado que contiene suero adquieren propiedades análogas a las que se observan durante el período peri-implantacional en el útero (54, 94). Entre estas esta la habilidad de los blastocistos de liberarse de la zona pelúcida y la adquisición de una superficie adhesiva y propiedades invasivas y migratorias de las células trofoblásticas.

Sin embargo se ha establecido que la liberación de la zona pelúcida, adhesión y crecimiento, no es necesaria para la expresión de algunos marcadores de diferenciación por los blastocistos cultivados (6, 87, 88), dentro de estos marcadores se encuentran, el activador del plasminógeno y la β glucoronidasa. Sin embargo el trofoblasto durante su desarrollo interactúa con proteínas de matriz extracelular y es posible que estas lo influyan.

Se ha determinado que proteínas de matriz extracelular (fibronectina, laminina, colágena tipo IV) promueven y favorecen la adhesión y extensión de blastocistos de ratón in vitro (4, 95).

Se piensa que dentro de los factores que regulan el metabolismo embrionario, así como la adhesión y diferenciación del trofoblasto se encuentran secreciones uterinas y del trofoblasto

(19, 32, 44) y algunos factores séricos, en base a ésto se llevó a cabo esta investigación para estudiar a la fibronectina como un factor sérico que favorece la adhesión y extensión de blastocistos cultivados in vitro.

DETECCION DE FIBRONECTINA EN EL SUERO DE BOVINO FETAL.

Hay pocos estudios de los componentes del suero que favorecen la adhesión y extensión del trofoblasto in vitro, Tachi, C. en 1992 hizo una caracterización parcial de los factores séricos y encontró que una fracción de peso molecular (PM) entre 30 y 100 KDa es capaz de inducir el inicio de la extensión del trofoblasto y otra fracción mayor a 100 KDa induce una mayor extensión y el desarrollo de la masa celular interna. Por estos antecedentes nosotros llevamos acabo la detección de fibronectina en el suero de bovino fetal.

Determinamos el contenido total de proteínas presentes en el suero, por el método de Lowry (60). Encontramos una concentración de 40.88 mg/ml.

La detección de fibronectina en el suero se logro a través de un corrimiento electroforético unidimensional en geles de poliacrilamida-SDS al 7.5%, presentandose en el suero una banda proteica con peso molecular similar a la fibronectina comercial usada como control (figura 5).

Posteriormente, comprobamos por la técnica de inmunoblot e inmunotinción que ésta banda de proteína corresponde a fibronectina.

Anteriormente se había establecido que la fibronectina es un componente del suero de diversas especies, y le llamaron "globulina insoluble en frío" (41, 106).

DETECCION DE FIBRONECTINA EN LA SUPERFICIE DE CULTIVO EXPUESTA AL SUERO.

Se detectó la presencia de fibronectina en una superficie de

cultivo expuesta a suero de bovino fetal al 10% (SFB), demostrándose que la fibronectina se deposita en las cajas de cultivo cuando se exponen al suero.

En otras células en cultivo como las células de riñón de criceto recién nacido la adhesión y extensión requieren la presencia de componentes del suero que se absorben a la superficie del sustrato, así como iones de Ca^{++} en el medio.

La adhesión celular a un sustrato ocurre por diversos mecanismos tanto en ausencia como en presencia de suero. Se ha postulado que las diferencias dependen de la adsorción de proteínas del suero a la superficie de cultivo en el cual las células empiezan adherirse a las proteínas del suero adsorbidas (12, 13, 14).

Se ha demostrado que la adsorción de los componentes del suero ocurren muy rápidamente en segundos (19), se adsorben a la superficie como una capa de moléculas (20) y forman un mosaico heterogéneo de proteínas adsorbidas.

También se ha demostrado la adsorción de fibronectina del plasma humano (40) a superficies hidrofóbicas e hidrofílicas, la unión de la fibronectina es mayor en superficies hidrofóbicas que hidrofílicas. Por otra parte la adsorción a la superficie de la fibronectina presente en el suero depende de la concentración de suero, ya que a bajas concentraciones de suero (0.01%) el depósito de fibronectina que se forma es mayor y a medida que aumenta la concentración (10%) la adsorción de la fibronectina es menor, lo cual puede deberse a que otros componentes del suero compiten por los sitios de adsorción de la fibronectina.

El suero de bovino fetal a una concentración del 10% deja una cubierta que contiene fibronectina en la superficie de cultivo expuesta a él. Nuestra detección fue específica ya que la reacción es negativa cuando se omite al primer anticuerpo contra fibronectina, ó cuando la superficie de cultivo se expone a otras proteínas como la albúmina ó la laminina (tabla 2, figura 6).

La metodología empleada por Grinnell y Feld para demostrar el depósito de fibronectina sobre la superficie de cultivo, se basa

en el mismo principio que la nuestra, es decir, en la captación por la fibronectina adsorbida de un anticuerpo contra ella, lo que ellos evalúan empleando un segundo anticuerpo radiomarcado y midiendo la radioactividad, después de unida a la superficie después de removerla con tripsina 1 mg/ml y NaOH 1 M.

El método que nosotros utilizamos, es más cualitativo, aunque puede adaptarse para propósitos cuantitativos y no emplea radioactividad, sino un segundo anticuerpo marcado con peroxidasa, lo que nos permitió detectar a la fibronectina directamente sobre la superficie de cultivo. No encontramos que este procedimiento se haya empleado con el mismo fin, consideramos que es un método sencillo para identificar a las proteínas que se adsorban en la superficie de cultivo, provenientes del suero ó de las secreciones de las células cultivadas.

CULTIVO PREVIO DE EMBRIONES.

Se demostró que el cultivo previo en medio de Biggers favorece el rompimiento de la zona pelúcida y la implantación sobre la cubierta sérica ó en presencia de suero (figura 9), ya que cuando esto no se realiza el porcentaje de blastocistos adheridos y extendidos no alcanza el 50% (figura 9).

Se ha dicho que la maduración de los blastocistos parece ser necesaria para que se de la implantación in vivo (Mintz, 1971). Similarmente in vitro la adhesión y extensión de los blastocistos son dependientes de la maduración temporal de su superficie externa y la adquisición de la capacidad de romper la zona pelúcida (93, 104). Por lo que creemos que el cultivo previo en medio de Bigger favorece la maduración de nuestros blastocistos que les permite romper la zona pelúcida en mayor proporción lograndose un porcentaje de implantación mayor, cuando son transferidos en los medios de cultivo utilizados (cNCTC-135-suero y precubierto de suero) (figura 9)

Cuando cultivamos los blastocistos directamente en cNCTC-135-suero observamos que el grado de madurez que presentan

es bajo, ya que sólo el $44.2 \pm 1.2 \%$ se adhieren y extienden y no llegan a alcanzar el T_{50} ruptura de la zona pelúcida, después de 96 h de cultivo (tabla 3). Por tanto los blastocistos de la cepa CD1 requieren de un período inicial de cultivo en un medio menos rico en nutrientes, sin suero (Biggers-BSA); a fin de que, al ser transferidos al medio con suero, la mayoría pueda implantarse (tabla 3, figura 9).

Otros autores han utilizado, también este período inicial de cultivo para sincronizar los blastocistos y mejorar la eficiencia de cultivo (9). Es posible que la exposición prematura de los blastocistos a los componentes del suero evite que completen su maduración. Nieder (1990) propone que la mejor maduración de los blastocistos depende, más bien, de su exposición por más tiempo a un contaminante de la fracción V de la albúmina sérica de bovino, sin embargo cuando cultivamos blastocistos de la cepa CD1 recién obtenidos en medio cNCTC-135-BSA, sobre la cubierta sérica, la proporción de embriones que se implanta, también es baja y aumenta cuando se cultivan primero en el medio de Biggers-BSA (tabla 3, figura 9). Por lo que reforzamos nuestra idea de que la exposición prematura a un medio rico en aminoácidos y otros nutrientes evite la maduración de los blastocistos.

EVOLUCION DEL CULTIVO SOBRE LA CUBIERTA SERICA.

Muchos sistemas de cultivo de blastocistos requieren la adición de suero ó de fracciones del suero para que ocurra la adhesión y extensión del trofoblasto, se ha sugerido que estan implicados componentes macromoleculares del suero, aún no conocidos.

Si la cubierta sérica es capaz de sostener la implantación in vitro entonces uno o varios de los componentes del suero que la forman corresponden a los factores involucrados en éste proceso.

Se demostró que el depósito dejado por el suero sobre la superficie de cultivo, conserva la actividad biológica de favorecer la adhesión y extensión del trofoblasto, en forma

similar al suero; ya que la proporción de embriones que se adhieren y extienden, el tiempo en que lo hacen y el área de extensión del trofoblasto después de cuatro días de cultivo, no presentan diferencias significativas entre los cultivos sobre la cubierta de suero, la cubierta de fibronectina y con suero (tabla 4 figura 10).

Como la fibronectina es uno de los constituyentes del depósito dejado por el suero y esta proteína purificada es capaz de sostener la implantación in vitro es por tanto factible que esta proteína sea uno de los factores séricos implicados, aunque otros componentes de este depósito podrían también participar.

Por otra parte se ha determinado que proteínas de matriz extracelular (fibronectina, laminina, colágena tipo IV), promueven y favorecen la adhesión y extensión de blastocistos de ratón in vitro (4, 95). Asimismo, el blastocisto expresa receptores para proteínas de matriz extracelular en su superficie celular.

En otras células como fibroblastos humanos, células de coriocarcinoma se ha observado la producción activa de moléculas de matriz extracelular como laminina y fibronectina, igual que en el trofoblasto. Lo que indica que la fibronectina celular producida por los blastocistos favorece también la adhesión y extensión y algunos factores séricos podrían actuar estimulando la liberación de fibronectina del trofoblasto.

EFEECTO DEL ANTICUERPO ANTI-FIBRONECTINA SOBRE EL CULTIVO DE BLASTOCISTOS.

Se realizaron cultivos en presencia de diferentes concentraciones de anticuerpos anti-fibronectina (0.0044, 0.0088, 0.0176 y 0.0352 mg/ml) en el medio de cultivo cNCTC-135 suplementado con el suero de bovino fetal al 10% y antibióticos.

Hay un efecto del anticuerpo a medida que aumenta su concentración, sobre la cinética de los cultivos, ya que el grado de adhesión se ve disminuído, alcanzando sólo un 51.72 % en la concentración más alta de anticuerpo figura (13) y solamente el

29.88 % del total de blastocistos cultivados se han extendido, mientras que en otros está totalmente inhibida (figura 14). Se observó también una disminución de los blastocistos que han roto la zona pelúcida (52.67 %). Sin embargo se ve un efecto inverso con respecto a la cavidad blastocélica ya que un 52.87% de los blastocistos la siguen manteniendo, no se sabe cual es el significado fisiológico ó la importancia de la perdida ó presencia de la cavidad blastocélica de los blastocistos que se desarrollan in vitro.

Por lo que concluimos que hay un efecto de la dosis de anticuerpo sobre la adhesión y extensión de los blastocistos (tabla 5), ya que se inhiben los parámetros cinéticos evaluados al estar presente el anticuerpo anti-fibronectina.

A una dilución de anticuerpo de 1:1000, 1:500 todos los blastocistos que rompen la zona pelúcida se adhieren y extienden lo cual nos indica que no fue bloqueada totalmente la fibronectina. Por otra parte, puede implicar que se libere fibronectina celular por los blastocistos durante su implantación. Por lo tanto el anticuerpo puede estar actuando, también sobre fibronectina producida por el blastocisto.

Estos resultados refuerzan la idea de que la fibronectina puede ser uno de los factores séricos que favorecen la extensión del trofoblasto. Además sugiere una importante participación de la fibronectina en el desarrollo peri-implantacional.

Nosotros consideramos que la fibronectina es uno de los factores séricos, aunque no el único, que sostiene la extensión del blastocisto in vitro; ya que como señalamos anteriormente, esta contenida en el SBF y el depósito dejado por el mismo sobre la superficie de cultivo, es capaz de sostener la adhesión y extensión del trofoblasto con la misma eficiencia con que lo hace el suero ó una cubierta de fibronectina. Por otra parte los anticuerpos contra fibronectina inhiben en alta proporción la extensión, pero no la adhesión a la superficie de blastocistos que han roto la zona pelúcida, en presencia de suero, por lo que consideramos que en la adhesión, intervengan otros factores

séricos.

Tachi presenta evidencias de otro u otros factores séricos de peso molecular menor de 100 KDa. Por otra parte se conoce que en el suero hay otra proteína que también es constituyente de la matriz extracelular, la vitronectina (58) la que en forma purificada sostiene la adhesión y extensión del trofoblasto in vitro (5). Sin embargo el peso molecular de ésta es de 140 KDa y no corresponde con lo encontrado por Armant y col (3, 4) de que la mayor actividad promotora del crecimiento trofoblástico, se encuentra en una fracción cercana a 250 KDa, lo que corresponde más a la fibronectina.

La participación de la fibronectina también podría ser la de unir otras moléculas, como factores de crecimiento y de esta manera facilitar su acción sobre el blastocisto y no solamente de proporcionar un sustrato a la extensión.

Encontramos por primera vez que los anticuerpos contra fibronectina inhiben la ruptura de la zona pelúcida, misma que es inhibida aún cuando los blastocistos ya tenían un día de cultivo en medio Biggers-BSA, antes de exponerlos al anticuerpo lo que favorece su ruptura. No sabemos como participe la fibronectina en la liberación de la zona pelúcida, pero pueden haber varias posibilidades para ello, por una parte al interactuar con el trofoblasto podría favorecer la liberación de una proteasa que intervenga en la ruptura de la zona pelúcida ó por proporcionar una matriz externa y por tanto puntos de anclaje al trofoblasto, facilitaría ondas de contracción y expansión, observadas en el blastocisto en esta etapa, que podrían contribuir a la ruptura de la zona pelúcida (73).

La conservación de la cavidad blastocélica de los blastocistos en presencia de anticuerpo, aún implantados, tal vez se deba, en parte a que la interacción del trofoblasto con la superficie de cultivo sea menos fuerte, sin embargo en los blastocistos que no rompen la zona pelúcida y que se cultivaron en suero sin el anticuerpo la cavidad también se pierde, lo que no ocurre en presencia de anticuerpo contra fibronectina.

Esto nos indica que la participación de la fibronectina es clave en el desarrollo pre y post-implantacional en mamíferos.

DISTRIBUCION INMUNOQUIMICA DE LA FIBRONECTINA EN LOS EMBRIONES IMPLANTADOS EN PRESENCIA DE ANTICUERPO CONTRA FIBRONECTINA

En cultivo en medio cNCTC-135-suero, no se presenta fibronectina en los embriones implantados (figura 15), ya que la tinción inmunquímica para fibronectina en los blastocistos cultivados bajo esta condición fue negativa, mientras que en presencia de anticuerpo la de tinción fue positiva.

Lo que indica que la presencia de anticuerpo modifica también la localización histoquímica de fibronectina, a concentraciones altas de anticuerpo (0.0176 y 0.0352 mg/ml) se presentan fibras gruesas abajo del trofoblasto y rodeando la cavidad del blastocelo, ésta distribución es similar a la que presentan los blastocistos antes de adherirse, pero mucho más intensa (figuras 15), también ésta distribución se observa *in vivo*, en donde se forma la membrana de Reichert, debajo del trofoblasto. A concentraciones bajas de anticuerpo (0.088 mg/ml) la fibronectina se localiza como fibras alrededor del cono ectoplacentario y en la masa celular (figura 15).

Es posible que la fibronectina desempeñe una función importante en la organización tridimensional del blastocisto en desarrollo, ya que a concentraciones bajas de anticuerpo el trofoblasto mural se extiende pero los derivados de la masa celular interna y del trofoblasto polar (cono ectoplacentario) permanecen más organizados que en el cultivo sin anticuerpo.

En los cultivos en el medio cNCTC-135-suero, la fibronectina podría ser producida por los blastocistos y liberada al medio sin almacenarse por lo que no se detecta fibronectina en los implantes cultivados en esta condición. Mientras que en presencia de anticuerpo esta fibronectina tal vez se este almacenando ó su

secreción sea dirigida a la parte basal del trofoblasto por lo que origina una membrana basal.

Otros estudios han confirmado la presencia de fibronectina en los blastocistos de rata cultivados en un medio libre de suero, Carnegie, J. 1991, estableciendo que la distribución de ésta proteína esta asociada a la membrana trofoectodermal en los blastocistos preadheridos y que después de 48-96 horas de cultivo sobre laminina , el citoplasma de las células trofoblásticas gigantes contienen fibronectina organizada como una malla granular.

En el ratón la fibronectina esta presente en la parte interna del trofocotodermo de blastocistos pre-implantados, (102, 108) y se ha sugerido que proporciona un sustrato para la migración de las células del endodermo cuando estas forman un forro a la cavidad del blastocele..

En otros estudios hemos encontrado que la distribución de fibronectina durante la implantación in vitro es modulada por la composición del sustrato. Cuando se cultiva sobre fibronectina se localiza como una malla citoplasmica y se concentra en los bordes y prolongaciones de las células gigantes del trofoblasto, esta distribución es diferente a la observada en cultivos con suero ó sobre la cubierta sérica, en la que como señalamos, no se detecta fibronectina histoquímicamente en los blastocistos implantados. Esto indica que el suero ó en la cubierta sérica hay otros factores además de la fibronectina que influyen sobre el trofoblasto.

VII. CONCLUSIONES

- 1). Se detectó una banda con peso molecular de 220 KDa en el suero de bovino fetal por electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS al 7.5% que correspondió a la subunidad monomérica de la fibronectina, lo que se confirmó por inmunotransferencia e inmunotinción.
- 2). La exposición de la superficie de cultivo a suero fetal de bovino al 10% por cuatro horas deja una cubierta que contiene fibronectina, detectable por inmunotinción.
- 3). Se demostró que el cultivo previo de los blastocistos en medio de Biggers por 17 horas, favorece su maduración, permitiendo que un mayor porcentaje de ellos se liberen de la zona pelúcida, se adhieran y extiendan al ser transferidos a un medio de cultivo que permite la implantación.
- 4). Los blastocistos cultivados en cNCTC-135-BSA al 0.4% sobre la cubierta dejada por el suero se adhieren y extienden en una proporción similar a aquellos cultivados en presencia de suero fetal de bovino (SFB) al 10% ó sobre una cubierta de fibronectina.
- 5). El área de extensión de los blastocistos cultivados en medio cNCTC-135-suero es igual a la de los cultivados sobre la cubierta de suero, después de 96 horas de cultivo.
- 6). La presencia de un anticuerpo contra fibronectina

inhibe la ruptura de la zona pelúcida y la extensión del trofoblasto, además de retardar la desaparición de la cavidad del blastocele. El efecto del anticuerpo sobre la cinética de los cultivos fue dependiente de la dosis empleada.

Por lo que es posible que la fibronectina sérica ó la producida por el blastocisto, desempeñen una función importante en la ruptura de la zona pelúcida, en la extensión del trofoblasto y en la organización tridimensional del conceptus in vivo e in vitro.

- 7). La concentración más alta del anticuerpo antifibronectina empleada reduce notablemente el área de extensión de los blastocistos en cultivo con respecto al cultivo en cNCTC-135-suero.
- 8). La distribución de fibronectina en los blastocistos implantados depende de las condiciones de cultivo. Demostrándose que la presencia de anticuerpos contra fibronectina modifica la localización histoquímica de esta, ya que ha concentraciones altas del anticuerpo se presenta en forma de fibras gruesas abajo del trofoblasto y rodeando la cavidad del blastocele y a bajas concentraciones se localiza alrededor del cono ectoplacentario y en la masa celular interna. En cultivos en presencia de suero la fibronectina no se detecta inmunohistoquímicamente.
- 9). La fibronectina posiblemente sea uno de los factores séricos que contribuyen a la adhesión y extensión del trofoblasto in vitro.

VIII. BIBLIOGRAFIA

- 1.- Anderson, L., Olson, E., Hoffman, H. (1986): Stage-specific alterations in the apical membrane glycoproteins of endometrial epithelial cells related to implantation in rabbits. *Biol. Reprod.* 34:701-720.
- 2.- Ansell, J., Snow, M. (1975): The development of trophoblast in vitro from blastocysts containing varying amounts of inner cell mass. *J. Embryol. Exp. Morph.* 33:177-185.
- 3.- Armant, D.R. (1991): Cell interactions with laminina and its proteolytic fragments during outgrowth of mouse primary trophoblast cells. *Biol. Reprod.* 45:664-672.
- 4.- Armant, D. R., Kaplan, H. A., Lennarz, W. J. (1986a): Fibronectin and laminin promote *in vitro* attachment and outgrowth of mouse blastocysts. *Devel. Biol.* 116:519-523.
- 5.- Armant, D.R., Kaplan, H. A., Mover, W., Lennarz, W. J. (1986b): The effect of hexapeptides on attachment and outgrowth of mouse blastocysts cultures in vitro: evidence for the involvement of the cell recognition tripeptide Arg-Gly-Asp. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 83:6751-6755.
- 6.- Barlow, P., Sherman, M. (1972): The biochemistry of differentiation of mouse trophoblast: studies on polyploidy. *J. Embryol. Exp. Morph.* 27:447-465.
- 7- Bevilacqua, E., Abrahamsohn, A. (1988): Ultrastructure of trophoblast giant cell transformation during the invasive stage of implantation of the mouse embryo. *J. Morphol.* 198:341-351.
- 8.- Biggers, J., Whiten, W., Whittingham, D. (1971): The culture of mouse embryos in vitro. In: Daniel, J. (Edit) *Methods in mammalian embryology*. Freeman, San Francisco pp 86-115.

9.- Blake, E., Schindler, J., Sherman, M. (1982): Protein synthetic requirements for outgrowth of trophoblast cells from mouse blastocyst. *J. Exp. Zool.* 224:401-408.

10.- Brenner, C., Adler, R., Rappolee, D., Pederson, R., Werb, Z. (1989): Genes for extracellular matrix-degrading metalloproteases and their inhibitor, TIMP are expressed during early mammalian development. *Genes. Dev.* 3:848-859.

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

12.- Casimiri, V., Rath, N., Parve, H., Psychoyos, A. (1980): Effect of sex steroids on rat endometrial epithelium and stroma cultured separately. *J. Steroid Biochem.* 12:293-298.

13.- Chávez, J. (1986): Cell surface of mouse blastocysts at the trophectoderm-uterine interface during the adhesive stage of implantation. *Amer. J. Anat.* 176:153-158.

14.- Chew, N., Sherman, M. (1975): Biochemistry of differentiation of mouse trophoblast: δ^5 , 3β -hidroxy steroid deshydrogenase. *Biol. Reprod.* 12:351-359.

15.- Cole, R., Paul, J. (1965): Properties of cultured pre-implantation mouse and rabbit embryos, and cell strains derived from them. En: . Wolstenholme, G.E., O' Connors M. (Edits) Pre-implantation stages of pregnancy, CIBA Foundation Symposium Churchill, London. pp. 82-112.

16.- Cowell, P. (1969): Implantation and development of mouse eggs transferred to the uteri of non-progestational mice. *J. Reprod. Fertil.* 19:29-245.

17.- Daniel, W. W. (1983): Bioestadística. Edit. Limusa, México.

18.- Deane, H., Rubin, B., Driks, E., Lobell, B., Leipsner, G. (1962): Trophoblastic giant cells in placentas of rats and mice and their probable role in steroid-hormone production. *Endocrin.* 70:407-419.

19.- Denker, W. (1990): Trophoblast-endometrial interactions at embryo implantation: a cell biological paradox. *Tropho. Res.* 4:3-27.

20.- Denker, W. ((1977): Implantation the role of proteinases, and blockage of implantation by proteinase inhibitors. *Adv. Anat. Embryol. Cell. Biol.* 53:234-342.

21.- Denker, W. (1980): Embryo implantation and trophoblast invasion. M. De Brabander (Edits) *Cell. Mov. and Neopl.* Oxford-New York: Pergamon Press. pp 151-162.

22.- Doggenweiller, C. (1990): Apuntes del curso de microscopía electrónica. Universidad de Chile, Santiago, Chile.

23.- Dziadek, M., Adamson, E. (1978): Localization and synthesis of alpha-fetoprotein in post-implantation mouse embryos. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 43:289-313.

24.- Enders, A. (1970): Fertilization, cleavage and implantation. En: Hafez, E. (Edit) *Reproduction and breeding techniques for laboratory animals.* Lea & Febiger, Philadelphia, pp. 137-156.

25.-Enders, A. (1976): Anatomical aspects of implantation. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 25:1-5.

26.- Enders, A, Schlafke, S. (1967): A morphological analysis of the early implantation stages in the rat. Am. J. Anat. 120:185-226.

27.- Enders, A., Given, R. L., Schlafke, S. (1978): Differentiation and migration of endoderm in the rat and mouse at implantation. Anat. Rec. 190:65-78.

28.- Enders, A., Chávez, D., Schlafke, S. (1981): Comparison of implantation in utero and in vitro. En: Glasser, S.R., Bullocks, D.W. (Edits) Cellular and molecular aspects of implantation. Plenum Publ. Corp. New York. pp. 3-32.

29.- Enders, A., Hendricks, A., Schlafke, S. (1983): Implantation of the rhesus monkey initial penetration of endometrium. Am. J. Anat. 167:275-298.

30.- Farach, M., Tang, J., Decker, G., Carson, D. (1987): Heparin/Heparan sulfate is involved in attachment and spreadind of mouse embryos in vitro. Dev. Biol. 123:401-410.

31.- Ferguson, M., Christie, G. (1967): Distribution of hydroxysteroid dehydrogenases in the placenta and foetal membranes of various mammals. J. Endocrin. 38:291-306.

32.- Fleming, S., Neill, C., Collier, M., Spinks, N., Ryan, A., Ammit, A. (1989): The role of embryonic signals in the control of blastocyst implantation. En: Yoshinaga, K. (Edit) Blastocyst implatation. Adams. Publishing Group Boston. pp 17-23.

33.- Glass, R. H., Aggeler, J., Spindle, A., Pedersen, R. A., Werb, A. (1983): Degradation of extracellular matrix by mouse trophoblast outgrowths: A model for implantation. J. Cell. Biol. 96:1108-1116.

34.- Glenister, T. W. (1961): Organ culture as a new method for studying the implantation of mammalian blastocyst. *Proc. Royal. Soc. Lond (Biol)*. 154:428-431.

35.- Glenister, T. W. (1966): Nidation processes in organ culture. *Int. J. Fertil*. 11:412-423.

36.- Glenister, T.W. (1967): Organ culture and its combination with electron microscopy of the nidation process. En: Westsin, B., Wiquist, N. (Edits), *Fertility and sterility*. Ser. 133, Amsterdam: Excerpta Medica Fdn. pp. 385-394.

37.- Glenister, T. W. (1971): Methods for studying ovoidimplantation and early embryo-placentad development in vitro. En: Daniel, J. C. (Edits) *Methods in mammalian embryology*, San Francisco: Wilt. Freeman and Co. pp. 320-333.

38.- Godkin, J., Lifsey, B., Gillespie, B. (1988): Characterization of bovine conceptus proteins produced during the peri and postattachment periods of early pregnancy. *Biol. Reprod*. 38:703-711.

39.- Gonda, M., Hsu, Y. (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*. 56:23-29.

40.-Grinnell, F., Feld, M. (1982): Fibronectine adsorption on hydrophilic and hydrophobic surface detected by antibody binding and analyzed during cell adhesion in serum-containing medium. *J. Biol. Sci*. 257 (9):4888-4893.

41.- Grinnell, F., Hays, D.G. (1978): Cell adhesion and spreading factor: similarity to cold insoluble globulin in human serum. *Exp. Cell. Res*. 115:221-229.

42.-Guzmán-Grenfell, A. M., Baiza-Gutman, L. A., Hicks-Gómez, J.J. (1973): Sistemas moleculares en las interacciones celulares II: Implantación embrionaria en mamíferos. Ginec. Obst. Mex. 61:22-25.

43.-Gwatkin, R. B. (1966a): Defined media and development of mammalian eggs in vitro. Ann. N. Y. Acad. Sci. 139:79-90.

44.- Gwatkin, R. B. (1966b): Aminoacid requirements for attachment and outgrowth of the mouse blastocyst in vitro. J. Cell Physiol. 68:335-344.

45.- Hames, B., Rickwood, D. (1985): Gel electrophoresis proteins: a practical approach. IRL Press. Washington.

46.- Hamilton, W., Mossman, H. (1973): Embriología Humana. Editorial Inter-Médica 4a. edición. México. pp 86-100.

47.- Hsu, Y. C. (1971): Post-blastocyst differentiation in vitro. Nature, Lond. 231:100.

48.- Hsu, Y.C. (1973): Differentiation in vitro of mouse embryos to the stage of early somite. Develop. Biol. 33:403-411.

49.- Hsu, Y. C.(1973): Differentiation in vitro of mouse embryos beyond the implantation stage. Nature (London). 239:200-202.

50.- Hsu, Y., Baskar, J., Stevens, L., Rash, J. (1974): Development in vitro of mouse embryos from the two-cell stage to the early somite stage. J. Embryol. Exp. Morph. 31:235-245.

51.- Hynes, R. O. (1986): Fibronectins. Scientific. American 254:42-51.

52.- Hynes, R. (1992): Integrins: Versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell*. 69:11-25.

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

54.- Jenkinson, E. (1977): The *in vitro* blastocyst outgrowth system as a model for the analysis of peri-implantation development. En.: Johnson, M. (Edit). *Development in mammals*. 11:151-172.

55.- Jenkinson, J., Searle, F. (1977): Cell surface changes on the mouse blastocyst at implantation. *Exp. Cell. Res.* 106:386-390.

56.- Kenneth, M., Yamada, & Kenneth, Olden. (1988): Fibronectins-adhesive glycoproteins of cell surface and blood. *Nature*. 275:179-184.

57.- Kim, Brady, M., Patrick Duff, M., Michael, K., Yancey, M. (1990): Plasma fibronectin concentrations during normal term labor. *Obstet Gynecol* 75:619-621.

58.- Kornbliht, A. R. Gutman, A. (1988): Molecular biology of the extracellular matrix proteins. *Biol. Rev.* 63:465-507.

59.- Laemmli, K. (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227:680-685.

60.- Lowry, O. H., Rosenbroug, N. J., Farr, L. A., Randall, R. S. (1955): Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193:265-275.

61.-McDonald, J. A. (1988): Extracellular matrix assembly. *Annu. Rev. Cell. Biol.* 4:183-207.

62.- Mintz, B. (1964): Formation of genotypically mosaic mouse embryos and aearly development of lethal (t^{12}/t^{12}) normal mosaics. J. Exp. Zool. 157:85.

63.- Morris, J. E., Potler, S. W., Rynd, L. S., Buckley, P.M. (1983): Adhesion of mouse blastocysts to uterine epithelium in culture. A requirement for mutual surface interactions. J. Exp. Zool. 225:467-479.

64.- Nieder, G. (1989): Analysis of proteins secreted by mouse embryos developing in vivo and in vitro. J. Exper. Zool. 252:134-142.

65.- Nieder, G. (1990): Protein secretion by the mouse trophoblast during attachment and outgrowth in vitro. Biol. Reprod. 43:251-259.

66.- Orsini, M. W. (1963): Morphological evidence on the intra-uterine career of the ovum. En: A. C. Enders (Ed), Delayed implantation, U. Chicago Press, pp. 155-169.

67.- Parr, E. L., Tung, H. N., Parr, M. B. (1987): Apoptosis as the mode of uterine epithelial cell death during embryo implantation in mice and rats. Biol. Reprod. 36:211-225.

68.-Peters, P., Hartle, J. (1985): The biosynthesis processing and secretion of laminin by human choriocarcinoma cells. J. Biol. Chem. 260:14732-14742.

69.-Potts, M. (1967): The ultrastructure of implantation in the mouse. J. Anat. 120:185-226.

70.- Psychoyos, A. (1960): Nouvelle contribution a l'etude de la nidation de l'oeuf chez la ratte. C. R. Acad. Sci., Paris. 251:3073-3075.

71.- Psychoyos, A. (1961a): La nidation de la ratte et la dose b' oestrogene necessaire. C. R, Acad. Sci. Paris. 253:1661-1617.

72.- Psychoyos, A. (1966): Etude des relations de l'oeuf et de l'endometre au cours de retard de la nidation ou des premieres phases du processus de nidation chez la ratte. C. R. Acad. Sci., Ser. D. 263:1755-1758.

73.- Psychoyos, A. (1973): Hormonal control of oovimplantation. Vitamins and Hormons 31:201-256.

74.- Psychoyos, A. (1986): Uterine receptivity for nidation. Ann. N. Y. Acad. Sci. 476:36-42.

75.- Pytela, R., Pierschbacher, M., Ruoslahti, E. (1985): Identification and isolation of a 140 KDa cell surface glycoprotein with properties expected of a fibronectin receptor. Cell. 40:191-198.

76.- Queenan, T., Arboleda, E., Ulloa-Aguirre, A., Golos, G., Cines, B., Shauss III, F. (1975): Regulation of urokinas-type plasminogen activator production by cultured human cytotrophoblasts. J. Biol. Chem. 262:10903-10906.

77.- Ryan, J., Neill, C., Walles, R. (1990): Oxidative metabolism of energy substrates by preimplantation mouse embryos in presence of platelet-activating factor. J. Reprod. Fertil. 89:301-307.

78.- Rizzino, A., Sherman, N. (1979): Development and differentiation of mouse blastocyst in serum free medium. Exp. Cell. Res. 121:221-233.

79.- Rowinski, J., Solter, D., Koprowski, H. (1976): Changes in concanavalin A induced agglutinability during preimplantation

mouse development. Exp. Cell Res. 100:404-406.

80.- Ruoslahti, E. (1988): Fibronectin and its receptors. Annu. Rev. Biochem. 57:375-413.

81.- Ruoslahti, E., Giancotti, F. (1989): Integrins and tumor cell dissemination. Cancer Cells. (Cold Spring Harbor). 1:119-126.

82.- Salomon, S., Sherman, M. (1975): Implantation and invasiveness of mouse blastocysts on uterine monolayers. Exptl. Cell Res. 90:261-268.

83.- Schindler, J., Sherman, M. (1981): Effects of α -amanitin on programming of mouse blastocyst development. Devel. Biol. 84:332-340.

84.- Schlafke, S., Enders, A. (1975): Cellular basis of interaction between trophoblast and uterus at implantation. Biol. Reprod. 12:41-65.

85.- Sellens, H., Sherman, I. (1980): Effects of culture conditions on the developmental programme of mouse blastocysts. J. Embryol. Exp. Morph. 56:1-22.

86.- Shapiro, S., Sherman, M. (1974): Sulfated mucopolysaccharides of midgestation embryonic and extraembryonic tissues of the mouse. Arch. Biochem. Biophys. 162:272-280.

87.- Sherman, M. I. (1972a): The biochemistry of differentiation of mouse trophoblast: Alkaline phosphatase. Devel. Biol. 27:337-350.

88.- Sherman, M. I. (1972b): Biochemistry of differentiation of mouse trophoblast: Esterase. Exp. Cell. Res. 75:449-459.

89.- Sherman, M. (1975b): Long term culture of cells derived from mouse blastocysts. *Differentiation*. 3:51-67.

90.- Sherman, M. (1978): Implantation of mouse blastocyst *in vitro*. En.: Daniel, J. (Edit). *Methods in mammalian reproduction*. Academic Press. San Francisco. 11:247-257.

91.- Sherman, M., Atienza-Samols, S. Nutley, N. (1978): *In vitro* studies on the surface adhesiveness of mouse blastocyst. En: Ludwig, H., Tauber, P. (Edits.): *Human fertilization*, George Thiems Publishers, Stuttgart, pp. 179-183.

92.- Sherman, M.I., Chew, N.J. (1972): Detection of maternal esterase in mouse embryonic tissues. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 69:2551-2555.

93.- Sherman, M., Salomon, D. S. (1975): The relationships between the early mouse embryo and its environment. In: Market, C. L., Papaconstantinou, P. (Edits): *The Developmental Biology of Reproduction*. Academic Press, New York pp. 277-309.

94.- Sherman, M., Wudl, L. R. (1976): The implanting mouse blastocyst. En: Poste, G., Nicolson, G.L. (Edits.) *The cell surface in animal embryogenesis and development*, Amsterdam: North-Holland Publ. pp 81-125.

95.- Shutherland, 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.

96.- Spindle, A., Pedersen, R. (1973): Hatching, attachment and outgrowth of mouse blastocysts *in vitro*.: Fixed nitrogen requirements. *J. Exp. Zool.* 186:305-318.

97.- Strickland, S., Reich, E., Sherman, I. (1976): Plasminogen activator in early embryogenesis enzyme production by trophoblast and parietal endoderm. Cell. 9:231-240.

98.- Surani, M. (1979): Glycoprotein synthesis and inhibition of glycosylation by tunicamycin in preimplantation mouse embryos: Compaction and trophoblast adhesion. Cell. 18:217-227.

99.-Tachi, C. (1992): Partial characterization of macromolecular components in fetal bovine serum required for development of mouse blastocysts cultured in vitro. Develop. Growth & Differ. 34:69-77.

100.-Talamás, R. (1989): Estudio de la Interacción de Entamoeba histolytica con fibronectina, un componente de matriz extracelular. Tesis. México.

101.- Tamkun, J., De Simone, D., Fonda, D., Patel, R., Buck, C., Horwitz, A., Hynes, R. (1986): Structure of integrin glycoprotein involved in the transmembrane linkage between fibronectin and actin. Cell. 46:271-282.

102.- Towbin, H., Staehelin, T., Gordon, J. (1979): Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets. Procedures and some applications. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 76:4350-4354.

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

104.- Weitlauf, H. (1989): Embryonic signaling at implantation in the mouse. En.: Development of preimplantation embryos and their environment pp. 359-376.

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

106.- Willey, L.M., Pedersen, R. A. (1977): Morphology of mouse egg cylinder development in vitro: A light and electron microscopy study. J. Exp. Zool. 200:389-402.

107.- Yamada, K. M., Olden, K. (1978): Fibronectins-adhesive glycoproteins of cell surface and blood. Nature 275:179-184.

108.- Yoshinaga, K. (1961): Effect of local application of ovarian hormones on the delay in implantation in lactating rats. J. Reprod. Fertil. 2:35-41.

109.- Yoshinaga, K (1988): Blastocyst Implantation. Serono Symposia USA. pp 47-55.