

LA INGESTA PERICONCEPCIONAL MODERADA DE ALCOHOL ALTERA LAS UNIONES INTERCELULARES DE EMBRIONES PERI-IMPLANTATORIOS MURINOS

Periconceptual moderate alcohol ingestion alters the intercellular junctions of murine peri-implantational embryos

Leticia PÉREZ-TITO¹; Cristian SOBARZO²; Tamara A. COLL¹; Martín R. VENTUREIRA¹; Elisa CEBRAL¹

1. Laboratorio de Reproducción y Fisiopatología Materno-Embrionaria. Instituto de Fisiología, Biología Molecular y Neurociencias (IFIBYNE-CONICET). Departamento de Biodiversidad y Biología Experimental (DBBE). Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. Buenos Aires, Argentina. 2. INBIOMED - CONICET - Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires. Buenos Aires, Argentina.
e-mail: cebral@hotmail.com

RESUMEN.

El consumo perigestacional de alcohol produce anomalías en la diferenciación y cavitación del blastocisto peri-implantatorio, posiblemente relacionadas con defectos en la adhesión intercelular. En hembras murinas expuestas a 10% de etanol en agua de bebida, 17 días previos a la fecundación y hasta el día 4 u 8 de gestación (HT), vs hembras controles (agua, HC), se estudió, con inmunofluorescencia (IF) simple y doble (confocal): 1) la localización, el patrón y nivel de expresión de E-cadherina y ZO-1 en blastocistos (BI); 2) la expresión de E-cadherina en embriones en gastrulación. En los BI de las HC, la marcación de E-cadherina fue continua en los contactos celulares del trofoectodermo mural (TM), polar (TP) y macizo celular interno (MCI), pero en los BI de las HT fue discontinua, sinuosa y con engrosamiento en los contactos celulares. En el 40-50% de BI de las HT, la ZO-1 se expresó en TM, TP y MCI con un patrón submembranoso débil y discontinuo pero con expresión granular perinuclear y citoplasmática. En las HT, hubo escasa co-localización de la E-cadherina con ZO-1 vs HC indicando alteración de la biogénesis de las uniones en el embrión preimplantatorio. En el ectodermo embrionario de HT, observamos menor expresión de E-cadherina que en el HC ($p < 0.05$, Scion Image). En conclusión, la expresión anómala de E-cadherina y de ZO-1 en los BI de HT sugiere que el debilitamiento de las uniones celulares participa en la alteración de la cavitación mientras que la pérdida de uniones adherentes (E-cadherina) en el ectodermo primitivo se relacionaría con dismorfogénesis producida por la exposición a alcohol.

Palabras claves: Alcohol, uniones de adhesión, E-cadherina y ZO-1, embriones peri-implantatorios, ratón.

ABSTRACT.

Murine consumption of alcohol produces perigestational anomalies in the differentiation and cavitation of peri-implantational blastocyst possibly related to intercellular adhesion defects. In CF-1 mouse females exposed to 10 % ethanol in drinking water for 17 days prior to fertilization and up to day 4 or 8 of gestation (TF) vs control females (water, CF) it was studied, by immunofluorescence (IF) single and double (confocal): 1) the location, pattern and the level of expression of E-cadherin and ZO-1 in blastocysts (BI), 2) the expression of E-cadherin in embryos at gastrulation. While BI from CF presented a continuous E-cadherin pattern in the mural trophectoderm cellular contacts (MT), polar (PT) and in the inner cell mass (ICM), BI from TF, the E-cadherin was discontinuous, sinuous and was presented with membranous accumulations. In 40-50% of BI from TF, the ZO-1 was expressed in MT, PT and ICM with a sub-membrane weak and discontinuous pattern but granular perinuclear and cytoplasmic expression. In TF, there was little co-localization between E-cadherin and ZO-1 vs CF, indicating impaired biogenesis joints in the preimplantation embryo. Embryonic ectoderm from TF had reduced expression of E-cadherin vs embryo-CF ($p < 0.05$, Scion Image). In conclusion, the abnormal expression of E-cadherin and ZO-1 in TF suggests that weakening of cell junctions is involved in the alteration of BI-cavitation while the loss of adherens junctions (E-cadherin) in the embryonic ectoderm can be related to dysmorphogenesis after alcohol exposure.

Keywords: Alcohol, adhesion junctions, E-cadherin and ZO-1, peri-implantational embryos, mouse.

INTRODUCCIÓN

El consumo materno de alcohol produce alteraciones embrio-feto-placentarias como crecimiento intrauterino y postnatal retrasado, prematuridad, abortos espontáneos tempranos y malformaciones congénitas. Estos defectos han sido caracterizados como “Desórdenes alcohólicos fetales” (FASD) (1, 2).

Los efectos de la exposición materna a alcohol sobre el embrión dependen de la dosis, la concentración, el tiempo y periodo de exposición. Al respecto, la variabilidad del FASD está relacionada con el momento de la gestación en que la droga actúa, pudiéndose distinguir las siguientes ventanas de exposición: periodo preconcepcional (antes de la gestación) o periodo concepcional que involucra las fases de preimplantación, implantación, gastrulación (3), organogénesis y fetal. Previamente nosotros demostramos que la exposición a etanol por un mes previo a la gestación induce, en hembras murinas prepúberes híbridas, efectos deletéreos en los oocitos (4), en la fecundación (5) y en el desarrollo durante la preimplantación (6, 7, 8). Recientemente demostramos que la ingesta moderada de alcohol desde dos semanas antes de la preñez y hasta la organogénesis temprana

(día 10 de gestación de ratón) induce, en hembras de ratones CF-1, retraso en la diferenciación embrionaria, disminución de la viabilidad, retardo del crecimiento y dismorfogénesis durante la organogénesis (9). Dado que propusimos que estas alteraciones embrionarias de la mitad de la gestación podrían ser consecuencia de las acciones nocivas de la exposición a alcohol en fases más tempranas del desarrollo, analizamos los efectos de la exposición de hembras murinas exocriadas (CF-1 y CD-1) a etanol al 10% desde antes de la gestación y hasta fases periimplantatorias (días 4 y 5 de gestación). Luego del consumo perigestacional de alcohol, las hembras murinas CD-1 tratadas presentaron embriones con anomalías morfológicas, diferenciación retrasada y escasa invasividad trofoblástica (10). Por otro lado, hembras CF-1 expuestas perigestacionalmente a alcohol hasta el día 4 (periodo pre-implantatorio) o hasta el día 8 de gestación (gastrulación) también presentaron alteraciones embrionarias. Al día 4 de gestación, las hembras tratadas (HT) tuvieron retraso de la diferenciación embrionaria (Fig. 1B) versus las hembras controles (HC, Fig. 1A) y un aumento de blastocistos morfológicamente anormales, en particular con defectos en la cavidad blastocélica (Fig. 1C) (11). De la

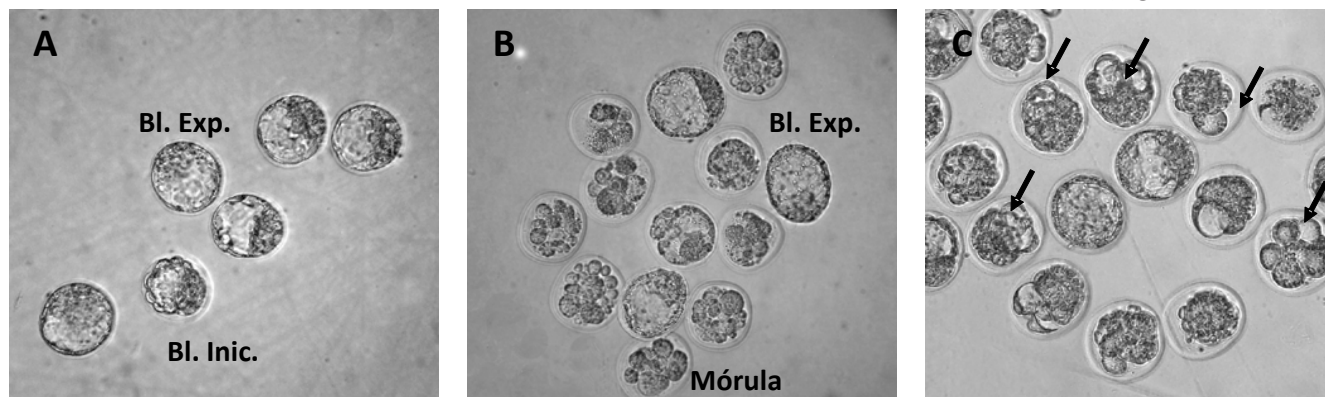


Figura 1. Diferenciación y calidad embrionaria al día 4 de gestación luego de la ingesta periconcepcional de alcohol. El grado de diferenciación y calidad embrionaria se analizó en microscopio invertido de contraste de fase. A: blastocistos iniciales (Bl. Inic.) y expandidos (Bl. Exp.) provenientes de hembras controles (HC). B y C: mórulas, blastocistos iniciales y expandidos provenientes de hembras tratadas (HT). B: retraso de diferenciación por aumento de la proporción de mórulas y reducción del número de blastocistos. C: Cavitación anormal embrionaria (flechas). Aumento 20x (microscopía invertida).

misma manera, cuando la exposición se mantuvo hasta el día 8 de gestación se observó retraso en la diferenciación embrionaria, de entre 8 y 24 horas, con mayor proporción de embriones en estadio TS10a y TS10ab, según escala de Theiler (TS) (Fig. 2B) (12) respecto del estadio embrionario promedio de las HC (TS10b) (Fig. 2A) estas alteraciones fueron acompañadas de incremento de apoptosis en el tejido embrionario (13).

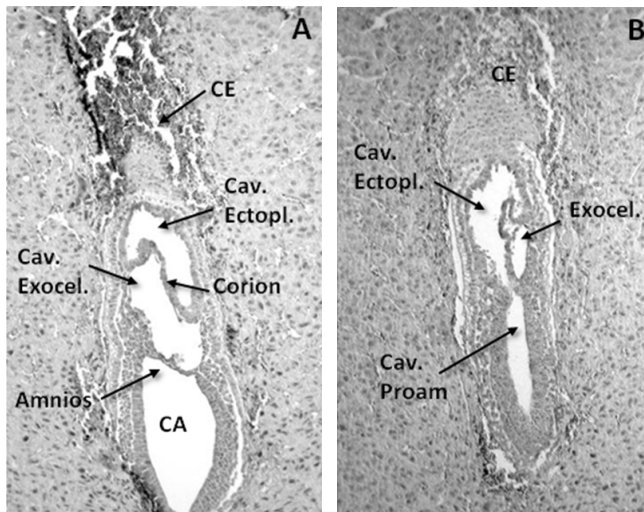


Figura 2. Diferenciación embrionaria en gastrulación posterior a la ingesta de alcohol hasta el día 8 de gestación. Los sitios de implantación extraídos al día 8 de gestación se procesaron histológicamente (HyE) para evaluar el estadio de diferenciación del embrión según la escala de Theiler (TS). A: embrión en estadio TS 10b (según Escala de Theiler). B: embrión en estadio TS 10ab. Los embriones provenientes de las HT presentaron retraso de 8 a 24 hs por aumento de la proporción de embriones en estadio TS 10ab vs el número de embriones de las HC. Aumento 10x.
Cav. Proam.: Cavidad Proamniótica; Cav. Ectopl.: Cavidad Ectoplacentaria; Exocel.: Exocoeloma; Cav. Exocel.: Cavidad Exocoelómica; CE: Cono Ectoplacentario.

Si bien existen diversos mecanismos generados por la acción deletérea del alcohol, el presente trabajo se centró en el estudio de las alteraciones, inducidas por la exposición a alcohol, en la expresión de moléculas de adhesión intercelular relevantes para el desarrollo embrionario periimplantatorio (blastocistos y embriones en gastrulación), como la proteína *Zonula Occludens-1* (ZO-1) de las uniones estrechas y la E-cadherina de las

uniones adherentes. En relación a ello, en nuestro modelo murino CF-1, recientemente demostramos que la exposición periconcepcional a cantidades moderadas de alcohol en el agua de bebida, si bien no afectó el patrón de distribución de N- y E-cadherina en embriones organogénicos al día 10 de gestación, se incrementó significativamente sus niveles de expresión en comparación con los embriones de las HC (9), alteraciones que podrían estar vinculadas con los efectos nocivos del alcohol sobre la diferenciación, crecimiento y morfología embrionaria.

En los mamíferos, la formación del blastocisto implica una compleja serie de eventos en una secuencia temporal precisa. Entre ellos, la polarización progresiva de los blastómeros durante la fase de compactación (14) se establece por la formación de uniones adherentes (UA) y uniones estrechas (UE) en la superficie basolateral y apicolateral intercelular, respectivamente (15, 16). Este ensamblaje secuencial y ordenado contribuye a la formación del primer tipo celular diferenciado que surge durante la embriogénesis: el trofoectodermo (TE). El desarrollo funcional de este importante epitelio, involucrado en el transporte polarizado, genera la cavidad blastocélica, un espacio que permitirá reordenamientos celulares y morfogenéticos adecuados para el desarrollo posterior del embrión (17). Una vez que el embrión de 8 células inició su compactación, proteínas de las UE como ZO-1, ocludina y claudina, se reúnen en la zona de contacto apicolateral de los blastómeros. Este proceso de montaje de las UE se produce secuencialmente, durante un período de 24 horas que transcurre entre la compactación y la formación de la cavidad blastocélica, mientras que sólo después de la fase de montaje final de las UE, se genera en el embrión un sello entre células epiteliales

adyacentes para regular la permeabilidad entre las células TE y la cavidad blastocélica (18). Con respecto a este proceso de cavitación es importante destacar que las primeras etapas en la biogénesis de las UE dependen de la expresión y ensamblaje de la E-cadherina en la membrana. Si esta proteína de la UA es inhibida, se provoca el montaje de las UE al azar en la membrana y se altera la formación del epitelio trofoectodérmico.

Si bien las moléculas de adhesión son fundamentales en los estadios iniciales de la embriogénesis, también lo son en estadios más avanzados, donde predominan eventos de diferenciación celular, crecimiento y proliferación. En estas fases, las cadherinas son críticas para la determinación, el mantenimiento de la diferenciación y la arquitectura de tejidos epiteliales (19). La clásica subfamilia de las UA que actúa en estadios tempranos de la embriogénesis, comprende las E-, N- y P-cadherinas que interactúan intracelularmente con B-catenina y p120ctn (p120 catenina) (20). Los cambios en el patrón espacio-temporal de la expresión de E-cadherina durante la embriogénesis tiene un marcado impacto en la mecánica de adhesión de las células (21). Dado que la expresión de la E-cadherina está involucrada en la transición epitelio-mesenquimal y la adquisición de un fenotipo apto para la migración (22). La pérdida de E-cadherina es una fuerza motriz para la transformación de las células epiteliales en mesenquimáticas durante la formación de mesodermo.

Por lo expuesto, dado que las uniones célula-célula están involucradas en la morfogénesis embrionaria y en el establecimiento y mantenimiento de la arquitectura de los tejidos, las alteraciones en el patrón de expresión de proteínas de las UA (cadherinas) y de UE (ZO-1) en embriones peri-implantatorios, inducidas por la ingesta materna de alcohol, podrían ser causa de las anomalías

morfológicas observadas durante el desarrollo. Por lo tanto, el objetivo del presente trabajo fue evaluar la distribución y el patrón de expresión (cualitativa y semicuantitativamente) de E-cadherina y ZO-1 en blastocistos y embriones en gastrulación, en el día 4 u 8 de gestación respectivamente, luego de la ingesta materna peri-gestacional de alcohol.

MATERIALES Y MÉTODOS

Modelo Animal

Ratones hembras y machos de la colonia exocriada CF-1 (*Mus musculus*) sexualmente maduros (60 días de edad) del Bioterio Central de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales (FCEN) de la Universidad de Buenos Aires (Buenos Aires, Argentina) fueron alojados en grupos de 5 hembras o por jaula o individualmente en el caso de los machos. Los animales fueron mantenidos bajo un régimen diario y constante de 12 hs de luz y 12 hs de oscuridad y temperatura controlada de 22°C; y alimentados con alimento balanceado comercial (Balanceado Cooperación Rata-Ratón, Asociación Cooperativa de Alimentos, S.A. Buenos Aires, Argentina) *ad libitum*. Las hembras, al inicio del tratamiento, presentaron un peso corporal promedio entre 28 y 30 g.

Experimentos in vivo: tratamiento de los animales

Los experimentos fueron llevados a cabo según los requisitos del *National Institute of Health for the Care and Use of Laboratory Animals* y la Res CD 140/00 de la CICAL-FCEyN para el Cuidado y Uso de animales de laboratorio.

Las hembras murinas adultas recibieron por vía oral,

etanol al 10% (v/v) en el agua de bebida *ad libitum* durante un total de 21 o 25 días según el diseño experimental. La solución de etanol fue renovada cada dos días a lo largo de todo el experimento.

Durante los primeros 15 días de tratamiento y antes de la puesta en apareo, se evaluó diariamente en cada hembra tratada (HT) el ciclo estral. Como la ingesta de etanol produjo alteraciones del ciclo a partir del día 7 de consumo de alcohol en aproximadamente el 80% de las hembras tratadas, al día 15 de tratamiento las hembras recibieron estimulación ovárica con gonadotrofinas. Para ello, fueron inyectadas por vía intra-peritoneal con 5 UI de Gonadotrofina Coriónica equina (eCG; Novormon) a las 13:00 hs y 48 hs después (día 17 del tratamiento) con 5 UI Gonadotrofina Coriónica humana (hGC; SIGMA-ALDRICH). Inmediatamente después de la inyección de hCG, las hembras fueron puestas para apareo con machos de la misma colonia no tratados separados individual y previamente. A la mañana del día siguiente, la cópula fue confirmada mediante la observación del tapón vaginal. Aquellas hembras que presentaron tapón vaginal (día 1 de gestación) fueron separadas y continuaron recibiendo etanol/agua hasta el día 4 u 8 de gestación. Las hembras controles (HC) recibieron agua como bebida, fueron superovuladas, apareadas y sacrificadas al día 4 o 8 de gestación de la misma manera que las HT. Se utilizó un mínimo de 5 animales por grupo experimental y estudio.

Recolección y procesamiento de embriones de pre-implantación

Al día 4 de gestación, tanto las HC como las HT fueron sacrificadas por dislocación cervical. La cavidad abdominal fue cuidadosamente abierta, los cuernos uterinos fueron rápidamente removidos y colocados en

una placa de Petri con solución Krebs-Ringer. Los embriones fueron extraídos por *flushing* uterino en medio Krebs-BSA entre las 96 y 99 hs post-hCG. Los mismos fueron lavados sucesivas veces en gotas de medio Krebs-BSA, observados bajo microscopio invertido de contraste de fase y fotografiados para su posterior clasificación según estadios embrionarios y análisis de la calidad morfológica. Posteriormente, los embriones en estadio de blastocisto Inicial (cavidad de hasta 50% del volumen total embrionario) y blastocisto expandido fueron fijados en una solución de paraformaldehído 2%, lavados y almacenados en microgotas de PBS a 4°C hasta la realización de la inmunofluorescencia simple y doble de E-cadherina y ZO-1.

Recolección y procesamiento de embriones en gastrulación

En el día 8 de gestación, tanto las HC como las HT fueron sacrificadas por dislocación cervical. La cavidad abdominal fue cuidadosamente abierta, los cuernos uterinos fueron rápidamente removidos y colocados en una placa de Petri con solución Krebs-Ringer. Los sitios de implantación (SI) fueron aislados e inmediatamente fijados en paraformaldehído 4%. Posteriormente fueron procesados histológicamente para obtener cortes y realizar inmunofluorescencia para E-cadherina en sitios con embriones clasificados en estadios TS10a, TS10ab o TS10b (E8) según Escala de Theiler (TS).

Inmunofluorescencia simple para ZO-1 en Blastocistos en suspensión

Los embriones fueron removidos de los cuernos uterinos en medio Krebs-BSA, lavados en PBS y fijados en una solución de paraformaldehído/PBS 2% por 20

min a temperatura ambiente (TA). Luego fueron lavados en PBS, permeabilizados con una solución de PBS-Tritón X-100 0,25% (PBST) por 30 min e incubados 30 min en solución de bloqueo PBST-BSA 5%. Posteriormente a los lavados en PBST fueron incubados con anticuerpo primario anti-ZO-1-FITC (Zymed) 1:80 en PBS-Tritón 0,01%-BSA 5% *overnight* a 4°C. Luego de los lavados con PBST los embriones fueron incubados con anticuerpo secundario anti-FITC biotinilado (Vector Lab.) 1:100 en PBS-Tritón 0,01%-BSA 5% 1 h a TA. Después del lavado en PBST fueron incubados con *Neutral Avidine-FITC* (Southern Lab.) 1: 200 en PBST 0,01%-BSA 5% 45 min a TA. Transcurrido ese tiempo, los embriones fueron nuevamente lavados en PBST y montados cuidadosamente en PBS:glicerol (1:1). Fueron observados y fotografiados bajo microscopio de fluorescencia y confocal, para la evaluación de la distribución y patrón de expresión de la inmunomarca. El control de especificidad de la reacción fue realizado omitiendo el anticuerpo primario.

Inmunofluorescencia para E-cadherina en Blastocistos en suspensión

Los embriones fueron removidos de los cuernos uterinos en medio Krebs-BSA, lavados en PBS y fijados 20 min en una solución de paraformaldehído/PBS 2% a TA. Luego fueron lavados en PBS, permeabilizados con una solución de PBS-Tritón X-100 0,25% (PBST) por 30 min e incubados en solución de bloqueo PBST-BSA 5% por 30 min. Luego de los lavados en PBST fueron incubados con anticuerpo primario anti-E-cadherina (BD-Mouse) 1:80 en PBS-Tritón 0,01%-BSA 5% *overnight* a 4°C. Luego de los lavados con PBST, los embriones fueron incubados con anticuerpo secundario anti-Mouse (Donkey)-Rodamina (Millipore) 1:75 en PBS-Tritón

0,01%-BSA 5% 1 h a TA. Posteriormente fueron lavados en PBST y montados cuidadosamente en PBS: glicerol (1:1). Los blastocistos fueron observados y fotografiados bajo microscopio de fluorescencia y confocal para la evaluación de la distribución y patrón de expresión de la inmunomarca. El control de especificidad de la reacción fue realizado omitiendo el anticuerpo primario.

Doble inmunofluorescencia para ZO-1 y E-cadherina en Blastocistos en suspensión

Los embriones fueron removidos de los cuernos uterinos en medio Krebs-BSA, lavados en PBS y fijados 20 min en una solución de paraformaldehído 2% a TA. Luego fueron lavados en PBS, permeabilizados con una solución de PBS-Tritón X-100 0,25% (PBST) por 30 min e incubados en solución de bloqueo PBST-BSA 5% por 30 min. Posteriormente a los lavados en PBST fueron incubados con anticuerpo primario anti-ZO-1-FITC (Zymed) 1:80 en PBS-Tritón 0,01%-BSA 5% *overnight* a 4°C. Al día siguiente, luego de los lavados con PBST, los embriones fueron incubados con anticuerpo secundario anti-FITC biotinilado (Vector Lab.) 1:100 en PBS-Tritón 0,01%-BSA 5% 1 a TA. Posteriormente fueron lavados en PBST e incubados con *Neutral Avidine-FITC* (Southern Lab.) 1: 200 en PBST 0,01%-BSA 5% 45 min a TA. Trascurrido ese tiempo, los embriones se lavaron y se incubaron con anticuerpo primario anti-E-cadherina (BD-Mouse) 1:80 en PBS-Tritón 0,01%-BSA 5% *overnight* a 4°C. Al día siguiente, luego de los lavados con PBST, fueron incubados con anticuerpo secundario anti-Mouse (Donkey)-Rodamina (Millipore) 1:75 en PBS-Tritón 0,01%-BSA 5% por 1 h a TA. Posteriormente se lavaron en PBST y se montaron cuidadosamente en PBS: glicerol (1:1). Finalmente, los embriones fueron

observados y fotografiados bajo microscopio de fluorescencia y confocal para evaluación del patrón de co-localización. El control de especificidad de la reacción fue realizado omitiendo el anticuerpo primario.

Inmunofluorescencia para E-cadherina en sitios de implantación E8

Los SI fueron fijados en una solución de paraformaldehído/PBS 4% por 18 hs a 4°C, deshidratados y embebidos en Paraplast. Secciones transversales de los SI fueron obtenidas realizando cortes de 5 µm perpendiculares al eje longitudinal del útero. El análisis de la inmunofluorescencia fue realizado para detectar E-cadherina en embriones en gastrulación (E8). Para ello, los preparados fueron desparafinados en xileno y rehidratados en una serie de alcoholes de concentración decreciente y finalmente lavados en PBS (3 veces 5 min cada una). Luego fueron expuestos a una recuperación antigénica en microondas a 400 w por 10 min y permeabilizados 20 min con PBS-Tritón 0,25%. Posteriormente las secciones fueron lavadas en PBS (3 veces 5 min cada una) e incubadas con suero de cabra 1:40 en PBS 1 h a TA. Los cortes se incubaron con anticuerpo primario anti-E-cadherina (*mouse monoclonal antibodies*; BD Pharmingen, San Diego, CA) 1:5 en PBS *overnight* a 4°C. Al día siguiente, luego de tres lavados en PBS (5 min cada uno), los cortes fueron incubados con anticuerpo secundario anti-Mouse (Goat)-Alexa 488 1:25 en PBS 1 h a TA en oscuridad. Posteriormente al lavado (PBS), los cortes fueron montados en PBS:glicerol (1:1) para ser observados en microscopio confocal (Olympus). Se fotografió, en 20x + zoom 2x, el embrión, los tejidos extraembrionarios, la cavidad amniótica y la

exocelómica. La especificidad de la reacción fue determinada mediante la omisión del anticuerpo primario. Se evaluó la distribución, patrón y expresión (intensidad relativa) de la inmunomarca en el ectodermo embrionario.

Análisis de imágenes y cuantificación de intensidad de inmunofluorescencia en sitios de implantación

Para semicuantificar la inmunoreactividad del ectodermo embrionario en muestras de HC y HT, se empleó el método descrito por Tolivia *et al.*, 2006 (23) y Fong *et al.*, 2007 (24). Todos los ajustes y condiciones de la captura de imágenes digitales con el microscopio confocal se mantuvieron iguales y constantes en todas las muestras. Las micrografías fueron guardadas en formato de imagen TIFF y procesadas usando Adobe Photoshop CS2 (Adobe Systems Inc, San Jose, CA) para reconocer, seleccionar y separar las señales del cromógeno del fondo inespecífico. De cada imagen 20x se seleccionó y recortó la región embrionaria del ectodermo/epiblasto, excluyendo los tejidos extraembrionarios y la cavidad exocelómica. Luego las imágenes fueron convertidas a escala de grises. La iluminación global de cada píxel en las imágenes convertidas corresponde a la intensidad de la fluorescencia. Posteriormente cada micrografía fue invertida para que los píxeles grises y negro representen zonas de fluorescencia sobre un fondo blanco, luego de lo cual fueron guardadas como una nueva imagen TIFF para ser analizada con el programa *Scion Image*, versión 4.0.3.2 (Scion Corporation, Frederick, MD). En cada micrografía (que contiene exclusivamente el ectodermo primitivo marcado) se midió la intensidad media de la señal del cromógeno (densidad relativa promedio, DP) (23). Los valores de DP en píxeles para cada tratamiento

fueron comparados estadísticamente.

Análisis estadístico

La densidad relativa promedio (DP) \pm la desviación estandar (DE) de las muestras de las HC y de las HT se compararon por ANOVA de un factor y Test de Student, usando el programa estadístico GraphPad Instat v2.05a (GraphPAD Software Inc., San Diego, CA. USA). Un $p < 0.05$ fue considerado estadísticamente significativo.

RESULTADOS

Efectos de la ingesta murina CF-1 periconcepcional de alcohol en las uniones intercelulares de blastocistos preimplantatorios

Previamente vimos que las HT tratadas hasta el día 4 de gestación presentaron una gran proporción de blastocistos anormales con alteraciones en la cavitación como vesiculización, partición y cavitación incompleta, al comparar con la formación blastocélica de los embriones de las HC (Fig. 1C). Dados estos resultados, analizamos el patrón de expresión de ZO-1 por inmunofluorescencia, en los contactos celulares de blastocistos iniciales (Fig. 3) y expandidos (Fig. 4). Se detectó expresión de ZO-1 en el trofoblasto polar (TP), mural (TM) y en el macizo celular interno (MCI).

En los blastocistos provenientes de hembras controles (HC) (Figs. 3A y B; Fig. 4A), ZO-1 se localizó, en los contactos celulares, en la periferia del citoplasma en forma submembranosa. La marca fue continua y definida. Por el contrario, en los embriones provenientes de HT, si bien ZO-1 fue detectada en los contactos

celulares de TP y TM, también evidenció deslocalización de la marca con desplazamiento hacia el núcleo (marca intracitoplasmática perinuclear), donde se presentó un patrón de marcación engrosada, granular e intensa en el 90% de los embriones analizados. En los contactos intercelulares, dicha marca se presentó discontinua, delgada y tenue indicando una señal debilitada (Figs. 3C y D; Figs. 4B y C).

Con el fin de determinar si la exposición a alcohol afecta las uniones adherentes de embriones preimplantativos, tanto blastocistos iniciales como expandidos fueron inmunomarcados para detectar E-cadherina.

E-cadherina se localizó en las superficies de contacto (membrana) de TP y TM de ambos grupos de blastocistos. Los blastocistos de las HC presentaron un patrón de marcación continuo y definido en las superficies celulares (Fig. 5A; Fig. 6A). Sin embargo, los embriones de las HT tuvieron patrones de expresión alterados tales como marcación engrosada y discontinua con distorsiones y acumulaciones membranosas (Figs. 5B, C y D; Fig. 6B).

Nuestro objeto fue analizar el grado de co-localización de ZO-1 y E-cadherina en los blastocistos, para ello se realizó doble inmunomarcación y análisis de imágenes de microscopía confocal. Encontramos que el 100% de los embriones provenientes de HC presentaron alto grado de co-localización (Fig. 7C) de ZO-1 (Fig. 7A) con E-cadherina (Fig. 7B), especialmente en TP. Sin embargo, solamente el 50% de los embriones de HT presentó co-localización positiva, con menor grado de marcación simultánea, que se localizó únicamente en TM en forma puntual (Fig. 7F).

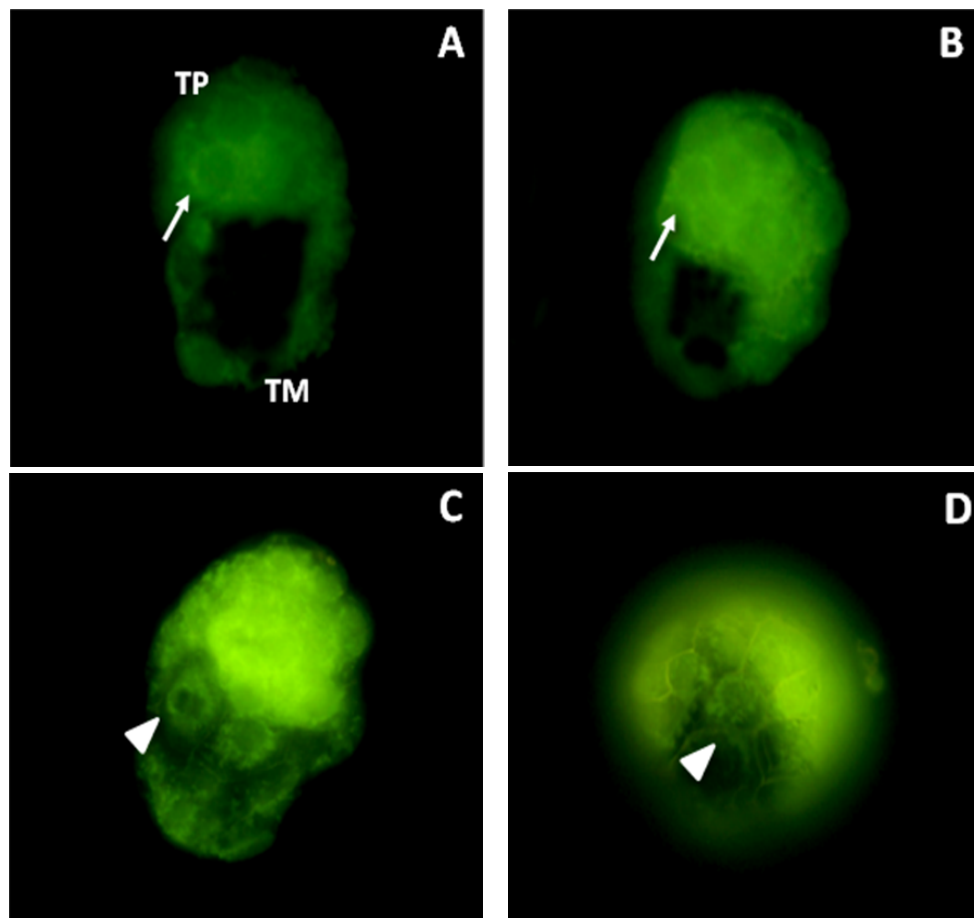


Figura 3. Inmunoexpresión de ZO-1 en blastocistos iniciales posterior a la exposición perigestacional a alcohol hasta día 4 de gestación. Se analizó la expresión de ZO-1 en blastocistos por inmunocitoquímica con anticuerpo primario anti-ZO-1-FITC, anticuerpo secundario anti-FITC biotinilado y *Neutral Avidine*-FITC. A y B: blastocistos provenientes de HC. ZO-1 se localiza en los contactos celulares de TP, TM y MCI. La marca es continua y definida (flechas). C y D: blastocistos provenientes de HT donde se observa que ZO-1 se localiza en los contactos celulares de TP y TM pero se evidencia deslocalización de la marca con desplazamiento hacia el núcleo, la cual es engrosada, granular e intensa. La marca en los contactos intercelulares es discontinua y delgada/ tenue (puntas de flecha). Aumento 40x.

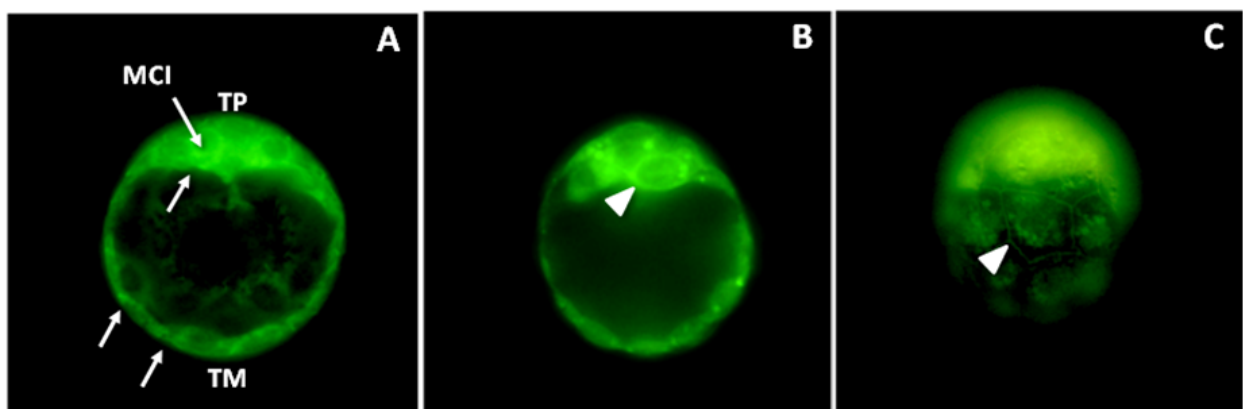


Figura 4. Inmunomarcación de ZO-1 en blastocistos expandidos.

Se realizó inmunocitoquímica en blastocistos expandidos en suspensión y revelado con FITC. A: blastocisto proveniente de HC. ZO-1 se localiza en los contactos celulares del TP, TM y MCI. La marca es continua y definida (flechas). B y C: blastocistos provenientes de HT: ZO-1 se deslocaliza hacia el núcleo, siendo la marca engrosada, granular e intensa (B: punta de flecha). En los contactos intercelulares, la inmunomarcación es delgada y/o leve (C: puntas de flecha). Aumento 40x.

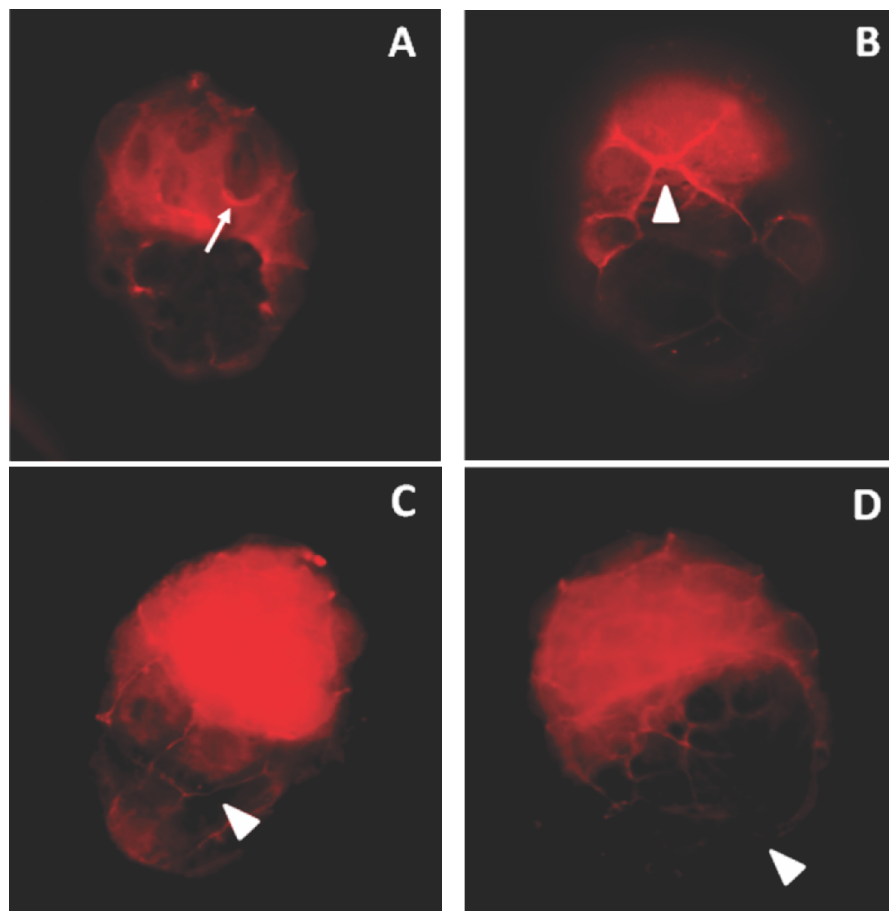


Figura 5. Inmunoexpresión de E-cadherina uniones adherentes de blastocistos iniciales luego de la ingesta periconcepcional de alcohol.
A: blastocisto proveniente de HC. E-cadherina se localiza en superficies de contacto de TP y TM. El patrón de marcación es continuo y definido (Flecha). B, C y D: blastocistos provenientes de HT. E-cadherina se inmunolocaliza en los contactos celulares de TP y TM pero se presentan anomalías en el patrón de marcación: marcación engrosada y discontinua con distorsiones y acumulaciones membranosas (Puntas de Flecha). Aumento 40x.

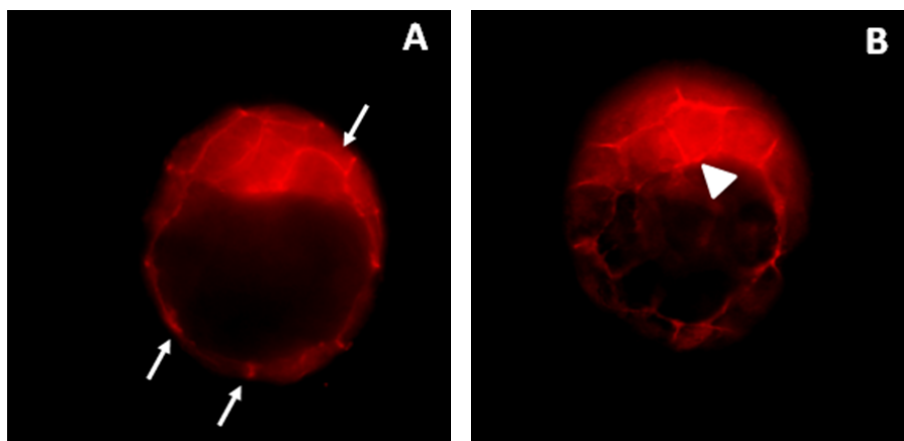


Figura 6. Inmunomarcación de E-cadherina en blastocistos expandidos posterior al consumo perigestacional de alcohol.
Los cortes se incubaron con anticuerpo primario anti-E-cadherina (*Mouse*) y con anticuerpo secundario anti-*Mouse* (*Goat*)-Alexa 488. A: blastocisto proveniente de HC. E-cadherina se localiza en superficies de contacto de TP y TM con un patrón continuo y definido (Flechas). B: blastocisto de HT. E-cadherina se inmunolocaliza en los contactos intercelulares pero se presenta marcación engrosada y discontinua con distorsiones y acumulaciones membranosas (Punta de Flecha). Aumento 40x.

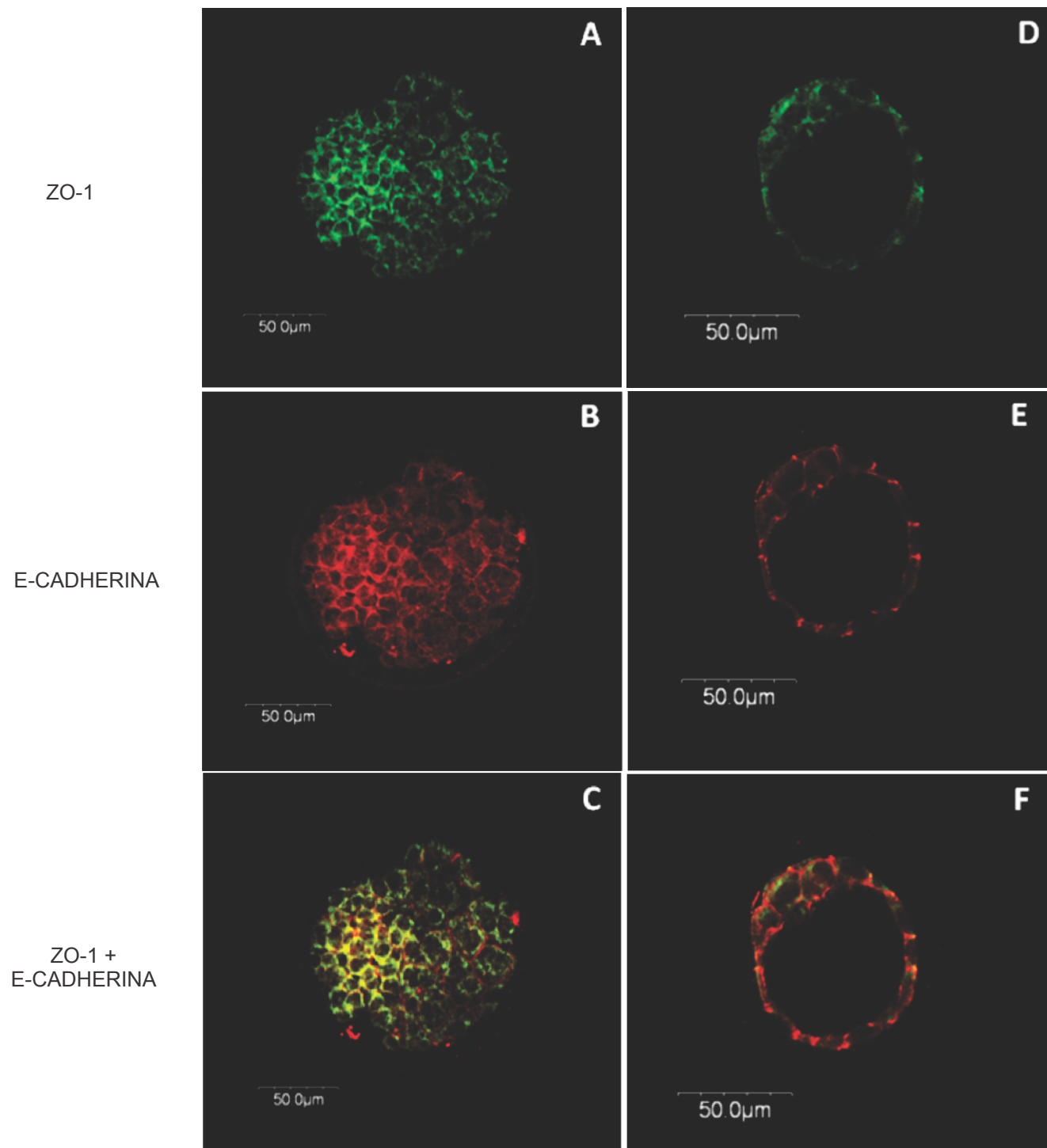
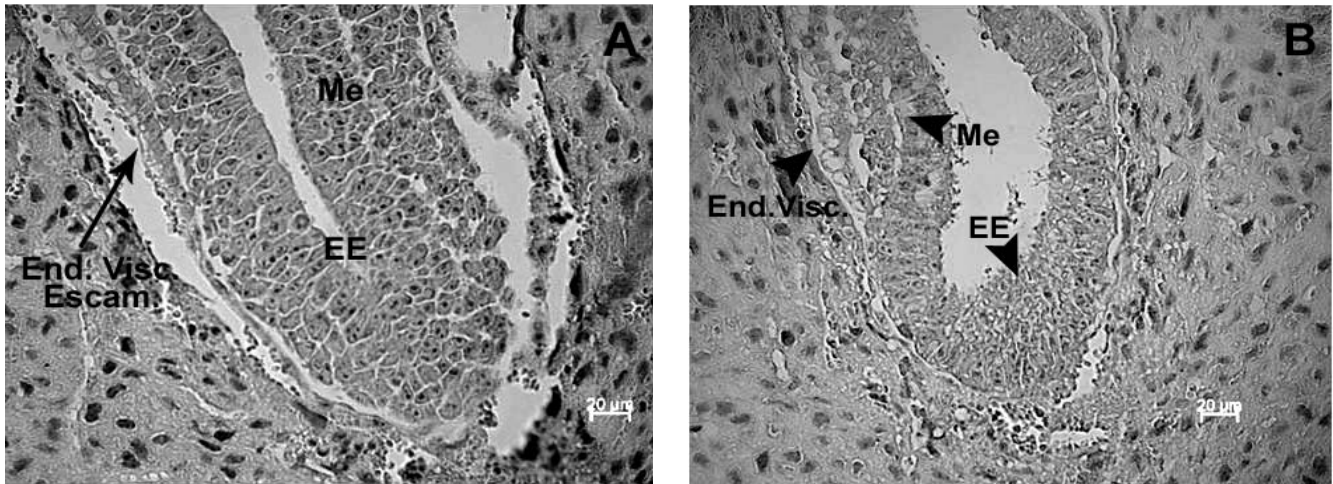


Figura 7. Análisis de la co-localización de ZO-1 y E-cadherina en blastocistos luego de la ingesta de alcohol hasta día 4 de gestación. Se realizó doble inmunocitoquímica para E-Cadherina (Rodhamina, rojo) y ZO-1 (FITC, verde) en blastocistos en suspensión. A, B y C: blastocistos provenientes de HC. A: ZO-1 (FITC, verde), se localiza en contactos celulares de TM, TP y MCI de forma submembranosa continua. B: E-cadherina (Rodhamina, rojo), se localiza en membrana de los contactos celulares de TM, TP y MCI en forma continua. C: Co-localización (amarillo) positiva en embriones de HC. Se co-localiza en TP y MCI en forma continua. D, E y F: blastocistos de HT. D: ZO-1 (verde) presenta localización citoplasmática dispersa y discontinua. E: E-cadherina (rojo) se encuentra en contactos celulares de TM y TP en forma membranosa pero discontinua e irregular. F: la co-localización (amarillo) de ZO-1-E-cadherina en embriones de HT fue levemente positiva sólo en TM.



Alteraciones en las uniones adherentes del ectodermo embrionario durante la gastrulación luego de la ingesta periconcepcional de alcohol

Se evaluó el efecto de la exposición a alcohol hasta el día 8 de gestación sobre las uniones adherentes de embriones en gastrulación. Se observó que los

embriones de las HT presentaron alteraciones histológicas en tejidos extraembrionarios y embrionarios, la más evidente fue desorganización celular del ectodermo embrionario, estas lesiones no se encontraron en los embriones de las HC (Fig. 8B versus Fig. 8A). A partir de estas observaciones, analizamos las

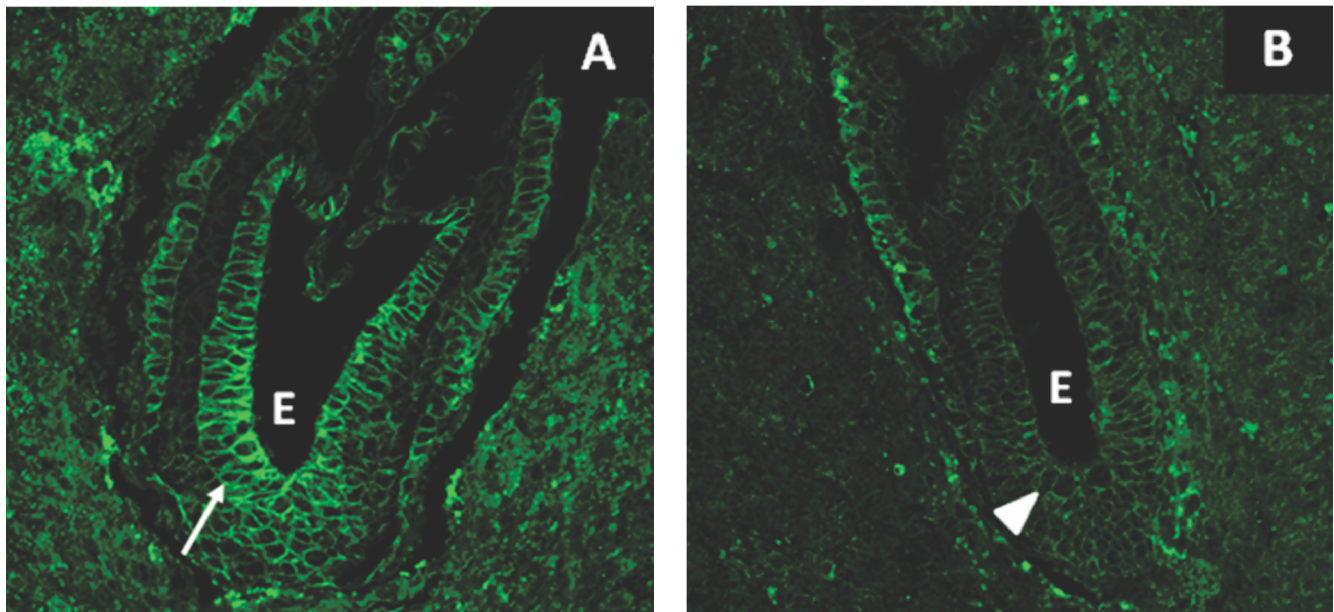


Figura 8. Expresión de E-cadherina en embriones de día 8 de gestación luego de la exposición periconcepcional a alcohol. Se detectó E-cadherina con inmunohistoquímica con anticupero primario anti-E-cadherina y secundario marcado con FITC (verde). A: inmunomarcación de E-cadherina en embrión (E) proveniente de HC. La marca se presentó fuerte y definida en el ectodermo embrionario (flecha). B: expresión de E-cadherina en embrión de HT. En el ectodermo embrionario la marca (verde) se redujo respecto de la marca de los embriones de las HC (punta de flecha).

uniones adherentes mediante inmunomarcación de E-cadherina (Fig. 9). Si bien no se encontraron diferencias en el patrón de expresión, que fue continuo y lineal en los contactos intercelulares de las células ectodérmicas de todos los embriones provenientes de HT y de HC, el análisis densitométrico semicuantitativo de la inmunoexpresión de dicha molécula mostró reducción significativa de la marca en los embriones provenientes de las HT (Fig. 9).

DISCUSIÓN

Los resultados hallados sugieren la inducción de alteraciones en el patrón de expresión y localización de E-cadherina de las uniones adherentes (UA) y de ZO-1 de las uniones estrechas (UE) en embriones peri-implantatorios luego de la ingesta periconcepcional de alcohol. Dado que las uniones célula-célula están involucradas en la morfogénesis embrionaria y en el establecimiento y mantenimiento de la arquitectura de los tejidos, la expresión anómala de proteínas de las uniones intercelulares podría ser la causa de las anomalías morfológicas observadas durante el desarrollo temprano del embrión que ocurren luego del consumo materno de alcohol.

El desarrollo normal durante la pre-implantación es crítico para el proceso de implantación (25). Los defectos en la formación del blastocisto darán lugar a pérdida embrionaria temprana. Durante el desarrollo, el embrión de 8 células se polariza progresivamente durante la fase de compactación de la mórula (14) estableciéndose la formación de uniones adherentes (UA) y uniones estrechas (UE) entre las células en las superficies basolateral y apicolateral, respectivamente (15, 16). El ensamblaje secuencial y ordenado de las uniones contribuye a la formación del primer tipo

celular diferenciado que surge durante la embriogénesis, el trofoectodermo (TE). Este epitelio está involucrado en el transporte polarizado que genera la cavidad blastocélica, un espacio que permitirá los reordenamientos celulares y morfogénéticos que darán posteriormente forma al embrión en desarrollo (17). Las moléculas de las uniones intercelulares, como la E-cadherinas y la ZO-1, juegan un rol fundamental en la morfogénesis y diferenciación de los tejidos (26), siendo la regulación de sus niveles de expresión crucial para la integridad de las uniones célula-célula y la diferenciación y remodelación celular. Las alteraciones en dicha regulación espacio-temporal son causas potenciales de anomalías embrionarias. Durante la embriogénesis preimplantatoria, la formación gradual primero de las UA y luego de las UE en los blastómeros externos de la mórula es fundamental para el desarrollo del trofoectodermo y la cavitación del blastocisto. En particular, la ZO-1 tiene un papel importantísimo en el proceso de diferenciación de mórula a blastocisto. Las proteínas de las UE, como ZO-1, ocludina y claudina, se reúnen en la zona de contacto apicolateral de los blastómeros. Este proceso de montaje de las UE se produce secuencialmente, durante el período de 24 horas entre la compactación y la formación de la cavidad blastocélica y es sólo después de la fase de montaje final de las UE que el embrión genera un sello entre células epiteliales adyacentes regulando así la permeabilidad entre las células TE y como consecuencia se forma la cavidad blastocélica (18). La inhibición o alteración de alguno de estos componentes afectará notablemente el desarrollo del blastocisto. Previamente, nosotros encontramos retraso de diferenciación en las HT expuestas hasta día 4 de gestación, evidenciado por una mayor proporción de

mórulas, en detrimento de la diferenciación de blastocistos. Este resultado sugiere que las alteraciones, inducidas por la exposición a alcohol, de las UE y UA pueden estar involucradas en esta detención del desarrollo embrionario. Por un lado, aunque la ZO-1 se encontró localizada en posición submembranosa con una expresión débil y discontinua, se hallaron acúmulos granulares perinucleares lo que indicó no sólo deslocalización de esta proteína en las UE sino también un posible incremento en la expresión citoplasmática trofoectodérmica. Por su parte, la marca de E-cadherina se localizó en los contactos membranosos intercelulares en ambos grupos de embriones, pero en los blastocistos de las HT se presentó discontinua, distorsionada y engrosada o con acumulaciones, sugiriendo que frente a la disrupción de las uniones adherentes, se induce una respuesta celular con aumento de su expresión. En concordancia con los resultados de este trabajo, previamente hallamos que la expresión proteica de N- y E-cadherina se encuentra incrementada en embriones organogénicos al día 10 de gestación luego de la exposición periconcepcional a alcohol (9). Si bien otros autores demostraron que embriones *knock-out* para E-cadherina no logran desarrollarse más allá del estadio de mórula, aunque se compacten (27, 28), sugerimos que la exposición *in vivo* a alcohol induce sobre-expresión de ZO-1 y E-cadherina como una respuesta compensatoria a la disrupción o debilitamiento de estas uniones intercelulares en los embriones preimplantativos.

La interrupción de la formación de la UE mediada por ZO-1 conduciría a la detención del desarrollo embrionario en la etapa de mórula. En tal sentido, ha sido bien establecido que la capa epitelial, en este caso del trofoectodermo, requiere en primer lugar de la formación de UA (E-cadherina) que ayuda a construir y

establecer las UE (20). Es importante destacar que las primeras etapas en la biogénesis de las UE dependen de la adhesión de E-cadherina, componente integral de membrana de las UA que, si es inhibida, provoca el montaje de las UE al azar en la membrana, alterando así la formación del epitelio trofoectodérmico. Estas dos redes de uniones intercelulares regulan conjuntamente la fuerza de adhesión entre las células que permiten la formación de epitelios. En ausencia de ZO-1, las uniones adherentes (E-cadherina) no proporcionarían suficiente sostén a las células externas de la mórula para iniciar la acumulación de líquido en el interior del embrión y su cavitación. Los resultados del presente trabajo sugieren que la exposición perigestacional a alcohol induciría alteraciones en el programa de biogénesis de las UE y UA en los blastocistos por pérdida de la co-localización de la E-cadherina con la ZO-1 en la membrana y submembrana respectivamente. Las anomalías en las uniones intercelulares tienen claras implicancias en la diferenciación epitelial del embrión y por ende en la dismorfogénesis de los blastocistos en cuanto al desarrollo de la cavidad, ya que la inhibición o el desarrollo anormal de las uniones en las membranas celulares fue asociado con la inhibición del proceso de cavitación y formación del blastocele (29, 30, 31).

Los efectos deletéreos de la exposición a alcohol hasta estadio de gastrulación (día 8 de gestación) en los tejidos embrionarios parecen seguir un patrón inverso. En el ectodermo embrionario primitivo la expresión de E-cadherina resultó deficiente. Una potencial relación con las alteraciones histológicas de estos tejidos, como la desorganización tisular y las anomalías morfológicas nucleares y la apoptosis descritas previamente (13) pueden vincularse a la pérdida de adhesión celular por

disrupción de la expresión de E-cadherina. Las anomalías de las uniones celulares constituyen importantes mecanismos inductores de posteriores defectos del desarrollo embrionario. Recientemente nosotros demostramos aumento de embriones organogénicos con anomalías del desarrollo del cierre del tubo neural (apertura permanente) y con alteraciones celulares y nucleares del mesodermo luego de la exposición periconcepcional a alcohol hasta el día 10 de gestación (9). Aunque en estos estadios embrionarios la expresión de E-cadherina se encontró incrementada comparando con la expresión de los embriones de las HC, no se descarta la posibilidad que el efecto nocivo del alcohol sobre la expresión de las moléculas de las UE y UA, sea dependiente de tejido y del estadio embrionario según los requerimientos moleculares necesarios en la biogénesis de estas uniones durante el desarrollo.

Finalmente, las moléculas de adhesión cumplen importantes funciones en los estadios iniciales y avanzados de la embriogénesis, donde predominan eventos de diferenciación celular, crecimiento y proliferación. Las cadherinas son críticas para la determinación y el mantenimiento de la diferenciación y de la arquitectura de tejidos epiteliales (19). La E-cadherina es importante durante la embriogénesis ya que cambios en su patrón de expresión espacio-temporalmente tiene un marcado impacto en la mecánica de adhesión de las células y en la integridad epitelial necesaria para el transporte transepitelial (21). En tal sentido, la expresión alterada de la E-cadherina

está involucrada en la transición epitelio-mesenquimal y la adquisición de un fenotipo de migración (22). En consecuencia, la pérdida de E-cadherina puede intervenir en la transformación de las células epiteliales en mesenquimáticas durante la formación de mesodermo. Por otra parte, las UE contribuyen al mantenimiento de la polaridad de la membrana celular y regulan la barrera de permeabilidad paracelular para iones y moléculas de acuerdo a su tamaño y carga. Finalmente, ambos tipos de unión, funcionan además como mediadores en la señalización intracelular, controlando aspectos tales como la proliferación y expresión génica.

En conclusión, la ingesta prolongada de alcohol desde antes de la gestación y hasta estadios peri-implantatorios induce dismorfogénesis embrionaria y pérdida gestacional temprana en el modelo murino CF-1, por daño en las uniones intercelulares, siendo particularmente afectadas las moléculas E-cadherina de las uniones adherentes y la ZO-1 de las estrechas, en los blastocistos y embriones en gastrulación.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a la Lic. Ayelén Dran por su asistencia técnica en el manejo animal en el Bioterio Central de la FCEN, UBA. Este trabajo fue sostenido con subsidios de los proyectos: PIP-CONICET 114-200801-00014 del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Argentina, y del BID-PICT-2008-2210 de la Agencia Nacional de Ciencia y Tecnología, Argentina.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Astley SJ (2004) Fetal alcohol syndrome prevention in Washington State: evidence of success. *Paediatr Perinat Epidemiol* 18:344-351.
2. Hoyme HE, May PA, Kalberg WO, Kodituwakku P, Gossage JP, Trujillo PM, Buckley DG, Miller JH, Aragon AS, Khaole N, Viljoen DL, Jones KL (2005) A practical clinical approach to diagnosis of fetal alcohol spectrum disorders: clarification of the 1996 institute of medicine criteria. *Pediatrics* 115:39-47.

3. Haycock PC, Ramsay M (2009) Exposure of Mouse Embryos to Ethanol During Preimplantation Development: Effect on DNA Methylation in the H19 Imprinting Control Region. *Biol Reprod* 81:618–627.
4. Cebal E, Lasserre A, Motta A, Gimeno MAF (1998) Mouse oocyte quality and prostaglandin synthesis by cumulus oocyte complex after moderate chronic ethanol intake. *Prost Leuk Ess Fatty Ac* 58:381–87.
5. Cebal E, Lasserre A, Rettori V, et al (1997) Impaired mouse fertilization by low chronic alcohol treatment. *Alcohol Alcoholism* 32 (5):563–572.
6. Cebal E, Lasserre A, Rettori V, et al (1999) Deleterious effects of chronic moderate alcohol intake by female mice on preimplantation embryo growth in vitro. *Alcohol Alcoholism* 34(4):551–558.
7. Cebal E, Lasserre A, Rettori V, Gimeno MAF (2000) Alterations in preimplantation *in vivo* development alter preconceptional chronic moderate alcohol consumption in female mice. *Alcohol Alcoholism* 35 (4):336–43.
8. Cebal E, Rettori V, Gimeno MA (2001) Impact of chronic low-dose alcohol ingestion during sexual maturation of female mice on in-vitro and in-vivo embryo development. *Reprod Toxicol* 15:123–29.
9. Coll TA, Perez-Tito L, Sobarzo CMA, Cebal E (2011) Embryo developmental disruption during organogenesis produced by CF-1 murine periconceptional alcohol consumption. *Birth Defects Res B* 92:560–574.
10. Pérez-Tito L, Bevilacqua E and Cebal E (2013) Peri-implantational in vivo and in vitro embryo-trophoblast development after perigestational alcohol exposure in CD-1 mouse. *Drug Chem Toxicol*, DOI: 10.3109/01480545.2013.834358, <http://informahealthcare.com/dct>.
11. Pérez Tito L, Coll T, Kotler M, Mudry M y Cebal E (2009). Posibles causas de aborto temprano relacionadas con la ingesta leve periconcepcional de alcohol. Susceptibilidad núcleo-citoplasmática de embriones perimplantatorios e interfase materno-embrionaria murina. XVI Congreso Argentino de Toxicología. Ciudad de Madryn, Chubut. 24 al 27 de junio de 2009. *Acta Toxicológica Argentina*, vol. 17 (suppl.), pag: 48–49.
12. Theiler K (1989) *The House Mouse: Atlas of Embryonic Development*. New York: Springer-Verlag.
13. Pérez Tito LG, Coll TA, Cebal E (2012) Relación entre alteraciones núcleo-citoplasmáticas y anomalías en la expresión de metaloproteasas en sitios de implantación por consumo periconcepcional de alcohol hasta fase de gastrulación en el ratón. LVII Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica. 14 y 17 de noviembre de 2012, Mar del Plata. *Medicina*, Vol. 72- (Supl. II)-pg.: 174.
14. Johnson MH, McConnell JML (2004) Lineage allocation and cell polarity during mouse embryogenesis. *Sem Cell Dev Biol* 15:583–597.
15. Ziomek CA, Johnson MH (1980) Cell surface interactions induce polarization of mouse 8-cell blastomeres at compaction. *Cell* 21:935–942.
16. Fleming TP, Sheth B, Fesenko I (2001) Cell adhesion in the preimplantation mammalian embryo and its role in trophectoderm differentiation and blastocyst morphogenesis. *Front Biosci* 6: D1000–D1007.
17. Eckert JJ, Fleming TP (2008) Tight junction biogenesis during early development. *Biochem Biophys Acta* 1778:717–728.
18. Sheth B, Fontaine JJ, Ponza E, McCallum A, Page A, Citi S, Louvard D, Zahraoui A, Fleming TP (2000) Differentiation of the epithelial apical junctional complex during mouse preimplantation development: a role for rab13 in the early maturation of the tight junction. *Mech Dev* 97:93–104.
19. Takeichi M (1991) Cadherin cell adhesion receptors as a morphogenetic regulator. *Science* 251:1451–1455.
20. Gumbiner BM (2000) Regulation of cadherin adhesive activity. *J Cell Biol* 148:399–403.
21. Wheelock MJ, Shintani Y, Maeda M, et al (2008) Cadherin switching. *J Cell Sci* 121:727–735.
22. Savagner P (2001) Leaving the neighborhood: molecular mechanisms involved during epithelial-mesenchymal transition. *BioEssays* 23:912–923.
23. Tolivia J, Navarro A, Del Valle E, Perez C, Ordonez C, Martinez E (2006) Application of Photoshop and Scion Image analysis to quantification of signals in histochemistry, immunocytochemistry and hybridocytochemistry. *Anal Quant Cytol Histol* 28:43–53.
24. Fong B, Watson PH, Watson AJ (2007) Mouse preimplantation embryo responses to culture medium osmolarity include increased expression of CCM2 and p38 MAPK activation. *BMC Dev Biol* 7:2.
25. Wang H, Ding T, Brown N, Yamamoto Y, Prince LS, Reese J, Paria B (2008) Zonula occludens-1 (ZO-1) is involved in morula to blastocyst transformation in the mouse. *Developmental Biology* 318:112–125.
26. Tunggal JA, Helfrich I, Schmitz A, et al (2005) E-cadherin is essential for in vivo epidermal barrier function by regulating tight junctions. *The EMBO Journal* 24:1146–1156.
27. Larue L, Ohsugi M, Hirchenhain J, Kemler R (1994) E-cadherin null mutant embryos fail to form a trophectoderm epithelium. *Proc Natl Acad Sci USA* 91:8263–8267.
28. Ohsugi M, Larue L, Schwarz H, Kemler R (1997) Cell-junctional and cytoskeletal organization in mouse blastocysts lacking E-cadherin. *Dev Biol* 185:261–271.
29. Thomas FC, Sheth B, Eckert JJ, Bazzoni G, Dejana E, Fleming TP (2004) Contribution of JAM-1 to epithelial differentiation and tight-junction biogenesis in the mouse preimplantation embryo. *J Cell Sci* 117:5599–608.
30. Sheth B, Moran B, Anderson JM, Fleming TP (2000) Post-translational control of occludin membrane assembly in mouse trophectoderm: a mechanism to regulate timing of tight junction biogenesis and blastocyst formation. *Development* 127:831–40.
31. Kim J, Gye MC, Kim MK (2004) Role of occludin, a tight junction protein, in blastocoel formation, and in the paracellular permeability and differentiation of trophectoderm in preimplantation mouse embryos. *Mol Cells* 17:248–54.