

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA.

**DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
Unidad Iztapalapa.**



Casa abierta al tiempo

**PATRON DE DISTRIBUCIÓN DE LA CADHERINA-E EN
EMBRIONES DE 4, 6 Y 8 BLASTÓMEROS DE HEMBRAS
HEMBRAS NULÍPARAS JÓVENES, ADULTAS Y MULTÍPARAS
DE HÁMSTER SIRIO DORADO.**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

PRESENTA

MenBRA. ALFREDO TREJO CÓRDOVA

**DIRECTOR DE TESIS:
Dr. ADOLFO ROSADO GARCÍA**

**ASESORA:
DRA. MARÍA DEL CARMEN NAVARRO MALDONADO**

**ASESOR:
DR. LUIS FELIPE JIMENEZ GARCÍA**

MÉXICO, D.F.

“El Doctorado en Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma Metropolitana pertenece al Padrón de Posgrados de Excelencia del CONACYT y además cuenta con el apoyo del mismo Consejo con el convenio PFP-20-93”

El jurado designado por la
División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Unidad Iztapalapa aprobó la tesis

PATRÓN DE DISTRIBUCIÓN DE LA CADHERINA-E EN EMBRIONES DE 4,6 Y 8
BLASTÓMEROS DE HEMBRAS NULÍPARAS JÓVENES, ADULTAS Y MULTÍPARAS DE
HAMSTER SIRIO DORADO

que presentó

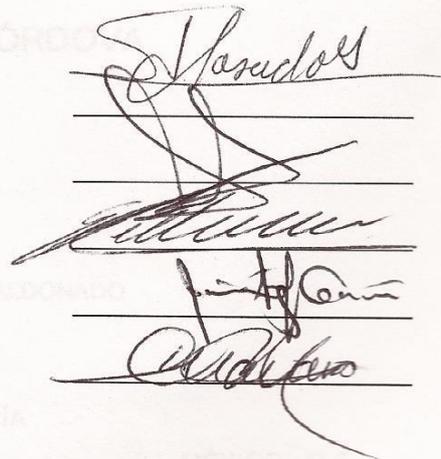
ALFREDO TREJO CÓRDOVA

Comité Tutorial:

Director: Dr. Adolfo Rosado García
Asesor: Dra. María Del Carmen Navarro Maldonado
Asesor: Dr. Luis Felipe Jiménez García

Jurado:

Presidente: Dr. Adolfo Rosado García
Secretario: Dr. Demetrio Alonso Ambríz García
Vocal: Dr. Enrique Pedernera Astegiano
Vocal: Dr. Luis Felipe Jiménez García
Vocal: Dra. María Del Carmen Navarro Maldonado



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA.

**DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
Unidad Iztapalapa.**



Casa abierta al tiempo

**PATRON DE DISTRIBUCIÓN DE LA CADHERINA-E EN
EMBRIONES DE 4, 6 Y 8 BLASTÓMEROS DE HEMBRAS
HEMBRAS NULÍPARAS JÓVENES, ADULTAS Y MULTÍPARAS
DE HÁMSTER SIRIO DORADO.**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

PRESENTA

MenBRA. ALFREDO TREJO CÓRDOVA

**DIRECTOR DE TESIS:
Dr. ADOLFO ROSADO GARCÍA**

**ASESORA:
DRA. MARÍA DEL CARMEN NAVARRO MALDONADO**

**ASESOR:
DR. LUIS FELIPE JIMENEZ GARCÍA**

MÉXICO, D.F.

INDICE

	Pag.
1.- INTRODUCCIÓN	4
1.1 Desarrollo embrionario preimplantacional	5
1.1.1. Fertilización	5
1.1.2. Proceso de segmentación	7
1.1.3. Activación del genoma embrionario	11
1.1.4. Compactación	12
1.1.5. Formación del blastocisto	14
1.2 Asincronía del desarrollo embrionario temprano	17
1.3. Transporte embrionario.	19
1.3.1. Regulación hormonal	20
1.3.2. Regulación por factores embrionarios	21
1.4. Adhesión celular	23
1.5. Moléculas de adhesión celular	28
1.5.1. Cadherina-E	33
1.5.1.1 Características estructurales	34
1.5.1.1.1. Dominio Extracelular	34
1.5.1.1.2. Dominio Intracelular	35
1.5.1.2. Características funcionales	37
1.5.1.2.1. Adhesión celular	37
1.5.1.2.1.1 Adhesión homofilica	37
1.5.1.2.2. Señalización	38
2.- JUSTIFICACIÓN	40

3.- HIPOTESIS	44
4.- OBJETIVOS	46
5.- MATERIAL Y MÉTODOS	48
5.1.Soluciones y reactivos	49
5.2. Animales.	49
5.3. Grupos experimentales.	50
5.4. Apareamientos.	50
5.5. Obtención de embriones.	50
5.6. Análisis estadístico.	52
6.- RESULTADOS	53
7.- DISCUSIÓN	65
8.- CONCLUSIONES	79
9.- BIBLIOGRAFÍA	81
10.- ARTICULOS PUBLICADOS	91

INTRODUCCIÓN

1.1. DESARROLLO EMBRIONARIO PREIMPLANTACIONAL

El desarrollo embrionario temprano o preimplantacional se define como el periodo comprendido entre la formación del cigoto (fertilización) y la implantación del blastocisto en el endometrio (Alberts et al., 2002). Durante este periodo el desarrollo del embrión se caracteriza por un aumento en el número de células y la realización de algunos cambios morfológicos como son la compactación celular y la formación del blastocisto (Ruddock-D´Cruz et al., 2007). A la par de estos cambios morfológicos ocurren cambios metabólicos sumamente complejos y extraordinariamente bien regulados, que incluyen la activación del genoma embrionario y el inicio de la diferenciación celular (Fleming et al., 2004).

1.1.1. Fertilización

La fertilización, se define como la unión de las dos células reproductoras o gametos, espermatozoides y ovocitos (Wassarman et al., 2005), dicho proceso conduce a la formación de un embrión de una célula, llamado cigoto o huevo. La fertilización en mamíferos consiste de varios procesos que deben ocurrir de manera ordenada y precisa (Fig 1):

1º. La fijación de espermatozoides capacitados, pero con acrosomas intacto, a la zona pelúcida del ovocito maduro,

2º. La reacción acrosomal del espermatozoide,

3º. Penetración del espermatozoide, después de sufrir la reacción acrosomal, a través de la zona pelúcida,

4º. Fusión del espermatozoide a la membrana plasmática del ovocito,

5º. Penetración del espermatozoide al interior del ovocito (generalmente solo penetra la cabeza) y

6º. Las reacciones cortical y de zona del ovocito (Wassarman, 2003, Wassarman et al., 2005).

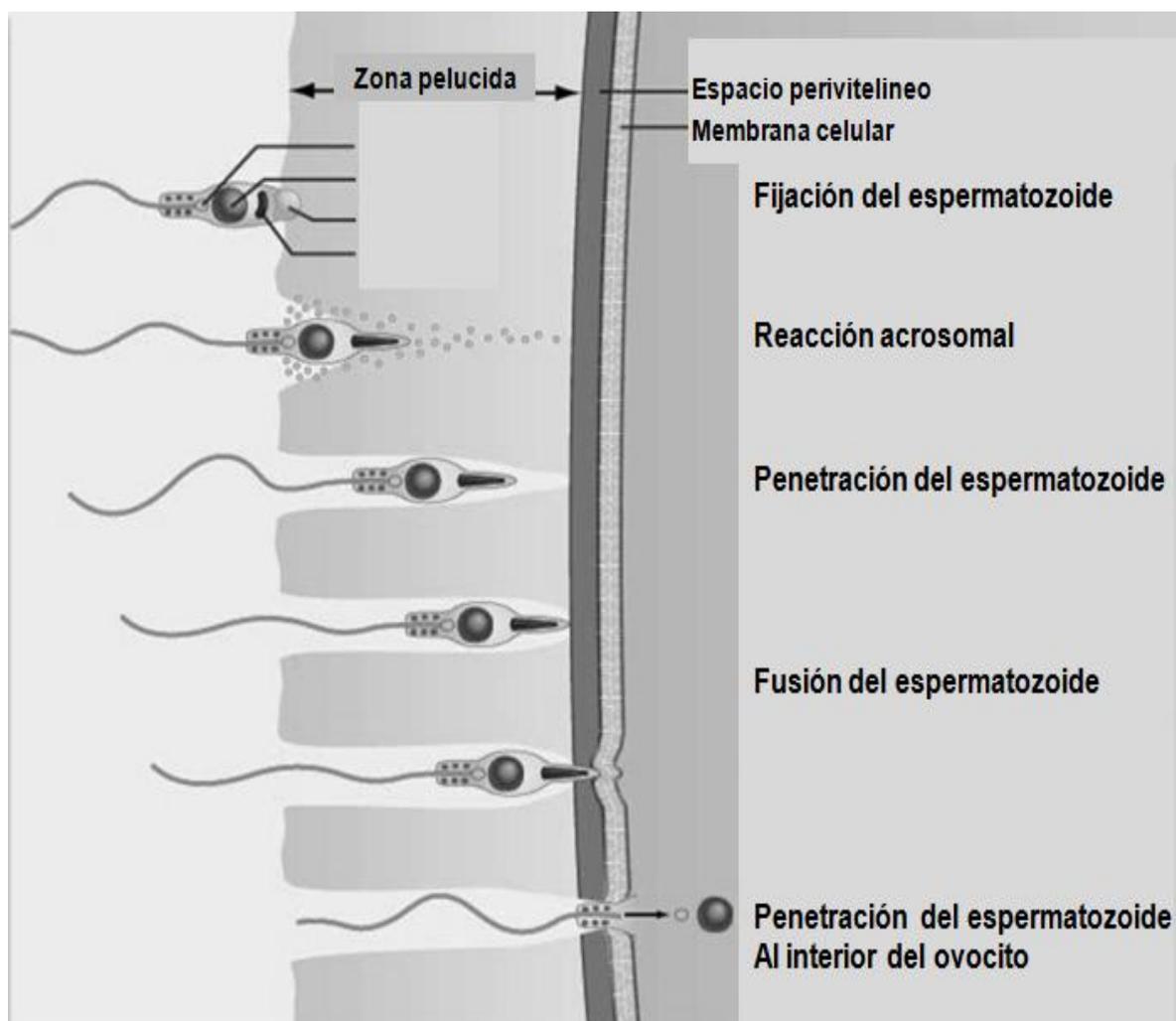


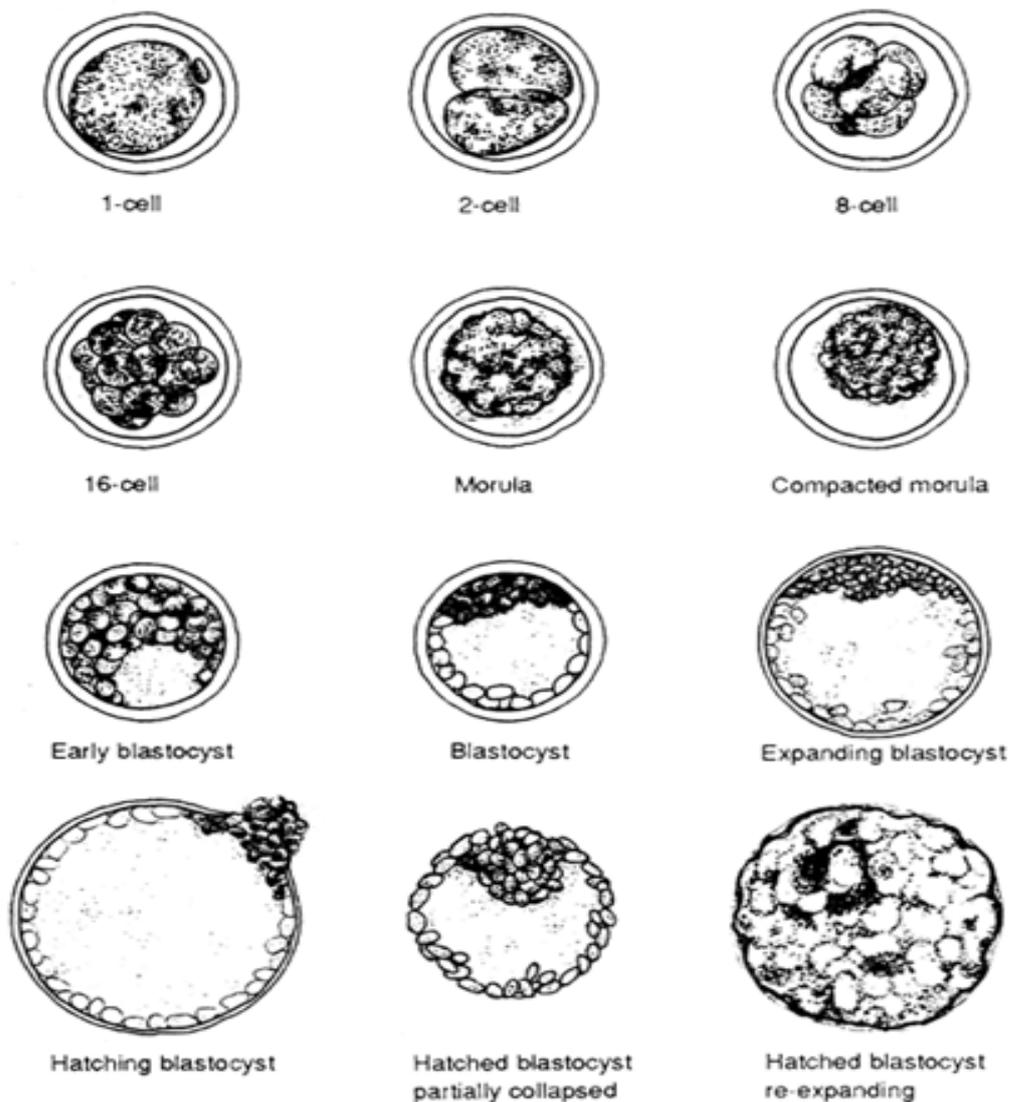
Figura 1. Proceso de fertilización

Posteriormente se realiza la reanudación de la meiosis del ovocito, hasta ese momento detenido en la profase I de la segunda división meiótica, la formación de los pronúcleos masculino y femenino (Storey,1995) y la singamia.

La capacitación espermática y la maduración meiótica de los ovocitos son procesos que ocurren antes de la fertilización, pero de igual forma son necesarios para que esta se lleve a cabo (Yanagimachi, 1994).

1.1.2. Proceso de segmentación

El cigoto, producto de la fertilización, aumentará el número de sus células a través de una serie de divisiones mitóticas, proceso conocido como segmentación, que dará por resultado un aumento en el número de células que tienen la característica de ser cada vez más pequeñas (Fig 2). Las células derivadas de la segmentación son conocidas como blastómeros (Gilbert,1994). Una característica importante de las primeras divisiones mitóticas es su sincronía, la cual perdura hasta la etapa previa al proceso conocido como compactación, o aún después según la especie animal, hasta la formación del blastocisto.



Existen varios tipos de segmentación dependiendo de cómo se lleven a cabo las divisiones mitóticas. Una clasificación de la segmentación se basa en la cantidad y localización del vítelo, lo cual determina la velocidad con que las células se dividen. La segmentación es más rápida en las zonas donde no hay vítelo, mientras que en la zona donde sí hay vítelo la segmentación es más lenta o no se realiza. De acuerdo a esta clasificación existen dos tipos de segmentación: la total u holoblástica y la parcial o meroblástica (Gilbert, 1994).

Segmentación holoblástica

Dentro de este tipo de segmentación hay tres subtipos: radial, bilateral, espiral (Fig. 3).

La segmentación **holoblástica radial** es típica de los huevos isolecitos: Celentéreos, equinodermos y mamíferos. En este tipo de segmentación los dos primeros planos de segmentación son verticales y en ángulo recto el uno con el otro. El tercer plano de segmentación es horizontal y doble, y se presenta a nivel del plano ecuatorial de la célula. El cuarto plano es vertical, doble y las células de cada hemisferio vuelven a dividirse. El quinto plano es horizontal y doble, la secuencia se repite y este proceso da lugar a células iguales llamadas blastómeros (Carlson, 2005).

La segmentación **holoblástica bilateral** es clásica de los huevos telolecitos (anfibios, anélidos, moluscos). Como el vítelo interfiere en la segmentación de los planos, esta será más rápida en el hemisferio animal (sin vítelo). Las células obtenidas son llamadas micrómeros. En el hemisferio vegetal hay una segmentación pero es más lenta y las células obtenidas son llamadas macrómeros (Goodwin y Lacroix, 1984).

La segmentación **holoblástica en espiral**, es una segmentación total y desigual que se presenta en un tipo especial de huevos telolecitos (gasterópodos, lamelibranquios) (Hickman et al., 2006). En este tipo de segmentación las dos primeras divisiones se realizan de la misma manera que en los casos anteriores, sin embargo, a partir del tercer plano de segmentación, éste ya no está orientado en dirección vertical u horizontal formando ángulo de 90° con el anterior, sino que

muestra una rotación de 45°. Esta inclinación sigue produciéndose y se van alternando los macrómeros y los micrómeros.

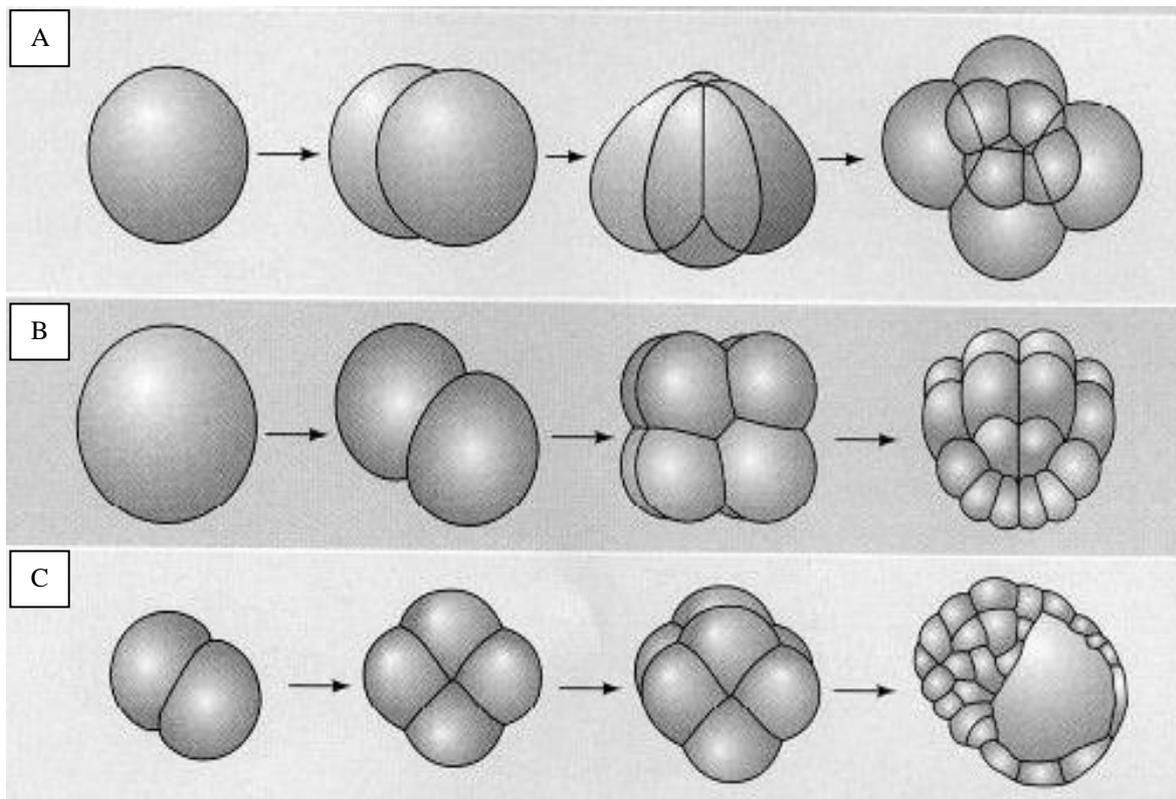


Figura 3. Tipos de segmentación holoblástica. a) Espiral, b) bilateral y c) Radial.

Segmentación meroblástica

En este tipo de segmentación hay dos subtipos: discoidal y superficial (Figura 4).

Segmentación discoidal. Es la más habitual en los huevos telolecíticos. La división solo afecta a un disco citoplásmico próximo al polo animal y la parte inferior (polo vegetativo) no se segmenta; a continuación se forma un disco de blastómeros, el blastodermo o blastodisco, a partir del cual se formará el embrión, que reposará sobre la masa vitelina (Kimmel y Law, 1985). Este tipo de segmentación ocurre en peces, reptiles y aves, entre otros.

Segmentación superficial. Es típica de los huevos centrolecíticos. El núcleo se divide repetidas veces sin que aparezcan límites celulares definidos dentro de la masa vitelina; luego, los núcleos emigran al citoplasma periférico y se disponen formando una capa sincicial; finalmente surgen los límites celulares que delimitan un blastodermo periférico alrededor del vítelo central no segmentado (Gilbert,1994). Este tipo de segmentación ocurre en los artrópodos.

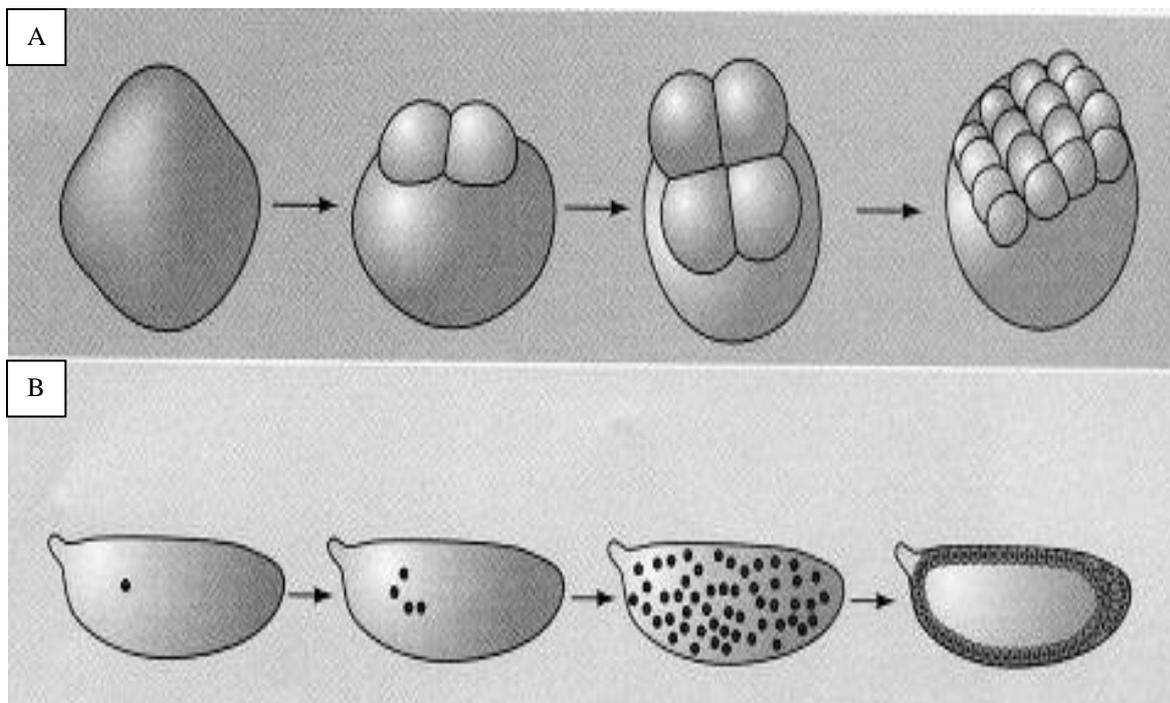


Figura 4. Tipos de segmentación meroblastica. A) discoidal y B) superficial.

1.1.3. Activación del genoma embrionario

Los ovocitos de mamíferos detenidos en la profase I de la segunda división meiótica están transcripcionalmente activos, producen y almacenan una gran cantidad de ARNm y proteínas que serán requeridas para la embriogénesis temprana (Minami et al., 2007). Durante la maduración meiótica del ovocito y las etapas iniciales del

desarrollo embrionario, la maquinaria transcripcional del ovocito y del cigoto es silenciada. En los mamíferos, dependiendo de la especie, ocurre la activación del genoma embrionario o ZGA (por sus siglas en inglés Zygotic Gene Activation) durante alguna de las fases de la segmentación (Latham y Schultz, 2001).

La ZGA es un evento importante que regula la transición del control materno al control embrionario del desarrollo. En el ratón, el inicio de la activación del genoma embrionario ocurre durante la etapa de dos células (Qiu et al., 2003). Inicio que depende, sin embargo, de las proteínas de origen materno y de las modificaciones post-transcripcionales de estas proteínas (Schultz, 1993).

La ZGA ocurre en dos etapas, una activación limitada ocurre entre las 18 y 21 h post-fertilización y una activación principal ocurre entre las 26 y 29 h post-fertilización (Flach et al., 1982). Aunque el primer signo de una mayor actividad transcripcional por el genoma embrionario aparece durante la etapa de 2 células, recientemente una medición más sensible realizada en un embrión en la etapa de 1 células ha sugerido que la activación del genoma embrionario puede iniciar en la etapa de 1 célula (Ram y Schultz, 1993).

1.1.4. Compactación

Cuando el embrión se ha desarrollado hasta la etapa de 8, 16 y aún 32 blastómeros según la especie animal de que se trate, después del tercer ciclo mitótico en el hámster, comienzan a formarse uniones adherentes entre los blastómeros aumentando su superficie de contacto, dando origen a una estructura celular

altamente compacta (Figura 5) (Mayor e Izquierdo, 1994), de ahí que este proceso es conocido como compactación (Kidder et al., 1990).



Figura 5. Embrión de 8 células compactado

Los contactos celulares que se desarrollan durante esta etapa son debido a la presencia de una molécula de adhesión dependiente de calcio, llamada Cadherina-E (Uvomorulina), la cual se distribuye progresivamente hacia las áreas de contacto celular conforme se va compactando el embrión y permanece ausente de las áreas apicales de las células polarizadas (Johnson et al., 1986).

Durante este proceso también ocurren algunos cambios a nivel de la organización de las membranas y del citoplasma de los blastómeros, dando origen a otra característica de la compactación, la polarización. La polarización de las células externas es evidente por la migración basal del núcleo y la acumulación apical de actina, clatrina, endosomas y microvellosidades (Suzuki *et al.*, 1999).

Se ha definido a la compactación como el primer evento de diferenciación celular que ocurre durante el desarrollo embrionario (Pratt et al., 1982). En un embrión compactado se pueden observar ya de manera preliminar dos poblaciones diferentes de blastómeros, los externos y los internos. Esta separación será manifiesta al formarse la mórula como resultado de la compactación. Es en este estadio del desarrollo del embrión donde se manifiesta con claridad una diferenciación celular ya que una mórula está formada por dos tipos de poblaciones celulares, las externas o polares, destinadas a la formación del trofoectodermo y que posteriormente darán origen a la placenta, y las internas o no polares, destinadas a la formación de la masa celular interna (MCI) y que formarán al embrión-feto (Fleming et al., 2001).

1.1.5. Formación del Blastocisto

Después de la etapa de mórula, el embrión continúa su desarrollo hasta formar un blastocisto, etapa en la cual se lleva a cabo la implantación del embrión en el útero. Cuando el embrión tiene aproximadamente 32 células, las células externas comienzan a bombear un fluido hacia los espacios intercelulares y posteriormente hacia los espacios extracelulares, formando una cavidad llamada blastocele (Borland et al., 1977), iniciándose así la formación del blastocisto (Figura 6). En blastocisto está bien claramente formado por dos tipos de células funcional y estructuralmente distintas: las células de la MCI las cuales darán origen al embrión mismo, y las células del trofoectodermo las cuales estarán involucradas en la formación de la placenta y de las membranas extraembrionarias (Gilbert,1994).

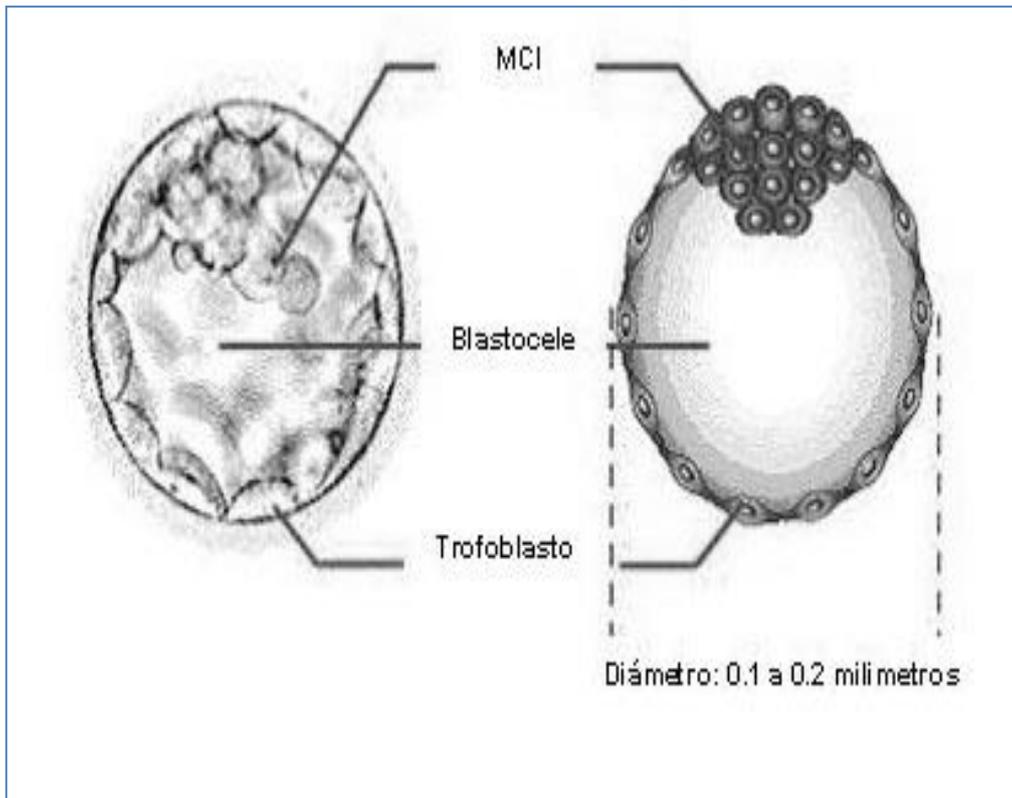


Figura 6. Embrión en la etapa de blastocisto

Sin embargo, el mecanismo a través del cual se lleva a cabo la formación del blastocisto no ha sido totalmente establecido. A este respecto, Yamanaka et al. (2006) hacen una revisión de los posibles mecanismos utilizados para regular la formación del blastocisto en el ratón.

Se han propuesto dos mecanismos involucrados en la formación del blastocisto:

- a) El modelo interno-externo
- b) El modelo de la polaridad celular

Modelo interno-externo

Modelo propuesto por Tarkowski y Wroblewska en 1967, según estos autores el destino de un blastómero que está conformando al blastocisto es establecido debido a la posición que tienen durante el estadio de mórula tardía, es decir, externa o interna. Según este modelo, la posición del blastómero en el embrión podría afectar su destino a través de varias vías, por ejemplo: el contacto celular podría informar a la célula su posición y por lo tanto determinar su destino celular. Las células internas tendrían contactos simétricos con las células que los rodean, mientras que las células externas tendrían contactos asimétricos con otras células.

Modelo de la polaridad celular

A diferencia del modelo interno-externo, el modelo de la polaridad celular propuesto por Johnson et al. (1981) propone que el destino celular en un blastocisto es establecido antes de la etapa de mórula. Según este modelo, el destino de un blastómero es establecido durante la etapa de 8 células a través del establecimiento de una polaridad celular. Las divisiones posteriores a esta etapa dan como resultado una distribución simétrica y asimétrica de la información de la polaridad dependiendo del plano de la división celular.

Cuando la división es de manera paralela al eje radial da por resultado la formación de dos células idénticas, ambas polarizadas. Estas células podrían estar destinadas a la formación de la línea del trofoectodermo. Mientras que una división perpendicular al eje da por resultado la formación de dos células diferentes una polar

y una no polar, proporcionando células para las dos líneas celulares que conforman al blastocisto, trofoectodermo y masa celular interna.

Aunque el mecanismo responsable de la formación del blastocisto no ha sido totalmente establecido, algunos eventos que ocurren durante este proceso son actualmente bien conocidos. Por ejemplo: las células del trofoectodermo adquieren las características de células epiteliales y comienzan a aplanarse y juntarse unas con otras a través de uniones estrechas (Ducibella y Anderson, 1975). Se sabe que hay una participación importante de los sistemas de transporte iónico del trofoectodermo en el establecimiento de gradientes iónicos a través del epitelio, que proporcionan la fuerza necesaria para mover agua hacia el fluido blastocélico. Pruebas de microanálisis electrónico de Na, Cl, K, Ca² y Mg² han mostrado que todos estos iones se encuentran concentrados dentro del fluido blastocélico (Borland et al, 1977). Los mecanismos de transporte activo requeridos para mover Na y Cl en contra de sus gradientes de concentración involucran la bomba de Na-K que ha sido localizada en el dominio basolateral del trofoectodermo (Benos et al., 1985). La presencia de uniones estrechas es también necesaria y tiene un papel multifuncional, proporcionando una pared impermeable que permite la acumulación de fluido, regulando el transporte para celular y contribuyendo a la polarización de la distribución de la ATPasa de Na-K (Watson et al., 1990).

1.2. Asincronía del desarrollo embrionario temprano

En especies que tienen la capacidad de gestar varias crías a la vez (politocas) se puede llegar a presentar un desfase en las etapas tempranas de la

segmentación entre los productos de esa gestación, este proceso es conocido como asincronía (Tsunoda *et al.*, 1985).

Entre las causas de este fenómeno se encuentran el tiempo de ovulación, el transporte de espermatozoides y del cigoto, la activación del ovocito, los factores internos del cigoto que controlan el proceso de segmentación, el ambiente donde estos procesos ocurren (Avery *et al.*, 1992) y la edad y paridad de las hembras (Navarro *et al.*, 2000; Trejo *et al.*, 2005). Sin embargo, son pocos los estudios que se han realizado para tratar de comprender este fenómeno.

Sato y Yanagimachi en 1972, utilizando hembras de hámster Sirio Dorado (*Mesocricetus auratus*) jóvenes (de 2 a 3 meses de edad y peso de 90 a 120 g) encontraron una sincronía relativa en las etapas tempranas de la segmentación, ya que en el día uno de la gestación hubo embriones de 1 a 2 blastómeros, en el día dos, de 2 a 4 blastómeros, en el tercer día, de 4 y 8 blastómeros y finalmente al cuarto día, blastocistos tempranos y expandidos.

En contraparte, Nieder y Caprio (1990), utilizando hembras de hámster Siberiano (*Phodopus sungorus*) nulíparas, reportaron una marcada asincronía en las etapas tempranas de la segmentación ya que al tercer día postcoito recuperaron embriones en diferentes etapas de la segmentación (2, 4, 6 y 8 blastómeros), mientras que en el cuarto día postcoito encontraron embriones en etapa de mórula, blastocisto e incluso de 4 y 8 blastómeros.

1.3. Transporte Embrionario.

Una vez que se ha llevado a cabo la fertilización, en la región ampular del oviducto, el cigoto o embrión, que carece de movilidad propia, tiene que ser transportado a través del oviducto (Figura 7) hasta el sitio de implantación en el útero (Villalón *et al.*, 1999), utilizando para ello varios mecanismos entre los que se encuentran la contracción de la musculatura lisa, el movimiento de las células ciliadas y del fluido oviductal en dirección al útero (Martinez *et al.*, 2000).

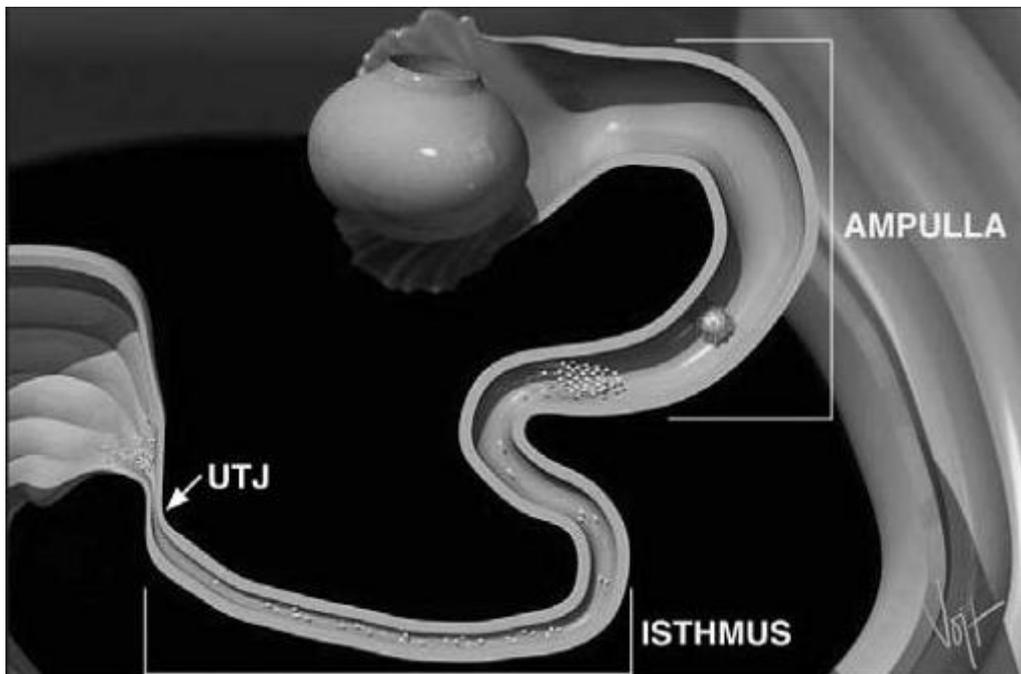


Figura 7. Transporte embrionario a través del oviducto

La duración del transporte oviductal debe ser la adecuada ya que si el embrión entra de manera anticipada al útero, puede ser expulsado a través de la vagina, mientras que una estancia mayor de los embriones en el oviducto puede disminuir su viabilidad (Velasquez *et al.*, 1995).

El que el embrión precise de un tiempo óptimo para su transporte a través del oviducto, hace pensar que se requieren mecanismos específicos para regular este proceso como son:

a) Regulación hormonal

b) Regulación a través de factores embrionario (Velásquez et al., 2001).

1.3.1. Regulación hormonal

El estradiol y la progesterona secretadas por el ovario tienen un papel importante en la regulación del transporte embrionario (Wu *et al.*, 1971; Ortiz *et al.*, 1979) a través de receptores intracelulares oviductales que controlan la síntesis de proteínas (Orihuela *et al.*, 2001a). El estradiol aumenta la velocidad del transporte embrionario (Rios et al., 2007), mientras que la progesterona ejerce un efecto contrario, sin embargo este comportamiento varía dependiendo de la especie, la dosis y el tiempo de administración (Villalón *et al.*, 1999).

Forcelledo *et al.* (1981) analizando los niveles de estradiol y progesterona y la tasa de transporte del cigoto en ratas, bajo tres condiciones fisiológicas (gestantes, pseudogestantes y ciclando), concluyeron que las diferencias observadas en el paso del embrión a través del oviducto, se relacionaban con los niveles hormonales de cada grupo. Sugiriendo además, que los niveles hormonales postovulatorios son los que más influyen en el transporte del embrión.

Por otra parte, Ortiz *et al.* (1979) estudiando el efecto de la administración de estradiol sobre el transporte embrionario y la fertilidad en ratas, concluyeron que esta hormona acelera el paso del embrión a través del oviducto, y que cuando los embriones entran de manera prematura al útero son expulsados a través de la vagina.

En cuanto al efecto de la progesterona sobre el transporte embrionario, Kendle y Lee en 1980, realizaron un estudio en el ratón para determinar la influencia de esta hormona sobre el paso de los embriones por el oviducto, concluyendo que no existe una relación entre la secreción postovulatoria de esta hormona y el transporte, sin embargo, si se administra la progesterona antes de la ovulación acelera el transporte de los embriones.

1.3.2. Regulación a través de factores de origen embrionario

Ha sido reportado que los embriones y ovocitos son transportados a diferentes velocidades en el oviducto de los murciélagos (Rasweiler, 1979), y de las yeguas (Weber *et al.*, 1991). En estas especies los ovocitos son selectivamente retenidos en el oviducto, mientras que los embriones son transportados hasta el útero.

Lo anterior sugiere que además de la participación de las hormonas ováricas en la regulación del transporte del embrión, existen factores que son producidos y liberados por el mismo embrión y que influyen sobre su paso a través del oviducto (Villalón *et al.*, 1982; Ortiz *et al.*, 1986; Villalón *et al.*, 1999).

A este respecto, Velasquez *et al.* (1995, 2001), realizando un trabajo para determinar la participación del factor activador de plaquetas o PAF (por sus siglas en inglés Platelet-Activating Factor) sobre el transporte embrionario, concluyeron que este factor que es producido y secretado por el embrión de hámster, actúa como señal reguladora para su transporte hacia el útero. Así mismo, se ha demostrado la existencia de receptores al PAF en las células del oviducto, localizadas en proximidad de los embriones y en cuanto a la expresión del RNAm del receptor del PAF, éste se produce principalmente en el endosálpinx, hecho que confirma que el PAF es un regulador parácrino del transporte.

Este factor también tiene un papel importante en la regulación del transporte embrionario en otras especies, en donde se ha reportado la liberación del mismo durante el transporte embrionario por el oviducto. Por otra parte, si el PAF es la señal que facilita el transporte del embrión hacia el útero y esto se realiza como en la rata, por el aumento de las contracciones del miosálpinx, el endosálpinx podría funcionar como una estación de relevo entre el embrión y las células del músculo liso (Villalón *et al.*, 1999; Martínez *et al.*, 2000).

Wijayagunawardane *et al.* (1999a) sugieren que la oleada preovulatoria de hormona luteinizante (LH), la secreción de estradiol proveniente de los folículos y la progesterona proveniente de cuerpos lúteos, tienen un efecto estimulador sobre la producción de prostaglandinas (PGE2 y PGF2-alfa) y endotelina (ET-1) durante el ciclo periovulatorio, ambos compuestos son agentes contráctiles de las células epiteliales del oviducto (Kozuka *et al.*, 1989; Martínez *et al.*, 1998). Se ha sugerido que una elevada concentración de endotelina (ET-1) durante este período podría

inducir la alta actividad contráctil del oviducto, necesaria para facilitar el transporte de gametos o embriones durante el período periovulatorio (Wijayagunawardane *et al.*, 1999b).

La ET-1 contrae a las células del músculo liso por el aumento intracelular de Ca^{2+} , proceso que es mediado a través de uno de los dos receptores propuestos para ET-1, el ET-A, por otra parte a través del receptor ET-B, la ET-1 estimula la liberación de factores relajantes, como el óxido nítrico (ON) (Palmer *et al.*, 1987). El ON ejerce sus efectos relajantes sobre las células del músculo liso a través de la activación de la enzima guanilato ciclasa que se encuentra dentro de estas células, esta enzima genera guanosin monofosfato cíclico (GMPc), seguido por una disminución de Ca^{2+} intracelular. Este agente relajante es sintetizado por la enzima óxido nítrico sintasa a través de la oxidación de L-arginina (Rosselli *et al.*, 1994).

1.4. ADHESIÓN CELULAR

La adhesión o unión celular es mediada por proteínas membranales que actúan como moléculas de adhesión intercelular especializadas y por zonas especializadas de la membrana celular que forman uniones celulares. La fijación de las células a la matriz extracelular o a otras células vecinas mediante moléculas de adhesión como las integrinas, cadherinas, selectinas o las inmunoglobulinas, no sirve sólo para sujetarse o para resistir fuerzas de compresión o de estiramientos. Estas proteínas no tienen una misión con consecuencias únicamente mecánicas para las células, sino de **mecanotransducción**. Cuando se unen a sus "ligandos", los dominios citosólicos de las proteínas de adhesión pueden desencadenar procesos internos

que afectan a la fisiología celular. Así, pueden afectar a ciertas vías de señalización interna, a la movilidad celular, provocar cambios en la expresión de genes, alteraciones del ciclo celular, incluso pueden determinar la supervivencia de la propia célula. Asimismo, defectos en la adhesión celular provocan numerosas patologías en los organismos que en algunos casos son letales. De hecho la mayoría de las células no se diferencian, proliferan o sobreviven si no están adheridas correctamente a un sustrato y la metástasis en los procesos cancerosos necesita un cambio previo de adhesión celular. Se produce por tanto un flujo de información desde el exterior celular que se transmite al citoplasma gracias a las proteínas de adhesión, similar al que se da en los receptores clásicos de la membrana plasmática. Es decir, la célula necesita anclarse al medio donde se encuentra y además saber a qué tipo de moléculas está sujeta.

Existen tres tipos de unión celular (Figura 8): las uniones de oclusión, que unen las células formando una barrera impermeable, las uniones comunicantes, que permiten el intercambio de moléculas entre las células y las uniones de anclaje, que unen las células entre sí para dotar al epitelio de resistencia mecánica.

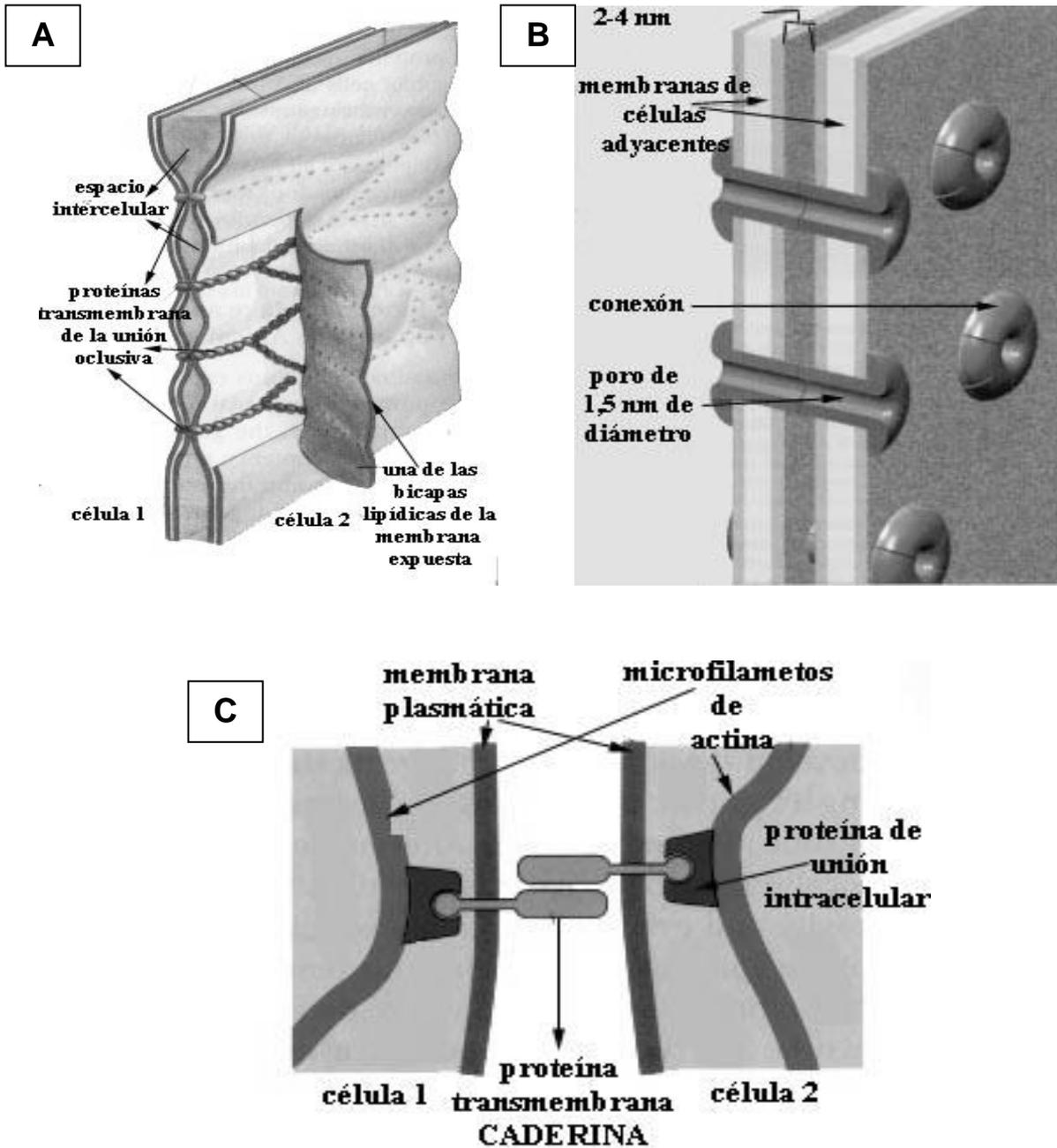


Figura 8. Tipos de unions: a) oclusión, b) Comunicantes y c) Anclaje

Uniones de oclusión

Las uniones de oclusión o estrechas están formadas por dos tipos de proteínas, las claudinas y las ocludinas (Alberts et al., 1998). Desempeñan principalmente dos funciones:

A) Impiden la difusión de moléculas entre células adyacentes, contribuyendo a la función de barrera desarrollada por las propias células epiteliales en las que se encuentran (Dragsten et al., 1981).

B) Impiden la migración lateral de proteínas especializadas de la membrana celular, de modo que delimitan y mantiene dominios especializados en la membrana celular (Balda y Matter, 1998).

Uniones comunicantes

Las uniones comunicantes (*gap junction*) permiten la difusión selectiva de moléculas como iones, segundos mensajeros y pequeños metabolitos entre células adyacentes facilitando la comunicación intercelular (Yeager y Harris., 2007). Este tipo de unión esta formado por dos tipos de proteínas, las panexinas (Meşe et al., 2007) y las conexinas que constituyen una familia de proteínas membranales que forman canales y que tienen cuatro dominios transmembranales hidrófobos con los terminales amino- y carboxilo- de las proteínas localizados en el lado citoplasmático de la membrana (Yeager., 1997).

Uniones de anclaje

Las uniones de anclaje brindan una estabilidad mecánica a grupos de células epiteliales y hace que estas funcionen como una unidad (Niessen, 2007).

Las uniones de anclaje se clasifican en dos grupos:

- a) uniones de anclaje en los que intervienen los filamentos intermedios
- b) uniones de anclaje en los que intervienen los filamentos de actina

Las uniones de anclaje donde intervienen los filamentos intermedios se clasifican en dos grupos: los desmosomas y los hemidesmosomas.

Los desmosomas están constituidos por dos proteínas desmocolina y desmogleína que a diferencia de las cadherinas clásicas si pueden establecer interacciones heterotípicas y conectan a la red de filamentos intermedios entre células adyacentes (Kowalczyk et al., 1999).

Los hemidesmosomas, las proteínas transmembranales que se encuentran en este tipo de adhesión son principalmente integrinas. Este tipo de unión conecta a la red de filamentos intermedios con la matriz extracelular (Turner y Burridge, 1991).

Las uniones de anclaje a través de los filamentos de actina se clasifican en dos grupos: las uniones adherentes y los contactos focales.

Los contactos focales. Este tipo de unión une a la red de filamentos de actina de una célula con la Matriz Extracelular. En los contactos focales interviene como molécula de adhesión de la célula, las Integrinas y como ligando en la Matriz a la fibronectina (Liu et al., 2000).

Las uniones adherentes: intervienen en la unión de la red de filamentos de actina entre células adyacentes. En este tipo de adhesión intervienen unas proteínas membranales conocidas como MOLÉCULAS DE ADHESIÓN, por ejemplo la cadherina-E (Perez-Morero et al., 2006).

1.5. MOLÉCULAS DE ADHESIÓN CELULAR

Las moléculas de adhesión celular fueron identificadas por su habilidad para favorecer la unión entre células y, entre las células y la matriz extracelular. Hay varios grupos de moléculas de adhesión celular: las selectinas, las integrinas, las inmunoglobulinas (Elanbam *et al.*, 1997) y las cadherinas (Fig 9).

Las **selectinas** son receptores de adhesión, que pueden formar uniones hetero y homotípicas, transitorias y específicas. Se caracterizan por poseer una estructura muy conservada, la cual incluye a un dominio tipo lectina, un dominio tipo factor de crecimiento epidérmico, dos o más dominios tipo proteína reguladora del complemento, una región transmembranal y una región intracitoplásmica corta en el extremo carboxilo terminal. Se han identificado a tres miembros de esta familia, los cuales corresponden a los antígenos de diferenciación leucocitaria CD62L (L-selectina), CD62P (P-selectina) y CD62E (E-selectina); estas tres moléculas reconocen y se unen, a través de su dominio tipo lectina, a diversos oligosacáridos, los cuales están usualmente conjugados con proteínas transmembranales. Los carbohidratos que parecen interactuar más fuertemente con las selectinas corresponden a las formas sializadas y fucosiladas del tetrasacárido Lewis x (sLex) y su isómero, Lewis a (sLea). Según se describe posteriormente, las moléculas que

interaccionan con las selectinas poseen, en mayor o menor grado, este tipo de carbohidratos. La selectina L (CD62L) se expresa constitutivamente en la membrana de granulocitos, monocitos y la mayoría de los linfocitos de sangre venosa periférica; al activarse estas células, la mayor parte de la selectina L es eliminada de la membrana mediante un mecanismo enzimático, el cual genera una forma soluble de la molécula, que es liberada al medio extracelular. La selectina P (CD62P) se expresa constitutivamente pero es almacenada en gránulos intracitoplásmicos de plaquetas y células endoteliales; al activarse estas células la selectina P es translocada a la membrana plasmática, permitiendo la interacción con sus ligandos. Por último, la selectina E (CD62E) no se expresa de novo en células endoteliales, como consecuencia de la inducción de la expresión del gen correspondiente durante la activación celular; esta inducción es generalmente consecuencia del efecto de lipopolisacáridos bacterianos o de citosinas tales como interleucina 1 o factor de necrosis tumoral alfa.

Las **integrinas** son una super-familia de glicoproteínas que participan mayormente en la unión de las células con la matriz extracelular. Aunque hay algunas que también participan en la unión célula-célula.

Están presentes en la superficie celular en elevadas concentraciones. Las moléculas se componen de dos cadenas glicoproteicas, α y β , y forman heterodímeros que se unen de forma no covalente. Las cadenas α contienen aproximadamente entre 1000 y 1200 residuos, en cambio las cadenas β tienen entre 760 y 790 residuos. Se han descubierto hasta el momento 14 cadenas α y 9 β , que en conjunto pueden formar unas 20 integrinas conocidas.

Fundamentalmente son receptores de membrana, algunos reconocen fibronectina, laminina, que son componentes mayoritarios de la matriz. Algunas de estas integrinas pueden ser específicas para una sola molécula, pero en cambio hay otras que pueden reconocer diferentes ligandos.

Las integrinas $\beta 1$ forman dímeros con, por lo menos, 9 tipos distintos de cadenas alfa. Las $\beta 2$, dimerizan con al menos tres tipos de cadenas alfa y median contactos célula-célula. Hay algunas que están muy estudiadas, como son LFA1 o antígeno de función linfocitaria1 formado como $\alpha L\beta 2$ y que se encuentra preferentemente en la superficie de los leucocitos. Mac1 está formada como $\alpha m\beta 2$, es el equivalente al anterior pero se presenta en los macrófagos. VLA-4 está en los linfocitos. Los receptores para estas tres moléculas son ICAM y VCAM que se encuentran en la superficie de las células endoteliales.

Las $\beta 3$, se pueden hallar en plaquetas entre otro tipo de células y se unen a proteínas como el fibrinógeno participando en la coagulación sanguínea.

En el interior celular principalmente se ligan a moléculas de actina; excepto las integrinas que poseen la cadena $\beta 4$ que pueden unirse a los filamentos intermedios, como la queratina.

Participan en uniones hemidesmosomales, habiéndose caracterizado principalmente dos; una de ellas tiene siempre la cadena $\alpha 6$ mientras que la otra contiene siempre $\beta 4$.

Las integrinas también desempeñan un papel fundamental en la adhesión de los leucocitos al endotelio, cuando estos migran hacia un foco inflamado. Intervienen en la “parada” de los leucocitos y permite el paso de éstos a través del endotelio.

La **superfamilia de las inmunoglobulinas** (IgSF) es un extenso grupo de proteínas solubles y de superficie celular que están implicadas en procesos de reconocimiento, unión o adhesión celular de las células. La asignación de una molécula a esta superfamilia se basa en que comparten rasgos estructurales con las inmunoglobulinas (también conocidas como anticuerpos). Todas ellas poseen un dominio conocido como dominio o plegamiento inmunoglobulina. Entre los miembros de la IgSF se incluyen receptores de antígenos en la superficie celular, correceptores y moléculas de coestimulación del sistema inmunitario, moléculas implicadas en la presentación de antígeno a los linfocitos, moléculas de adhesión celular y ciertos receptores de citocinas. Habitualmente están asociadas con funciones del sistema inmunitario.

Las **cadherinas** son las principales moléculas de adhesión celular que se han descubierto. Estas proteínas cuya actividad es dependiente de calcio (Vestweber, 1987) son un componente importante de un tipo de unión celular llamado adherente o *adherens junctions*, que se asocian a través de proteínas citoplasmáticas con los filamentos de actina (Takeichi, 1995).

Nuestro trabajo está sobre todo relacionado con este último tipo de moléculas de adhesión intercelular, por lo cual les dedicaremos un estudio suficientemente amplio en esta introducción.

Desde su descubrimiento y hasta la fecha, más de 100 miembros de la familia de las cadherinas han sido identificados y clasificados con base en el grado de similitud que presentan en relación al grupo de cadherinas llamadas clásicas, ya que fueron las primeras que se descubrieron. Este grupo de cadherinas esta formado por la cadherina-E, la P y la N que se nombraron dependiendo del tejido donde se descubrieron: la cadherina E se localizó inicialmente en las células epiteliales, la cadherina P en placenta y la cadherina N en neuronas (Mollet et al., 2000). Además de las cadherinas clásicas se han establecido los siguientes grupos: cadherinas atípicas, desmogleínas, desmocolinas y cadherinas flamingo (Halbleib y Nelson, 2006).

En este trabajo nos referiremos con mayor amplitud al estudio de la composición estructural y propiedades adhesivas y de transcripción celular de la Cadherina E.

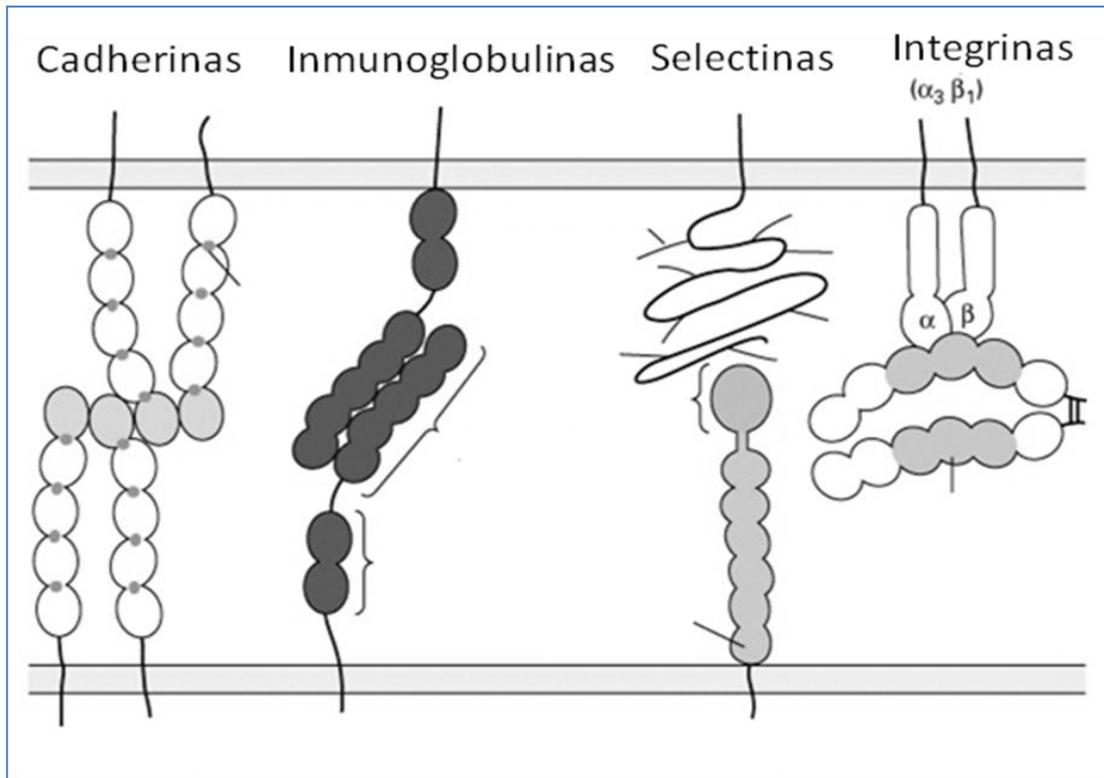


Figura 9. Tipos de moléculas de adhesión celular

1.5.1. CADHERINA-E

La cadherina-E es quizás el miembro más importante del grupo de las cadherinas clásicas. Inicialmente esta proteína fue identificada como la responsable de mantener unidas a las células epiteliales (Gumbiner, 1996). Actualmente, se sabe que la cadherina-E no es exclusiva de las células epiteliales sino que también se expresa en otras células como las células germinales (ovocitos y espermatozoides) y en la superficie de los blastómeros durante las etapas tempranas del desarrollo embrionario (Bloor *et al.*, 2002).

1.5.1.1. Características estructurales

Una molécula de cadherina está constituida por tres regiones o dominios (Figura 10): El extracelular con un grupo amino-terminal, el transmembranal y el intracelular con un grupo carboxi-terminal (Ivanov *et al.*, 2001).

1.5.1.1.1. Dominio Extracelular

Independientemente del tipo de cadherina, todas tienen una característica estructural importante: su dominio extracelular, compuesto por un número variado de repeticiones extracelulares de cadherina, llamadas ECs, (por sus siglas en ingles: extracellular cadherins repeats) dependiendo del tipo de cadherina (Nollet *et al.*, 2000).

En las cadherinas clásicas, el dominio extracelular o amino-terminal (N-terminal) está formado por 5 subdominios nombrados desde EC-1, que se encuentra en la parte distal de la membrana, hasta EC-5 en la parte proximal. El dominio extracelular constan de aproximadamente 100 aminoácidos (Harrison *et al.*, 2005).

Shapiro *et al.*, (1995) mostraron una estructura más detallada de este dominio, en el que cada uno de estos dominios está formado por siete hebras, nombradas de la A a la G, y arregladas como dos hojas β de tal manera que los extremos terminales amino y carboxi se encuentren en lados opuestos del dominio. Las hebras D, E y B forman una hoja y las hebras A, G, F y C forman la otra hoja. El segmento que conecta a las hebras C y D adopta una estructura helicoidal cuya característica es

una sucesión de vueltas y un juego de enlaces de hidrogeno. A este segmento se le conoce como una cuasi helice β .

Este dominio tiene características funcionalmente importantes: en el subdominio EC1 se localiza una secuencia de aminoácidos relacionada con la unión entre cadherinas y con la especificidad de la unión (Shasby, 2007), llamada HAV, debido a que está formada por los siguiente aminoácidos histidina, alanina y valina (Nose, 1990).

Otra característica importante del dominio extracelular son los sitios de unión al calcio. Este ión tiene un papel fundamental en la estabilidad de las uniones adherentes dependientes de cadherinas, su unión es un pre-requisito para que se lleve a cabo la adhesión dependiente de cadherina. (Overduin *et al.*, 1995).

1.5.1.1.2. Dominio Intracelular

El dominio intracelular o citoplasmático contiene un grupo carboxi-terminal (C-terminal) y consta de aproximadamente 150 aminoácidos. Una característica importante de este dominio es su alto grado de conservación entre los diferentes subtipos de cadherinas (Halbleib y Nelson, 2006), lo que hace suponer que tienen una participación importante en la actividad funcional de esta proteína.

Este dominio mantiene una estrecha relación con la actividad funcional de las cadherinas, ya que a través de éste la cadherina forma complejos con otras

proteínas, mismos que son importantes para mantener estable la función adhesiva (Ivanov *et al.*, 2001).

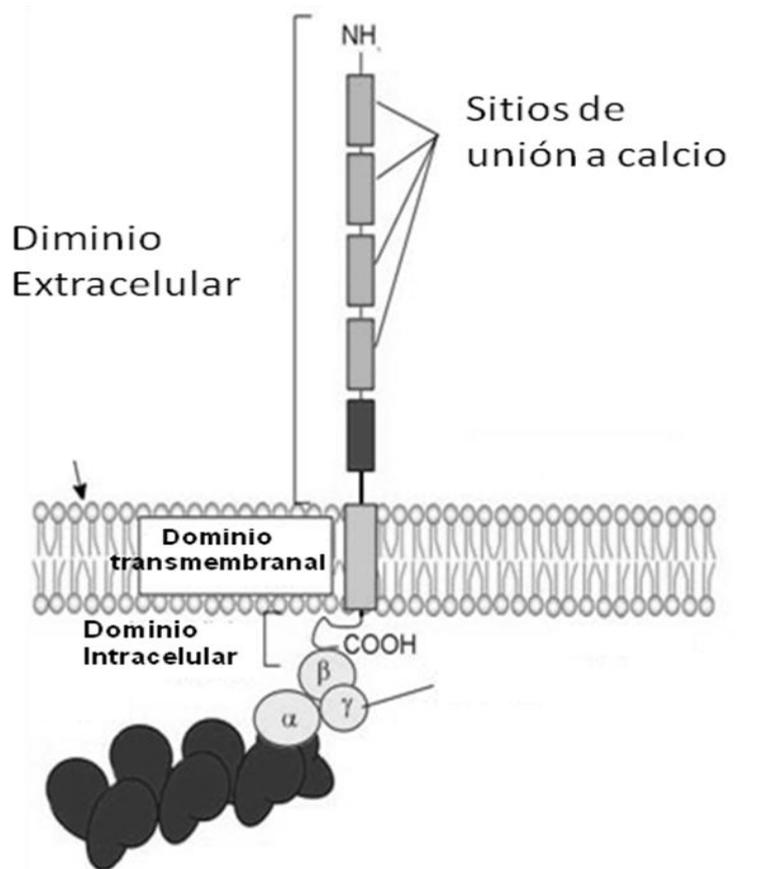


Figura 10. Estructura de la cadherina-E

1.5.1.2. Características funcionales

1.5.1.2.1. Adhesión celular.

La participación de las cadherinas en la formación de uniones adherentes fue la primera función establecida y por lo tanto es la más conocida hasta ahora. Esta actividad adhesiva tiene una característica muy importante, es de tipo homotípica,

es decir que las células se adhieren entre sí solamente cuando presentan el mismo tipo de cadherina (Gumbiner, 2000).

1.5.1.2.1.1. Adhesión homofílica

Bases estructurales de la adhesión Homofílica

El uso de técnicas como la resonancia magnética y los rayos X, permitieron establecer un análisis más completo de la estructura de la región extracelular de las cadherinas E y N, logrando establecer con esto las bases estructurales de la adhesión a través de cadherinas (Shapiro *et al.*, 1995).

Shapiro *et al.* (1995) fueron de los primeros investigadores que sugirieron el desarrollo de dos tipos de interacciones durante la formación de uniones entre cadherinas: laterales o cis y de adhesión o trans.

Dímeros Laterales.

Uno de los primeros eventos que ocurren es la formación de interacciones entre dos moléculas de cadherina que se encuentran en la misma superficie celular, conocidos como dímeros laterales, de hebra o cis.

El mecanismo para la formación de estos dímeros no es totalmente conocido, sin embargo, se ha establecido como una característica importante el intercambio de una cadena lateral de triptofano-2 (Trp-2) hacia una bolsa hidrofóbica formada por

las cadenas laterales de Ile 92', Ile 24', Ala 80', Ala 78', Tyr 36' y la parte alifática de Glu 89' (Shapiro *et al.*, 1995).

Dímeros de Adhesión

Una segunda interacción, involucra el alineamiento antiparalelo de moléculas de cadherina provenientes de superficies celulares opuestas. En la formación de estos dímeros se involucran los residuos de las hebras β : C, D, F y G, así como la cuasi helice β (Figura). La secuencia His-Ala-Val (HAV) que se encuentra en la hebra F la cual es altamente conservada en el dominio EC-1, ha sido implicada en la adhesión homofílica (Patel y Gumbiner, 1995, Patel *et al.*, 2003).

1.5.1.2.2 Señalización

A partir de un conocimiento más detallado de la estructura de las cadherinas, se logró establecer una segunda función relacionada con el dominio intracelular, la señalización intracelular (Takeichi,1991). Otra evidencia que fortaleció la función de señalización es que la actividad y función de estas proteínas es altamente regulada a través de mecanismos que involucran la participación de vías de señalización (Doherty y Walsh, 1994).

Takeichi (1991) fue de los primeros investigadores que sugirieron esta nueva función para las cadherinas. Según el autor, un aspecto importante de la función de las cadherinas es la formación de complejos de adhesión con el citoesqueleto y el que una tirosina cinasa de la familia src esté localizada en este complejo. Tales

observaciones permitieron sugerir que las uniones celulares dependientes de cadherina podrían ser utilizadas como señalizadores intracelulares.

Posteriormente se ha reportado que algunas moléculas de señalización interactúan con las cadherinas; entre ellas se encuentran las enzimas tirosina-cinasas y las fosfatasas (Steinberg y McNutt, 1999), las cinasas-lipídicas (Pece *et al.*, 1999), las GTPasas (Nelson, 2008), así como la misma catenina beta. Estas interacciones podrían servir como reguladores de la actividad de la cadherina, afectando la formación de complejos de señalización, o representando mecanismos para la señalización activada a través de cadherinas (Yap y Kovacs, 2003).

Señalización a través de la cadherina-E

Numerosos estudios indican que los receptores de adhesión celular pueden afectar la forma, la movilidad y el crecimiento celular, no solo a través de la unión mecánica de una célula con otra o con algún substrato (matriz extracelular), sino que también activan señales internas (Ivanov *et al.*, 2001).

Existen tres vías a través de las cuales las células transmiten señales intracelulares dependientes de cadherina:

- a) A través de la familia Rho de pequeñas GTPasas.
- b) A través de la vía de señalización Wnt.
- c) A través de receptores tirosina-cinasa.

JUSTIFICACIÓN

Nuestro grupo de trabajo ha estudiado el desarrollo embrionario temprano en el hámster Sirio Dorado (*Mesocricetus auratus*) en hembras bajo dos condiciones de paridad: nulíparas (tanto jóvenes, 3 meses de edad, como adultas, 8 meses de edad) y múltiparas (3 partos anteriores) (Navarro *et al.*, 2000). Los resultados mostraron que las hembras nulíparas jóvenes tenían una menor asincronía en las etapas tempranas de la segmentación (de 2 hasta 8 células), cuando se comparaban con las hembras adultas, tanto nulíparas como múltiparas. Además, se encontró que existe un retraso en el patrón de segmentación en las hembras múltiparas en comparación con las hembras nulíparas. Un aspecto que debe mencionarse es que el patrón de desarrollo embrionario de las hembras múltiparas está retrasado entre 2 y 4 horas con respecto al de las hembras nulíparas. Esto podría explicarse por una variación del tiempo de gestación correlacionada con la edad avanzada de las hembras, lo cual ha sido previamente reportado en algunas especies animales. Soderwall *et al.* (1960) mencionan que las hembras de un mes de edad tienen un período de gestación de 373 horas, mientras que las de 14 meses de edad lo tienen de 402 horas, es decir de 29 horas más. Según estos autores las hembras de 4 meses de edad tienen una gestación de 378 horas y las de 8 meses de 386 horas, es decir de 8 horas más. Nuestros resultados indican que entre las hembras nulíparas y las múltiparas la diferencia en el tiempo de desarrollo embrionario puede ser considerada igual a 4 horas. Es decir, la prolongación de la gestación relacionada con el avance en la edad de las hembras puede ser ya justificado por un retraso significativo en las fases de segmentación temprana del ovocito fecundado. Si se considera que parece bien demostrado que aquellos embriones que se dividen tempranamente son los que tienen mayores probabilidades de implantarse (Edwards, 1998; Kubish y col., 1998; Lonergan y col.,

1999) es importante tomar en cuenta este retraso en el desarrollo embrionario en las especies animales, de tal forma que pueda tenerse un mejor control en la tasa de implantación y por ende en la prolificidad. Nuestros resultados, igual que los de Soderwall y col (1960) y los de Parkening y Chang (1976), indican que no hay diferencias ni en la tasa de ovulación, ni en la tasa de fertilización entre las hembras nulíparas jóvenes (3-4 meses de edad) y las hembras multíparas (7-8 meses de edad). En un trabajo posterior, nuestro grupo ha estudiado el efecto de la edad y/o paridad sobre el patrón de segmentación y el transporte embrionario en hembras nulíparas jóvenes, viejas, y multíparas de hámster sirio dorado (*Mesocricetus auratus*) (Trejo *et al.* 2005). Los resultados obtenidos mostraron que conforme aumenta la edad y/o el número de partos de las hembras se observa un retraso en el proceso de segmentación, lo cual se hizo evidente porque en hembras multíparas y nulíparas adultas la presentación de los primeros embriones compactados y las primeras mórulas ocurre 4 horas más tarde (66-67 hrs postcoito) en comparación a lo observado en las nulíparas jóvenes (62-63 hrs postcoito). Es también notable que la migración de los embriones de la trompa al útero se retrasa significativamente en las hembras multíparas o nulíparas adultas, lo cual puede relacionarse también con el proceso de compactación (Trejo *et al.*, 2005). Con base en estos resultados se ha sugerido la existencia de alteraciones en algunos de los mecanismos y/o factores que regulan el proceso de segmentación en los embriones de hembras adultas y/o multíparas. Otros investigadores han tratado de explicar ese fenómeno sin existir al momento resultados concluyentes. Day *et al.* (1989) reportaron un retraso en el patrón de segmentación en las ratas Long-Evans de 10 meses de edad y determinaron que este retraso podría estar relacionado con la alteración del patrón de síntesis del ARNm del cigoto. Se ha establecido que conforme aumenta la edad

de las hembras ocurre una disminución en la capacidad reproductiva, misma que está caracterizada por una disminución en la fertilidad y en el tamaño de la camada, pero no parece estar relacionada con el número de ovocitos que llegan a las trompas de la hembra en cada ovulación (Trejo et al, 2006). La disminución en la fertilidad ha sido relacionada con un menor número de blastocistos normales disponibles para su implantación (Anzalone *et al.*, 2000), lo cual podría implicar cambios en el mecanismo de compactación embrionaria (Kawai *et al.*, 2000). Por lo tanto, el estudio de la distribución de la cadherina-E en los embriones obtenidos a partir de hembras adultas o multíparas, que presentan un retraso en el proceso de segmentación, podría ayudar a comprender las relaciones que existen entre procesos como la compactación, funcionalidad del citoesqueleto, la expresión génica y el potencial de desarrollo de estos embriones, así como los procesos de señalización necesarios para un desarrollo embrionario normal.

HIPOTESIS

Un cambio en la distribución de la cadherina-E en los embriones de hámster obtenidos de hembras nulíparas adultas y multíparas estará relacionado con el retraso en el patrón de segmentación y en el transporte embrionario que se ha observado en este tipo de hembras.

OBJETIVOS

GENERAL

Determinar si la distribución de la cadherina-E en el embrión de hámster está relacionada con el retraso en el patrón de segmentación observada en las hembras adultas y multíparas.

ESPECIFICOS

Conocer el patrón de distribución de la cadherina-E en los embriones de los tres grupos de hembras.

**MATERIAL
Y
METODOS**

5.1. Reactivos y Soluciones

- a) Anticuerpo primario anti-cadherina-E (Santa Cruz Biotechnology Inc. sc-8426)
- b) Anticuerpo secundario anti-IgG marcado con fluoresceína (Sigma, F8521)
- c) Medio de montaje Vecta shield (Vector Laboratories, Inc.).

En la realización de este trabajo se utilizaron las siguientes soluciones:

- a) Solución buffer de fosfatos (PBS, pH 7.2)
- b) Solución Tyrode ácida (pH 2.5) (Sigma, T1788)
- c) Paraformaldehído () al 4% en PBS
- d) Albumina (fracción V, Sigma A4503) al 5% en PBS
- e) Tritón X-100 (Sigma T8787) al 1% en PBS

5.2. Animales

Se utilizaron hembras hámster sirio dorado (*mesocricetus auratus*). Todos los animales fueron obtenidos a partir de nuestra colonia y mantenidos a 25°C bajo condiciones controladas, con un fotoperiodo de 14 horas de luz y 10hrs de oscuridad. El alimento y agua fue proporcionada de manera *ad libitum*. Se utilizaron hembras regulares (Trejo et al., 2005) para lo cual se les realizó un seguimiento a través de citología vaginal exfoliativa durante 12 días y solamente se incluyeron en el estudio hembras que mostraron una duración de 4 días en su ciclo estral.

5.3. Grupos experimentales

Las hembras hámster regulares fueron divididas en tres grupos:

- 1) Nulíparas jóvenes (NJ), dos meses de edad y un peso de 128 ± 15 grs
- 2) Nulíparas adultas (NA), de ocho meses de edad y un peso de 168 ± 18 grs
- 3) Multíparas adultas (MA), de ocho meses de edad y un peso de ocho meses de edad.

5.4. Apareamiento

Durante el tercer día del ciclo (día 1 del ciclo corresponde a la secreción vaginal postovulatoria) que corresponde a la fase de proestro, las hembras fueron colocadas de manera individual con un macho de fertilidad probada y entrenados para montar rápidamente. Solamente 15 minutos fueron permitidos para la monta y la ocurrencia del patrón de eyaculación fue observada directamente (Navarro *et al.*, 2000; Trejo *et al.*, 2005). La fertilización fue considerada exitosa al observar espermatozoides en el lavado vaginal que se realizó 60min después de la monta.

5.5. Obtención de embriones

Para obtener embriones de 4, 6 y 8 células, las hembras fueron sacrificadas a través de dislocación cervical a las 60 y 68hrs post coito. Los oviductos y úteros fueron disectados y perfundidos de manera separada (Navarro *et al.*, 2000; Trejo *et al.*, 2005).

Eliminación de la Zona Pelúcida

Antes de realizar la inmunotinción de los embriones, fue necesario eliminar la zona pelúcida (ZP) para lo cual los embriones fueron incubados durante 60seg en una solución Tyrode ácida (pH 2.5).

5.6. Técnica de inmunofluorescencia

Para realizar la inmunotinción de los embriones se siguió la técnica propuesta por Kawai et al. (2002) con alguna modificaciones. Los embriones libres de la ZP fueron lavados dos veces en una gota de 50 µl de PBS, inmediatamente después los embriones fueron fijados en una solución de paraformaldehído al 4% durante 30min. Los embriones fijados fueron lavados dos veces en una gota de 50µl de PBS. Después de este lavado los embriones fueron permeabilizados a través de ser tratados con una solución de Triton X-100 al 1% durante 10min. Los embriones libres de su ZP, fijados y permeabilizados fueron incubados en una solución de albumina al 5% durante 1hr para bloquear los sitios inespecíficos de unión del anticuerpo.

Después los embriones fueron incubados con el anticuerpo primario anti-cadherina-E (1:50) durante dos horas a temperatura ambiente y finalmente los embriones fueron incubados durante 1hr a temperatura ambiente y en oscuridad con el segundo anticuerpo anti-IgG marcado con fluoresceína (1:50). Como un control para la tinción no específica por el segundo anticuerpo, la incubación con el anticuerpo anti-cadherin E fue omitida. Embriones inmunomarcados fueron montados en medio

Vecta shield (Vector Laboratories, Inc.), y la intensidad y distribución de la fluorescencia fue observada y registrada usando un microscopio confocal con barrido de laser (Leica, model TCS-SP5).

Análisis de Imágenes

La intensidad de tinción para cadherina-E fue cuantificada a través de densitometría computarizada, usando el paquete estadístico NCSS (2007). La integración independiente de el área bajo la curva, dividida en 5 secciones (Figura1), permite obtener la concentración de cadherina-E en tres regiones: la libre de contacto celular, la del citoplasma y transversalmente en la región de adhesión celular de cada embrión. A demás, la integración de la fluorescencia fue obtenida siguiendo longitudinalmente cada una de las zonas de adhesión entre membranas de cada embrión (Figura 2).

5.7. Análisis estadístico

Los datos fueron analizados estadísticamente a través de un análisis de varianza. Diferencias fueron consideradas significativas cuando $p < 0.05$.

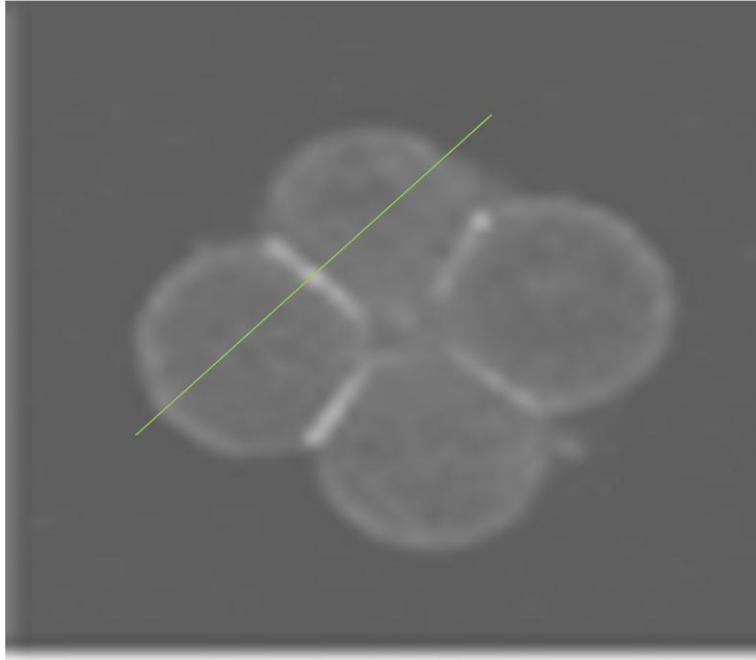


Figura 1. Integración computarizada del escaneo confocal transversal pasando a través de dos blastómeros adyacentes.

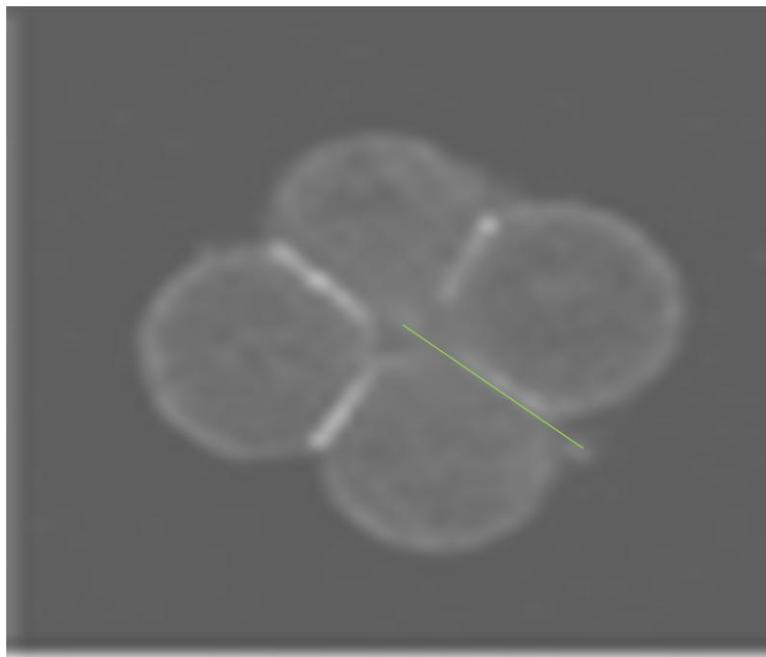


Figura 2. Intensidad de la fluorescencia obtenida a través de escaneo con el microscopio confocal en las regiones de contacto celular.

RESULTADOS

El patrón de distribución de la cadherina-E en los embriones de 4, 6 y 8 blastómeros de los tres grupos de hembras fue el mismo, encontrándose localizada la inmunofluorescencia en tres regiones principales: la de contacto celular, la libre de contacto celular y el citoplasma

Patrón de distribución de la cadherina-E.

Etapas de 4 células

Durante esta etapa del desarrollo embrionario temprano, la cadherina-E se encuentra localizada en los sitios de adhesión (Figura 3) en los tres grupos de hembras. Sin embargo, la intensidad de fluorescencia es mayor ($P < 0.01$) en los embriones de las hembras jóvenes en comparación con los embriones de las hembras nulíparas adultas y multíparas (Tabla 1). En los embriones de los tres grupos de hembras se observa una tinción en la superficie libre (membranal) y en el citoplasma (Figura 4) aunque de menor intensidad a la observada en los sitios de adhesión ($P < 0.01$) de estos mismos embriones. Sin embargo, la intensidad de fluorescencia membranal y citoplasmática en los embriones de las hembras jóvenes es mayor ($P < 0.01$) a la observada en los embriones de las hembras nulíparas adultas y multíparas (Tabla 1). No se observaron diferencias significativas entre los embriones de las hembras nulíparas adultas y multíparas.

Etapas de 6 células

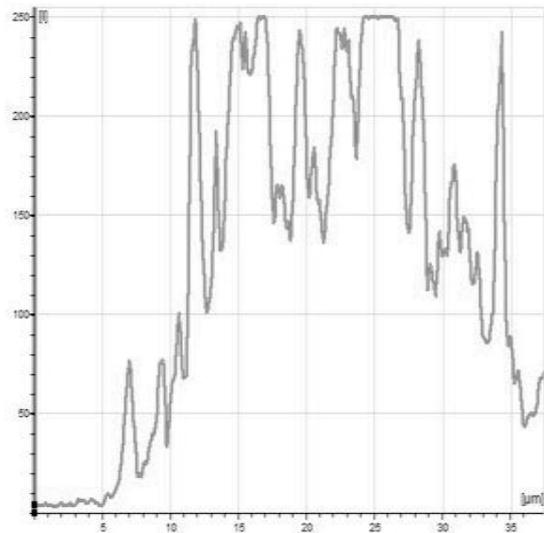
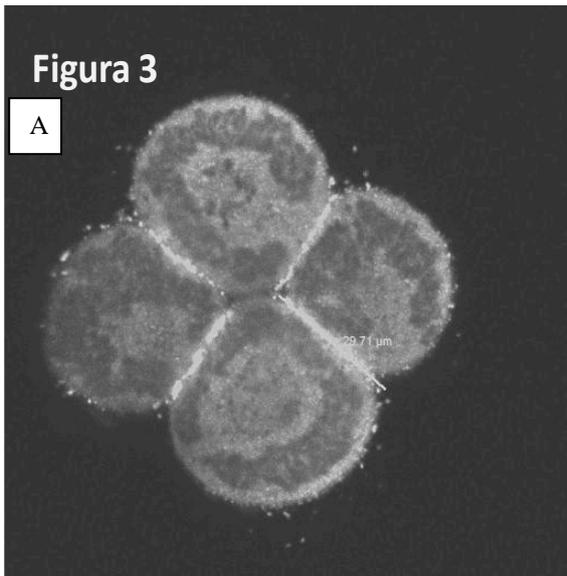
Durante esta etapa del desarrollo embrionario temprano aumenta la localización de la cadherina-E hacia los sitios de adhesión en los embriones de los tres grupos de hembras (Figura 5), sin embargo, la intensidad de fluorescencia es mayor en los embriones de las hembras jóvenes ($P < 0.01$) en comparación con los embriones de las hembras nulíparas adultas y multíparas (Tabla 2). Mientras que entre los embriones de estos dos últimos grupos no hubo diferencias significativas. Se observa una tinción en los sitios libres de contacto y en el citoplasma (Figura 6). Sin embargo, los datos cuantitativos no fueron establecidos.

Etapas de 8 células

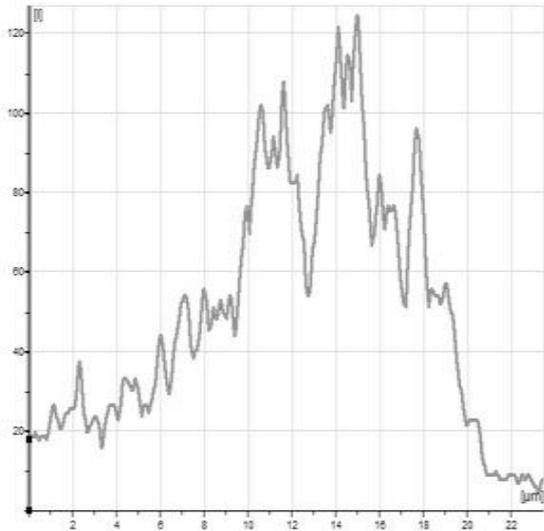
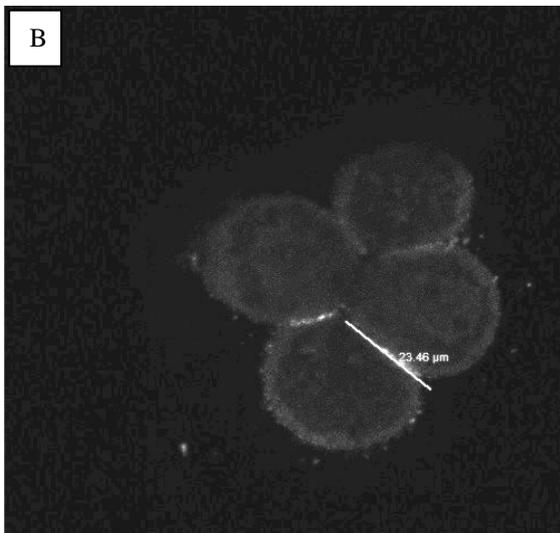
En esta etapa del desarrollo continúa la relocalización de la cadherina-E hacia los sitios de adhesión en los embriones de los tres grupos de hembras (Figura 7). La intensidad de fluorescencia en los embriones de las hembras jóvenes es significativamente mayor ($P < 0.01$) en comparación con los embriones de las hembras nulíparas adultas y multíparas (Tabla 3). Mientras que en los embriones de estos dos grupos de hembras no hubo diferencias significativas. Al igual que en los embriones de 6 células no fue posible determinar de manera cuantitativa la intensidad de fluorescencia en los sitios libres de contacto y en el citoplasma (Figura 8). Sin embargo, se mantiene una mayor intensidad en los embriones de las hembras jóvenes en comparación con los embriones de las hembras nulíparas adultas y multíparas.

Figura 3

A



B



C

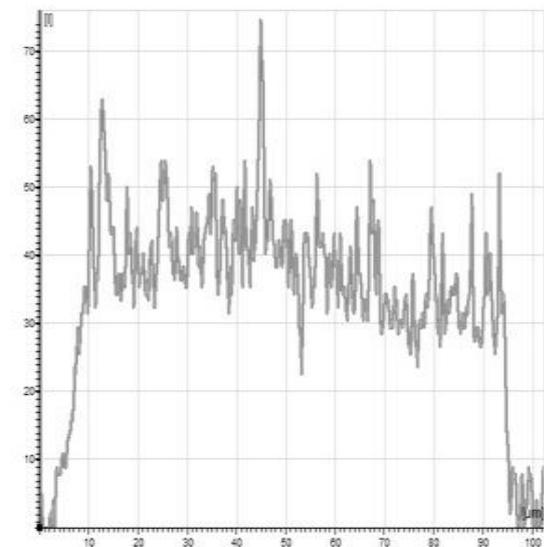
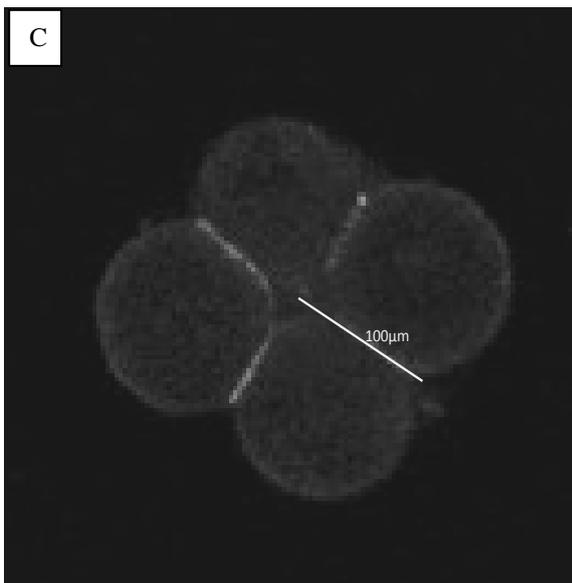


Figura 4

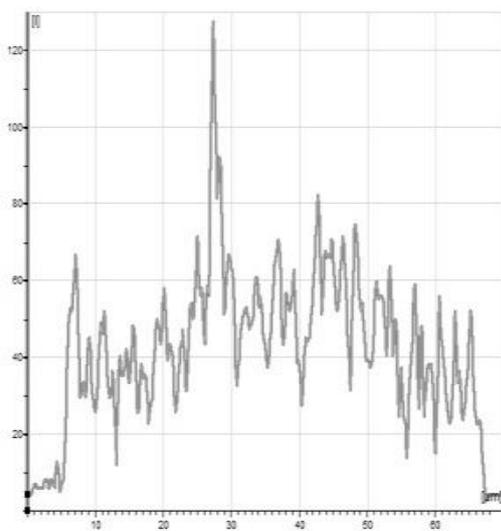
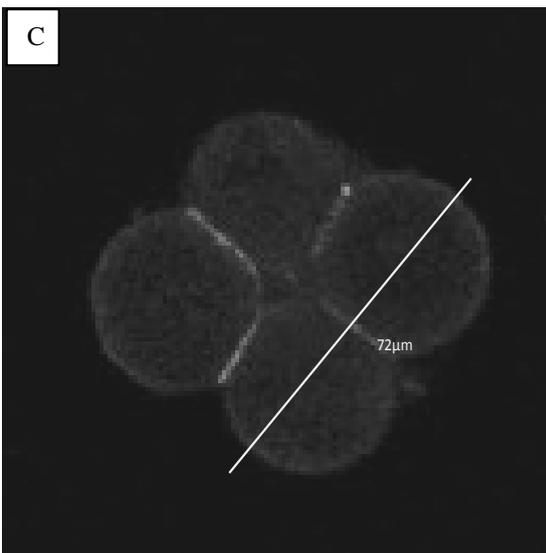
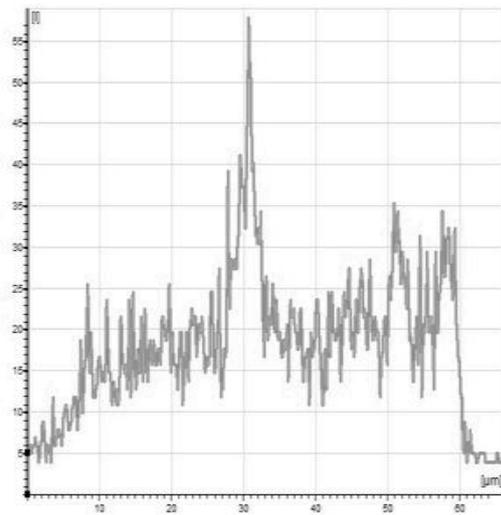
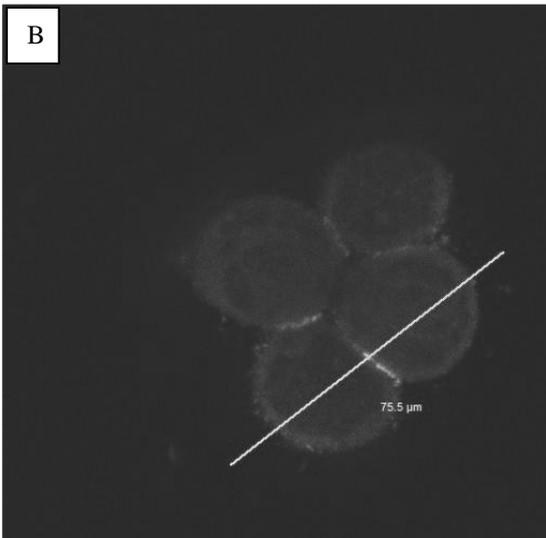
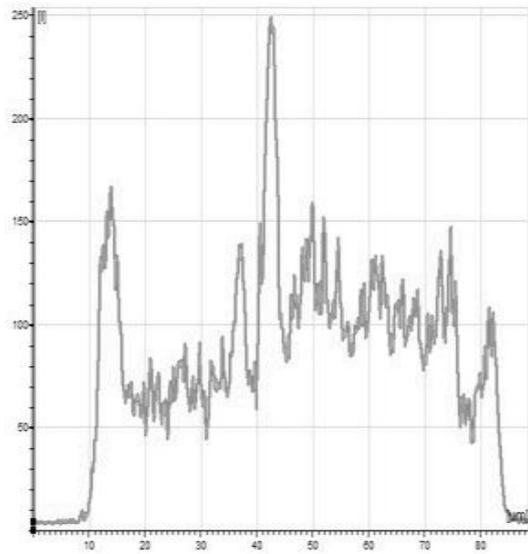
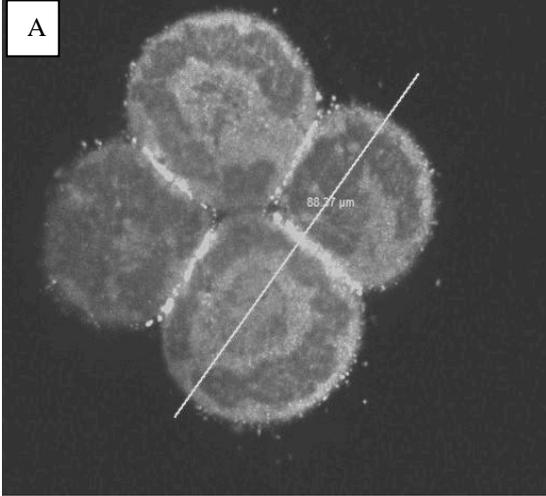


Figura 5

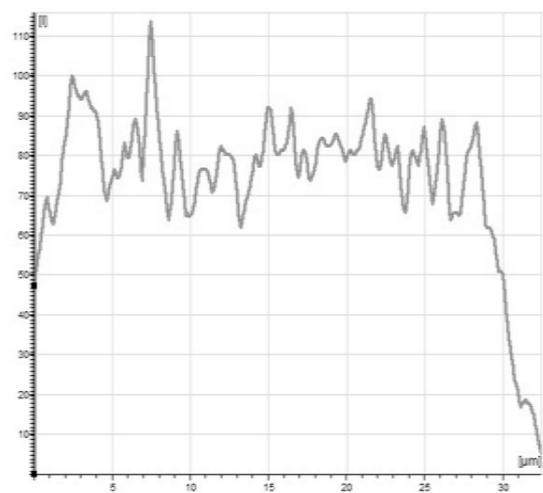
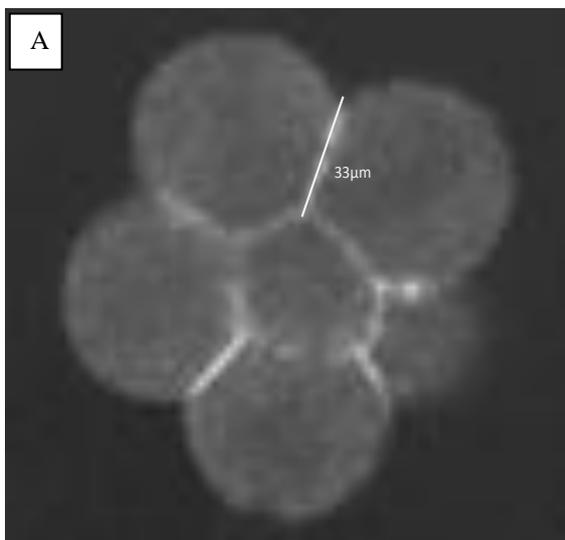
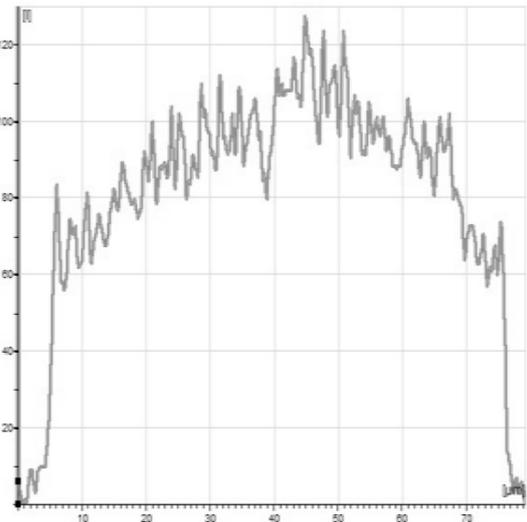
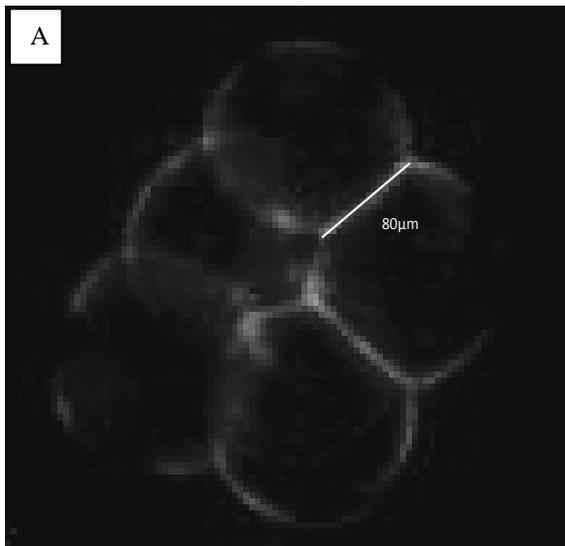
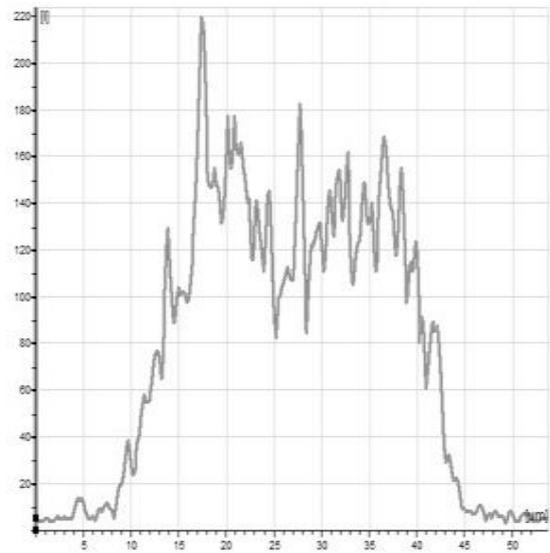
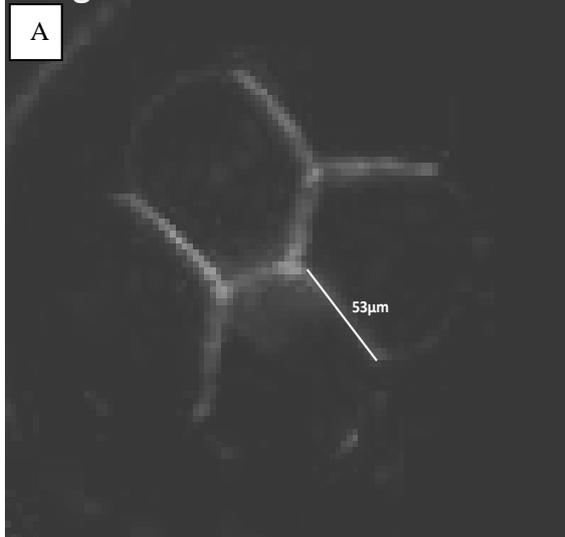


Figura 6

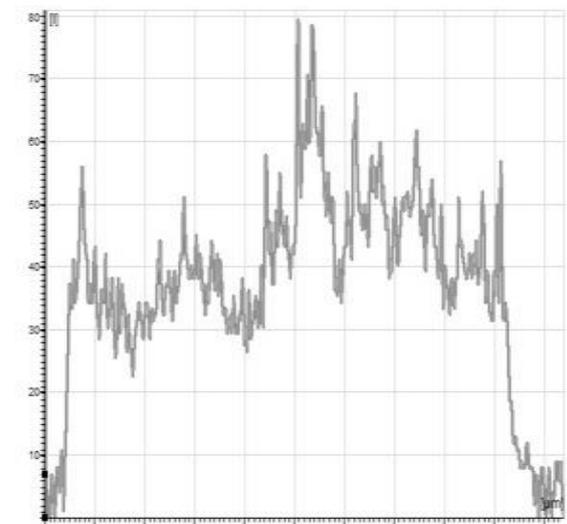
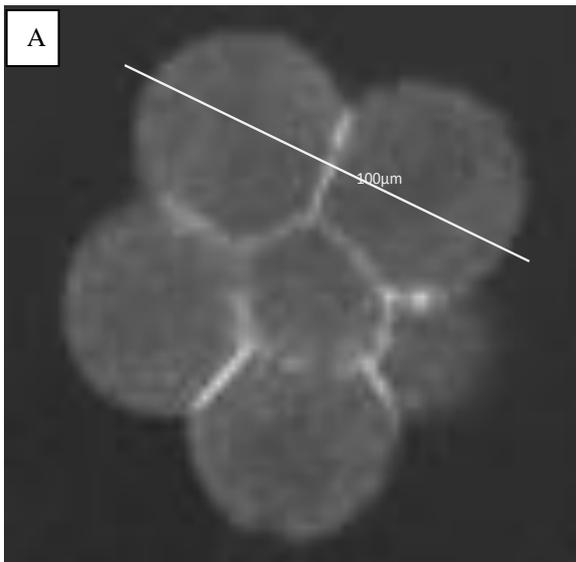
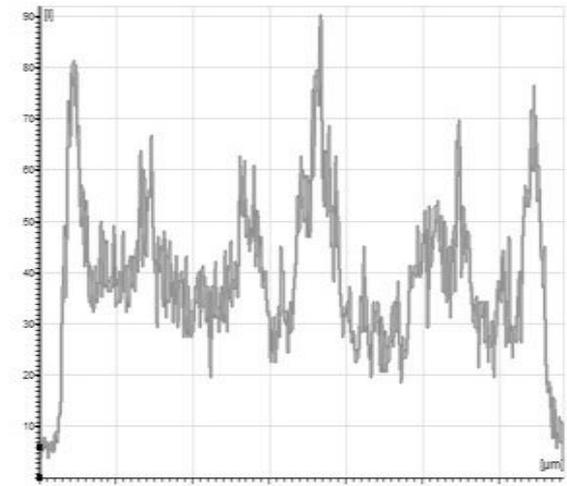
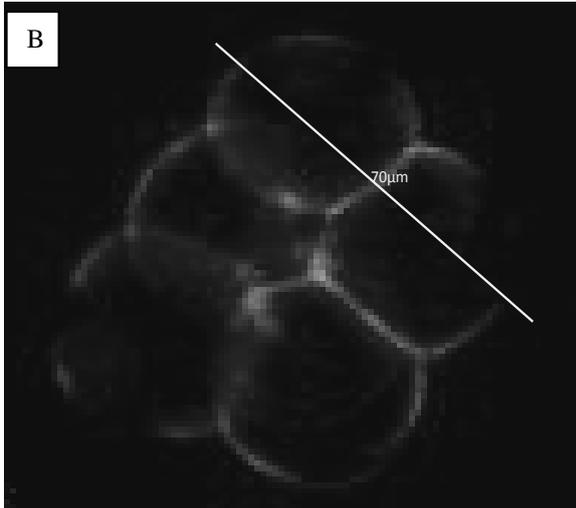
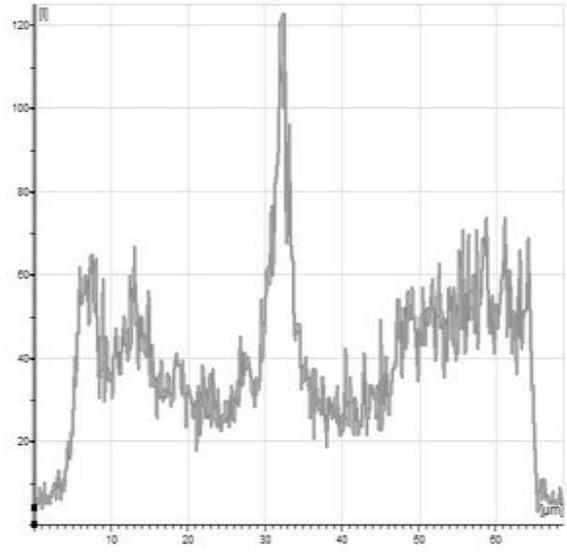
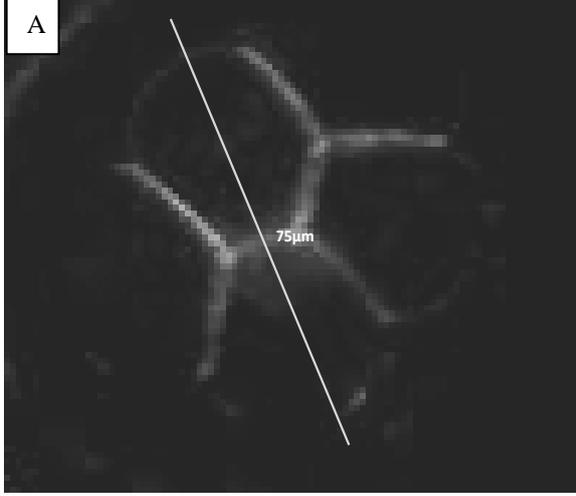
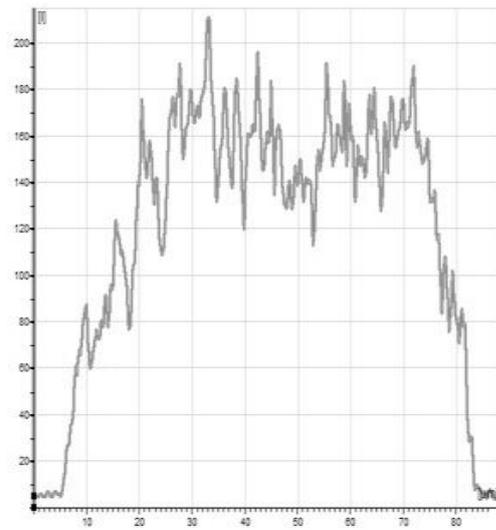
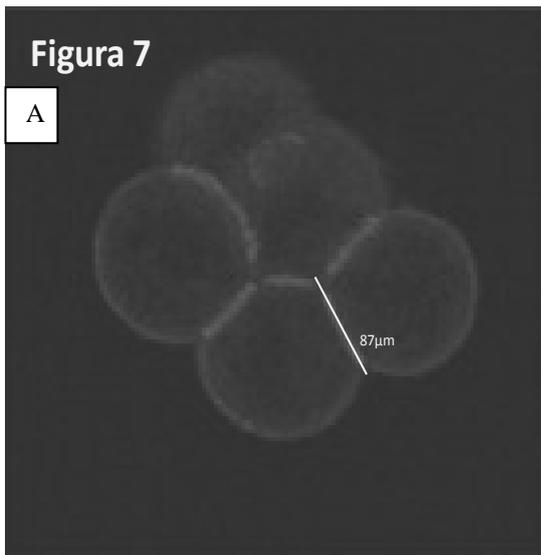


Figura 7

A



B

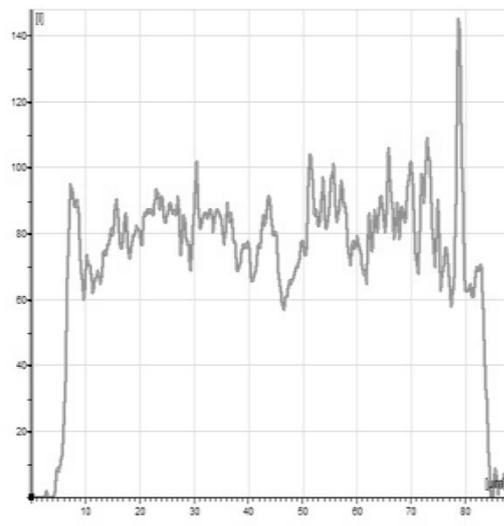
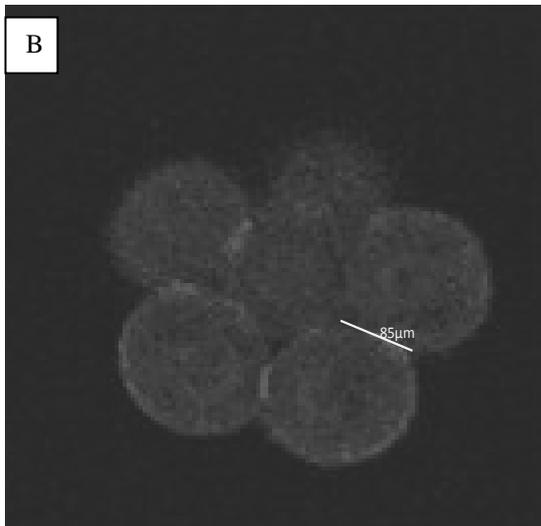


Figura 8

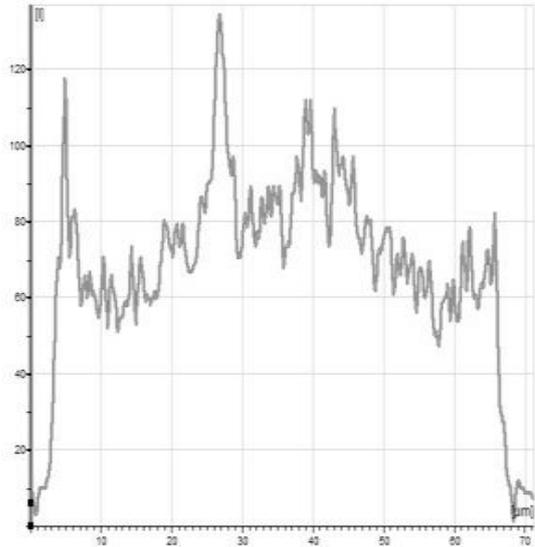
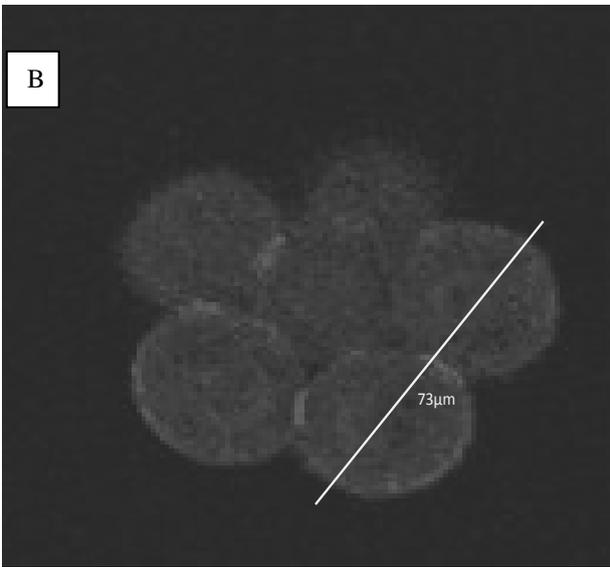
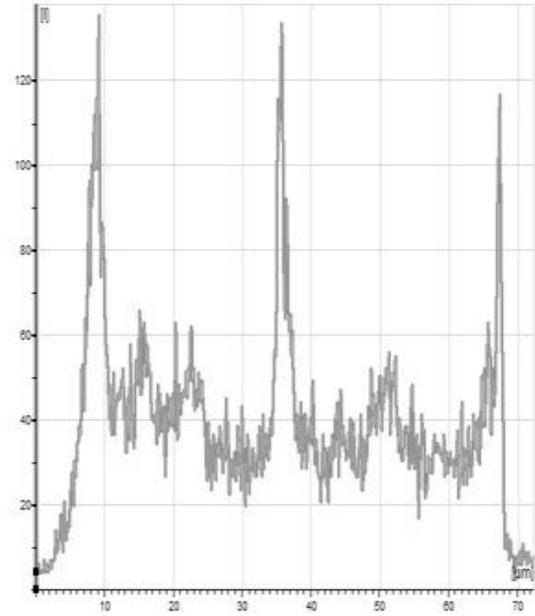
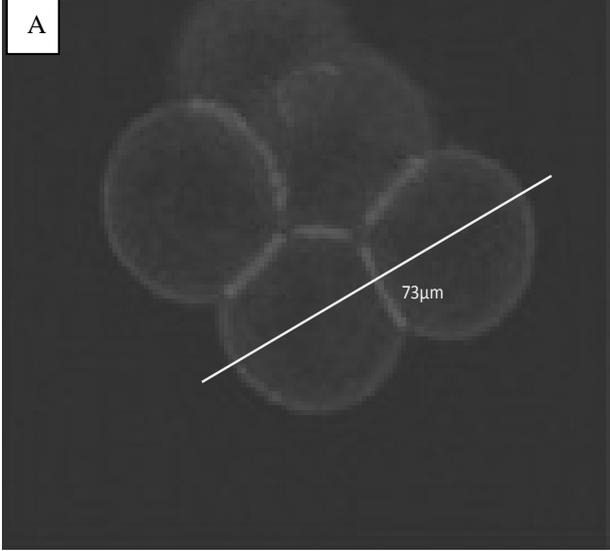


Figura 3. Inmunolocalización de la cadherina-E en los sitios de adhesión en embriones de células de hembras A) nulíparas jóvenes, B) nulíparas adultas y C) Multiparas.

Figura 4. Inmunolocalización de la cadherina-E en la región libre de contacto celular, citoplasmática y en los sitios de contacto celular en embriones de 4 células de hembras a) nulíparas jóvenes, b) nulíparas adultas y c) multíparas.

Figura 5. Inmunolocalización de la cadherina-E en los sitios de adhesión en embriones de 6 células de hembras a) nulíparas jóvenes, b) nulíparas adultas y c) multíparas.

Figura 6. Inmunolocalización de la cadherina-E en la región libre de contacto celular, citoplasmática y en los sitios de contacto celular en embriones de 6 células de hembras a) nulíparas jóvenes, b) nulíparas adultas y c) multíparas.

Figura 7. Inmunolocalización de la cadherina-E en los sitios de adhesión en embriones de 8 células de hembras a) nulíparas jóvenes, b) nulíparas adultas.

Figura 8. Inmunolocalización de la cadherina-E en la región libre de contacto celular, citoplasmática y en los sitios de contacto celular en embriones de 8 células de hembras a) nulíparas jóvenes, b) nulíparas adultas.

Tabla 1. Datos cuantitativos obtenidos a partir de la integración de los escaneos de microscopia confocal de embriones de hámster de 4 células inmunoteñidos				
	Integración de escaneo transversal por región			Integración de escaneo longitudinal de adhesiones celulares
	Membrana libre	Citoplasma	Zona de Adhesión	
NJ	0.43±0.09	2.53±0.40	0.87±0.06	6.07±0.97
NA	0.17±0.05	0.73±0.13	0.29±0.05	1.91±0.53
M	0.19±0.06	0.86±0.24	0.32±0.06	1.96±0.44

Tabla 2. Datos cuantitativos obtenidos a partir de la integración de los escaneos de microscopia confocal de embriones de hámster de 6 células inmunotefidos				
Integración de escaneo transversal por región			Integración de escaneo longitudinal de adhesiones celulares	
	Membrana libre	Citoplasma	Zona de Adhesión	
NJ	0.39±0.06	3.41±0.27	1.23±0.03	8.37±0.83
NA	0.15±0.10	0.93±0.10	0.55±0.09	2.31±0.33
M	0.15±0.09	0.72±0.15	0.47±0.10	2.42±0.23

Tabla 3. Datos cuantitativos obtenidos a partir de la integración de los escaneos de microscopia confocal de embriones de hámster de 8 células inmunoteñidos				
Integración de escaneo transversal por región			Integración de escaneo longitudinal de adhesiones celulares	
	Membrana libre	Citoplasma	Zona de Adhesión	
NJ	0.31±0.10	3.87±0.12	2.43±0.06	9.23±0.43
NA	0.12±0.06	0.82±0.10	0.67±0.09	3.09±0.33
M	0.10±0.03	0.79±0.09	0.72±0.15	2.87±0.26

DISCUSIÓN

Recientemente se ha estudiado la participación de la edad y/o condición reproductiva (número de partos) de hembras hámster Sirio Dorado (*Mesocricetus auratus*) en el patrón de segmentación embrionaria temprana (Navarro *et al.*, 2000; Trejo *et al.*, 2005; Trejo *et al.*, 2008). Los resultados obtenidos mostraron que a mayor edad y/o número de partos de las hembras se observa un retraso en el proceso de segmentación, lo cual se hizo evidente por la presentación de las primeras mórulas, 4 horas más tarde (66-67hrs PC) en las hembras multíparas y nulíparas adultas que en las nulíparas jóvenes. Esto podría estar relacionado con alteraciones en algunos de los factores que regulan el proceso de segmentación.

Varias han sido las propuestas para tratar de entender el patrón de segmentación de los embriones de hembras adultas. Day *et al.* (1989) reportaron un retraso en el patrón de segmentación en las ratas hembras Long-Evans de 10 meses de edad, y determinaron que este retraso podría estar relacionado con la alteración del patrón de síntesis del ARNm del cigoto. Lapolt *et al.* (1990) y Day *et al.* (1991) reportaron que un aumento en los niveles de estradiol o una disminución en la proporción de progesterona, durante las etapas tempranas de la gestación afectan el patrón del desarrollo embrionario temprano en ratas hembras. Según Murray y Messinger, (1994) la obtención de embriones viables es consecuencia de una serie de interacciones celulares que ocurren durante la fertilización y posteriores divisiones mitóticas y que son reguladas por moléculas de adhesión celular (Shirayoshi *et al.*, 1983).

Recientemente (Goval y Alexander, 2000) han demostrado que la Genisteina, un inhibidor específico de la proteína-tirosina cinasa, retrasa o previene la conversión de

embriones de 4 a 8 blastómeros, observándose además que los embriones de 8 blastómeros así tratados presentan un fenómeno morfológico similar a la compactación. Estos resultados permiten suponer que aunque no es capaz de prevenir el proceso de compactación el inhibidor participa en la distribución de Cadherinas en la superficie celular que es necesaria para que este proceso se realice. Estas observaciones han sido comprobadas y extendidas por el trabajo de Kawai et al. (2002), quienes han señalado que varios inhibidores del proceso de fosforilación de proteínas, particularmente la Calyculina A y el ácido benzil-fosfónico previenen la segmentación, pero sin inhibir por completo el proceso de compactación del embrión.

A través de varios estudios *in vivo* e *in vitro* se ha podido establecer que las cadherinas son las principales moléculas de adhesión que mantienen a las células unidas entre sí durante las primeras etapas del desarrollo embrionario. *In vitro* la utilización de anticuerpos anti cadherina tiene un efecto de disgregación de los blastómeros (Shirayoshi et al., 1983), mientras que *in vivo*, las mutaciones que inactivan la función de las cadherina inhiben el proceso de compactación (Larue et al., 1994).

Se sabe que los componentes del complejo Cadherina-E-Catenina en el cigoto y en el embrión temprano se derivan de la actividad de los genes de la madre a través del RNAm que es conservado durante las fases iniciales de la segmentación. En el cigoto humano la actividad genómica es evidente en el estadio de 4 células (Taylor et al., 1997). Sin embargo, también se ha encontrado que la participación del genoma del embrión es ya importante en la etapa de dos células. La evidencia de

clara expresión genética en el estadio de dos células (Nothias et al., 1995; Minami et al., 2001; Wiekowski et al., 1997) y el hallazgo de notables diferencias entre los embriones masculinos y femeninos en esta misma etapa (Mittwoch, Watt & Aplin, 1995) parecen indicar que en los embriones de mamíferos la transición de 2 (tal vez de una célula) a 4 células marca la transición entre la etapa de control genómico de la madre y el dominio de la información genética del embrión (incluyendo la degradación evidente del RNAm materno). Estos datos apoyan la idea de que la diferenciación del embrión en el animal superior se inicia efectivamente tan temprano como la etapa de dos blastómeros. En apoyo de estas ideas debe agregarse que en los embriones del humano y del ratón se ha descrito una clara polarización bilateral en el embrión de dos células (Edwards and Beard, 1997; Neganova et al., 2000). Nuestros datos parecen apoyar esta posibilidad: la estructura del embrión de cuatro células, particularmente los obtenidos de nulíparas jóvenes, indica que ya existe la evidencia de una clara polarización en la distribución de la Cadherina E entre los contactos intercelulares y el resto de la membrana plasmática, aplanamiento celular y adecuadas comunicaciones intercelulares.

La etapa del desarrollo en la cual se lleva a cabo la compactación embrionaria varía entre las diferentes especies: en los roedores ocurre en la etapa de 8 blastómeros, en bovinos en la etapa de 16 a 32 y en los conejos en la etapa de 32 a 64 blastómeros (Nikas *et al.*, 1996). Los mecanismos que regulan el inicio de la compactación en los embriones no son totalmente conocidos, sin embargo, una serie de modificaciones post-traduccionales que incluyen la redistribución (Vestweber *et al.*, 1987; Bloor *et al.*, 2000) y la fosforilación de la cadherina-E han sido relacionados con el inicio de la compactación embrionaria (Kawai *et al.*, 2002).

Varios reportes señalan que la Cadherina-E funciona como un agente anti-proliferativo, pero de acuerdo a los resultados de Liu et al. (2006) los contactos célula-célula establecidos a través de la Cadherina-E pueden tanto inhibir, como estimular la proliferación celular. Las significativas diferencias señaladas en nuestro trabajo entre las hembras jóvenes y las adultas, tanto nulíparas como multíparas, indican que la distribución adecuada de Cadherina- E en los embriones de cuatro células, tanto en el establecimiento de contactos intercelulares, como en la periferia de la membrana celular, son un factor importante en la regulación y estimulación de la división de los blastómeros en el embrión temprano de hámster. Recordemos que la persistencia de embriones de cuatro células, por periodos largos de tiempo, y la aparición tardía de mórulas, son dos de las diferencias significativas encontradas por nosotros entre las hembras nulíparas jóvenes y las hembras multíparas adultas durante el desarrollo embrionario temprano (Navarro et al., 2000). Estos resultados son similares a los reportados por Blaha (1964) quien encontró que a las 63-68 horas post ovulación, menos del 1% of los embriones recuperados de las hembras jóvenes son embriones de cuatro células, mientras que pueden alcanzar hasta el 18 % en los animales adultos. Parece evidente que la concentración insuficiente de Cadherina E encontrada en los embriones de cuatro células obtenidos de hembras adultas, tanto nulíparas como multíparas, así como su inadecuado patrón de distribución, puede formar parte de los factores que propician el retardo y la desincronización del proceso de segmentación del embrión en estos dos tipos de hembras. Estos resultados estarían de acuerdo con otros reportes que muestran que el aumento en el contenido de Cadherina-E, y su localización en la periferia celular, se asocian con un aumento en la proliferación celular (Brabletz et al., 2001; Sundfelt 2003; Reddy et al., 2005; Liu et al., 2006).

Se ha considerado que la formación del embrión de ocho células, seguido de la compactación y la formación de una mórula, es el estadio más temprano en que se manifiesta el proceso de diferenciación, el cual termina con la producción de dos tipos de células en el embrión: un pequeño grupo de blastómeros internos ó no polares que están rodeados por otro grupo de blastómeros externos ó polares (Gilbert, 1994). Los blastómeros polares contribuyen a la formación de las células del **Trofectodermo** que darán origen a la placenta y a otras estructuras extraembrionarias, mientras que los no polares darán origen a la **Masa Celular Interna** (MCI) cuyas células producirán al embrión (Suzuki et al., 1999). En la regulación de estos trascendentes procesos participan una serie de estructuras y procesos celulares, tales como microfilamentos, microtúbulos, calcio intracelular, proteína cinasa C ó PKC (Fleming et al., 2001) y moléculas de adhesión celular (Takeichi, 1988; Pey et al., 1998), particularmente la Cadherina-E.

La compactación parece ser indispensable para el desarrollo morfogenético que llevará a la formación de los dos grupos celulares que darán como resultado la formación de la masa celular interna y el trofectodermo. Es entonces posible postular que la síntesis, almacenamiento y distribución de la Cadherina-E en embriones antes de la compactación debe constituir un hecho de la mayor importancia para el desarrollo sincrónico y adecuado del embrión del mamífero. La Cadherina-E parece funcionar tanto como agente que como sujeto en estos procesos. Por un lado, la activación de la Rac1 por la Cadherina-E (Nakagawa et al., 2001; Noren et al., 2001), parece inducir el reclutamiento de la Actina para el establecimiento de uniones adherentes intercelulares firmes (Ehrlich et al., 2002; Chu et al., 2004). Por otro lado, en el ratón, en el humano y probablemente también en el hámster, el

proceso de compactación se desarrolla sin requerir la síntesis de novo de proteínas y se caracteriza por la modificación post-traducción de moléculas de Cadherina-E ya sintetizadas, pero que no son funcionales (Ohsugi et al., 1996; Kawai et al., 2002). Estas modificaciones inducen a la Cadherina a relocalizarse en las superficies lateral y basal de los blastómeros para propiciar el establecimiento de uniones celulares firmes y una polarización celular adecuada. Algunas proteínas del grupo de las GTPasas pequeñas, como la Rac, parecen participar de una manera crítica en el establecimiento de amplias zonas de contacto firme entre los blastómeros (Wheelock and Johnson, 2003; Kovacs et al., 2002).

Durante el desarrollo preimplantacional del embrión la Cadherina-E es acumulada en el citoplasma como una molécula inactiva, prefuncional, lista para ser utilizada (Ohsugi et al., 1996). Estos autores han propuesto que la acumulación de cantidades adecuadas de esta molécula de adhesión es indispensable para que el proceso de compactación pueda verificarse sin trastornos en el momento preciso del desarrollo embrionario. Los resultados de Goval et al. (2000) indican que, como un prerrequisito para que se realice satisfactoriamente el proceso de compactación del embrión, la β -catenina debe ser también redistribuida en lados opuestos de la membrana celular. De manera muy especial la presencia de cantidades adecuadas de Cadherina-E prefuncional parece ser un requisito indispensable durante la transición de mórula a blastocisto. La falta de Cadherina en este momento interfiere definitivamente con el establecimiento de un trofoectodermo funcional (Kan et al., 2007). Nuestros resultados en el hámster parecen apoyar esta conclusión y muestran, adicionalmente, que el retraso en el desarrollo embrionario encontrado en las hembras adultas parece ser debido, al menos en parte, a una acumulación

insuficiente de Cadherina-E en el citoplasma de los blastómeros en el estadio de cuatro células del desarrollo del embrión.

Según Neganova et al. (2000) el enriquecimiento de Cadherina-E en los contactos entre blastómeros hermanos contribuye a la organización de los blastómeros durante las fases iniciales de la segmentación del embrión, definiendo la presencia de zonas libres de micro vellosidades. Esta polarización temprana del embrión parece ser importante para mantener la armonía y sincronización de las segmentaciones tempranas y en la predeterminación del futuro de cada blastómero (Edwards y Beard, 1997; Gardner, 1997; Antczak y Blerkom, 1998, 1999). La producción de dominios especialmente polarizados en la membrana plasmática es indispensable durante la realización de procesos celulares importantes (Drubin and Nelson, 1996), incluyendo la diferenciación. Por lo tanto, la reducción señalada en este trabajo en la concentración de Cadherina-E asociada a la membrana en los embriones de 4 células obtenidos de hembras adultas, podría ser un factor que contribuyera a explicar los trastornos del desarrollo embrionario temprano observados en nuestro trabajo. Estos resultados son similares a los reportados, bajo diferentes condiciones experimentales, por Barth et al. (1997).

Los estudios *in vitro* sugieren que una gran proporción de pérdidas embrionarias ocurren durante las fases del desarrollo embrionario anteriores a la implantación. Los datos de Hardy (1993) muestran que después de la fertilización *in vitro* de ovocitos humanos aproximadamente el 95 % experimentan rápida y fácilmente las dos primeras divisiones celulares; pero la segmentación se detiene en este punto y ~60% de los embriones cultivados no pasa a la etapa de 8 células, antes de la

compactación y de la formación del blastocisto. Más recientemente ha sido confirmado que el éxito de este proceso de reproducción asistida se correlaciona con un desarrollo embrionario sincrónico y que los embriones destinados a sobrevivir muestran un patrón adecuado de uniones intercelulares durante su desarrollo inicial (Hardy et al. 1996; Scott et al., 2000; Bloor et al., 2002; Kan et al. 2007). En este contexto nuestros resultados adquieren particular importancia puesto que señalan que los problemas reproductivos asociados frecuentemente con la multiparidad y/o la edad (Ortiz, 1955; Soderwall et al., 1960; Van Kooij et al., 1996) pueden ser debidos a modificaciones en el patrón de distribución de uniones intercelulares en el embrión temprano.

Se ha propuesto que el embrión es capaz de auto-regular su desarrollo y su transporte durante las fases anteriores a la implantación. Los resultados obtenidos en este trabajo soportan esta idea y sugieren que la cadherina-E podría ser uno de estos factores ya que existen diferencias significativas en su distribución entre los embriones de las hembras jóvenes y los embriones de las hembras adultas o múltiparas que contribuyen a explicar las diferencias encontradas tanto en su segmentación como en su transporte.

Una vez que se ha llevado a cabo la fertilización, el cigoto o embrión, que carece de movilidad propia, debe ser transportado hasta su sitio de implantación en el útero, desplazándose a través del oviducto (Villalón et al., 1999). Para ello puede utilizar la regulación de diferentes procesos oviductales, como la contracción de la musculatura lisa, la actividad de las células ciliadas y el movimiento del fluido oviductal en dirección al útero (Martinez et al., 2000). A fin de que el embrión y el

endometrio alcancen un desarrollo sincrónico óptimo para lograr una implantación exitosa, el transporte del embrión a través de la trompa y su llegada al útero deben estar programadas y sujetas a regulación fisiológica estricta. Hasta el momento se han descrito tres sistemas reguladores del transporte oviductal; uno que utiliza señales embrionarias, otro en el que predominan los esteroides ováricos, y un tercero, probablemente el más viable, en el que participan señales tanto originadas en el organismo materno, como señales originadas en el embrión mismo..

En la rata, la duración del transporte oviductal es dependiente, al menos en parte, de las hormonas ováricas (Croxatto, 2002). El estradiol y la progesterona secretadas por el ovario tienen un papel importante en la regulación del transporte oviductal (Ortiz et al., 1979) a través de receptores intracelulares oviductales que controlan la síntesis de proteínas (Orihuela et al., 2001). El estradiol aumenta la velocidad de transporte embrionario, mientras que la progesterona ejerce un efecto contrario (Villalón et al., 1999). El estradiol ejerce sus efectos a través de dos mecanismos: uno genómico y otro no genómico. Las acciones genómicas se basan en la capacidad de los receptores a estradiol para unirse a co-activadores o co-represores que dan por resultado la activación o inhibición de la transcripción de ciertos genes (Nilsson et al., 2001). La activación de señales de transducción puede ayudar a la modulación de vías importantes que tienen discretas acciones celulares, incluyendo la fosforilación de proteínas a través de tirosín-cinasas y de la MAPK (Migliaccio et al., 2000). La fosforilación inducida por estradiol es esencial para acelerar el transporte embrionario en el oviducto (Levin et al., 2001). Esto es de gran importancia para nuestro trabajo pues la firmeza de las uniones intercelulares en que

participa la Cadherina-E depende de la fosforilación de las proteínas que participan (ver más abajo)

Las acciones no genómicas de estradiol resulta de la activación de sistemas de señalización celular dependientes de la existencia de receptores membranales. Los estrógenos pueden iniciar una señalización no genómica rápida asociada con la activación de segundos mensajeros (Nadal et al., 2001). Entre estas vías de señalización se encuentra también la activación de la proteín-kinasa activada por mitógenos o MAPK (por sus siglas en inglés Mitogen Activated Protein Kinase), la proteín-kinasa C y la cinasa del 1-3-difosfoinositol (PI3K) (Levin, 1999).

Se ha establecido que durante su estancia en la trompa de Falopio, el embrión temprano es capaz de producir la modificación de su microambiente induciendo la vascularización y la formación de células secretoras que le aseguren una nutrición adecuada durante los primeros cinco días de su vida (Georgiou et al., 2007). También participa en la regulación de su velocidad de transporte modificando el movimiento ciliar y la contractilidad del oviducto. Estos efectos ocurren entre las 24 y 48 horas después de que ocurre la fertilización implicando que las cascadas de señalización son rápidamente iniciadas a través de señales producidas por el embrión. La información disponible en la especie humana sugiere que los esteroides ováricos no cumplen un papel fundamental en la regulación del transporte oviductal, lo cual hace probable que esté regulado por señales embrionarias. La regulación del transporte oviductal en el hámster presenta cierta similitud con la humana ya que en ambas especies los embriones secretan factor activador de plaquetas (PAF) y los oviductos expresan receptores para PAF (Velasquez et al., 2001). Estos receptores

son funcionales ya que en ambas especies median trombocitopenia asociada a la preñez temprana (Velasquez et al., 1995). Sugerimos que el transporte oviductal en el háster, de modo semejante a lo que parece suceder en la especie humana, es regulado por el embrión a través de la liberación de PAF y que algunos aspectos de las patologías tubáricas están relacionados con alteraciones en el sistema de señalización del PAF que dependen de la segmentación adecuada del embrión.

Las cadherinas fueron descubiertas en un principio únicamente como moléculas que participan en la formación de uniones entre células adyacentes. Sin embargo, recientemente se ha establecido que las cadherinas también participan en la regulación de las funciones celulares a través de tres vías de señalización que dependen de su interacción con otro tipo de moléculas de señalización: GTPasas, la vía Wnt y a través de receptores tirosina quinasa (Yap y Kovacs, 2003). Un segundo modelo sugiere que la misma cadherina puede participar en la transducción de señales celulares desde el exterior hacia el interior de la célula (Müller et al., 2008).

Hay evidencia de que existen dos vías de señalización que involucran a las GTPasas como vías de señalización de las cadherinas. Una interna-externa, de la GTPasa a la cadherina y la externa-interna, iniciada por la cadherina. Se ha establecido que la formación de contactos celulares dependientes de cadherina-E activa a la señal a través de Rac1 (Kovacs et al., 2002) miembro de la familia Rho de GTPasas. La familia de Rho GTPasas tiene cuatro funciones totalmente establecidas: formación y organización de los filamentos de actina en el citoesqueleto; regulación de la dinámica de los microtubulos del citoesqueleto; trafico membranal (secreción, endocitosis y fagocitosis); regulación de la expresión génica

y control del crecimiento celular (Noren et al., 2003; Malliri et al., 2004). Un atractivo mecanismo para el efecto de cadherina en las proteínas G podría involucrar una activación local de fosfatidilinositol 3 cinasa (PI-3K) a través de la fijación de Cadherina-E (Kovacs et al., 2002; Pece et al., 1999).

La vía Wnt/ catenina- β es la vía de señalización estudiada que mejor indica el funcionamiento de la Cadherina-E a través de su molécula de unión la catenina- β . Esta vía tiene como objetivo principal regular la estabilidad de la catenina- β que actúa como cofactor de transcripción afectando la expresión génica (Clevers, 2006). En la ausencia del ligando Wnt, el nivel citosólico de la catenina- β es bajo, debido a su ubiquitinación dependiente de fosforilación y posterior degradación (Clevers, 2006). La catenina beta fosforilada es reconocida por la enzima Trcp-beta, una subunidad con actividad ligasa de la ubiquitina E3, dando por resultado que la catenina beta sea ubiquitinada y degradada. La Wnt, a través de varios complejos (He et al., 2004), recluta Axina a la membrana celular, resultando en la inhibición de la degradación de la catenina beta fosforilada. La catenina beta así estabilizada se acumula en el núcleo (Staal et al., 2002) y forma complejos con algunos factores de transcripción como son el factor de células T/factor aumentador de linfocitos o TCF/LEF, estos factores de transcripción se unen al ADN para activar la expresión génica (Gonçalves et al., 2008).

Otro de los mecanismos utilizados por las cadherinas para transmitir señales hacia el interior de a células es a través de receptores tirosina quinasa o RTK (por sus siglas en ingles Receptor Tyrosine Kinase). Dentro de este grupo de receptores se encuentran los siguientes: receptor del factor de crecimiento epidermal o EGFR, al

factor de crecimiento parecido a insulina, receptor del factor de crecimiento neural o NGFR, el factor de crecimiento de fibroblastos o FGF receptor (Tsukita et al., 1991).

Pece y Gutkind (2000) reportaron que la señalización a través de receptores será activada cuando las células hacen contacto con otras células. También sugieren que la cadherina podría inducir el reclutamiento y autoactivación del receptor al factor de crecimiento a través de interacciones laterales heterofilicas entre el receptor tirosina quinasa y el complejo cadherina-catenina. El establecimiento de las uniones dependientes de cadherina promueve la activación independiente del receptor al factor de crecimiento de las siguientes dos vía Akt y MAPK (Reddy et al., 2005).

CONCLUSIONES

Con los resultados obtenidos en este trabajo se puede concluir que una concentración insuficiente y un patrón de distribución inadecuado de la cadherina-E en los embriones obtenidos de hembras nulíparas adultas y multíparas, puede ser uno de los factores que propician el retraso y asincronía en el proceso de segmentación de los embriones obtenidos de estos tipos de hembras.

En relación con el transporte del embrión a través del oviducto también se puede concluir que la cadherina-E podría ser uno de los factores embrionarios que participan en la autoregulación de su transporte durante las etapas preimplantacionales.

Otra conclusión de este trabajo es en relación con la polarización de la célula, de la distribución de la Cadherina E entre los contactos intercelulares y el resto de la membrana plasmática, aplanamiento celular y adecuadas comunicaciones intercelulares.

BIBLIOGRAFIA

- Avery, B.; Jorgensen, C.B.; Madison, V.; Greve, T. 1992. Morphological development and sex of bovine in vitro-fertilized embryos. *Mol. Reprod and Develop.* 32: 264-270.
- Antczak M, Van blerkmon J. 1997. Oocyte influences on early development: the regulatory proteins leptin and STAT3 are polarized in mouse and human oocytes and differentially distributed within the cells of the preimplantation stage embryo. *Mol. Hum. Reprod.* 3(12):1067-86.
- Anzalone, Ch.R.; Hong, L.S; Lu, J.K.H.; LaPolt, P.S. 2001. Influences of age and ovarian follicular reserve on estrous cycles patterns, ovulation, and hormone secretion in the Long-Evans rat. *Biol. Reprod.* 64:1056-1062.
- Barth, A. I., Nathke, I. S. & Nelson, W. J. (1997). Cadherins, catenins and APC protein: interplay between cytoskeletal complexes and signalling pathways. *Curr. Opin. Cell Biol.* 9, 683–690.
- Balda MS, Matter K. 1998. Tight junctions. *J. Cell sci.* 111(Pt 5):541-7
- Blaha, G.C. 1964. Effect of age of the donor and recipient on the development of transferred golden hamster ova. *Anat. Rec.* 150 :413-416.
- Benos DJ, Biggers JD, Balaban RS, Mills JW, Overström EW. Development aspects of the sodium-dependent transport processes of preimplantation rabbit embryos. *Soc. Gen. Physiol. Ser.* 39:211-35.
- Borland RM, Biggers JD, Lechene CP. 1977. Fluid transport by rabbit blastocysts in vitro. *J. Reprod. Fertil.* 51; 131-135.
- Bloor DJ., Metcalfe AD., Rutherford A., Brison DR., Kimler SJ. 2002. Expression of cell adhesion molecules during human preimplantation embryo development. *Mol Hum Reprod.* Mar;8(3):237-45
- Croxatto HB. 2002. Physiology of gamete and embryo transport through the fallopian tube. *Reprod. Biomed. Online* 4: 160-169.
- Chu, Y.S., Thomas, W. A., Eder, O., Pincet, F., Pérez, E., Thiery, J.P. & Dufour, S. (2004). Force measurements in E-Cadherin mediated cell doublets reveal rapid adhesion strengthened by actin cytoskeleton remodeling through Rac and Cdc42. *J. Cell Biol.* 167, 1183-1194.
- Day, J.R.; Lapolt, P.S.; Lu, J.K.H. 1991. Plasma patterns of prolactin, progesterone, and estradiol during early pregnancy in aging rats: relation to embryonic development. *Biol Reprod.* 44:786-790.
- Dragsten PR, Blumenthal R, Handler JS. 1981. Membrane asymmetry in epithelia: is the tight junction a barrier to diffusion in the plasma membrane?. *Nature* Dec 24, 294(5843):718-22
- Doherty P, Walsh FS. 1994. Signal transduction events underlying neurite outgrowth stimulated by cell adhesion molecules. *Curr. Opin. Neurobiol.* 4(1):49-55.
- Day, J.R.; Lapolt, P.S.; Morales, T.H.; Lu, J.K.H. 1989. An abnormal pattern of embryonic development during early pregnancy in aging rats. *Biol. Reprod.* 41:933-939.

- Edwards, H.E.; Tweedie, Ch. J.; Terranova, P.F.; Lisk, R.D.; Wynne-Edwards, K.E. 1998. Reproductive aging in the Djungarian hamster, *Phodopus campbelli*. *Biol. Reprod.* 58:842-848.
- Edwards RG, Beard HK. 1997. Oocyte polarity and cell determination in early mammalian embryos. *Mol. Hum. Reprod.* 3(10):863-905
- Flach G, Johnson MH, Braude PR, Taylor RA, Bolton VN. 1982. The transition from maternal to embryonic control in the 2-cell mouse embryo. *EMBO J.* 1:681-686.
- Fleming TP., Sheth B., Fesenko I. 2001. Cell adhesion in the preimplantation mammalian embryo and its role in trophoctoderm differentiation and blastocyst morphogenesis. *Front Biosci.* Aug 1;6:D1000-7.
- Fleming TP, Kwong WY, Porter R, Ursell E, Fesenko I, Wilkins A, Miller DJ, Watkins AJ, Eckert JJ. 2004. The embryo and its future. *Biol Reprod.* Oct;71(4):1046-54
- Forcelledo, M.L.; Vera, R. Croxatto, H.B. 1981. Ovum transport in pregnant, pseudopregnant, and cycle rats and its relationship to estradiol and progesterone blood levels. *Biol. Reprod.* 24:760-765.
- Gilbert, S.F. 1994. *Development Biology.* Sinauer Associates, Inc. Sunderland, Massachusetts. USA. 4^o ed. Pp 725-746.
- Goval JJ, Alexandre H. 2000. Effect of genistein on the temporal coordination of cleavage and compaction in mouse preimplantation embryos. *Eur J. Morphol.* 38(2): 88-96.
- Goval, J. J., Van Cauwenberge, A. & Alexandre, A. (2000). Respective roles of protein tyrosine kinases and protein kinases C in the upregulation of β -catenin distribution, and compaction in mouse preimplantation embryos: a pharmacological approach. *Biol. Cell.* 92, 513-516.
- Gonçalves V, Matos P, Jordan P. 2008. The beta-catenin/TCF4 pathway modifies alternative splicing through modulation of SRp20 expression. *RNA* 14(12):2538-49.
- Goodwin BC, Lacroix NH. 1984. A further study of the holoblastic cleavage field. *J. Theor. Biol.* Jul 7; 109(1):41-58.
- Gumbiner BM. 1996. Cell Adhesion: The molecular basis of tissue architecture and morphogenesis. *Cell* (84): 345 357.
- Gumbiner BM. 2000. Regulation of cadherin adhesive activity. *J Cell Biol.* Feb 7;148(3):399-404.
- Halbleib JM y Nelson WJ. 2006. Cadherins in development: cell adhesion, sorting, and tissue morphogenesis. *Genes Dev.* 20(23):3199-214.
- Harrison OJ., Corps EM., Kilshaw PJ. 2005. Cadherin adhesion depends on a salt bridge at the N-terminus. *J Cell Sci.* 2005 Sep 15;118(Pt 18):4123-30. Epub 2005 Aug 23. Erratum in: *J Cell Sci.* Oct 1;118(Pt 19):4587.
- Hardy, K. (1993). Development of human blastocysts *in vitro*. In Bavister, B. D. (ed), *Preimplantation Embryo Development.* Springer-Verlag, New York. pp. 184-199.

- Hardy K, Warner A, Winston RM, becker DL. 1996. Expression of intercellular junctions during preimplantation development of the human embryo. *Mol. Hum. Reprod.* 2(8):621-32.
- Ortiz E. 1955. The relation of advancing age to reactivity of the reproductive system in the female hamster. *Anat. Rec.* 122(4):517-37.
- Ivanov DB, Philippova MP y Tkachuk VA. 2001. Structure and Functions of Classical Cadherins. *Biochemistry (Moscu)* 66(10): 1174-1286.
- Johnson MH, Maro B, Takeichi M. 1986. The role of cell adhesion in the synchronization and orientation of polarization in 8-cell mouse blastomeres. *J. Embryol. Exp. Morph.* 93, 239-255
- Johnson, M.H.; Ziomek, C.A. 1981. Induction of polarity in mouse 8-cell blastomeres: specificity, geometry, and stability. *J. Cell Biology* 91;303-308.
- Kan, N. G., Stemmler, M. P., Junghans, D., Kanzler, B., de Vries, W. N., Dominis, M. & Kemler, R. (2007). Gene replacement reveals a specific role for E-Cadherin in the formation of a functional trophectoderm. *Development* 134, 31-41.
- Kovacs, E. M., Ali, R. G., McCormack, A. J. & Yap, A. S. (2002). E-Cadherin homophilic ligation directly signals through Rac and PI3-kinase to regulate adhesive contacts. *J. Biol. Chem.* 277, 6708–6718.
- Kawai Y., Yamaguchi T., Yoden T., Hanada M. & Miyake, M. (2002). Effect of protein phosphatase inhibitors on the development of mouse embryos: protein phosphorylation is involved in the E-Cadherin distribution in mouse two-cell embryos. *Biol. Pharm. Bull.* 25, 179-183.
- Kubisch HM, Larson MA, Roberts RM. 1998. Relationship between age of blastocyst formation and interferon-tau secretion by in vitro-derived bovine embryos. *Mol. Reprod. Dev.* 49(3):254-60.
- Kendle, K.E.; Lee, B. 1980. Investigation of the influence of progesterone on mouse embryo transport by using antiprogesterone steroids. *J. Reprod. Fert.* 58: 252-258.
- Kidder, G.M.; Rains, J.; McKeon, J. 1987. Gap junction assembly in the preimplantation mouse conceptus is independent of microtubules, microfilaments, cell flattening, and cytokinesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 84(11):3718-3722.
- Kimmel CB, Law RD. 1985. Cell lineage of zebrafish blastomeres. I. Cleavage pattern and cytoplasmic bridges between cells. *Dev. Biol.* 108(1): 78-85.
- Kozuka, M.; Ito, T.; Hirose, S.; Tkahashi, K.; Hagiwara, H. 1989. Endothelin induces two types of contractions of rat uterus: phasic contractions by way of voltage-dependent calcium channels and developing contractions through a second type of calcium channels. *Biochem. and Biophys. Research Comm.* 159(1):317-323.
- Kowalczyk AP, Bornslaeger EA, Norvell SM, Palka HL, Green KJ. 1999. Desmosomes: intercellular adhesive junctions specialized for attachment of intermediate filaments. *Int. Rev. cytol.* 185:237-302.
- LaPolit PS, Day JR, Lu JK. 1990. Effects of estradiol and progesterone on early embryonic development in aging rats. *Biol. Reprod.* 43(5):843-50

- Lonergan P, Khatir H, Piumi F, Rieger D, Humblot P, Boland MP. 1999. Effect of time interval from insemination to first cleavage on the development characteristics, sex ration and pregnancy rate after transfer of bovine embryos. *J. Reprod. Fertil.* 117(1):159-67.
- Latham KE., Schultz RM. 2001. Embryonic genome activation. *Front Biosci*; 6: D748-759.
- Liu Y, Nusrat A, Schnell FJ, Reaves TA, Walsh S, Pochet M, Parkos CA. 2000. Human junction adhesion molecule regulates tight junction resealing in epithelia. *J. Cell sci.* 113(Pt 13):2363-74.
- Larue L, Ohsugi M, Hirchenbain J, Kemler R. 1994. E-cadherin null mutant embryos fail to form a trophectoderm epithelium. *Proc. Natl. Acad. Sci USA.* 91(17):8263-7.
- Liu, W, F., Nelson, C. M., Pirone, D. M. & Chen Ch. S. (2006). E-Cadherin engagement stimulates proliferation via Rac1. *J. Cell Biol.* 173, 431-441.
- Martinez, S.P; Viggiano, M.; Franchi, A.M.; Herrero, M.B.; Ortiz, M.E.; Gimeno, M.F.; Villalón, M. 2000. Effect of nitric oxide synthase inhibitors on ovum transport and oviductal smooth muscle activity in the rat oviduct. *J. Reprod. and Fert.* 118: 111-117.
- Martinez, P.S.; Franchi, A.M.; Viggiano, J.M.; Herrero, M.B.; Gimeno, M. 1998. Effect of prostaglandin F2 alpha (PGF2 alpha) on oviductal nitric oxide synthase (NOS) activity: possible role of endogenous NO on PGF2 alpha-induced contractions in rat oviduct. *Prostaglan. Other Lipid Mediat* 56(2-3):155-166.
- Mayor, R.; Izquierdo, L. 1994. Morulae at compaction and the pattern of protein synthesis in mouse embryos. *Differentiation* 55(3):175-184.
- Mese G, Richard G, White TW. 2007. Gap junctions: basic structure and function. *J. Invest. Dermatol.* 127 (11):2516-24
- Minami N, Suzuki T, Tsukamoto S. 2007. Zygotic gene activation and maternal factors in mammals. *J. Reprod. Dev.* 53(4):707-715.
- Minami, N., Sasaki, K., Aizawa, A., Miyamoto, M. & Imai, H. (2001). Analysis of gene expression in mouse 2-cell embryos using fluorescein differential display: Comparison of culture environments, *Biol. Reprod.* 64, 30-35.
- Murray, M.K.; Messinger, S.M. 1994. Early embryos development in the Djungarian hamster (*Phodopus sungorus*) is accompanied by alterations in the distribution and intensity of an estrogen (E2)-dependent oviduct glycoprotein in the blastomere membrane and zona pellucida and in its association with F-actin. *Biol. Reprod.* 51:1126-1139.
- Migliaccio A, Castoria G, Di Domenico M, de Falco A, Bilancio A, Lombardi M, Barone MV, Ametrano D, Zannini MS, Abbondanza C , Auricchio F. 2000. Steroid-induced androgen receptor-oestradiol receptor beta-*Src* complex triggers prostate cancer cell proliferation. *EMBO J.* 2000 Oct 16;19(20):5406-17.
- Müller EJ, Williamson L, Kolly C, Suter MM. 2008. Outside-in signaling through integrins and cadherins: a central mechanism to control epidermal growth and differentiation?. *J. Invest. Dermatol.* 128(3):501-16.
- Nadal A, Ropero AB, Laribi O, Maillet M, Fuentes E, Soria B. 2000. Nongenomic actions of estrogens and xenoestrogens by binding at a plasma membrane receptor unrelated to

estrogen receptor alpha and estrogen receptor beta. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 97(21):11603-8.

Nothias JY, Majumder S, Kaneko KJ, DePamphilis ML. 1995. Regulation of gene expression at the beginning of mammalian development. *J. Biol. Chem.* 270(38):22077-80.

Nikas G, Ao A, Winston RM, Handyside AH. 1996. Compaction and surface polarity in the human embryo in vitro. *Biol. Reprod.* 55(1): 32-7.

Neganova, I. E., Sekirina, G. G. & Eichenlaub-Ritter, U. (2000). Surface-expressed E-Cadherin, and mitochondrial and microtubule distribution in rescue of mouse embryos from 2-cell block by aggregation. *Mol. Hum. Reprod.* 6, 454-464.

Navarro-Maldonado, M.C., Ambríz, D.G., Mundo, E.R., Trejo, A.C., Hernández, O.P. & Rosado, A. (2000). Desarrollo embrionario temprano en el hámster sirio dorado, *Mesocricetus auratus* (Mammalia:rodentia). *Acta Zool. Mex.* 105-115.

Nieder, G.L.; Caprio, T.L. 1990. Early embryos development in the siberian hamster (*Phodopus sungorus*). *Mol. Reprod. and Develop.* 27:224-229.

Niessen CM. 2007. Tight junctions/adherens junctions: basic structure and function. *J. Invest. Dermatol.* 127(11):2525-32.

Nollet, F., Kools, P., and van Roy, F. 2000. Phylogenetic analysis of the cadherin superfamily allows identification of six major subfamilies besides several solitary members. *J. Mol. Biol.* 299: 551–572.

Nakagawa M, Fukata M, Yamaga M, Itoh N, Kaibuchi K. 2001. Recruitment and activation of Rac 1 by the formation of E-cadherin-mediated cell-cell adhesion sites. *J. Cell Sci.* 114(Pt 10):1829-38.

Neganova, I. E., Sekirina, G. G. & Eichenlaub-Ritter, U. (2000). Surface-expressed E-Cadherin, and mitochondrial and microtubule distribution in rescue of mouse embryos from 2-cell block by aggregation. *Mol. Hum. Reprod.* 6, 454-464.

Noren, N. K., Niessen, C. M., Gumbiner, B. M. & Burridge K.. (2001). Cadherin engagement regulates Rho family GTPases. *J. Biol. Chem.* 276, 3330-33308.

Nose A., Tsuji K., Takeichi M. 1990. Localization of specificity determining sites in cadherin cell adhesion molecules. *Cell.* Apr 6;61(1):147-55.

Ortiz, M.E.; Villalón, M.; Croxatto, H. 1979. Ovum transport and fertility following postovulatory treatment with estradiol in rat. *Biol. Reprod.* 21:1163-1167.

Ortiz, M. E., Bedregal, P., Carvajal, M.I. & Croxatto, H.B. (1986). Fertilized and unfertilized ova are transported at different rates by the hamster oviduct. *Biol. Reprod.* 34, 777-781.

Orihuela, A.P.; Ríos, M.; Croxatto, H.B. 2001a. Disparate effects of estradiol on egg transport and oviductal protein synthesis in mated and cyclic rats. *Biol. Reprod.* 65: 1232-1237.

Overduin M, Harvey TS, Bagby S., Tong KI, Yau P, Takeichi M, Ikura M.1995. Solution structure of the epithelial cadherin domain responsible for selective cell adhesion. *Science.* Jan 20;267(5196):386-9.

- Ohsumi, M., Butz, S. & Kemler, R. (1996). β -Catenin is a major tyrosine-phosphorylated protein during mouse oocyte maturation and preimplantation development. *Dev. Dyn.* 206, 391–402.
- Ortiz, M.E.; Villalón, M.; Croxatto, H. 1979. Ovum transport and fertility following postovulatory treatment with estradiol in rat. *Biol. Reprod.* 21:1163-1167.
- Orihuela, A.P.; Ríos, M.; Croxatto, H.B. 2001a. Disparate effects of estradiol on egg transport and oviductal protein synthesis in mated and cyclic rats. *Biol. Reprod.* 65: 1232-1237.
- Pece S., Chiariello M., Murga C., Gutkind JS. 1999. Activation of the protein kinase Akt/PKB by the formation of E-cadherin-mediated cell-cell junctions. Evidence for the association of phosphatidylinositol 3-kinase with the E-cadherin adhesion complex. *J Biol Chem.* Jul 2;274(27):19347-51.
- Pece S, Gutkind JS. 2000. Signaling from E-cadherins to the MAPK pathway by the recruitment and activation of epidermal growth factor receptors upon cell-cell contact formation. *Mol Endocrinol.* Oct;19(10):2564-78
- Pey R, Vial C, Schatten G, Hafner M. 1998. Increase of intracellular Ca²⁺ and relocation of E-cadherin during experimental decompaction of mouse embryos. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 95(22):12977-82.
- Patel SD, Chen Ch P, Bahna F, Honig B y Shapiro L. 2003. Cadherin-mediated cell–cell adhesion: sticking together as a family. *Current Opinion in Structure Biology* 13(6):690-698
- Pratt HP, Ziomek CA, Reeve WJ, Johnson MH. 1982. Compaction of the mouse embryos: an analysis of its components. *J. Embryol. Exp. Morph.* 70:113-132.
- Palmer, R.M.J.; Ferrige, A.G; Moncada, S. 1987. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 327: 524-526.
- Perez-Moreno M y Fuchs E. 2006. Catenins: keeping cells from getting their signals crossed. *Dev Cell.* 11(5):601-12.
- Qiu JJ; Zhang WW; Wu ZL; Wang YH; Quian M; Li YP. 2003. Delay of ZGA initiation occurred in 2-cell blocked mouse embryos. *Cell Res* 13; 179-185.
- Rosselli, M.; Imthurn, B.; Macas, E.; Keller, P.J. and Dubey, R.K. 1994. Endogenous nitric oxide modulates endothelin-1 induced contraction of bovine oviduct. *Biochem. and Biophys. Research Comm.* 201(1):143-148.
- Ram PT, Schultz RM. 1993. Reporter gene expression in G2 of the 1-cell mouse embryo. *Dev. Biol.* Apr. 156(2):552-6
- Rasweiler, J.J. 1979. IV. Differential transport of embryos and degenerating ova by oviduct of the long-tongued bat *Glossophaga soricina*. *J. Reprod. Fertil.* 55:329-334.
- Ríos, M; Orihuela, A.P.; Croxatto, H.B. 1997. Intraoviductal administration of ribonucleic acid from estrogen-treated rats mimics the effect of estrogen on ovum transport. *Biol. Reprod.* 56:279-283.

Ruddock-D´Cruz NT, Hall VJ, Tecirlioglu RT, French AJ. 2007. Gene expression analysis of single preimplantation bovine embryos and the consequence for developmental potential. *Soc Reprod Fertil Suppl* 64:341-63.

Reddy, P., Liu, L., Ren, C., Lindgren, P., Boman, K., Shen, Y., Lundin, E., Ottander, U., Rytinky, M. & Liu, K. (2005). Formation of E-Cadherin mediated cell-cell adhesion activates Akt and mitogen activated protein kinase (MAPK) via phosphatidylinositol 3 kinase and ligand-independent activation of epidermal growth factor (EGF) receptor in ovarian cancer cells. *Mol. Endocrinol.* 19, 2564–2578.

Soderwall, A.L., Kent, H.A., Turbyfill, C.L. & Britenbaker, A. (1960). Variation in gestation length and litter size of the golden hamster *Mesocricetus auratus*. *J. Geront.* 15, 246-248.

Shapiro L, Fannon AM, Kwong PD, Thompson A, Lehmann MS, Grübel G, Legrand JF, Als-Nielsen J, Colman DR and Hendrickson WA.1995. Structural basis of cell-cell adhesion by cadherins. *Nature*. Mar 23; 374(6520):327-37.

Shasby DM. 2007.Cell-cell adhesion in lung endothelium. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. Mar; 292(3):L593-607.

Sato, A; Yanagimachi, R. 1972. Transplantation of preimplantation hamster embryos. *J. Reprod. Fert.* 30:329-332.

Schultz RM. 1993. Regulation of zygotic gene expression in the mouse. *Bioessays* 8, 531-8.

Storey, B.T. 1995. Interactions between gametes leading to fertilization: the sperm is age view. *Reprod Fertil Dev.* 7(4):927-942.

Suzuki, H.; Azuma, T.; Koyama, H.; Yang, X. 1999. Development of cellular polarity of hamster embryos during compaction. *Biol. Reprod.* 61:521-526.

Steinberg MS, McNutt PM. 1999. Cadherin and their connections: adhesion junctions have broader functions. *Curr. Opin. Cell Biol.* 11(5):554-60.

Soderwall, A.L.; Kent, H.A.; Turbyfill, C.L.; Britenbaker, A.L. 1960. Variation in gestation length and litter size of the golden hamster, *Mesocricetus auratus*. *J. Geront.* 15:246-248.

Shirayoshi Y, Okada TS, Takeichi M. 1983. The calcium-dependent cell-cell adhesion system regulates inner cell mass formation and cell surface polarization in early mouse development. *Cell* 35(Pt 2): 631-8.

Takeichi M. 1988. The cadherins: cell-cell adhesion molecules controlling animal morphogenesis. *Development* 102(4):639-55
Takeichi M. 1988. The cadherins: cell-cell adhesion molecules controlling animal morphogenesis. *Development* 102(4):639-55

Taylor DM, Ray PF, Ao A, Winston RM, Handyside AH. 1997. Paternal transcripts for glucose-6-phosphate dehydrogenase and adenosine deaminase are first detectable in the human preimplantation embryo at the three-to four-cell stage. *Mol- Reprod. Dev.* 48(4):442-8.

Tarkowski AK., Wroblewska J. 1967. Development of blastomeres of mouse eggs isolated at the 4- and 8-cell stage. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 18:155-180.

Takeichi M. 1991. Cadherin cell adhesion receptors as a morphogenetic regulator. *Science*. Mar 22; 251(5000):1451-5.

Trejo, A., Navarro-Maldonado, C., Jiménez, F. & Rosado, A. (2006). Effect of maternal age and parity on the presence and distribution of E-Cadherin in hamster embryos during pre-implantation development and transport. *Reprod. Fert. Devel.* 18, 181

Trejo et al., 2008

Trejo, C. A., Navarro, M. C., Ambríz, G. D. & Rosado, A. (2005). Effect of maternal age and parity on preimplantation embryo development and transport in the golden hamster (*Mesocricetus auratus*). *Lab. Animals* 39, 290-297

Takeichi M. 1995. Cadherin cell adhesion receptors as a morphogenetic regulator. *Science* 251(5000): 1451-1455.

Turner CE, Burridge K. 1991. Transmembrane molecular assemblies in the cell-extracellular matrix interactions. *Curr. Opin. Cell Biol.* 3(5):849-53.

Tsunoda, Y.; Tokunaga, T.; Sugie, T. 1985. Altered sex ration of live young after transfer of fast and slow developing mouse embryos. *Gamete Research* 12:310-304.

Velasquez, L.A.; Aguilera, J.G.; Croxatto, H.B. 1995. Possible role of platelet activating factor (PAF) in embryonic signalling during oviductal transport in the hamster. *Biol. Reprod.* 52: 1302-1306.

Velasquez LA, Maisey K, Fernandez R, Valdes D, Cardenas H, Imarai M, Delgado J, Aguilera J, Croxatto HB. 2001. PAF receptor and PAF acetylhydrolase expression in the endosalpinx of the human Fallopian tube: possible role of embryo-derived PAF in the control of embryo transport to the uterus. *Human Reprod.* 16(8):1583-7

Villalón, M.; Velasquez, L.; Croxatto, H. 1999. Oocyte and embryo transport. *Encyclopedia of Reproduction* Vol 3. pp459-468.

Villalón, M.; Ortiz, M.E.; Aguayo, C.; Muñoz, J.; Croxatto, H.B. 1982. Differential transport of fertilized and unfertilized ova in the rat. *Biol. Reprod.* 26: 337-341.

Vestweber D., Gossler A., Boller K., Kemler R. 1987. Expression and distribution of cell adhesion molecule uvomorulin in mouse preimplantation embryos. *Dev Biol.* Dec; 124(2):451-6.

Van Kooij, R. J., Looman, C. W. N., Habbema, J. D. F., Dorland, M. & te Velde, E. R. (1996). Age-dependent decrease in embryo implantation rate after in vivo fertilization. *Fert. Steril.* 66, 769-775.

Villalón, M.; Velasquez, L.; Croxatto, H. 1999. Oocyte and embryo transport. *Encyclopedia of Reproduction* Vol 3. pp459-468.

Wassarman PM, Jovine L, Qi H, Williams Z, Dariel C, Litscher ES. 2005. Recent aspects of mammalian fertilization research. *Mol. Cell. Endocry.* 234: 95-103.

Wassarman PM. 2003. Fertilization. *Chem. Tracts-Biochem. Mol. Biol.* 16: 117-204.

- Watson AJ, Pape C, Emanuel, JR, Levenson R, Kidder GM. 1990. Expression of Na/K-ATPase alpha and beta subunit genes during preimplantation development of the mouse. *Dev. Genet.* 11; 41-48.
- Wheelock MJ, Johnson KR. 2003. Cadherin-mediated cellular signaling. *Curr. Opin. Cell Biol.* 15(5):509-14.
- Weber, J.A.; Freeman, D.A.; Vanderwall, D.K.; Wooda, G.L. 1991. Prostaglandin E2 hastens oviductal transport of equine embryos. *Biol. Reprod.* 45:544-546.
- Wiekowski M, Miranda M, Nothias YJ, DePamphilis ML. 1997. Changes in histone synthesis and modification at the beginning of mouse development correlate with the establishment of chromatin mediated repression of transcription. *J. Cell Sci.* 110(Pt 10):1147-58.
- Mittwoch, Watt & Aplin, 1995
- Wijayagunawardane, M.P.;Choi, Y.H.; Miyamoto, A.; Kamishita, H.; Fujimoto, S. Takagi, M.; Sato, K. 1999a. Effect of ovarian steroids and oxytocin on the production of prostaglandin E2, prostaglandin F2 alpha and endothelin-1 from cow oviductal epithelial cell monolayers in vitro. *Animal Reprod. Sci.* 56:11-17.
- Wijayagunawardane, M.P.; Miyamoto, A.; Sato, K. 1999b. Prostaglandin E2, prostaglandin F2 alpha and endothelin-1 production by cow oviductal epithelial cell monolayers: effect of progesterone, estradiol 17 beta, oxytocin and luteinizing hormone. *Theriogenology* 52(5):791-801.
- Wu, J.T.; Dickman, Z.; Johnson, D.C. 1971. Effects of oestrogen and progesterone on the development, oviductal transport and uterine retention of eggs in hypophysectomized pregnant rats. *J. Endocrinol.* 51:569-574.
- Yamanaka Y., Ralston A., Robert OS., Rossant J. 2006. Cell and Molecular regulation of the mouse blastocyst. *Dev. Dynam.* 235:2301-2314.
- Yanagimachi R. 1994. Mammalian fertilization. In: Knobil, E., Neill, JD. (Eds), *The Physiology of Reproduction*, vol. 1. Raven Press, NY, pp. 189-317.
- Yeager M, Harris Al. 2007. Gap junction channel structure in the early 21st century: facts and fantasies. *Curr Opin. Cell Biol.* 19(5):521-8
- Yap A. S. & Kovacs, E. M. (2003). Direct Cadherin-activated cell signaling: a view from the plasma membrane. *J. Cell. Biol.* 160, 11-16.

**ARTICULOS
PUBLICADOS**

Effect of maternal age and parity on preimplantation embryo development and transport in the golden hamster (*Mesocricetus auratus*)

C A Trejo, M C Navarro, G D Ambriz and A Rosado

Departamento de Biología de la Reproducción, Universidad Autónoma Metropolitana – Iztapalapa, Av. Michoacán y Purísima Col. Vicentina, Iztapalapa, DF, CP 09340, México

Summary

Preimplantation embryo development was studied in the golden hamster (*Mesocricetus auratus*). Three groups of regularly cycling female hamsters were used: (I) 30 nulliparous young female (NYF) hamsters; (II) 24 nulliparous adult female (NAF) hamsters and (III) 30 multiparous adult female (MAF) hamsters. Female hamsters were mated with male hamsters of proven fertility. Only 15 min were allowed for mating. The moment of ejaculation was registered. Female hamsters were killed from 60 to 69 h after coitus. Corpora lutea were counted in both ovarian surfaces. Oviducts and uterine horns were flushed separately and embryo number, stage of development and distribution were recorded. Adult female hamsters, nulliparous and multiparous, had significant higher ovulation rates than NYF, but their reproductive efficiency was significantly lower. Preimplantation embryo development and transport were highly synchronous in NYF, but not in adults. Morulae were observed in NYF as early as 62–63 h after coitus. In adult female hamsters, significant numbers of morulae were found until 66–67 h. On the contrary, in NYF four-cell embryos were detected only until 60–61 h, while four-cell embryos were found until 64–65 h in NAF, and until 66–67 h in MAF. Embryo transport from the oviduct to the uterus is practically completed at 62–63 h after coitus in NYF, while it is evidently retarded in adult animals. In NYF all eight-cell embryos reached the uterus by 62 h after coitus. In adult female hamsters, both nulliparous and multiparous, a considerable number of eight-cell embryos fail to migrate into the uterus even at 67 h after coitus.

Keywords Hamster; embryo development; embryo transport

Our knowledge of the factors that participate in early mammalian embryo development and transport *in vivo* is still incomplete (Lonergan *et al.* 1999). Although there is solid evidence that hormonal state of the female hamster participates in the regulation of ovum transport in mammals (Erb & Wynne-Edwards 1993, Croxatto 2002), the differential velocities of oviduct

transport of fertilized and unfertilized ova in several mammalian species (Ortiz *et al.* 1986) originated the hypothesis that ovum itself is capable of regulating its own development and transport in the early stages of embryo development. In accord with this hypothesis, there have been some recent reports showing that the embryo regulates its own development and transport by the secretion of some active factors like platelet-activating factor (PAF) (Velasquez

Correspondence: C A Trejo. Email: tecaifredo@hotmail.com

Accepted 8 December 2004

© Laboratory Animals Ltd. *Laboratory Animals* (2005) 39, 290–297

Presence and distribution of E-cadherin in the 4-cell golden hamster embryo. Effect of maternal age and parity

A. Trejo^{2*}, D. Ambriz^{1,2}, M.C. Navarro-Maldonado², E. Mercado² and A. Rosado²

Departamento de Biología de la Reproducción, Universidad Autónoma Metropolitana – Iztapalapa, Iztapalapa, Mexico

Date submitted: 27.09.07. Date accepted: 15.02.08

Summary

Maternal age dependency of gestation time in hamster and in other mammals is a well demonstrated fact. We have recently shown that adult nulliparous and multiparous hamster females show significant asynchrony and retard on early embryo development (from two blastomeres to morula stages) when compared with nulliparous young females. The number of cell–cell adhesions between blastomeres in early embryo development has been reported to be a good indication of the ability of embryos to cleave and develop. In this work we studied, by indirect immunofluorescence, the presence and distribution of E-cadherin in 4-cell embryos obtained from nulliparous young (NYF), nulliparous adult (NAF) and multiparous adult (MAF) hamster females. Distribution and intensity of fluorescence was observed and registered using confocal microscopy. Staining intensities for E-cadherin were quantified by computed densitometry in the free membrane regions, in the cytoplasm region and in the cell–cell adhesion zones of each embryo. E-Cadherin in all the studied zones was significantly higher ($p < 0.01$) in NYF. Cadherin concentration in the intercellular membranes was always statistically higher ($p < 0.05$) than in the free membrane regions. An appreciable concentration of E-cadherin was found in the cytoplasm of the 4-cell embryos obtained from the three groups of females, but was significantly higher in NYF. No statistical differences were observed in any of the parameters studied between NAF and MAF. Our results seem to indicate that changes in the reproductive behavior related to age and/or multiparity may be correlated with changes in the processes related to intercellular adhesions during early cleavage.

Keywords: Compaction, E-cadherin, Embryo development, Hamster

Introduction

Maternal age dependency of gestation time in hamster (Soderwall *et al.*, 1960; Navarro *et al.*, 2000) and in other mammals, is a well demonstrated fact. Soderwall *et al.* (1960) reported that 1-month-old hamster females have gestation periods of 373 h, 4-month-old females gave birth after 378 h, 8-month-old females after 386 h and 14-month-old females after 402 h, i.e. they showed 24–29 h longer gestation periods than young females. We

have recently shown (Trejo *et al.*, 2005) that adult (8-month-old) nulliparous and multiparous females show significant asynchrony and retard on early embryo development (from two blastomeres to morula stages) when compared with nulliparous young (2-month-old) females.

Our knowledge of the factors that contribute to *in vivo* embryo development and transport are still incomplete. Solid experimental evidence supports the hypothesis that hormonal state of the female regulates ovum transport in mammals. Significant differences, however, between the rate of oviduct transport of embryos of different ages and of fertilized and unfertilized eggs in several mammalian species (Ortiz *et al.*, 1986), support the idea that the conceptus itself may autoregulate its own transport. This fact may be due, in part, to the secretion of some embryo-derived factors (Tranguch *et al.*, 2003) or to the capacity of the embryo to regulate its own development (Stoddart *et al.*, 2001). The ability of embryos to develop to term, is related to the number of cell–cell adhesions

*Doctorado en Ciencias Biológicas. Universidad Autónoma Metropolitana.

¹All correspondence to Demetrio Ambriz. Universidad Autónoma Metropolitana - Iztapalapa, Av. San Rafael Atlixco No. 186 Col. Vicentina, Iztapalapa, Mexico, D.F., C.P. 09340. Tel: +55 58044706. Fax: +55 58044930. e-mail: deme@xanum.uam.mx

²Departamento de Biología de la Reproducción, Universidad Autónoma Metropolitana – Iztapalapa. Av. San Rafael Atlixco N° 186 Col. Vicentina, Iztapalapa, Mexico, D.F., C.P. 09340.

Contenido

ContactoS No. 57, Julio-Septiembre 2005

<hr/> <p>Editorial 3</p> <hr/> <p><i>Una contribución al estudio del comportamiento viscoelástico de hilos textiles sometidos a tracción.</i> 5 M. Olvera, G. Guillén, A. M. Islas, L. E. Mercado</p> <p><i>La importancia de Spirulina en la alimentación acuícola.</i> 13 Ramón de Lara Andrade, Thalía Castro Barrera, Jorge Castro Mejía, Germán Castro Mejía, Aida Malpica Sánchez y Verónica García Castillo.</p> <p><i>Implicaciones fisiológicas de la masturbación en los primates no humanos.</i> 17 Demetrio Ambriz García, Rita Ortiz Latorre y Alfredo Trejo Córdova</p> <p><i>Análisis del nivel del mar en seis puertos del Golfo de México a través de un método alternativo.</i> 21 Norma Sánchez-Santillán, René Garduño López y Pilar Negrete Redondo.</p> <p><i>Una partícula cuántica dentro de una caja circular en presencia de un campo magnético uniforme.</i> 28 N. Aquino y E. Castaño.</p> <p><i>Importancia de los probióticos en la acuicultura, utilizando Artemia franciscana como bioencapsulante.</i> 39 Germán Castro, Jorge Castro, Thalía Castro, Alejandra Estrada y Verónica García.</p>	<p><i>De viandas y brebajes. Vinos</i> 44 Escancio "Kansho" Almazara.</p> <p><i>Crónica de los efectos físicos. Parte IV.</i> 47 José Maria Filardo Bassalo.</p> <p><i>El periodo mínimo de un péndulo físico.</i> 60 Angel Manzur Guzmán.</p> <p><i>Distribuciones Linux LiveCD. Una descripción de KNOPPIX.</i> 63 Oscar Ávila Mejía.</p> <p><i>CEUAMI: presencia de la comunidad estudiantil de Computación en la UAM-I.</i> 68 María de la Luz Colín García.</p> <hr/> <p>Nuestra portada <i>Viñedos.</i> Véase el artículo: De viandas y brebajes. Vinos. Pág. 44</p> <p>Contraportada <i>Collage de fotografías.</i> Véase el artículo: De viandas y brebajes. Vinos. Pág. 44</p> <p>Tercera de forros <i>Estereograma.</i></p>
--	--

CS

ContactoS en la WEB

Lea los artículos publicados en ContactoS en

<http://www.iztapalapa.uam.mx>

con la entrada:

Nuestras publicaciones, REVISTA CONTACTOS.

Contenido

ContactoS No. 67, Enero-Marzo 2008

<hr/> <p>Editorial 3</p> <hr/> <p><i>Simulación y predicción de escenarios en sistemas ecológicos, de impacto ambiental y clima.</i> 5 Norma Sánchez-Santillán</p> <p><i>Windows Vista vs Linux Ubuntu 7.04.</i> 10 Óscar Ávila Mejía.</p> <p><i>Sal de tierra, riqueza del lago de Texcoco.</i> 24 Édgar Anaya.</p> <p><i>La teoría del Control Total de Calidad aplicada a los servicios automatizados. El caso de las ATM.</i> 26 Alfredo de la Lama García y Paula de la Lama Zubirán.</p> <p><i>De viandas y brebajes. Chiles.</i> 32 Escancio "Kansho" Almazara.</p> <p><i>Clones, copias exactas o réplicas únicas.</i> 35 Leticia Ponce de León García, Claudia Barbosa Martínez y Cecilia L. Jiménez-Sierra.</p> <p><i>Curiosidades de la física, parte V.</i> 41 José María Filardo Bassalo.</p>	<p><i>La metáfora científica y los libros de texto.</i> 52 Rosa María Aguilar Garduño, Alan Arroyo</p> <p><i>El proceso de compactación celular en el embrión temprano.</i> 57 Alfredo Trejo Córdova, María del Carmen Navarro Maldonado y Demetrio Ambriz García.</p> <p><i>Aprovechamiento de la energía solar para aplicaciones de CD a través de convertidores eficientes.</i> 62 Pedro Bañuelos Sánchez, Oswald Jiménez López.</p> <p><i>Noticias Breves.</i> 69 Alma E. Martínez Licona.</p> <hr/> <p>Nuestra portada <i>Lago de Texcoco. foto de Édgar Anaya</i> Véase el artículo: Sal de tierra, riqueza del lago de Texcoco. Pág. 24</p> <p>Contraportada <i>Collage de fotografías.</i> Véase el artículo: De viandas y brebajes. Chiles. Pág. 32</p> <p>Tercera de forros <i>Estereograma.</i></p>
---	---

CS

ContactoS en la WEB

Lea los artículos publicados en ContactoS en

<http://www.izt.uam.mx>

con la entrada:

Publicaciones, Contactos.

Contenido

ContactoS No. 68, Abril-Junio 2008

Editorial	3		
<i>Algunas consideraciones acerca de los sistemas de clasificación climática.</i> Norma Sánchez Santillán y René Garduño L.	5	<i>Nutritivas y apetecibles: conozca de leguminosas comestibles. Parte II. Tubérculos y algunos árboles interesantes.</i> Ma. Eugenia Fraile, Angélica Martínez-Bernal, Ma. Dolores García-Suárez y Rebeca Slomianski.	56
<i>Mac OS X v10.5 Leopard.</i> Óscar Ávila Mejía.	11	<i>Cuestiones de la economía.</i> Caupolicán Muñoz Gamboa.	63
<i>Curiosidades de la física, parte VI.</i> José María Filardo Bassalo.	18	<i>¿Puede la D(+)adrenalina ayudar a prevenir las enfermedades psicósomáticas?.</i> José Paulo de Oliveira Filho, José Maria Filardo Bassalo, Nelson Pinheiro Coelho de Souza.	70
<i>Cadherina-Cadherina: mecanismo de adhesión.</i> Alfredo Trejo Córdoba.	30		
<i>De viandas y brebajes. Tacos.</i> Escancio "Kansho" Almazara.	34	Nuestra portada <i>Árbol de tamarindo</i> Véase el artículo: Nutritivas y apetecibles: conozca de leguminosas comestibles. Parte II. Pág. 56	
<i>Macroalgas y pasto marino, útiles bio-indicadores de contaminación por hidrocarburos fósiles en sistemas acuáticos.</i> Laura Georgina Calva B. y Rocío Torres Alvarado.	38	Contraportada <i>Collage de fotografías.</i> Véase el artículo: De viandas y brebajes. Tacos. Pág. 34	
<i>La Teoría de Flory-Huggins en la ingeniería de soluciones y mezclas de polímeros.</i> Eduardo Macario Moctezuma N.	47	Tercera de forros <i>Esterograma.</i>	

ContactoS en la WEB
Lea los artículos publicados en ContactoS en
<http://www.izt.uam.mx>
con la entrada:
Publicaciones, Contactos.

cs