



UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

División de estudios de posgrado

Campus Tuxtepec

MAESTRÍA EN BIOTECNOLOGÍA

**TERMOPROTECCIÓN DEL IGF-1 EN EMBRIONES DE 4
CÉLULAS DE HÁMSTER SOMETIDOS A UN ESTRÉS
CALÓRICO *IN VITRO*: EFECTO DE LA REDISTRIBUCIÓN DE
LA CADHERINA-E.**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
MAESTRO EN BIOTECNOLOGÍA**

PRESENTA:

ISMAEL ABAD BENÍTEZ

**DIRECTOR: DRA. CYNTHIA M. ANTONIO CISNEROS
CO-DIRECTOR: DR. ALFREDO TREJO CÓRDOVA**

TUXTEPEC, OAXACA, MÉXICO, 2016



UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

San Juan Bautista Tuxtepec, Oaxaca, a 12 de Mayo de 2016

JAEG/MB/13/01

C. Ismael Abad Benitez
Estudiante de la Maestría en Biotecnología
Universidad del Papaloapan

Por este medio le informo que el jurado de su examen para obtener el grado en Maestro en Biotecnología estará integrado por los siguientes investigadores.

Dr. Sergio Ramírez Ordoñez	UNPA	Presidente
M.C. Nicolás Valenzuela Jiménez	UNPA	Vocal
Dra. Gladis Morales Terán	UNPA	Secretario
M.C. Cecilio Ubaldo Aguilar Martínez	UNPA	1er Suplente
Dr. Víctor Manuel Meza Villalvazo	UNPA	2º Suplente

Sin más por el momento, le envío saludos cordiales.

Atentamente



Dr. Mario Valera Zaragoza
Jefe de la División de Estudios de Posgrado

UNPA
Maka charrims, masa iperit
Dak lo-tawa, chi ji ji
OAXACA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO



M. en C. Héctor López Arjona
Vice-rector Académico
Vo.Bo.

UNPA
Maka charrims, masa iperit
Dak lo-tawa, chi ji ji
OAXACA
VICE-RECTORIA ACADEMICA

Ccp. Dra. Cynthia M. Antonio Cisneros, Asesora de tesis
Ccp. L.P. Yesenia Barrientos Arenal, Jefa de Servicios Escolares
Ccp. Archivo

CAMPUS TUXTEPEC
C. Circuito central No. 200, Col. Parque Industrial,
C.P. 38301, Tuxtepec, Oax.
Tel. 01(287)8759240

www.unpa.cdu.mx

CAMPUS LOMA BONITA
Av. Ferrocarril S/N, Ciudad universitaria,
C.P. 68400, Loma Bonita, Oax.
Tel. 01(281)8729230



UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

OFICIO	DEP/2016/108
ASUNTO	Autorización de impresión de tesis MB

San Juan Bautista Tuxtepec, Oaxaca, México a 07 de Octubre de 2016

L. P. YESENIA BARRIENTOS ARENAL
JEFA DE SERVICIOS ESCOLARES
UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

Sirva la presente para informarle que el jurado del examen para obtener el grado de Maestro en Biotecnología del C. Ismael Abad Benitez, matricula 13140001, ha autorizado la impresión del manuscrito que lleva por título **"Termoprotección del IGF-1 en embriones de 4 células de hámster sometidos a estrés calórico *in vitro*: efecto de la redistribución de la cadherina-e"** para su posterior presentación y defensa por parte del sustentante.

Sin otro asunto en particular, me despido quedando atento ante cualquier duda y deseándole suerte en todas sus actividades.

Atentamente

terra uberrima, mens aperta
Bou Lo-tama, chi ji jú



Dr. MARIO VALERA ZARAGOZA DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO
Jefe de la División de Estudios de Posgrado

C.c.p. Ismael Abad Benitez
C.c.p. Archivo.

CAMPUS TUXTEPEC
C. Circuito central No. 200, Col. Parque Industrial.
C.P. 38301, Tuxtepec, Oax.
Tel. 01(287)8759240

www.unpa.edu.mx

CAMPUS LOMA BONITA
Av. Ferrocarril S/N, Ciudad universitaria.
C.P. 68400, Loma Bonita, Oax.
Tel. 01(281)8729230

DEDICATORIA

A mi madre: Irma Benítez Zamudio, por su amor, paciencia y por ser una madre ejemplar, sobre todo por saber impulsarnos siempre hacia adelante a pesar de las circunstancias más difíciles.

A mis hermanos: Por la necesidad de conseguir más logros.

A mi Alma Mater: Universidad del Papaloapan campus Loma Bonita.

A mis hermanos en la fe de Casa de Dios y Puerta del Cielo.

AGRADECIMIENTOS

A Dios primeramente por permitirme culminar este proyecto.

A mi Directora, Dra. Cynthia M. Antonio Cisneros y especialmente a mi Co-Director, Dr. Alfredo Trejo Córdova, por ser parte fundamental en la elaboración de esta tesis.

A todos los miembros de mi comité evaluador y revisores.

A la Universidad del Papaloapan campus Tuxtepec (UNPA-Tux) por el tiempo en que me ofreció las facilidades educativas para culminar mi posgrado.

A la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa (UAM-I), especialmente a los Doctores: Demetrio Alonso Ambríz García y María Del Carmen Navarro Maldonado, por abrirme las puertas de su laboratorio y casa durante más de 6 meses. A todos mis amigos (el equipo del laboratorio S-233-234, del edificio de Ciencias Biológicas y de la Salud UAM-I, la comunidad “*inexplicable*” UAM-I. La Dra. Liora Zrifén Nahon de Shoshani y los integrantes de su laboratorio de Fisiología celular y molecular, en CINVESTAV-IPN unidad Zacatenco). A la C. Cecilia Silva Reyes y la comunidad de adultos mayores “Dulce alegría”.

Al **CONACyT** por la beca obtenida, con No. de becario **588739** y por el proyecto (**164415**) del fondo SEP-CONACyT (2011).

CONTENIDO	PÁG.
ÍNDICE DE CUADROS	IX
ÍNDICE DE FIGURAS	X y XI
ABREVIATURAS	XII
RESUMEN	XIII
ABSTRACT	XIV
1 INTRODUCCIÓN	1
2 REVISIÓN DE LITERATURA	3
2.1 Fertilización.....	3
2.2 Desarrollo embrionario preimplantacional.....	4
2.2.1 Proceso de segmentación	5
2.2.2 Activación del genoma embrionario	5
2.2.3 Compactación embrionaria.....	6
2.3 El 6-DMAP y la compactación embrionaria inducida	8
2.4 Moléculas de adhesión celular	9
2.4.1 Tipos de moléculas de adhesión celular.....	10
2.4.2 Cadherinas	14
2.4.3 Cadherina-E	14
2.4.3.1 Características estructurales	15
2.4.3.1.1 Dominio extracelular	15
2.4.3.1.2 Dominio intracelular	17
2.4.3.2 Características funcionales.....	17
2.4.3.2.1 Adhesión celular	17
2.4.3.2.2 Uniones de anclaje.....	18
2.4.3.2.3 Señalización.....	19
2.5 Factores de crecimiento	20
2.5.1 Factor de crecimiento parecido a insulina (IGF-1).....	21
2.5.1.1 Funciones del IGF-1 a nivel celular.....	21
2.6 Termoprotección celular.....	24
2.7 La vía PI3K/AKT (Vía Fosfatidilinositol 3 cinasa/Proteína cinasa B).....	25
2.7.1 Cadherina-E y la vía PI3K.....	26

2.7.2	El IGF-1 y la vía PI3K	27
2.8	El estrés celular	28
2.8.1	Efecto del estrés calórico <i>in vitro</i> sobre el desarrollo embrionario	28
2.9	Apoptosis	29
2.9.1	Métodos para detectar la apoptosis	30
2.9.2	Prueba de la anexina V	33
3	ANTECEDENTES	36
4	JUSTIFICACIÓN	39
5	HIPÓTESIS	40
6	OBJETIVO GENERAL	41
6.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	41
7	MATERIALES Y METODOS	42
7.1	Reactivos	42
7.2	Localización del área experimental	42
7.3	Animales	42
7.3.2	Apareamiento	43
7.3.3	Obtención de embriones de 4 células	43
7.4	Experimento: Cambio en la localización de la cadherina-E en embriones de 4 células y su efecto en la función termoprotectora del IGF-1 durante un estrés calórico <i>in vitro</i>	44
7.4.2	Determinación de la tasa de desarrollo embrionario	44
7.4.3	Determinación de apoptosis	45
7.4.3.1	Eliminación de la ZP	45
7.4.3.2	Prueba de anexina V (apoptosis)	45
7.4.4	Localización de la cadherina-E en embriones de 4 células de hámster... ..	45
7.4.5	Técnica de inmunofluorescencia	46
7.4.6	Análisis de imágenes	47
7.5	Análisis estadístico	47
8	RESULTADOS	49
8.1	Obtención de embriones	49
8.2	Inducción de la compactación en embriones de 4 células	49
8.3	Cambio en la localización de la cadherina-E en embriones de 4 células y su efecto en la función termoprotectora del IGF-1 durante un estrés calórico <i>in vitro</i>	51

8.3.1	Tasa de desarrollo de embriones de 4 células (compactados y no compactados) sometidos a estrés calórico	51
8.3.2	Tasa de apoptosis de embriones de 4 células (compactados y no compactados) sometidos a estrés calórico	53
9	DISCUSIÓN	54
9.1	Obtención de embriones de 4 células	54
9.2	Compactación prematura en embriones de 4 células	54
9.3	Análisis de la redistribución de cadherina-E	55
9.4	Efecto termoprotector del IGF-1.....	57
9.4.1	Tasa de desarrollo en embriones de 4 células no compactados.....	57
9.4.2	Efecto del IGF-1 en embriones no compactados	59
9.4.3	El IGF-1 en el incremento de la tasa de desarrollo de EC	59
9.4.4	El papel de la redistribución de cadherina-E en el éxito del desarrollo de EC	61
9.4.5	Apoptosis	62
10	CONCLUSIONES	64
11	RECOMENDACIONES	65
12	BIBLIOGRAFÍA	66
13	ANEXOS	79

ÍNDICE DE CUADROS

	Página
Cuadro 1 Tipos, fuente y funciones de factores de crecimiento.....	22

ÍNDICE DE FIGURAS

		Página.
Figura 1	Esquema del proceso general de fertilización.....	4
Figura 2	Proceso de compactación embrionaria.....	7
Figura 3	Tipos de adhesión celular.....	10
Figura 4	Estructura de la cadherina-E.....	16
Figura 5	Función del IGF-1 a nivel celular.....	23
Figura 6	Esquema general de la vía PI3K/AKT.....	26
Figura 7	Esquema general de la apoptosis y necrosis celular.....	30
Figura 8	Esquema general de un citómetro de flujo.....	32
Figura 9	Mecanismo de acción de la anexina V.....	35
Figura 10	Figura 10. Embriones 4 células vistos en microscopio invertido (100 X). A) Embriones no compactados y B) compactados.....	48
Figura 11	Embrión no compactado de 4 células de hámster. A) Localización de la cadherina-E en embriones no compactados de 4 células, B) intensidad de fluorescencia.....	49

Figura 12	Embrión compactado de 4 células de hámster. A) Localización de la cadherina-E en embriones no compactados de 4 células, B) intensidad de fluorescencia.....	50
Figura 13	Evaluación de la tasa de desarrollo en embriones sometidos a un estrés calórico (41 °C/9 h y 37.5 °C/15 h).....	51
Figura 14	Evaluación de la tasa de apoptosis en embriones sometidos a un estrés calórico (41 °C/9 h y 37.5 °C/15 h).....	52

ABREVIATURAS

6-DMAP: 6-dimetilaminopurina

AGE: Activación del genoma embrionario

ARNm: Ácido ribonucleico mensajero

DAG: Diacilglicerol

DPBS: Solución Amortiguadora de fosfato salino de Dulbecco

dUTP: Desoxiuridina trifosfato

ECs: Repeticiones de cadherina extracelular

EC: Embriones compactados

ENC: Embriones no compactados

EROs: Especies reactivas al oxígeno

CAM: Molécula de adhesión celular

GTP: Guanosín trifosfato

IGF-1: Factor de crecimiento parecido a insulina tipo 1

NH₂: Grupo Amino

PBS: Solución amortiguadora de fosfatos

PI3K: Fosfoinositol 3 cinasa

PKC: Proteína cinasa C

RTK: Receptores de tirosina cinasa

SRC: Proto-oncogén-proteína tirosina cinasa

TCM-199: Medio de cultivo de tejidos-199

Wnt: Ruta Wingless

ZP: Zona pelúcida

RESUMEN

Se evaluó la función termoprotectora del IGF-1 en embriones de hámster de 4 células donde la cadherina-E fue relocalizada (compactados). Se emplearon 30 hembras nulíparas jóvenes de hámster sirio dorado, con una edad promedio de 2 ± 0.5 meses y peso promedio de 128 ± 0.35 g, las hembras fueron mantenidas a $30\text{ }^{\circ}\text{C}$, con fotoperiodo de 14 horas luz/10 de oscuridad y alimentadas a libre acceso. Las hembras fueron sacrificadas a las 65 h poscoito. Se obtuvieron embriones de 4 células (N= 180), que fueron distribuidos en dos grupos: grupo experimental (compactación inducida, n= 90), incubados con 0.6 mM de 6-DMAP durante 6 h/ $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ / 5 % CO_2 y testigo (no compactados, n= 90), sin 6-DMAP. La localización de la cadherina-E se evaluó a través de microscopía confocal. Los embriones compactados mostraron una mayor intensidad en los sitios de adhesión celular, en comparación con los no compactados. Ambos grupos de embriones fueron incubados en medio suplementado con 100 ng/ml de IGF-1 durante 6 h a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, 5 % CO_2 , sometidos a un estrés calórico por 9 h ($41\text{ }^{\circ}\text{C}$, 5 % CO_2) y 15 h ($38.5\text{ }^{\circ}\text{C}$, 5 % CO_2). Al término del periodo de cultivo se determinó la tasa de desarrollo y apoptosis. La proporción de los embriones que alcanzaron la etapa de 6 células fue mayor ($p<0.05$) en los embriones compactados que en los no compactados (63 % vs 38.5 %). La intensidad de anexina V (apoptosis) fue significativamente menor en los embriones compactados de 4, 6 y 8 células en comparación con embriones no compactados (23, 25 y 18 vs 36, 34, 30, $p<0.05$). Se concluye que la función termoprotectora del IGF-1 aumenta con el cambio en la localización de la cadherina-E.

Palabras clave: cadherina-E, hámster, embriones, estrés calórico, apoptosis, IGF-1.

ABSTRACT

Thermoprotective function of IGF-1 in hamster embryo cells 4 where E-cadherin was relocated (compacted) was evaluated. 30 young nulliparous female Golden Syrian hamster were used, with an average age 2 ± 0.5 months and average weight of 128 ± 0.35 g, females were maintained at 30°C , photoperiod 14 h light /10 dark, fed ad libitum. Females were sacrificed at 65 h post-coital. Embryos 4 cells (N= 180) were obtained, which were distributed in two groups: experimental group (with induced compaction, n= 90), incubated with 0.6 mM 6-DMAP for 6 h/ 37°C / 5 % CO_2 and witness group: (uncompacted, n= 90), without 6-DMAP. Location of E-cadherin was evaluated by confocal microscopy, compacted embryos showed greater intensity in sites of cell adhesion, compared to uncompacted. Both groups were incubated in medium supplemented with 100 ng/ml of IGF-1 for 6 h at 37°C , 5 % CO_2 , subjected to heat stress for 9 h (41°C , 5 % CO_2) and 15 h (38.5°C , 5 % CO_2). At the end of the culture period the rate of development and apoptosis was determined. The embryos that reached stage 6 cells was higher ($p < 0.05$) in the compacted embryos than uncompacted (63 % vs 38.5 %). Annexin V intensity (apoptosis) was significantly less in embryos compacted of 4, 6 and 8 cells compared to non-compacted embryos (23, 25 and 18 vs 36, 34, 30, $p < 0.05$). It is concluded that IGF-1 thermoprotective function increases with the change in location of E-cadherin.

Keywords: E-cadherin, hamster embryos, heat stress, apoptosis, IGF-1.

1 INTRODUCCIÓN

El uso de la reproducción animal asistida, ha promovido grandes avances en la producción animal; sin embargo, técnicas como la producción *in vitro* de embriones, presentan problemas en cuanto a su eficiencia. Una probable causa que ha sido estudiada es el estrés calórico. Rivera *et al.* (2004), reportaron una tasa de desarrollo hasta blastocisto de 27.5 %, cuando los ovocitos son sometidos a estrés calórico *in vitro*. De la misma forma, Jousan y Hansen. (2004) reportaron un aumento de 15 % en el número de células apoptóticas en blastocistos de bovino, cuando son sometidos a estrés calórico.

El IGF-1 ha sido empleado para tratar de reducir los efectos del estrés calórico bajo condiciones *in vitro* (Jousan *et al.*, 2008). Jousan y Hansen. (2004) reportaron una tasa de apoptosis del 6 %, cuando los embriones son sometidos a estrés calórico (41 °C) en presencia de IGF-1. Se ha establecido que el mecanismo de acción, por el que el IGF-1 funciona, involucra la activación de algunas vías de señalización (Spanos *et al.*, 2000). Bonilla *et al.* (2011), encontraron que el efecto del IGF-1 es dependiente de la etapa de segmentación, así, durante las etapas de 2 a 4 células, este efecto no es observado, mientras que, en embriones de 8 células, mórula o blastocisto si se observa este efecto.

La cadherina, pertenece a una familia de moléculas de adhesión, cuya actividad es dependiente de calcio (Goodwin y Yap, 2004) y se ha establecido que su distribución, varía con la etapa de la segmentación. En etapas de 2 a 4 células, su distribución es principalmente citoplasmática, mientras que en embriones de 8

células, se acumula en los sitios de adhesión (Trejo *et al.*, 2006; Trejo *et al.*, 2008). Este cambio en la distribución de la cadherina-E, está asociado con el aumento en el número de sitios de adhesión, requeridos durante la compactación celular (Li *et al.*, 2009). Además de su función adhesiva, la cadherina-E está involucrada en la activación de algunas vías de señalización; Hale *et al.* (2008), establecieron que la vía de señalización PI3K, es activada a través de cadherina-E.

No se ha establecido, si existe una relación entre la localización de la cadherina-E y la actividad diferencial del IGF-1 entre embriones de 4 células y embriones de más de 8 células. Por lo tanto, el objetivo de este estudio, fue evaluar la actividad termoprotectora del IGF-1 en embriones donde la localización de la cadherina-E fue alterada (embriones de 4 células compactados).

2 REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Fertilización

La fertilización es un proceso fisiológico que comprende la interacción intercelular a 3 niveles del espermatozoide con el ovocito: 1) la membrana plasmática, 2) zona pelúcida (ZP) y 3) células del cúmulo. Inicia con el reconocimiento de receptores específicos a nivel de membrana de ambos gametos y culmina con la fusión de los cromosomas paternos y maternos (Evans, 2002) **(Figura 1)**.

Los espermatozoides, previo a la etapa de fertilización, sufren un proceso de capacitación, en el tracto reproductivo de la hembra, el cual, da origen a cambios en la composición y en las propiedades de la membrana plasmática (Evans, 2002).

Posteriormente, durante la interacción del espermatozoide con la zona pelúcida del ovocito, ocurre la reacción acrosomal; que consiste en la vesiculación de la membrana plasmática y por acción enzimática, el espermatozoide penetra las distintas capas de la ZP hasta fusionarse con la membrana plasmática del ovocito (Wassarman *et al.*, 2005).

Al penetrar el espermatozoide la membrana vitelina, el ovocito es activado, completa la meiosis y expulsa el primer y segundo cuerpo polar en el espacio perivitelino e inmediatamente después se reanuda la actividad meiótica ovocitaria, que da lugar a la primera estructura embrionaria de una célula, llamado cigoto (Storey, 1995).

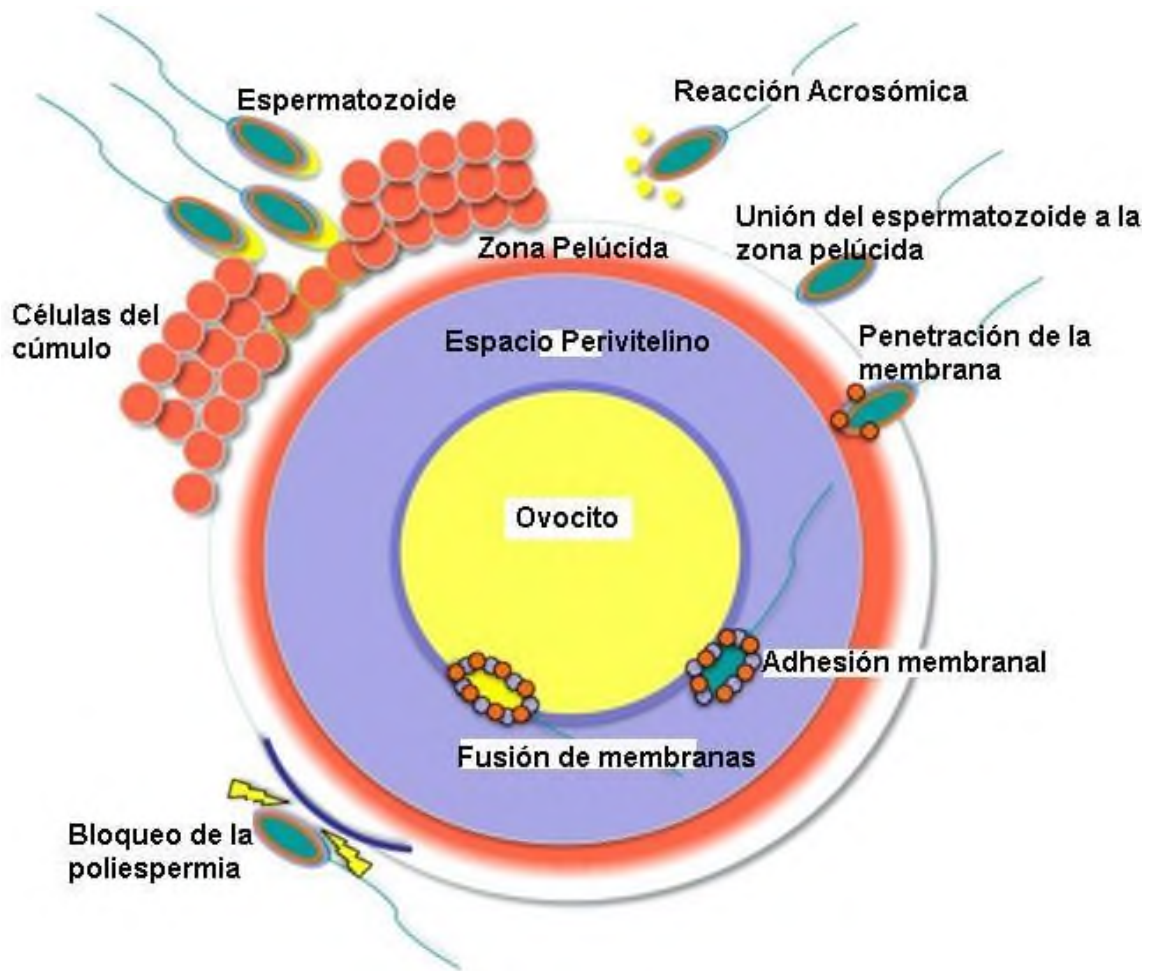


Figura 1: Esquema del proceso general de la fertilización. Modificado de Naoko *et al.* (2012).

2.2 Desarrollo embrionario preimplantacional

Se define, como el periodo comprendido desde la formación del cigoto, hasta la implantación del blastocisto en el endometrio (Schultz, 2002). El cigoto, aumentará el número de sus células a través de una serie de divisiones mitóticas, proceso conocido como segmentación (Gilbert, 1994). También ocurren cambios metabólicos sumamente complejos y bien regulados que incluyen la activación del genoma embrionario y el inicio de la diferenciación celular que producirán cambios

morfológicos importantes en el embrión como la compactación embrionaria, la formación de la mórula y el blastocisto (Fleming *et al.*, 2001).

2.2.1 Proceso de segmentación

Consiste en una serie de divisiones por mitosis que da como resultado un incremento del número de células o blastómeros (Galina, 2006).

La segmentación modifica las características de las células, conforme avanza el estadio de desarrollo. Una característica importante de las primeras divisiones mitóticas es su sincronía y se pueden encontrar embriones de 2, 4 y 8 células, esto se debe a que el ciclo celular es corto, sin embargo conforme aumenta el número de blastómeros, el ciclo celular se alarga y dura hasta la etapa previa al proceso conocido como compactación (Galina, 2006).

Existen dos tipos de segmentación: la total (holoblástica) y la parcial (meroblástica). La primera se basa en la cantidad y localización del vítelo, lo cual determina la velocidad con que las células se dividen, mientras que en la segunda la segmentación es más rápida en las zonas donde no hay vítelo, pero en zonas donde sí hay vítelo, la segmentación es más lenta o no se lleva a cabo (Gilbert, 1994).

2.2.2 Activación del genoma embrionario

Es un evento importante, que permite la transición del control genético materno hacia el desarrollo del propio genoma del embrión (Latham y Schultz, 2001). Depende en gran manera del ARNm, así como de las proteínas de origen materno almacenadas de manera inicial en el ovocito, ya que éstas van a sufrir cambios

durante su transcripción por parte del embrión (Schultz, 1993).

En mamíferos, de manera general, la activación del genoma ocurre durante alguna de las fases de la segmentación (Latham y Schultz, 2001) y en dos etapas, es decir, 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). El momento de activación es específico de especie, por ejemplo, en ratón la activación del genoma ocurre durante el estadio de 2 células (Bellier *et al.*, 1997) y en el caso de los bovinos en el estadio de 8-16 células (Wee *et al.*, 2006).

Aunque se sabe, que el primer signo, de una mayor actividad transcripcional por parte del embrión para adquirir su genoma, aparece durante la etapa de 2 células, una medición más sensible, realizada en embriones de 1 célula, ha sugerido que la activación del genoma embrionario puede iniciar desde esa etapa (Ram y Schultz, 1993).

Sin embargo, a raíz de lo mencionado anteriormente, se sabe que durante las etapas iniciales del desarrollo embrionario, la maquinaria transcripcional del cigoto es silenciada (Minami *et al.*, 2007), lo cual representa una etapa crítica ya que el embrión es vulnerable a cambios agresivos en su medio, debido a la falta de síntesis de proteínas que le ayuden a soportar efectos poco favorables, como las altas temperaturas (Rivera y Hansen 2001).

2.2.3 Compactación embrionaria

Generalmente, cuando el embrión se ha desarrollado hasta etapas específicas de 8-16 células en el caso del ratón, de 16-32 células en bovinos, 10-18 células en

humanos y de 34-64 células en conejos, los blastómeros presentan un aumento de superficie de contacto célula-célula, debido a la formación de uniones adherentes. Este proceso marca el inicio de la compactación embrionaria (Mayor e Izquierdo, 1994) y transcurre durante el proceso de división celular hasta que los bordes entre blastómeros son poco perceptibles (**Figura 2**).

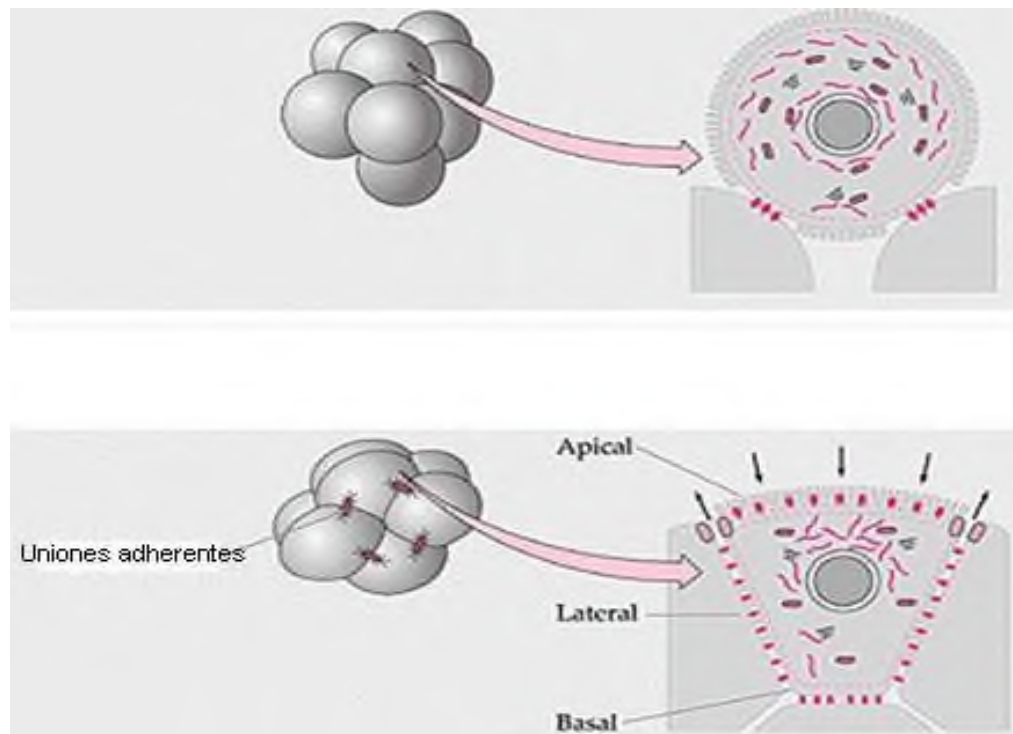


Figura 2: Proceso de compactación embrionaria. Modificado de Fleming. (1992).

Los contactos celulares que se desarrollan durante esta etapa, son debido a la presencia de una CAM, conocida como cadherina-E, la cual se distribuye progresivamente del citoplasma, a la membrana celular produciendo contactos celulares, especialmente uniones estrechas conforme se va compactando el embrión (Trejo *et al.*, 2008).

La compactación embrionaria, se caracteriza porque de manera natural, ocurre un aplanamiento mecánico de los blastómeros que cambian la organización de las membranas y el citoplasma, originando otra característica importante, la polarización celular.

La compactación embrionaria, está considerada entre los eventos iniciales de diferenciación celular embrionaria (Pratt *et al.*, 1982). El proceso de compactación embrionaria origina 2 tipos celulares, las externas o polares, destinadas a la formación del trofoectodermo y que posteriormente darán origen a la placenta y las células internas o no polares, destinadas a la formación de la masa celular interna (Fleming *et al.*, 2001).

2.3 El 6-DMAP y la compactación embrionaria inducida

El 6-DMAP, es un inhibidor de la cinasa Serina-Treonina (Néant y Guerrier, 1988) que ha sido empleado para inducir la compactación química en embriones de desarrollo temprano (Aghion *et al.*, 1994). También es usado como un agente efectivo, en el proceso de activación partenogenética en ovocitos (Gómez *et al.*, 2009).

Este fármaco como tal, no produce una compactación celular completa, sino trabaja en el proceso de aceleración de la compactación, por medio de la inducción del aplanamiento celular mecánico prematuro, en blastómeros de embriones tempranos (Aghion *et al.*, 1994).

Aghion *et al.* (1994), utilizaron el 6-DMAP y lograron inducir de manera química la compactación de embriones tempranos de ratas, descubriendo que durante el

proceso de compactación, el 6-DMAP sólo producía aplanamiento de los blastómeros, proceso por el cual, la cadherina-E cambió su localización de pequeñas concentraciones en el citoplasma, hacia la membrana plasmática y originó sitios de uniones tipo GAP entre blastómeros.

2.4 Moléculas de adhesión celular

Participan en una amplia serie de procesos fisiológicos, por ejemplo en la organización de las células animales durante el desarrollo embrionario mediante su diferenciación, migración y localización en órganos y tejidos, para favorecer la unión intercelular y de las células con la matriz extracelular, entre otros (Macías, 2004).

Actúan como receptores, a nivel de la membrana y participan en el reconocimiento de proteínas que se adhieren a la membrana plasmática (González y Sánchez, 1999) y por medio de señalizaciones intracelulares, dan lugar a condiciones moleculares específicas y necesarias como la expresión génica, cambios fenotípicos de inducción, adhesión celular y expresión de determinadas moléculas en la membrana (Mackay y Imhof, 1993).

Además, forman estructuras de unión celular e intercelular a nivel de membrana, donde participan en funciones de fijación, sujeción, resistencia, compresión y estiramiento de las células a la matriz extracelular o a otras células (Halbleib y Nelson, 2006). Los tipos de adhesión que generan estas moléculas se presentan en la **Figura 3**.

Las uniones de oclusión, unen las células formando una barrera impermeable. En cambio, las uniones comunicantes, permiten el intercambio de moléculas entre

las células con las uniones de anclaje y estas últimas, unen las células entre sí, para dotar al epitelio de resistencia mecánica.

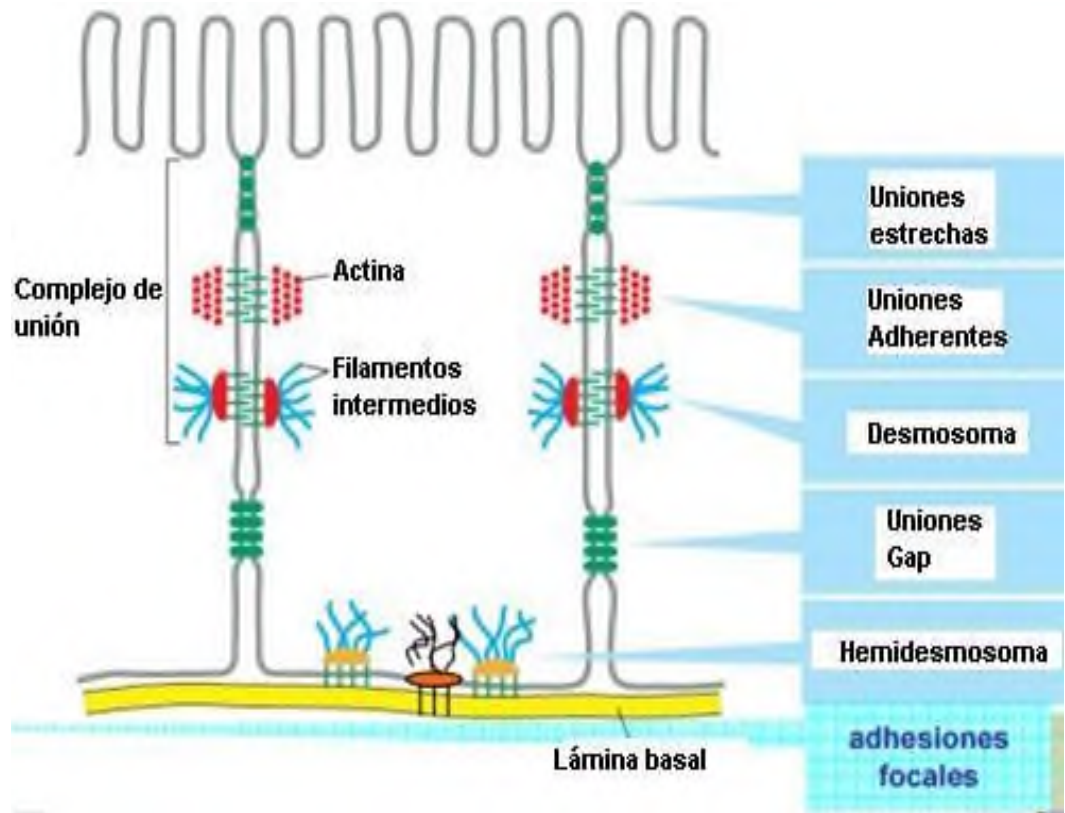


Figura 3: Tipos de adhesión celular. Modificado de Alberts *et al.* (2002).

2.4.1 Tipos de moléculas de adhesión celular

Existen varios grupos de moléculas de adhesión celular: Las selectinas, las integrinas, las inmunoglobulinas y las cadherinas (González *et al.*, 1999).

Las selectinas, poseen un extremo amino terminal, secuencias consenso, así como un dominio parecido al EGF y una estructura citoplasmática en el extremo carboxilo terminal, son receptores de adhesión expresados en los leucocitos, plaquetas y células endoteliales o en endotelio, sólo ejercen su función a nivel

vascular y pueden formar uniones hetero y homotípicas, transitorias y específicas (Tedder *et al.*, 1995).

Se han identificado tres miembros de esta familia, que corresponden a los antígenos de diferenciación leucocitaria L-selectina, P-selectina y 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 (Hynes, 1994).

La selectina L, se expresa constitutivamente en la membrana de granulocitos, monocitos y la mayoría de los linfocitos de sangre venosa periférica, que al ser activados mediante un mecanismo enzimático, generan una forma soluble de esta molécula por la que es liberada al medio extracelular (Jutila *et al.*, 1989).

La selectina P, se expresa constitutivamente, pero es almacenada en gránulos intracitoplásmicos de plaquetas y cuerpos de Weibel-Palade de células endoteliales; al activarse estas células, la selectina P es translocada a la membrana plasmática, permitiendo la interacción con sus ligandos (Mackay y Imhof, 1993).

La selectina E, no se expresa en células endoteliales, debido a que se encuentra bajo control transcripcional, 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 (Rothe y Falanga, 1992).

Las integrinas, son una super-familia de glicoproteínas, que, por medio de receptores de membrana, participan mayormente en la unión de las células con la

matriz extracelular y el citoesqueleto intracelular, para mediar la migración celular y la adhesión, aunque hay algunas que también participan en la unión célula-célula (Hynes, 1994), todos los tipos celulares expresan en su superficie una o más integrinas (Hemler, 1998).

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 (Hemler, 1998).

Se han descubierto hasta el momento, 14 cadenas α y 9 β , que en conjunto pueden formar unas 20 integrinas conocidas y 24 dímeros diferentes, resultantes de la combinación de las subunidades α y β identificadas (Horwitz, 1997). Fundamentalmente son receptores de membrana, algunos reconocen fibronectina y 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 (Hynes, 1994).

Las integrinas, también desempeñan un papel fundamental en la adhesión celular de los leucocitos al endotelio, cuando estos migran hacia un foco de inflamación, intervienen en la regulación de los leucocitos, permitiendo su paso a través del endotelio, (Ferguson *et al.*, 1996).

Las integrinas, además de traducir señales celulares, también son responsables de la interacción entre células y de conectarlas con la matriz extracelular, situación que es de vital importancia en procesos biológicos y fisiológicos, como la

diferenciación celular desde la formación de capas germinales, hasta en estructuras complejas como órganos y tejidos, además participan en la regulación y mantenimiento de la homeostasis, inflamación, coagulación sanguínea, cicatrización de heridas, respuesta inmune, maduración celular, crecimiento, metástasis tumorales y desarrollo embrionario (Horwitz, 1997).

La superfamilia de las inmunoglobulinas (IgSF), comprende un gran grupo de glucoproteínas de superficie celular, que están implicadas en procesos de reconocimiento. Su actividad principal, es establecer uniones de adhesión entre células (Aplin *et al.*, 1998).

Las moléculas de esta superfamilia, se identifican por la presencia de un número variado de dominios relacionados y rasgos estructurales con las inmunoglobulinas. La estructura molecular típica de esta familia, posee un dominio extracelular largo, conocido como dominio o plegamiento inmunoglobulina y un dominio citoplasmático (Aplin *et al.*, 1998).

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 citosinas, habitualmente están asociadas con funciones del sistema inmunitario (Hamers-Casterman *et al.*, 1993).

Finalmente, otras moléculas de importancia relevante, dentro de la superfamilia de las inmunoglobulinas son las de clase I y II.

2.4.2 Cadherinas

Son moléculas monoméricas, (constituidas por cadenas simples de aminoácidos), que constituyen receptores homofílicos (que tienen afinidad con proteínas similares) que se unen a cadherinas idénticas expresadas en células heterotípicas (células de tipos distintos) para establecer contacto célula-célula.

Las acciones de las cadherinas son importantes en un tipo de unión celular llamado adherente, que se asocian a través de proteínas citoplasmáticas con los filamentos de actina (Takeichi, 1991), lo cual, permite la adhesión celular y la estructura de los tejidos, la persistencia de los espacios intercelulares, el desarrollo embrionario, la implantación de los blastómeros y la morfogénesis (Takeichi, 1991).

Se han identificado 3 tipos de cadherinas, la cadherina-E, la P y la N, nombradas 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 (Nollet *et al.*, 2000).

Según Suzuki. (1999), de acuerdo a características funcionales y homología de secuencia, las cadherinas se clasifican en tres grandes subfamilias: protocadherinas, cadherinas desmosomales y cadherinas clásicas. Además de las cadherinas clásicas, se han establecido los siguientes grupos: cadherinas atípicas, desmogleínas, desmocolinas y cadherinas flamingo (Halbleib y Nelson, 2006).

2.4.3 Cadherina-E

Son las moléculas de adhesión celular del grupo de las cadherinas clásicas más estudiadas en la actualidad. Hasta la fecha, existen más de 100 miembros de la

familia de las cadherinas identificadas y clasificadas de acuerdo al grado de similitud, relacionado al grupo de cadherinas llamadas clásicas, ya que fueron las primeras que se descubrieron (Shapiro *et al.*, 1995).

Desde que se identificó la Cadherina-E, se sabe que es la responsable de mantener unidas a las células epiteliales (Gumbiner, 1996).

Actualmente, es conocido que la cadherina-E no es exclusiva de células del epitelio, sino que también se expresa en las células germinales (ovocitos y espermatozoides) y en la superficie de los blastómeros durante las etapas tempranas del desarrollo embrionario (Bloor *et al.*, 2002).

2.4.3.1 Características estructurales

Una molécula de cadherina, está constituida por tres regiones o dominios. El extracelular con un grupo amino-terminal, el transmembranal y el intracelular con un grupo carboxi-terminal (Ivanov *et al.*, 2001) (**Figura 4**).

2.4.3.1.1 Dominio extracelular

Todo el grupo de las cadherinas, comparte una característica estructural importante, conocida como dominio extracelular, que está compuesto por un número de 3-5 aminoácidos extracelulares de cadherina, llamadas ECs, dependiendo del tipo de cadherina (Nollet *et al.*, 2000).

Las cadherinas clásicas, se clasifican en cinco subfamilias de acuerdo a la estructura base de sus dominios y organización genómica, el dominio extracelular o amino-terminal (N-terminal), está formado por 5 subdominios nombrados desde EC-1.

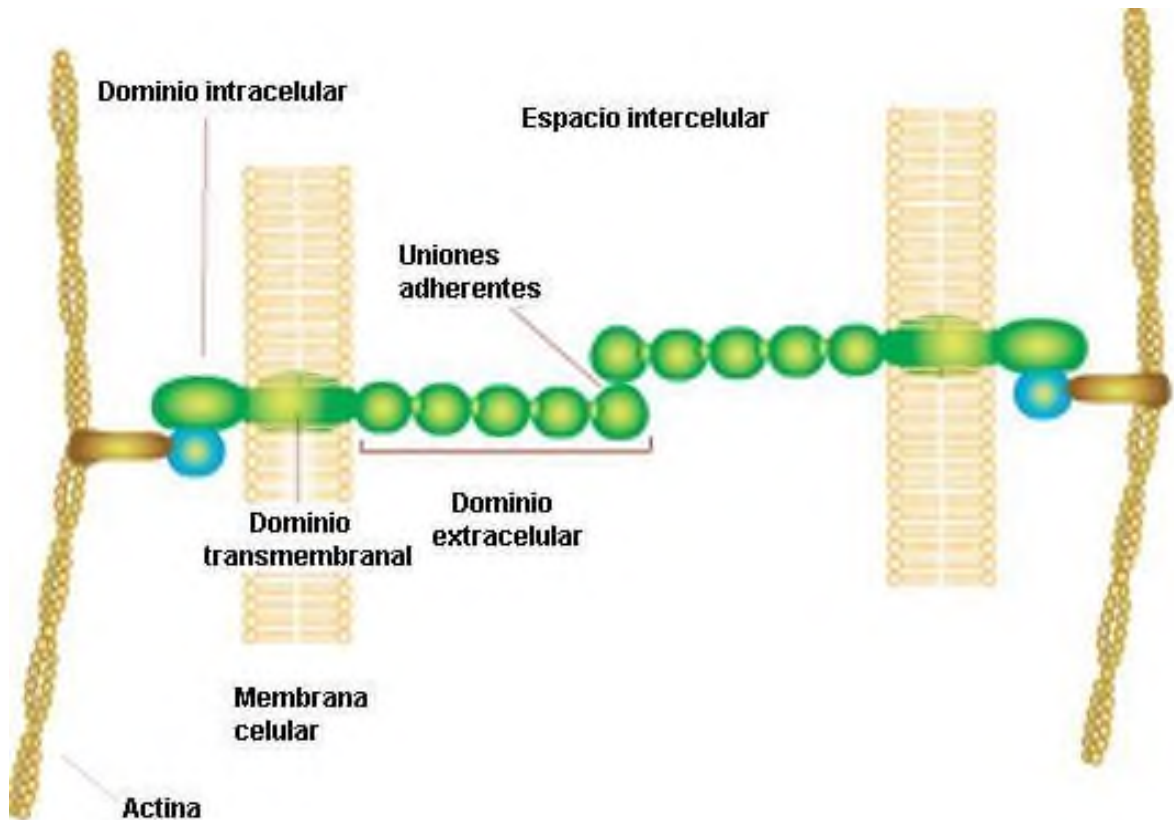


Figura 4: Estructura de la cadherina-E. Modificado de Sigma-Aldrich. (2015).

Localizado en la parte distal de la membrana, hasta EC-5 ubicado en la parte proximal (Harrison *et al.*, 2005).

Se sabe que el dominio extracelular, presenta un arreglo proteínico en forma de red, debido a que la conformación de sus extremos amino y carboxilo terminal se encuentran en puntos opuestos de los repetidos ECs (Shapiro *et al.*, 1995).

Una característica importante de este dominio, es la que ocurre en el subdominio EC1, ya que de manera funcional posee una secuencia de aminoácidos, que está muy relacionada con el mecanismo de unión entre cadherinas a nivel celular y brinda la capacidad para establecer uniones celulares homotípicas (Shasby, 2007), dicho

dominio es llamado HAV, debido a que está construido por los aminoácidos: histidina, alanina y valina (Nose *et al.*, 1990).

Otra característica importante del dominio extracelular, son los sitios de unión al calcio ya que estabiliza los ECs interactuando con los residuos del extremo amino de ECs adyacentes, fundamental en la estabilidad de las uniones adherentes dependientes de cadherinas y de ello depende el funcionamiento de la adhesión dependiente de esta CAM (Overduin *et al.*, 1995).

2.4.3.1.2 Dominio intracelular

El dominio citoplasmático, contiene un grupo carboxi-terminal (C-terminal), una característica importante de este dominio, es su alto grado de conservación entre los diferentes subtipos de cadherinas (Halbleib y Nelson, 2006), el cual interactúa indirectamente con los filamentos de actina, por medio de un grupo de proteínas de anclaje intracelular llamadas cateninas, por lo que esta interacción es esencial para la eficiencia de la adhesión célula-célula (**Figura 4**).

La mayoría de las cadherinas, funcionan como proteínas de adhesión transmembranal, que unen indirectamente los citoesqueletos de las células que adhieren (Ivanov *et al.*, 2001).

2.4.3.2 Características funcionales

2.4.3.2.1 Adhesión celular

La formación de uniones adherentes de las cadherinas, fue la principal función que se descubrió 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 y no entre cadherinas de otros subgrupos (Gumbiner, 1996).

A su vez, se sabe que la cadherina-E, es una molécula de adhesión celular que promueve la señalización celular (Levy *et al.*, 1999) y activa la vía PI3K (Hale *et al.*, 2008).

La capacidad de adhesión celular de las cadherinas, se ha visto de manera bastante clara en etapas específicas del embrión, a pesar que la distribución de la cadherina-E en el embrión, varía con la etapa de segmentación, es decir, en etapas de 2 a 4 células, la distribución es citoplasmática y por lo tanto poco activa, mientras que en embriones de 8 células en adelante, la cadherina-E es funcional cuando se acumula principalmente en los sitios de contacto celular (Trejo *et al.*, 2006), durante el proceso de compactación embrionaria.

2.4.3.2.2 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 las 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).

En el caso de 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, une a la red de filamentos de actina de una célula con la matriz extracelular. En los contactos focales interviene como molécula de adhesión, las Integrinas y como ligando en la Matriz, la fibronectina (Liu *et al.*, 2000).

Las uniones adherentes: intervienen en la unión de la red de filamentos de actina entre células adyacentes.

2.4.3.2.3 Señalización

Algunos estudios, sobre la estructura de las cadherinas, demostraron que cambios de concentración del calcio intracelular, generaban la activación de proteínas G y tirosinas cinasas, lo que dio pie a establecer una función importante relacionada con el dominio intracelular: la señalización intracelular (Takeichi, 1991). Lo anterior, está fundamentado en estudios donde encontraron distintas moléculas que pertenecían a receptores de señalización celular, a nivel de las uniones célula-célula en células epiteliales (Tsukita *et al.*, 1999). Por otra parte, se estableció que era factible usar como señalizadores celulares, a las uniones celulares, a las uniones

celulares generadas por cadherinas, debido a la presencia de una tirosina cinasa de la familia SRC, ubicada en el complejo de adhesión con el citoesqueleto, durante el proceso de adhesión célula-célula (Takeichi, 1991). A partir de este conocimiento, se tienen identificadas las moléculas de señalización que interactúan con cadherinas, como catenina β , RTK, enzimas GTP, entre otras (Nelson, 2008).

De manera general, se conoce que existen tres vías a través de las cuales, las células transmiten señales intracelulares dependientes de cadherina:

1. A través de la familia Rho de pequeñas GTPasas.
2. A través de la vía de señalización Wnt.
3. A través de receptores tirosina-cinasa.

2.5 Factores de crecimiento

Son proteínas con un peso molecular inferior a los 30,000 daltons, sintetizadas por varios órganos y tejidos, cuyas funciones involucran diversos procesos celulares, que van desde la proliferación celular ya que poseen una función mitogénica, procesos fisiológicos complejos, como la inflamación y la cicatrización de tejidos, incluyendo también el desarrollo de tejidos, entre otros (Josso y Di Clemente, 1997).

Particularmente se liberan inmediatamente después de su síntesis, en los órganos donde se producen y ejercen una función de tipo endocrina y autocrina. (Rothe y Falanga, 1992).

Los factores de crecimiento se dividen en 5 familias, siendo las más conocidas

y estudiadas las siguientes:

El factor de crecimiento insulínico (Insulin growth factor, IGF), el factor de desarrollo epidérmico (Epidermal growth factor, EGF), el factor de crecimiento transformador (Transforming growth factor, TGF) y el factor de crecimiento derivado de las plaquetas (Platelet-derived growth factor, PDGF) (Block, 2007) (**Cuadro 1**).

2.5.1 Factor de crecimiento parecido a insulina (IGF-1)

El IGF-1, es sintetizado y secretado principalmente por el hígado, aunque también se expresa en varios tejidos reproductivos, como el ovario, oviducto, útero y el embrión (Rhoads *et al.*, 2008).

Es un péptido de 70 aminoácidos, relacionado estructuralmente a la insulina (50 % de homología en la secuencia) y al factor de crecimiento similar a la insulina tipo 2 (IGF-II) (70 % de homología). Es normalmente considerado como una hormona metabólica, la cual media varios de los efectos anabólicos de la hormona de crecimiento (Duan, 2002).

2.5.1.1 Funciones del IGF-1 a nivel celular

Las acciones del IGF-1 incluyen: progresión del ciclo celular, proliferación, diferenciación, regulación de la función y de la muerte celular (Kim y Fazleabas, 1999).

Los niveles de expresión del IGF-I son diferentes en las etapas consecutivas del desarrollo (**Figura 5**). El transcrito de IGF-I, ha mostrado estar presente en la preimplantación del embrión de ratón y un aumento en los niveles de ARNm ha sido observado en etapas de blastocisto (Handwerger, 2003).

Cuadro 1: Tipos, fuente y funciones de factores de crecimiento: Rothe y Falanga. (1992).

Factor de crecimiento	Fuente	Funciones
PDGF	Plaquetas, macrófagos, células endoteliales y células dañadas.	Quimiotáxis, Proliferación de fibroblastos, producción de colagenasa.
TGF-β	Macrófagos, plaquetas, neutrófilos, linfocitos, fibroblastos, células epiteliales y endoteliales.	Proliferación de fibroblastos, Quimiotáxis, metabolismo de colágeno.
EGF	Plasma, Macrófagos, células epiteliales, plaquetas,	Proliferación de células epiteliales.
TGF-α	Macrófagos activados, Macrófagos, células epiteliales.	Proliferación de células epiteliales.
KGF	Fibroblastos.	Proliferación de células epiteliales.
IL-1	Macrófagos.	Proliferación de fibroblastos.
FGF	Macrófagos, Fibroblastos, células endoteliales.	Proliferación de fibroblastos, contracción de heridas.
TNF- α	Macrófagos, Linfocitos T.	Proliferación de fibroblastos.
IGF-1	Plasma, hígado, fibroblastos.	Síntesis de proteoglicanos sulfatados y colágeno, Proliferación de fibroblastos.
IFNs	Linfocitos, fibroblastos	Inhibición de fibroblastos, Proliferación y síntesis de colágeno.

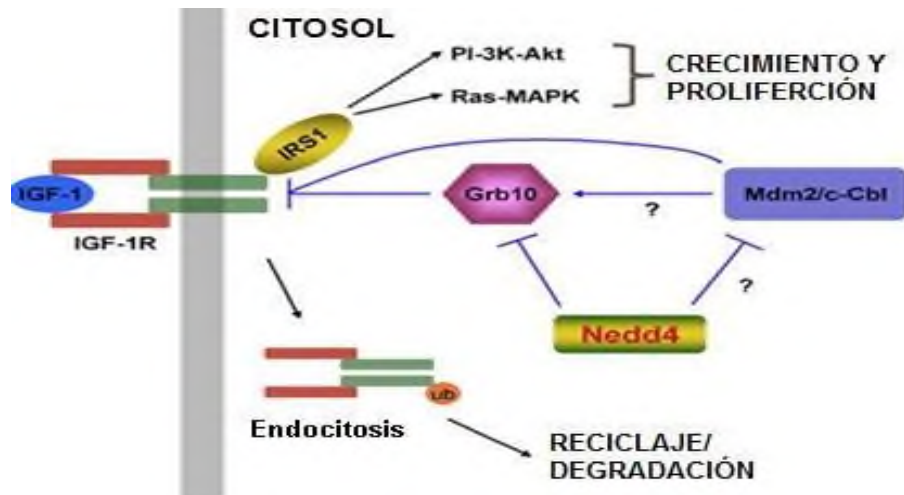


Figura 5: Función del IGF-1 a nivel celular, modificado de Yang y Kumar. (2010).

Numerosos reportes, han descrito la presencia de bajos niveles de proteína y ARNm de IGF-I, durante las últimas etapas de embriogénesis y su modo de acción en las etapas embrionarias, es generalmente considerada como autocrina/paracrina (Mandl, 2002).

Por otra parte, en un estudio realizado por Jousan y Hansen. (2004), estudiaron el efecto del estrés calórico en embriones de bovino, incubados en IGF-1, encontraron una tasa de desarrollo del 58 % en embriones de 16 células, sometidos a 41 °C y atribuyeron al IGF-1 una función termoprotectora.

Finalmente, Bonilla *et al.* (2011), realizaron una investigación similar a la de Jousan y Hansen. (2004) y determinaron que el efecto termoprotector del IGF-1 es dependiente de la etapa de la segmentación en la que se encuentran los embriones, en embriones de 2 a 4 células no observaron este efecto protector, en tanto que, en embriones de 8 células, mórula y blastocisto si se evidenció.

Numerosos reportes, han descrito la presencia de bajos niveles de proteína y ARNm de IGF-I, durante las últimas etapas de embriogénesis y su modo de acción en las etapas embrionarias, es generalmente considerada como autocrina/paracrina (Mandl, 2002).

Por otra parte, en un estudio realizado por Jousan y Hansen. (2004), estudiaron el efecto del estrés calórico en embriones de bovino, incubados en IGF-1, encontraron una tasa de desarrollo del 58 % en embriones de 16 células, sometidos a 41 °C y atribuyeron al IGF-1 una función termoprotectora.

Finalmente, Bonilla *et al.* (2011), realizaron una investigación similar a la de Jousan y Hansen. (2004) y determinaron que el efecto termoprotector del IGF-1 es dependiente de la etapa de la segmentación en la que se encuentran los embriones, en embriones de 2 a 4 células no observaron este efecto protector, en tanto que, en embriones de 8 células, mórula y blastocisto si se evidenció.

2.6 Termoprotección celular

Es el proceso fisiológico en el cual, la célula, al exponerse a condiciones estresantes de temperatura, es capaz de adaptarse a la exposición de una temperatura más severa (Heredia *et al.*, 1997).

Diversos estudios han demostrado, que el IGF-1 actúa como un factor de sobrevivencia en embriones de preimplantación de bovino, cuando son expuestos a un choque térmico en condiciones *in vitro* (Jousan y Hansen, 2004).

Por ejemplo, Jousan y Hansen. (2004), mostraron que al incubar embriones de bovino de 16 células en IGF-1 y después someterlos a un estrés térmico inicial

de 38.5 °C en condiciones *in vitro*, se incrementaba la resistencia térmica de los embriones, cuando fueron expuestos a estrés calórico de 41 °C. Es decir, los embriones adquirieron termorresistencia, al soportar una temperatura aún más agresiva de 41 °C. A partir de este método dichos autores obtuvieron una tasa de desarrollo del 58 % en embriones que se desarrollaron del estadio de 16 células a blastocistos, durante la etapa de desarrollo de la producción *in vitro* de embriones.

2.7 La vía PI3K/AKT (Vía Fosfatidilinositol 3 cinasa/Proteína cinasa B)

El estudio de la ruta de la PI3K/AKT, es de vital importancia para el conocimiento de eventos celulares implicados en la proliferación, crecimiento y sobrevivencia celular (Hiles *et al.*, 1992).

La vía de la PI3K/AKT, es estimulada fisiológicamente como consecuencia de la activación de RTK, como los factores de crecimiento, que en el caso del IGF-1, autofosforilan el sustrato del receptor de insulina (IGF-1R) y también fosforila la subunidad p85 de la PI3K (Dupont y Holzenberger, 2003) (**Figura 6**).

La fosforilación de la subunidad p85, conduce a un cambio conformacional de dicha proteína, que promueve la unión de la subunidad catalítica (p110) y activa la ruta (Hennessy *et al.*, 2005).

La PI3K activa, también fosforila el fosfatidilinositol 3,4 difosfato (PIP2), convirtiéndolo en el segundo mensajero fosfatidil inositol 3,4,5 trifosfato (PIP3), el cual, corriente abajo, conduce a la activación de la proteína AKT (Hennessy *et al.*, 2005).

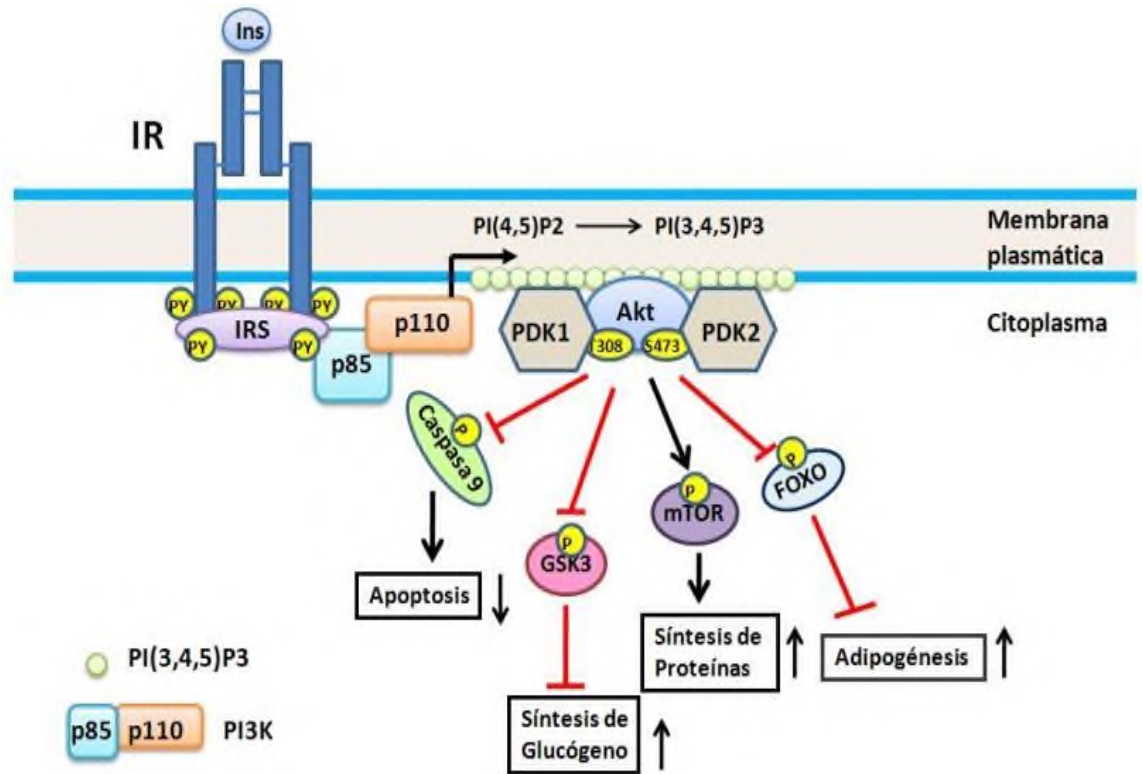


Figura 6: Esquema general de la vía PI3K/AKT. Adaptado de Olivares y Arellano. (2008).

La AKT tiene múltiples blancos, responsables de los efectos de la activación de la vía, sin embargo, la activación anormal de esta vía, conduce a una respuesta proliferativa y antiapoptótica que se relaciona con el desarrollo de múltiples tipos de cáncer; por esto, su estudio es parte crucial para el entendimiento de los procesos de carcinogénesis (Davies *et al.*, 2000).

2.7.1 Cadherina-E y la vía PI3K

La ruta PI3K es activada por estímulos celulares, como los de regulación de la proliferación celular, motilidad, diferenciación y supervivencia, sin embargo, también se ha visto que es activada por estímulos celulares, que favorecen la

adhesión celular y esto se ha evidenciado, porque esta ruta también participa en cambios de conformación del citoesqueleto y movilizaciones intracelulares (Osaki *et al.*, 2004).

Por el momento, se sabe que la cadherina-E a través de su dominio intracelular, tiene una participación importante en la activación de vías de señalización intracelular, que están relacionadas con la proliferación, crecimiento y sobrevivencia de las células, tales como la ruta PI3K/AKT (Levy *et al.*, 1999).

Además, existe evidencia de que la PI3K podría ser activada, después de la polarización de cadherina-E hacia los complejos de adhesión dependientes de esta molécula (Pece *et al.*, 2000).

2.7.2 El IGF-1 y la vía PI3K

La actividad del IGF-1, es regulada por el IGF-1R, sin embargo, uno de los efectos más importantes del IGF-1 cuando ocupa el IGF-1R, es que causa la autofosforilación del mismo, así como la fosforilación de residuos de tirosina y la subunidad p85 de la PI3K, dando como resultado, la activación de la ruta de la PI3K/AKT (Dupont y Holzenberger, 2003).

De acuerdo con Yoshida *et al.* (1998), el IGF-1R es expresado en embriones con estadios tempranos de desarrollo, desde el estadio de 2 células prolongándose hasta el estadio de blastocisto.

Jousan *et al.* (2008), determinaron que el IGF-1 actúa a través de la activación de la vía de señalización dependiente de PI3K. Playford *et al.* (2000), establecieron que el IGF-1, también participa en la regulación de la actividad

transcripcional de la catenina β , que es un componente esencial de los complejos de adhesión dependientes de cadherina-E.

2.8 El estrés celular

El estrés oxidativo, actualmente es el tipo de estrés celular más conocido y estudiado, consiste en el desequilibrio entre la generación de especies reactivas de oxígeno y los mecanismos antioxidantes, que de persistir puede producir un daño celular irreversible (Fuchs *et al.*, 1997). Puede presentarse por una deficiencia en la generación de sustancias protectoras naturales, o por una excesiva exposición a agentes generadores de especies reactivas de oxígeno (EROs) (Chihuailaf *et al.*, 2002).

Las EROs, desencadenan inestabilidad celular, debido a que requieren estabilizar su carga molecular desestabilizando a otras macromoléculas, cuando no existen medios suficientes para estabilizar los efectos de las EROs, las vías de señalización celular activan proteínas específicas, entre ellas el factor de necrosis tumoral α (TNF- α), que induce la apoptosis celular inducida por estrés (Ylikoski *et al.*, 2002).

2.8.1 Efecto del estrés calórico *in vitro* sobre el desarrollo embrionario

Estudios recientes han demostrado, que el estrés por calor, causa infertilidad y no sólo afecta la secreción hormonal y el desarrollo del embrión, sino también daña al ovocito (Rivera y Hansen, 2001).

Por ejemplo, los ovocitos de bovino recolectados durante el verano, muestran una disminución en la capacidad para convertirse en blastocistos después de la

fertilización *in vitro* (Al-Katanani *et al.*, 2002). Esto sugiere, que el proceso de maduración de ovocitos es susceptible al estrés calórico y se ha demostrado que la exposición de ovocitos de bovino, a temperatura elevada durante la maduración *in vitro*, disminuye las tasas de división celular y la formación de blastocistos (Roth y Hansen, 2004).

Estudios anteriores, han demostrado que los embriones en estadios tempranos de desarrollo (o durante el desarrollo embrionario preimplantacional) son sensibles a las altas temperaturas (Rivera y Hansen, 2001).

Por ejemplo, el porcentaje de fertilización y de embriones viables en vacas inseminadas, son menores durante meses calientes (22.1 %) que durante meses fríos (43.1 %) (López-Gatius, 2003).

2.9 Apoptosis

Es un proceso normal, esencial para reemplazar células dañadas que no presentan un funcionamiento adecuado o que han sufrido alteraciones. La apoptosis en células, es inducida por varios estímulos internos y externos o daño celular causado por radiaciones ionizantes, infección por patógenos (virus, bacterias, parásitos) o señales extracelulares (Wyllie, 1997) (**Figura 7**).

A nivel celular, la apoptosis produce cambios morfológicos irreversibles, el citoplasma y el núcleo se condensan, los organelos celulares cambian de ubicación o se compactan, hasta que ocurre fragmentación nuclear y de proteínas previos a la lisis (Wyllie, 1997).

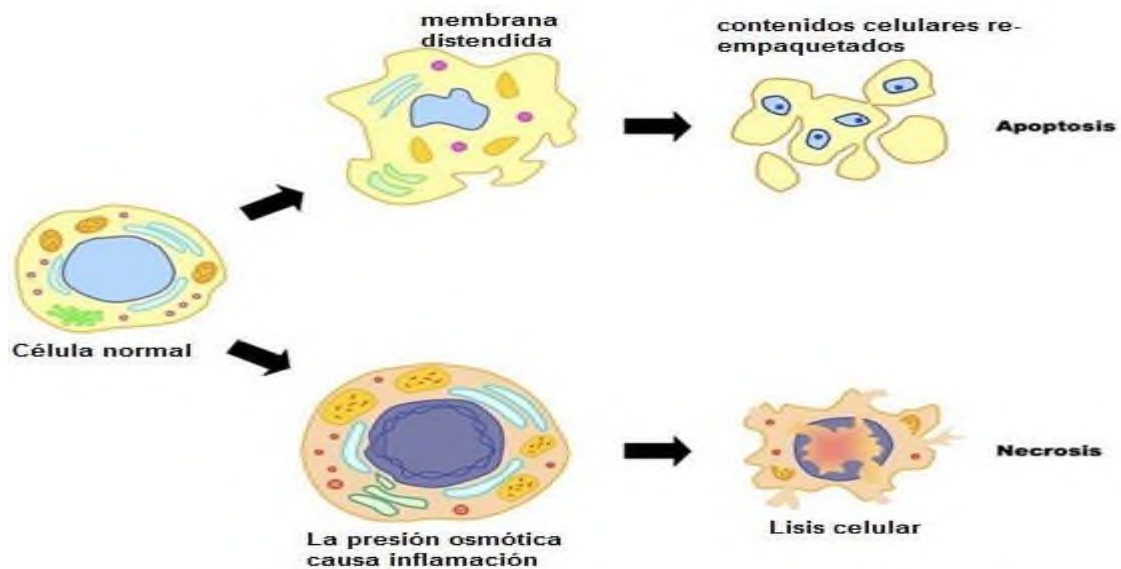


Figura 7: Esquema general de la apoptosis y necrosis celular. Modificado de Cai-ping *et al.* (2014).

Posteriormente los macrófagos, consumen los residuos celulares apoptóticos por medio de la fagocitosis (Kerr *et al.*, 1972).

2.9.1 Métodos para detectar la apoptosis

Con el estudio de las bases bioquímicas de la apoptosis celular, se han revelado muchos procesos y características útiles para discriminar entre células normales y apoptóticas. Las características estructurales y conformacionales que sufren las células apoptóticas, como son condensación del citoplasma y del núcleo, modifica y compacta los organelos de la célula, e inician las distintas fragmentaciones de proteínas que brindan soporte a estructuras celulares internas y externas.

Otro evento que indica apoptosis, es cuando se encuentran células aisladas o en regiones donde el grupo celular al que pertenecen, no ejerce la función

adecuada o afectan interfiriendo en el buen funcionamiento de células y tejidos normales (Negoescu *et al.*, 1997).

Actualmente, existen técnicas que determinan, identifican y etiquetan las células apoptóticas, para ello se necesitan, microscopía de luz (preferentemente con fluorescencia). Por medio de esta técnica, se pueden apreciar cambios en la organización celular, tales como la condensación de la cromatina o la aparición de cuerpos apoptóticos, que son fragmentos celulares que se desprenden durante el proceso de muerte (Negoescu *et al.*, 1997).

La microscopía de fluorescencia, revela la conformación celular por medio de marcadores moleculares unidos a un fluoróforo, que normalmente al ser excitado emite una onda de luz, dichos marcadores funcionan por medio de la afinidad por ciertas proteínas expuestas en la membrana (Green *et al.*, 1994).

La técnica TUNEL (Terminal dUTP Nick End Labeling), es empleada en la detección temprana de la apoptosis, así como en la detección de la fragmentación del ADN, asociado con las últimas etapas de la cascada apoptótica celular.

Con la ayuda de la citometría de flujo y microscopía es posible incluso, conocer la concentración de células que se encuentran a punto de morir (Kroemer *et al.*, 2009).

Jousan y Hansen. (2004), describen la técnica como sigue, los embriones, se incuban en una RNA-asa que mantiene la integridad del ARN a 37 °C en oscuridad durante 1 h. Posteriormente las células tratadas, se lavan en PBS y se incuban con 25 ml de solución de reacción TUNEL (que contiene isotiocianato de

fluoresceína conjugado dUTP), con la solución de células incubadas con RNA-asa, durante 1 h a 37 °C en oscuridad. Las células se lavan en PBS y se incuban en 25 mL de Hoechst 33342 (1 mg / ml) durante 12 min, en oscuridad. Por último, las células se lavan con PBS, para eliminar el exceso de Hoechst 33342 y las células se fijan en un portaobjetos para ser analizadas al microscopio de fluorescencia.

La citometría de flujo, es un método rápido que permite el análisis de diversas estructuras y organelos celulares y, analiza la conformación celular, sin embargo, el parámetro más importante en el que se basa para detectar apoptosis, es por medio de la cantidad de ADN (Gong *et al.*, 1994) (**Figura 8**).

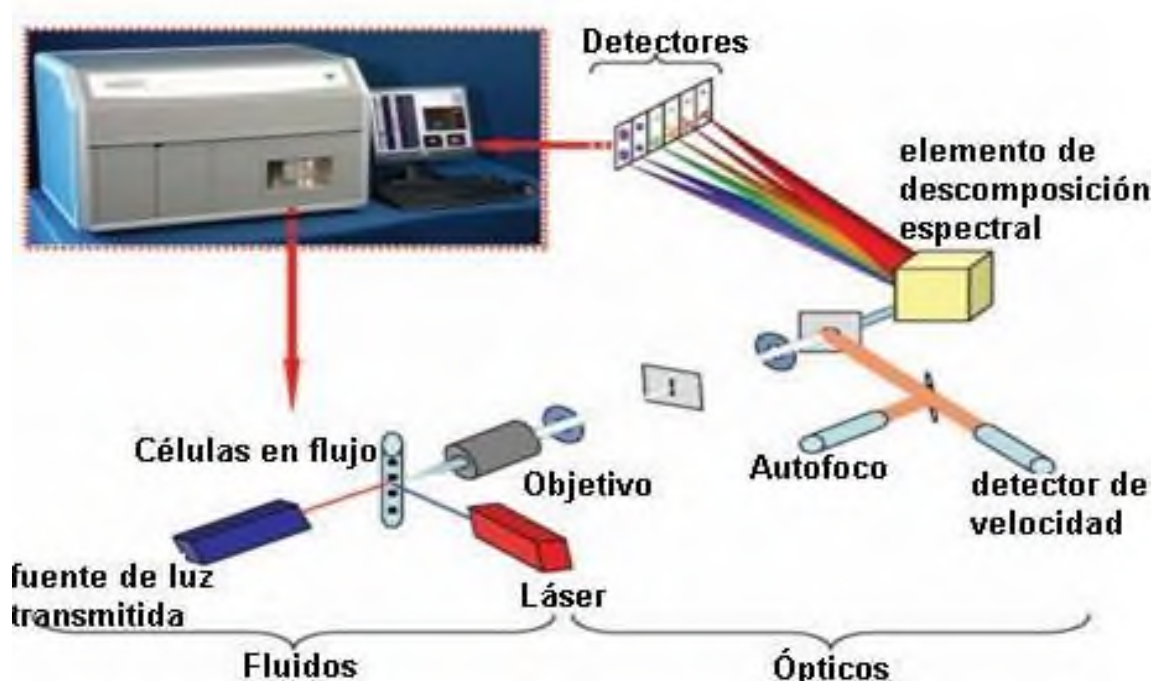


Figura 8: Esquema general de un citómetro de flujo. Modificado de Zuba-Surma *et al.* (2007).

El equipo está compuesto, con un sistema parecido a un microscopio que ofrece una cuantificación de parámetros celulares, necesarios para evaluar la morfología celular y con ello determinar si una célula es funcional o si ha sufrido apoptosis (Orfao *et al.*, 1994).

Incluye una celda de flujo laminar, que conduce al líquido que contiene la muestra celular hacia la fuente láser, posteriormente, los sensores que identifican las células, son evaluados en un sistema de medición que analiza el contenido de ADN celular, por medio de la traducción de las señales y ondas luminosas en valores alfanuméricos, que son procesados mediante un sistema de amplificación lineal o logarítmico, los cuales se muestran en un ordenador con la ayuda de un histograma (McCloskey *et al.*, 1994).

Las desviaciones de los valores medios, reportados en el histograma del monitor, se consideran como células apoptóticas (Gong *et al.*, 1994).

Sin embargo, a partir del cambio en la simetría de la membrana plasmática, se han desarrollado métodos que permiten detectar la apoptosis celular, por medio de la afinidad de ciertos compuestos químicos hacia proteínas específicas, como es el caso de la Anexina V, que tiene afinidad por la fosfatidilserina que en respuesta a la apoptosis migra al exterior de la membrana celular (Cornelissen *et al.*, 2002).

2.9.2 Prueba de la anexina V

Es una técnica utilizada en la detección y estudio de células apoptóticas, con fines científicos y de diagnóstico (Cornelissen *et al.*, 2002). La apoptosis

genera cambios celulares estructurales tanto externos como internos. A partir de éste conocimiento, se han estudiado las proteínas que se encuentran disponibles a nivel de la membrana celular durante esa etapa.

Se ha observado, que existe un cambio estructural externo, que origina un cambio en la simetría de la membrana plasmática; cuando una célula entra en el proceso temprano de muerte por apoptosis, un fosfolípido específico que se encuentra normalmente en la membrana interior, se expone hacia el exterior de la membrana celular, tal es el caso de la fosfatidilserina (PS) (Vermes *et al.*, 1995).

La translocación de PS, del interior hacia el exterior de la membrana, es un marcador específico para la apoptosis.

El procedimiento de esta prueba, se describe a continuación. Las células se mantienen en PBS y posteriormente son colocadas en el buffer de unión de Anexina V-FITC (Anexina V-FITC, Kit detección de apoptosis, Sigma A2214), incubados en 500 µl de buffer de unión a temperatura ambiente por 10 min, en condiciones de oscuridad, posteriormente las células se colocan en un portaobjetos y se determina la fluorescencia en el microscopio de fluorescencia (Cornelissen *et al.*, 2002) (**Figura 9**).

Sin embargo, la técnica se encuentra limitada por ciertos problemas, por ejemplo, al analizar la apoptosis celular con el microscopio de fluorescencia, se puede conducir a un significativo número de falsos eventos positivos (hasta un 40 %), cuando el técnico, al realizar la contabilización celular, asocia la tinción de

Ioduro de propidio (PI) de ARN en el compartimento citoplasmático (Vermes *et al.*, 1995).

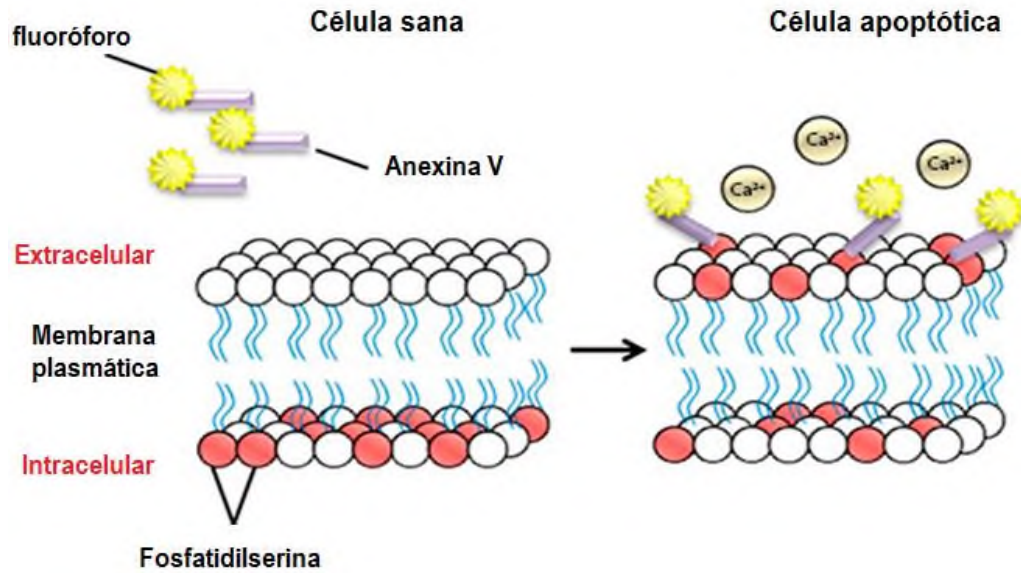


Figura 9: Mecanismo de acción de la anexina V. Modificado de Demchenko. (2013).

3 ANTECEDENTES

El factor de crecimiento parecido a Insulina-1 o IGF-1, se ha utilizado ampliamente como termoprotector (Jousan *et al.*, 2008). Jousan y Hansen. (2004), determinaron que el IGF-1 actúa como un factor de supervivencia, cuando los embriones de bovino, en etapas tempranas del desarrollo son sometidos a un estrés calórico (41 °C/ 9 h), estos autores reportaron una tasa de apoptosis y desarrollo del 6 y 58 % respectivamente.

Por otra parte, Bonilla *et al.* (2011), realizaron un experimento para tratar de determinar si la actividad termoprotectora del IGF-1 era dependiente de la etapa de desarrollo del embrión, sometieron embriones a un estrés calórico (41 °C/ 15 h y 38.5 °C/ 9 h) en presencia o ausencia de IGF-1. Estos autores reportaron que en embriones de 2 a 4 células tratados con IGF-1 y sometidos a un estrés calórico, solo el 20 % desarrollan hasta blastocisto, mientras que embriones de 8 células o mórulas, bajo las mismas condiciones, el 50 % desarrollan hasta blastocisto, así concluyeron que el efecto termoprotector del IGF-1, es dependiente de la etapa de la segmentación en la que se encuentran los embriones.

En cuanto al mecanismo de acción del IGF-1, Jousan *et al.* (2008), determinaron que el IGF-1 actúa a través de la activación de la vía de señalización dependiente de PI3K. Además, Kim *et al.* (2006), determinaron que el IGF-1 a través de su receptor, el IGF-1R, mejora el desarrollo de embriones producidos *in vitro* disminuyendo la tasa de apoptosis y regula la expresión de genes relacionados con este proceso.

La cadherina-E pertenece a una familia de moléculas de adhesión celular cuya actividad es dependiente de calcio (Goodwin y Yap, 2004) y se expresa en células epiteliales, en los blastómeros durante el desarrollo embrionario y también en los gametos (Rufas *et al.*, 2000). La cadherina-E tiene dos funciones, la formación de uniones adherentes (Gumbiner, 1996) y la transducción de señales (Pece *et al.*, 2000). Siendo una molécula de adhesión, su localización es principalmente en la membrana, sin embargo, se sabe que la localización de la cadherina-E varía con la etapa de segmentación.

Trejo *et al.* (2008), evaluaron la distribución y localización de la cadherina-E en embriones de hámster de 4, 6 y 8 células y determinaron que la distribución de esta molécula varía con la etapa de segmentación, en etapas tempranas (4 a 6 células) su localización es en citoplasma principalmente, mientras que en etapas superiores (8 células) su localización cambia a los sitios de adhesión.

Aghion *et al.* (1994), realizaron un estudio para tratar de inducir una compactación celular prematura en embriones de 4 células y de acuerdo con estos autores, la incubación por 5 h en un medio suplementado con 6-DMAP (0.6 mM) induce un aumento en los sitios de adhesión dependiente de cadherina-E y formación de uniones gap similar a lo que se observa durante el proceso de compactación normal.

La relación entre la cadherina-E y el IGF-1 ha sido de gran interés recientemente. Se ha establecido que el IGF-1 es capaz de influir en la función adhesiva de la cadherina-E. Morali *et al.* (2001), establecieron que cuando las

células con una morfología polarizada típica de epitelios son tratadas con IGF-1 sus características morfológicas cambian a un fenotipo no polarizado o mesénquima.

Recientemente, Bedzhov *et al.* (2012), establecieron que en embriones preimplantacionales, el receptor a IGF-1, se encuentra en forma activa en los sitios de contacto dependientes de cadherina y que se requiere de esta molécula para activar el receptor del factor de crecimiento, sugiriendo una relación entre cadherina-E e IGF-1.

4 JUSTIFICACIÓN.

Estudios realizados tanto *in vivo* como *in vitro*, han permitido establecer que el estrés calórico, es uno de los factores que comprometen la capacidad de desarrollo del embrión hasta la etapa de blastocisto (Sakatani *et al.*, 2004). Se ha propuesto el uso del IGF-1 como agente termoprotector para embriones que son sometidos a una temperatura de 42 °C *in vitro* (Jousan *et al.*, 2008). En relación con esta actividad del IGF-1 se ha establecido que depende de la etapa de segmentación de los embriones (Bonilla *et al.*, 2011). El IGF-1 es un péptido que estimula una gran variedad de acciones en diferentes tejidos (Yakar y Adamo, 2012). Existen evidencias de que el IGF-1 influye en la adhesión celular, así, cuando células con una morfología polarizada típica de epitelios, son tratadas con IGF-1, sus características morfológicas cambian a un fenotipo no polarizado o mesénquima.

El mecanismo involucrado, en esta actividad del IGF-1 incluye la degradación de cadherina-E y la disociación de la catenina β del complejo de adhesión (Morali *et al.*, 2001). No obstante, una participación de la cadherina-E en la regulación de la actividad del IGF-1 no ha sido establecida en embriones tempranos.

5 HIPÓTESIS

Un cambio en la localización de la cadherina-E a través de la compactación inducida en embriones de 4 células de hámster incrementará la función termoprotectora del IGF-1 cuando los embriones son sometidos a un estrés calórico *in vitro*.

6 OBJETIVO GENERAL

Determinar si existe una relación entre la localización de la cadherina-E y una mayor actividad termoprotectora (tasa de apoptosis y desarrollo) del IGF-1 en embriones de 4 células de hámster sometidos a un estrés calórico.

6.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Determinar la tasa de desarrollo bajo condiciones de estrés calórico en embriones de hámster de 4 células cuya localización de la cadherina-E ha sido modificada (embriones compactados).

- 2) Determinar la tasa de apoptosis bajo condiciones de estrés calórico en embriones de hámster de 4 células cuya localización de la cadherina-E ha sido modificada (embriones compactados).

7 MATERIALES Y METODOS

7.1 Reactivos

- a) Test de Anexina V (Sigma Aldrich, cat: APOAF-50T ST)

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) Tritón X-100 (Sigma T8787) al 1 % en PBS.

7.2 Localización del área experimental

La presente investigación, se llevó a cabo en el laboratorio de Reproducción Animal Asistida de la Universidad del Papaloapan de la ciudad de Loma Bonita, en el estado de Oaxaca, ubicado al 18° 06´ Latitud Norte y 95 ° 53´ Longitud Oeste, a una altura de 30 msnm.

El clima del lugar es cálido húmedo con lluvias abundantes en verano, la temperatura anual promedio y precipitación total, durante 2010, fueron 24 °C y 1,906.1 mm, respectivamente (FAM, 2012).

7.3 Animales

Para el estudio, se emplearon un total de 30 hembras nulíparas jóvenes de hámster sirio dorado (*Mesocricetus auratus*), de 2 meses de edad, con un peso promedio de 128±0.35 g mantenidas a 30 °C, con fotoperiodo de 14 horas luz por 10 de oscuridad, el alimento comercial y agua fueron proporcionados a libre acceso.

7.3.1 Apareamiento

Se realizó el seguimiento del ciclo estral a través de citología vaginal exfoliativa durante 12 días, se consideraron hembras regulares aquellas que presentaron al menos 2 ciclos estrales, cada 4 días, sin interrupción. Solo hembras con ciclo estral normal (duración de 4 días) fueron seleccionadas. Al tercer día del ciclo estral (fase de proestro), las hembras, fueron colocadas de manera individual con un macho de fertilidad probada. Solamente 15 min fueron permitidos para la monta y la ocurrencia del patrón de eyaculación fue observada directamente.

La fertilización fue considerada exitosa, al observar espermatozoides en el lavado vaginal (lavado con solución salina al 0.9%) que se realizó en la hembra apareada al día siguiente después de la monta.

7.3.2 Obtención de embriones de 4 células.

A las 74 h pos-coito, las hembras fueron sacrificadas por dislocación cervical en el Laboratorio de Reproducción Animal Asistida. Se diseccionaron con la ayuda de tijeras y pinzas de disección, los oviductos (hasta el segmento intramural) y los ovarios.

Los oviductos, fueron perfundidos con ayuda del microscopio estereoscópico con una jeringa para insulina y aguja punta roma calibre 29, con 1 mL de DPBS 1X libre de Ca^{2+} y Mg^{2+} , los embriones fueron colectados con una pipeta Pasteur, con punta modificada adaptada con una manguera de látex para la succión y colocados en cajas de cultivo de 4 pozos (Nunc) con 200 μL de DPBS 1X por pozo.

7.4 Experimento: Cambio en la localización de la cadherina-E en embriones de 4 células y su efecto en la función termoprotectora del IGF-1 durante un estrés calórico *in vitro*.

Este experimento fue realizado, para determinar si existe una relación entre la localización de la cadherina-E y la función termoprotectora del IGF-1. Embriones de 4 células (n=180) fueron obtenidos como se describe anteriormente (sección 7.3.2). Se formaron dos grupos: 1) un grupo experimental (n=90), donde los embriones fueron incubados por 6 h a 38 °C en TCM-199 suplementado con DMAP (0.6mM) para inducir un cambio en la localización de la cadherina-E (Aghion et al., 1994) y 2) un grupo testigo (n=90) donde los embriones fueron incubados por 6 h a 38 °C en TCM-199 sin suplementar.

7.4.1 Embriones bajo estrés calórico

Ambos grupos de embriones, fueron colocados en gotas de 50 µl de medio TCM-199 suplementado con 100 ng/ml de IGF-1 (5 µl:45 µl) y cubierta con aceite mineral.

Los embriones fueron sometidos a estrés calórico, siguiendo la técnica propuesta por Jousan y Hansen. (2004), EC (n=10/gota, 9 repeticiones) y ENC (n=10/gota, 9 repeticiones), fueron incubados durante 24 h, bajo las siguientes condiciones: 9 h a 41 °C y 15 h a 38.5 °C. Después del periodo de cultivo, se determinó la etapa de segmentación y la tasa de apoptosis.

7.4.2 Determinación de la tasa de desarrollo embrionario.

Después del periodo de incubación (24 h), se realizó la determinación de la etapa de segmentación, ambos grupos de embriones, fueron observados en el

microscopio invertido, seleccionando aquellos que no sufrieron apoptosis y colocados en una nueva gota de 50 μ l de TCM-199, se contabilizó el número total de blastómeros de cada embrión.

7.4.3 Determinación de apoptosis

7.4.3.1 Eliminación de la ZP

Antes de realizar la tinción con el test de Anexina V, fue necesario eliminar la ZP en los embriones del grupo EC (n=90) y el grupo ENC (n= 90), para lo cual, los embriones fueron incubados durante 60 s en una solución Tyrode ácida (pH 2.5).

7.4.3.2 Prueba de anexina V (apoptosis)

La apoptosis fue detectada, a través de Anexina V-FITC (Sigma A2214) siguiendo la técnica propuesta por Levy *et al.* (1998). Los embriones después del tratamiento de estrés calórico, fueron lavados tres veces con PBS y colocados en el buffer de unión (5 μ L de anexina V-FITC y 5 μ l de buffer de unión). Los embriones fueron incubados, agregando la solución preparada con 5 μ L de anexina V-FITC, a temperatura ambiente, durante 15 min en condiciones de oscuridad. Posteriormente, fueron colocados en un portaobjetos y observados en el microscopio de fluorescencia.

7.4.4 Localización de la cadherina-E en embriones de 4 células de hámster

Para la técnica de inmunofluorescencia, se emplearon 4 embriones que representaron a ambos grupos, EC y ENC (2 embriones para cada grupo), se aseguró que estos embriones, no formaran parte de la población total de

embriones empleados para ambos grupos en el experimento. Fueron lavados 3 veces en gotas de 50 μ L de PBS, los EC y ENC fueron almacenados en gotas independientes.

7.4.5 Técnica de inmunofluorescencia

Para realizar la inmunotinción de los embriones (del grupo experimental y el grupo testigo) se siguió la técnica propuesta por Kawai *et al.* (2002) con algunas modificaciones.

Los embriones de ambos grupos EC y ENC (en total 4 embriones), fueron lavados dos veces en una gota de 50 μ L de PBS, inmediatamente después fueron fijados, en una solución de paraformaldehído al 4 % durante 30 min. Después de este lavado, los embriones fueron permeabilizados con una solución de Triton X-100 al 1 % durante 10 min.

Los embriones libres de la zona pelúcida, una vez fijados y permeabilizados, fueron incubados en una solución de albumina al 5 % durante 1 h, para bloquear los sitios inespecíficos de unión del anticuerpo.

Posteriormente fueron incubados, con el anticuerpo primario anti-cadherina-E (1:50) durante 2 h, a temperatura ambiente y finalmente fueron incubados durante 1 h a temperatura ambiente y en oscuridad con el segundo anticuerpo anti-IgG marcado con fluoresceína (1:50).

Los 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).

7.4.6 Análisis de imágenes

La concentración de cadherina-E fue analizada en 2 regiones: la del citoplasma y la región de adhesión celular de cada embrión. Especialmente se analizaron las zonas de adhesión entre blastómeros, de las 2 muestras de cada grupo de embriones (2 EC y 2 ENC), con la finalidad de observar el comportamiento de la redistribución de la cadherina-E durante estadios tempranos.

La integración de la fluorescencia fue obtenida siguiendo longitudinalmente cada una de las zonas de adhesión entre membranas de cada embrión con ayuda de microscopía confocal.

7.5 Análisis estadístico

Los efectos de la tasa de desarrollo y apoptosis se analizaron a las 24 h, mediante un análisis de varianza utilizando el procedimiento del *Modelo Lineal General (GLM) de SAS (SAS, 1989). La significancia estadística fue $p < 0.05$.

$$*Y_i = \beta_0 + \beta_1 X_{i1} + \beta_2 X_{i2} + \dots + \beta_k X_{ik} + \epsilon_i \quad i = 1, 2, \dots, n,$$

- **Y_i = observación de la respuesta. (En embriones compactados o no compactados, $i = 1 \dots 90$).**
- **$X_{i1}, X_{i2}, \dots, X_{ik}$ = valor fijo de la variable de predicción, desencadenados por el estrés calórico (41 °C), vistos en cada embrión compactado o no compactado.**

- $\beta_0, \beta_1, \beta_2, \dots, \beta_k$ = parámetros lineales desconocidos en Embriones compactados o no compactados, $\beta_0, \dots, \beta_{90}$, donde, β = desarrollo o apoptosis y $\beta_k \chi_{ik}$ = el efecto no conocido desde 1...90 embriones compactados o no compactados por el efecto del valor fijo de la variable de predicción, correspondiente al estrés calórico de 41 °C.
- ϵ_i = error aleatorio.

8 RESULTADOS

8.1 Obtención de embriones

Se obtuvieron un total de 180 embriones de 4 células, que fueron distribuidos en dos grupos: embriones compactados (n= 90) y embriones no compactados (n= 90).

8.2 Inducción de la compactación en embriones de 4 células

Los embriones del grupo experimental fueron incubados en presencia de 6-DMAP para inducir la compactación prematura (**Figura 10**). Una muestra de 90 embriones, fueron incubados en presencia de 6-DMAP para inducir su compactación prematura. En la Figura 10 se muestran embriones no compactados (**Figura 10A**) y compactados (**Figura 10B**).

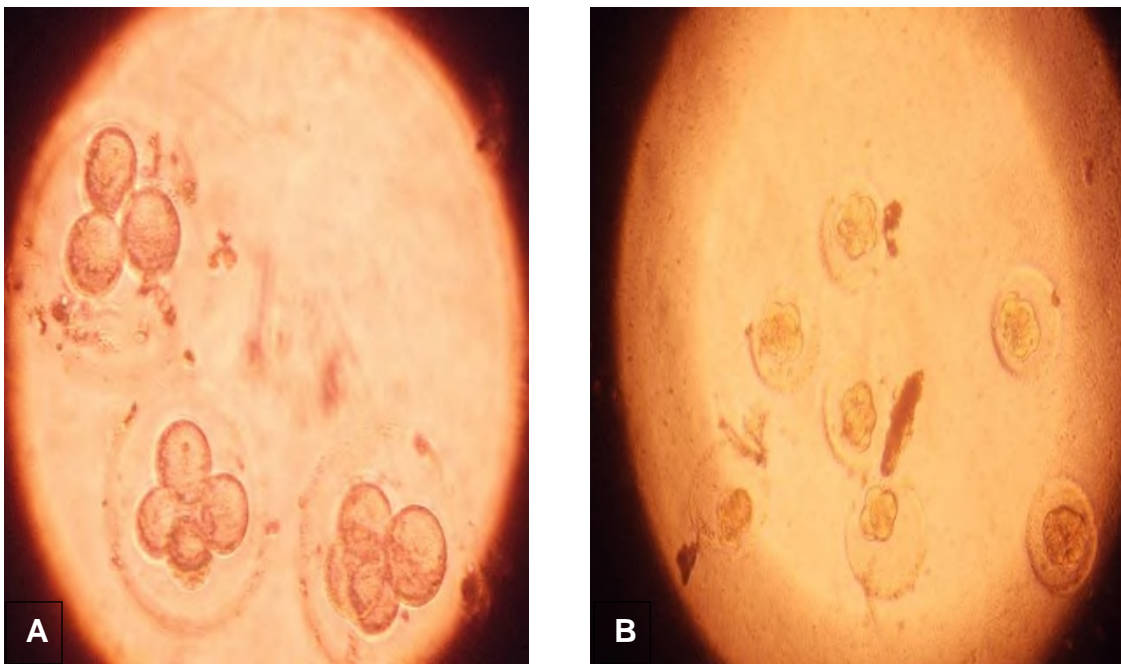


Figura 10. Embriones 4 células vistos en microscopio invertido (100 X). A) Embriones no compactados y B) compactados.

Para comprobar el efecto del 6-DMAP, en la redistribución de la cadherina-E, dos embriones de cada grupo fueron analizados en el microscopio confocal (**Figura 11 y 12**). En ENC, la localización es principalmente en el citoplasma y muy poca en los sitios de adhesión (**Figura 11A**), la máxima intensidad de fluorescencia, en las zonas de adhesión es de 70 unidades (**Figura 11B**) (grafica obtenida a través del escáner del microscopio confocal).

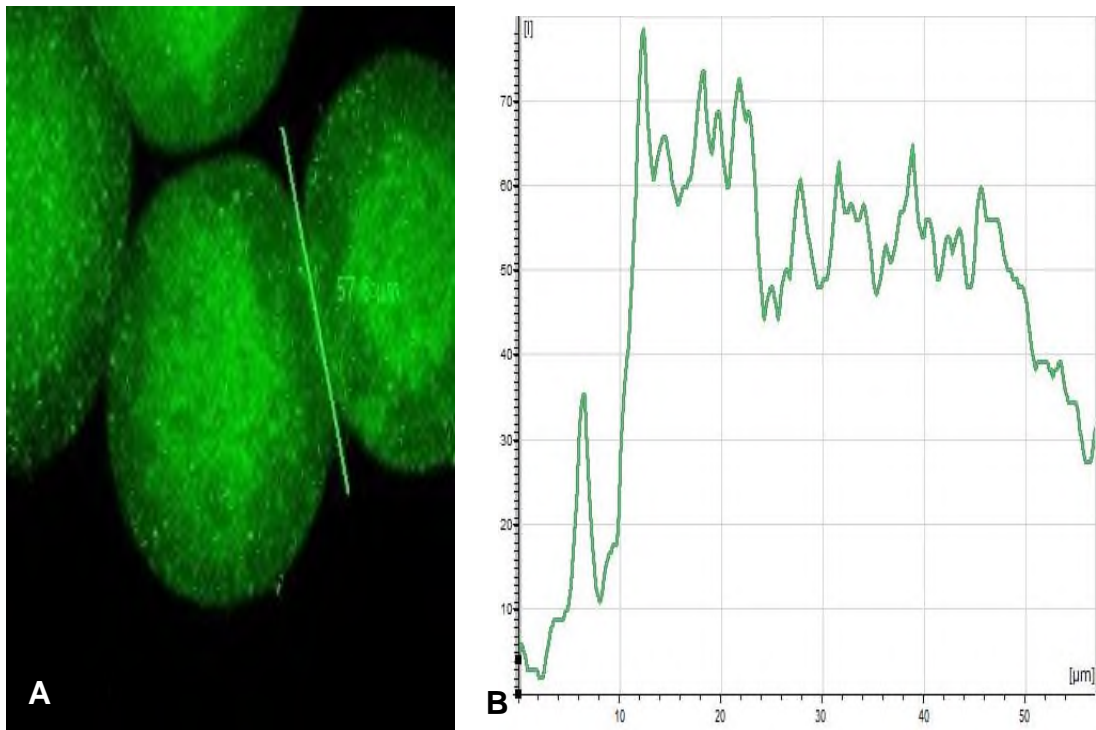


Figura 11. Embrión no compactado de 4 células de hámster. A) Localización de la cadherina-E en embriones no compactados de 4 células, B) intensidad de fluorescencia.

Por otra parte, en EC, cambia la localización de la cadherina-E del citoplasma a las zona de adhesión (**Figura 12A**), la máxima intensidad de fluorescencia en las zonas de adhesión es de 200 unidades (**Figura 12B**) (grafica obtenida a través del escáner del microscopio confocal).

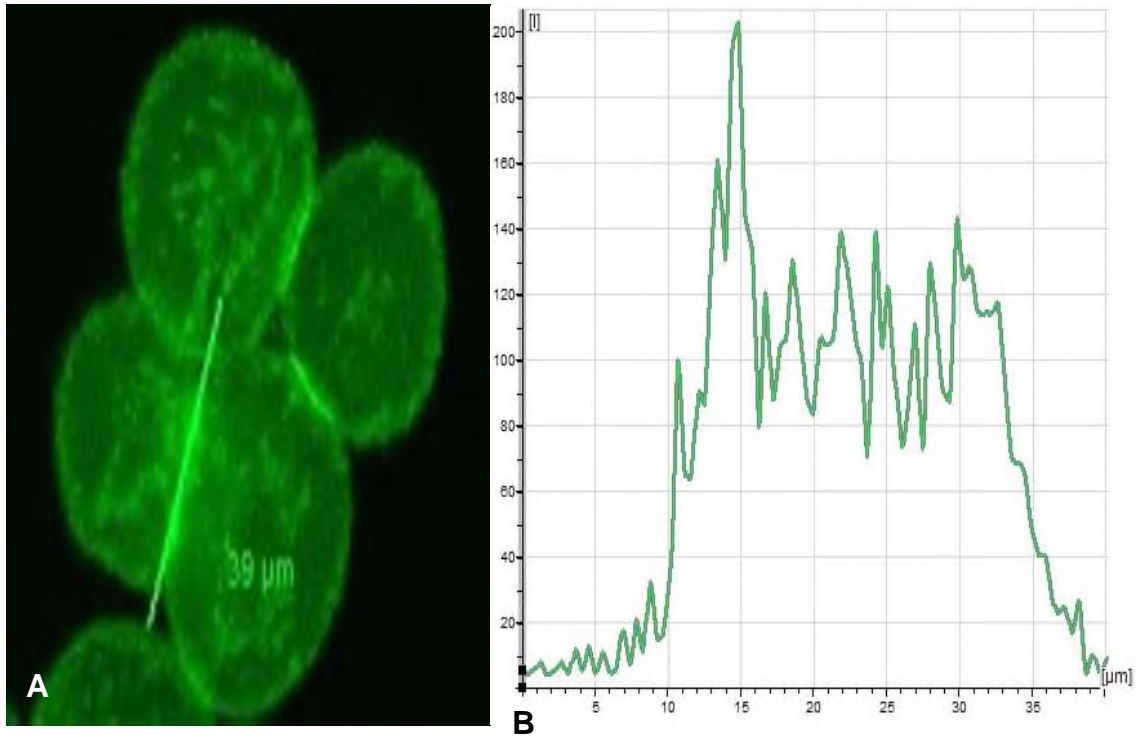


Figura 12. Embrión compactado de 4 células de hámster. A) Localización de la cadherina-E en embriones compactados de 4 células, B) intensidad de fluorescencia de la cadherina-E

8.3 Cambio en la localización de la cadherina-E en embriones de 4 células y su efecto en la función termoprotectora del IGF-1 durante un estrés calórico *in vitro*.

8.3.1 Tasa de desarrollo de embriones de 4 células (compactados y no compactados) sometidos a estrés calórico

Los embriones compactados mostraron diferencias significativas ($p < 0.05$) en la tasa de desarrollo (**Figura 13**). El 63 % de los embriones alcanzaron la etapa de 6 células, mientras que los embriones no compactados solo el 38.5 % alcanzaron la etapa de 6 células. Sin embargo, en la etapa de 8 células no se

encontraron diferencias significativas entre embriones compactados y no compactados (21 vs 19.5 %, respectivamente).

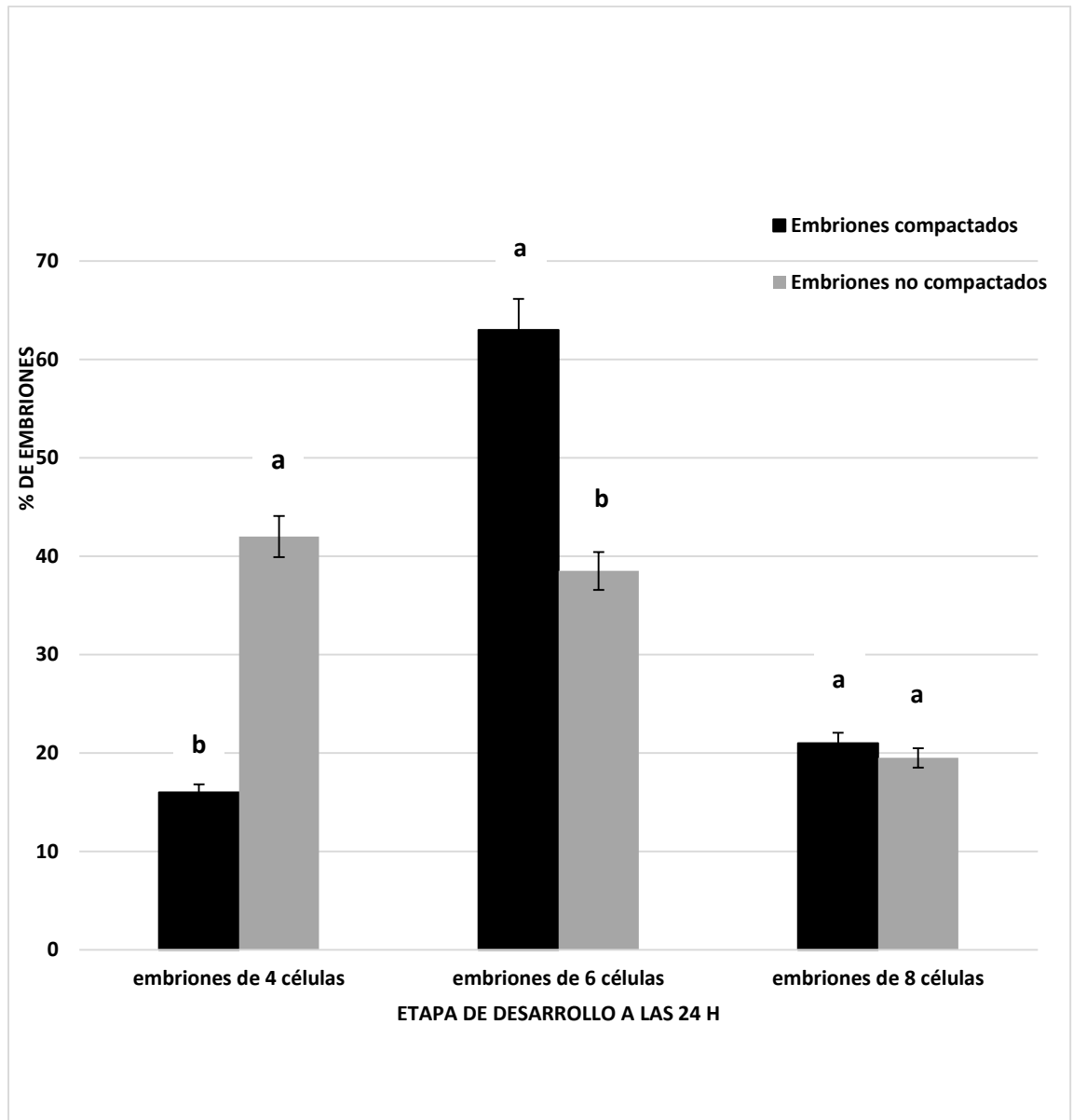


Figura 13: Evaluación de la tasa de desarrollo en embriones sometidos a estrés calórico (41 °C/9 h y 38.5 °C/15 h). Literal diferente en una columna indica diferencia estadística significativa (p< 0.05).

8.3.2 Tasa de apoptosis de embriones de 4 células (compactados y no compactados) sometidos a estrés calórico

La intensidad de anexina V o tasa de apoptosis se muestra en la **Figura 14**. Los embriones de 4 células compactados mostraron una disminución significativa ($p < 0.05$) de la intensidad en las etapas de 4, 6 y 8 células (22.8, 25.5 y 18.0%) en comparación con los embriones no compactados (36.5, 33.0 y 30.5%).

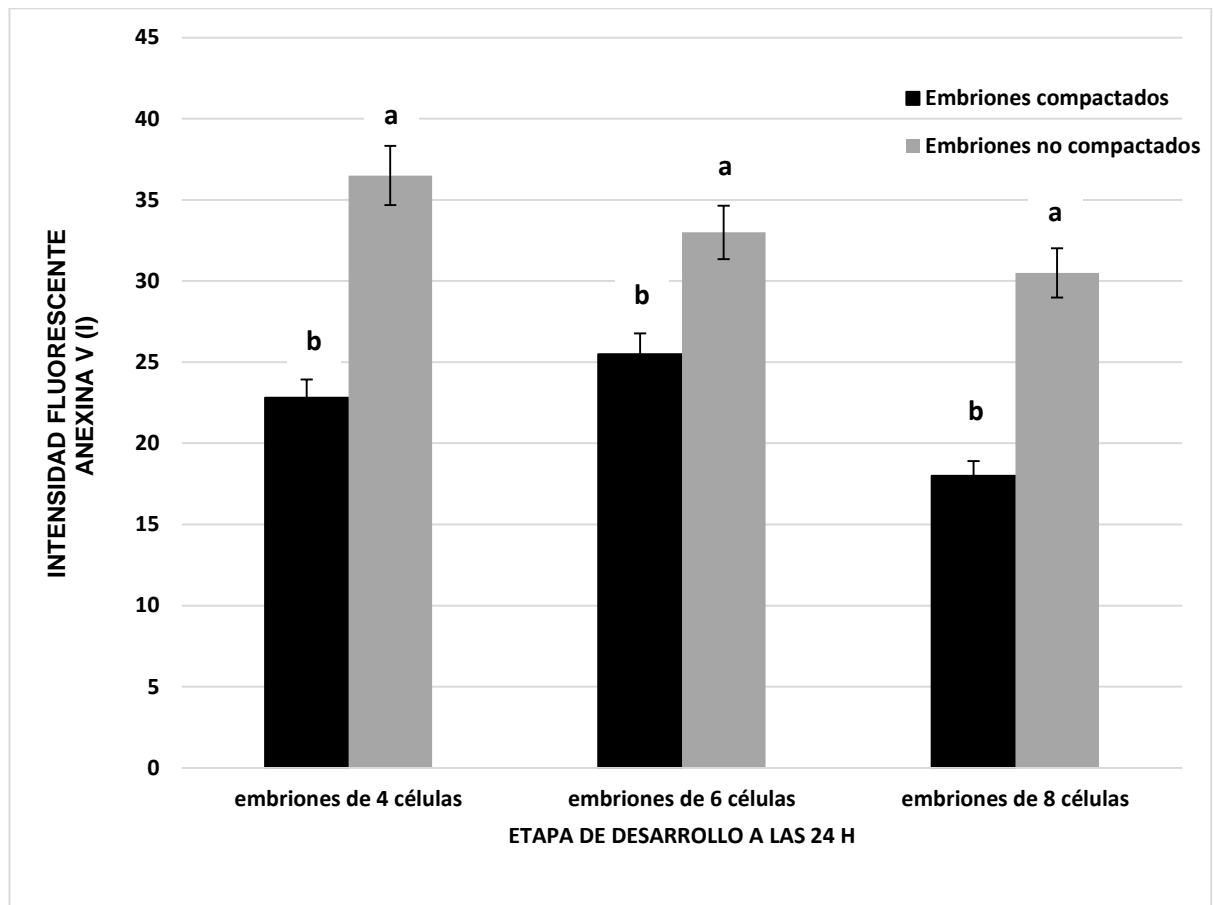


Figura 14: Evaluación de la tasa apoptosis en embriones sometidos a estrés calórico (41 °C/9 h y 38.5 °C/15 h). Literal diferente en una columna indica diferencia estadística significativa ($p < 0.05$).

9 DISCUSIÓN

9.1 Obtención de embriones de 4 células

El desarrollo embrionario preimplantacional, comprende desde el momento de la fertilización, hasta que se lleva a cabo la implantación del blastocisto (Schultz, 2002). En el hámster, la implantación del blastocisto, se lleva a cabo a las 80 h postcoito (Sato y Yanagimachi, 1972). En este trabajo, los embriones de 4 células se obtuvieron a las 65 h postcoito, lo cual coincide con lo reportado por Sato y Yanagimachi. (1972) para esta misma especie, estos autores obtuvieron embriones de 4 células a las 65 h postcoito.

9.2 Compactación prematura en embriones de 4 células

En roedores, la compactación celular, se lleva a cabo durante la transición de la etapa de 8 células a mórulas. Este proceso, marca el comienzo de la formación de dos tipos de células, el trofoectodermo y la masa celular interna (Fleming *et al.*, 2001).

Durante la compactación, la cadherina-E cambia su localización hacia los sitios de adhesión entre blastómeros (Westweber *et al.*, 1987). Se ha demostrado que 6-DMAP (inhibidor de la cinasa serina-treonina), es capaz de inducir una redistribución de la cadherina-E y compactación prematura, en embriones de 4 células de rata (Aghion *et al.*, 1994).

En este trabajo, la incubación de embriones de 4 células, en presencia de 6-DMAP, induce una redistribución de cadherina-E y un incremento en los sitios de adhesión, dependientes de esta CAM, lo cual ha sido confirmado, mediante un

análisis de estos embriones, con microscopio confocal (**Figuras 11 y 12**).

El mecanismo, por el que el 6-DMAP, causa una redistribución de la cadherina-E, no ha sido reportado, se sabe, que es un inhibidor de la cinasa serina-treonina y ha sido utilizado para impedir el rompimiento de la vesícula germinal, durante la maduración de ovocitos (Rime *et al.*, 1989), en la sincronización del ciclo celular (Samaké y Smith, 1996) y en la activación de ovocitos (Alexander *et al.*, 2006). Otros de los efectores del 6-DMAP, son los microtubúlos del citoesqueleto. Szöllösi *et al.* (1993) establecieron, que existen proteínas cinasas sensitivas a 6-DMAP, que alteran la dinámica de los microtubulos.

Los microtúbulos actúan como guías, para direccionar el movimiento de proteínas, hacia la periferia celular y para la elaboración de uniones celulares (Gauthier-Rouviere *et al.*, 2000). Stevens *et al.* (2007) reportaron que el bloqueo de la dinámica de los microtúbulos, altera la habilidad de las células, para concentrar y acumular cadherina-E, en los sitios de contacto celular. Por lo tanto, el mecanismo involucrado en la inducción de la compactación, a través del 6-DMAP, podría estar relacionado con la dinámica de los microtubúlos.

9.3 Análisis de la redistribución de cadherina-E

Recientemente, se ha estudiado la distribución de la cadherina-E, en embriones tempranos (Trejo *et al.*, 2008), en el presente trabajo, en EC de 4 células la máxima intensidad de fluorescencia fue de 200 unidades (**Figura 12B**), mientras que en ENC la máxima intensidad de fluorescencia fue de 70 unidades

(Figura 11B). Estas concentraciones de cadherina-E coinciden con lo reportado por Trejo *et al.* (2008), que encontraron una intensidad de 70-250 unidades de esta CAM, en embriones de 4 células en los sitios de contacto.

Una propuesta de una posible actividad de la cadherina-E en embriones de 4 células en la formación de comunicaciones celulares ha sido relacionada con la alta concentración de cadherina-E encontrada en esos embriones (Trejo *et al.*, 2008). Modina *et al.* (2010), afirman que la mayor cantidad de esta CAM se encuentra principalmente en los estadios de 0-4 y de >16 células y Neganova *et al.* (2000) describen una amplia distribución de esta CAM en embriones humanos desde el estadio de 2 células. Sin embargo, en un trabajo realizado por Ohsugi *et al.* (1996), descartan que la cadherina-E, participe en estadios tempranos de manera similar a lo que ocurre durante la compactación embrionaria normal, debido a que esta CAM durante estadios tempranos, permanece de manera inactiva o prefuncional y la razón de su acumulación en cantidades adecuadas, es indispensable para que el proceso de compactación, pueda realizarse sin trastornos en el momento preciso del desarrollo embrionario.

En el presente trabajo el embrión temprano demostró susceptibilidad a los estímulos externos, con la respuesta positiva del 100 % de EC al tratamiento de inducción de la compactación con 6-DMAP (Aghion *et al.*, 1994), que fueron similares a la sensibilidad de los ovocitos observados por Xu *et al.* (2007), expuestos a pulsaciones eléctricas con 6-DMAP, que indujeron la activación de los mismos. La razón de una posible activación de la cadherina-E en EC del presente trabajo, pudo desencadenarse a partir del proceso del achatamiento de

los blastómeros, por inducción de la compactación con 6-DMAP, ya que en el presente trabajo, fue observado que cuando los blastómeros permanecieron en contacto, favorecían gradualmente el incremento de esos sitios de unión, especialmente en EC.

9.4 Efecto termoprotector del IGF-1

9.4.1 Tasa de desarrollo en embriones de 4 células no compactados

El estrés calórico tiene un efecto negativo sobre la tasa de desarrollo embrionario preimplantacional *in vitro* (Silva *et al.*, 2013). En el presente trabajo, en los embriones de 4 células no compactados y sometidos a un estrés calórico (41 °C/ 9 h), la tasa de desarrollo en la etapa de 8 células fue de 19.5 %.

Esta disminución en la tasa de desarrollo coincide con lo reportado para otras especies, Tseng *et al.* (2004), reportaron un 36 % de desarrollo *in vitro* hasta blastocisto cuando los embriones de porcino de 4 células son sometidos a una temperatura de 41 °C durante 4 h. Un estrés oxidativo o exceso en la producción de EROs generados por un aumento de temperatura ha sido relacionado con la disminución en la tasa de desarrollo embrionario *in vitro* (Sakatani *et al.*, 2004).

Bedaiwy *et al.* (2004) establecieron una relación negativa entre la tasa de desarrollo y los niveles de ERO, es decir a niveles elevados de EROs la tasa de desarrollo disminuye. A pesar de no haberse determinado los niveles de EROs es posible que de acuerdo a lo establecido por Bedaiwy *et al.* (2004), la disminución en la tasa de desarrollo obtenida en embriones no compactados (19.5%), esté relacionada con la generación de EROs en el medio de cultivo. Por

otra parte, la tasa de desarrollo en embriones de 4 células compactados hasta la etapa de 8 células fue de 21 %, ligeramente superior aunque no estadísticamente diferente en comparación con los embriones no compactados (19.5 %).

Por otra parte, el 42 % de los embriones de 4 células no compactados que fueron sometidos a un estrés calórico (41 °C/ 9 h) permanecieron en esta etapa, lo que sugiere un bloqueo o arresto en esta etapa de desarrollo debido al aumento de la temperatura. Un bloqueo en el desarrollo embrionario debido al estrés calórico ha sido reportado en bovinos, Rivera *et al.* (2004), reportaron que el 25 % de los embriones de 2 células incubados a una temperatura de 41 °C y evaluados a los 3 días alcanzaron la etapa de 8 células. Las diferencias del porcentaje de embriones arrestados entre lo reportado por Rivera *et al.* (2004) y los resultados de este trabajo podrían deberse a la etapa de segmentación en la que se aplicó el estrés calórico (4 vs 2 células).

Una respuesta al estrés calórico dependiente de la etapa de segmentación ha sido establecida por Aréchiga y Hansen. (1998), de acuerdo a estos autores los embriones de 1-2 células son más sensibles debido a que el genoma embrionario se encuentra inactivo, mientras que embriones de 4-8 células son más resistentes al estrés calórico. La alta sensibilidad de los embriones de 2 células al estrés calórico podría deberse a la capacidad limitada para sintetizar enzimas relacionadas con el estrés oxidativo, como por ejemplo glutatión reducido (Gardiner y Reed, 1994).

9.4.2 Efecto del IGF-1 en embriones no compactados

Factores de crecimiento de origen materno o embrionario regulan el desarrollo preimplantacional *in vivo* (Kane *et al.*, 1997). Green y Day. (2013) reportaron que el IGF-1 actúa como un factor paracrino que mejora el desarrollo embrionario preimplantacional *in vitro*.

Después de 24 h de cultivo en presencia de IGF-1, el 38.5 % de los embriones de 4 células no compactados se desarrollaron hasta la etapa de 6 células y 19.5 % hasta la etapa de 8 células. Estos resultados coinciden con lo reportado por Harvey y Kaye. (1992), los cuales concluyen que el IGF-1 no tiene un efecto benéfico en las primeras etapas del desarrollo (1-8 células), mientras que en las etapas de morulas y blastocistos si hay un efecto. Al respecto, Smotrich *et al.* (1996), proponen que el inicio de la expresión del receptor a IGF-1 se lleva a cabo entre la etapa de 8 y 14 células, y que la estimulación del desarrollo embrionario es a través de este receptor. Además de esta carencia de efecto del IGF-1 en etapas tempranas se debe considerar el efecto del estrés calórico en la tasa de desarrollo.

9.4.3 El IGF-1 en el incremento de la tasa de desarrollo de EC

Los resultados obtenidos en este trabajo, muestran que el IGF-1, aumentó la tasa de desarrollo en EC de 4 células, del total de embriones que fueron sometidos a estrés de 41 °C/9 h, el 63 % alcanzaron la etapa de 6 células y el 21 % la etapa de 8 células. Lo anterior es superior a la actividad reportada por Edwards y Hansen. (1997) para el IGF-1 en embriones de 2 células (10 %), sin embargo, esta variación en los resultados podría deberse a la duración del estrés

calórico (12 h, comparada con las 9 h empleadas en el presente estudio), ya que se ha establecido una relación entre el efecto del estrés calórico y la duración del estrés. Rivera y Hansen. (2001), reportaron una disminución del 99.5 % en la tasa de desarrollo cuando los embriones fueron sometidos a estrés calórico de 41 °C durante 12 h.

La razón por la que el IGF-1 mejoró la tasa de desarrollo en EC, coincide con lo reportado por Jousan y Hansen. (2004), quienes, aseguran que los factores específicos, por la que el IGF-1 protege a los embriones, se debe en gran parte a que este factor regula la captación de glucosa en embriones preimplantatorios como establecen Pantaleon y Kaye. (1996) y tal efecto podría generar sobrevivencia en los embriones al estrés calórico, además reduce los efectos del H₂O₂ en embriones tempranos (Kurzawa *et al.*, 2002) y bloquea la acción de los radicales libres. Estas declaraciones están de acuerdo a otros estudios que establecen que la participación del IGF-1, en el desarrollo embrionario preimplantacional, actúa como un factor autocrino que mejora la tasa de desarrollo (Green y Day, 2013), además, Harvey y Kaye. (1992), establecieron que la suplementación del medio de cultivo con IGF-1, incrementa la proporción de blastocistos y disminuye el número de embriones, que permanecen en la etapa de mórula.

El presente estudio, indica un efecto termoprotector del IGF-1 en el desarrollo de EC de 4 células, en condiciones de estrés calórico *in vitro* (Jousan y Hansen, 2004), por acción de la redistribución de Cadherina-E, **Figura 12**, además, que estos embriones pudieron ser favorecidos por mecanismos metabólicos

(Pantaleon y Kaye, 1996) y antioxidantes (Kurzawa *et al.*, 2002), que explican, el alto porcentaje de EC que alcanzaron el estadio de 6 células.

9.4.4 El papel de la redistribución de cadherina-E en el éxito del desarrollo de EC

Existe una diferencia significativa ($p < 0.05$) entre la tasa de desarrollo de ENC (38.5 %) y EC (63 %), estas diferencias probablemente se deben a una posible actividad termoprotectora del IGF-1 en EC, por acción de la redistribución de cadherina-E. Los resultados de EC coinciden con la tasa de desarrollo reportada por Jousan y Hansen. (2004), estos autores al cultivar embriones de ≥ 16 células de bovino en IGF-1 a estrés calórico de 41 °C/9 h y 38.5 °C/15 h, obtuvieron una tasa de desarrollo hasta blastocisto del 58 %.

Sin embargo, en estadios avanzados de desarrollo se tiene comprobada la distribución de cadherina-E (Mayor e Izquierdo, 1994), lo cual soporta que los resultados en la tasa de desarrollo del presente trabajo, se deben a una relocalización de la cadherina-E, del citoplasma hacia los sitios de contacto de EC de 4 células, tal como se muestra en la **Figura 12A** y que este fue un factor clave en el aumento de la tasa de desarrollo celular (Liu *et al.*, 2006), además, de acuerdo con Reddy *et al.* (2005), un mayor número de IGF-1R, pudieron ser activados a partir de una mayor área de contacto entre blastómeros de EC, el cual, según Kim *et al.* (2006), mejora el desarrollo de embriones producidos *in vitro*, disminuyendo la tasa de apoptosis y regula la expresión de genes relacionados con este proceso y otros RTK.

No obstante, se establece la necesidad, de evidenciar mediante experimentos subsecuentes, la existencia de procesos de señalización celular por la vía PI3K/AKT, que vinculan la actividad de cadherina-E, con el IGF-1 en EC de 4 células, necesarios para un eficiente desarrollo embrionario temprano.

9.4.5 Apoptosis

La actividad anti-apoptotica del IGF-1 ha sido ampliamente establecida en blastocistos, pero en etapas tempranas no existe evidencia de esta actividad. En este trabajo, se ha establecido una relación entre la distribución de la cadherina-E y la actividad del IGF-1 en embriones de 4 células.

En el presente estudio, al cultivar EC y ENC de 4 células en IGF-1, a estrés calórico de 41 °C/9 h y 38.5 °C/15 h, se observó que los resultados, de la tasa de apoptosis en EC, fue menor ($p < 0.05$) durante las 24 h de tratamiento con estrés calórico en todas las etapas de desarrollo (22.8, 25.5 y 18 %) respecto a los ENC (36.5, 33 y 30.5 %). Esta tasa de apoptosis coincide con lo reportado por Paula-Lopes y Hansen. (2002), que obtuvieron 28 % de apoptosis, en embriones de ≥ 16 células de bovino cultivados a 41 °C/9 h.

Diversos daños celulares han sido observados durante el cultivo de embriones bajo condiciones de estrés calórico (Makarevich y Markkula, 2002). Rivera *et al.* (2004), aseguran que existe una relación de las primeras 12 h de cultivo *in vitro* en condiciones de estrés calórico, con una mayor alteración de filamentos de actina, microtúbulos, citoesqueleto y contenido nuclear. En el presente trabajo, aunque no se determinó la alteración de las estructuras celulares antes mencionadas, es posible que de acuerdo a lo establecido por

Rivera *et al.* (2004) el aumento de la tasa promedio de apoptosis obtenida en EC (22.1 %) y ENC (33.3 %) está relacionada con la alteración de estructuras de soporte y conformación celular. Además, en el caso de los EC, es probable que el IGF-1, disminuyó la tasa de apoptosis, de acuerdo a lo establecido por Jousan y Hansen. (2004), quienes, aseguran que los efectos anti-apoptóticos del IGF-1, son mediados a través de la vía de señalización que involucra al IGF-1R. Este RTK, es activo por la vía PI3k/AKT, la cual tiene un efecto inhibitor en proteínas pro-apoptóticas, como Bad y Caspasa 9, estimula proteínas anti-apoptóticas, como Bel-2 y actúa produciendo una buena cantidad de factores de transcripción y proteínas reguladoras.

Por otra parte, la razón más acertada, por la que los ENC, experimentaron una mayor tasa de apoptosis, durante la exposición al estrés calórico, se debe a una producción excesiva de ERO (Bedaiwy *et al.*, 2004).

Por lo tanto, probablemente, la tasa de EC es mejor que la de ENC, a partir de la redistribución de cadherina-E, por medio de la compactación inducida con 6-DMAP, así como la posterior relación entre la localización de esta CAM y una mayor actividad termoprotectora del IGF-1, iniciadas a través de señales intercelulares, entre el IGF-1, cadherina-E y el embrión temprano, probada bajo efecto del estrés calórico en condiciones *in vitro*.

10 CONCLUSIONES

A partir de los resultados obtenidos en este trabajo se puede concluir lo siguiente:

- Se confirma que el IGF-1 actúa como termoprotector para los embriones tempranos.
- Que existe una relación entre la distribución de la cadherina-E y la actividad termoprotectora del IGF-1 en embriones tempranos. Es decir, que la cadherina-E podría estar regulando la actividad termoprotectora del IGF-1.

11 RECOMENDACIONES

Para tratar de establecer la relación entre cadherina-E e IGF-1, se recomienda lo siguiente:

1. Realizar un estudio, donde se obtengan embriones de 8 células compactados y se bloquee la actividad de la cadherina-E antes de ser sometidos a estrés calórico.
2. Realizar un estudio donde se evalúe la activación de vías de señalización como la PI3K/AKT en embriones de 4 células compactados y 8 células.

12 BIBLIOGRAFÍA

- Aghion, J. Gueth-Hallonet, C. Claude, A. Geros, D y Maro, B. (1994). Cell adhesion and gap junction formation in the early mouse embryo are induced prematurely by 6-DMAP in the absence of E-cadherin phosphorylation. **Journal of Cell Science**. 107: 1369-1379.
- Alberts, B. Johnson, A. Lewis, J. Raff, M. Roberts, K y Peters, W. (2002). *Molecular Biology of the cell*, 4th edition. Garland Science. New York, USA.
- Alexander, B. Coppola, G. Di Berardino, D. Rho, G.J. St John, E. Betts, D.H y King, W.A. (2006). The effect of 6-dimethylaminopurine (6-DMAP) and cycloheximide (CHX) on the development and chromosomal complement of sheep parthenogenetic and nuclear transfer embryos. **Molecular Reproduction Development**. 73:20–30.
- Al-Katanani, Y.M. Paula–Lopes F.F y Hansen, P.J. (2002). Effect of season and exposure to heat stress on oocyte quality of Holstein cows. **Journal Dairy Science**. 58:171–82.
- Aplin, A.E. Howe, A. Alahari, S.K y Juliano, R.L. (1998). Signal transduction and signal modulation by cell adhesion receptors: the role of integrins, cadherins, immunoglobulin-cell adhesion molecules, and selectins. **Pharmacology Review**. 50: 197-263.
- Aréchiga, C.F. y Hansen, P.J. (1998). Response of preimplantation murine embryos to heat shock as modified by developmental stage and glutathione. **In Vitro Cellular and Developmental Biology Animal**. 34: 655–659.
- Bedaiwy, M.A. Falcone, T. Mohamed, M.S. Aleem, A.A. Sharma, R.K. Worley, S.E. Thornton, J y Agarwal, A. (2004). Differential growth of human embryos in vitro: role of reactive oxygen species. **Fertility Sterile**. 82: 593-600.
- Bedzhov, I. Liszewska, E. Kanzler, B y Stemmler, M. (2012). Igf1-r Signaling Is Indispensable for Preimplantation Development and Is Activated via a Novel Function of E-cadherin. **Journal Plos Genetics**. 8: 3.
- Bellier, S. Chastant, S. Adenot, P. Vincent, M. Renard, J.P y Bensaude, O. (1997). Nuclear translocation and carboxyl-terminal domain phosphorylation of RNA polymerase II delineate the two phases of zygotic gene activation in mammalian embryos. **European Molecular of Biology Organization Journal**. 16: 6250–6262.

- Block, J. (2007). Effect of insulin-like growth factor-1 on development and post-transfer survival of bovine embryos produced in vitro. A dissertation presented to the graduate school of the University of Florida in partial fulfillment of the requirements for the degree of doctor of philosophy. University of Florida.
- Bloor, D.J. Metcalfe, A.D. Rutherford, A. Brison, D.R y Kimber, S.J. (2002). Expression of cell adhesion molecules during human pre-implantation embryo development. **Molecular Human Reproduction**. 8: 237–245.
- Bonilla, A.Q. Oliveira, L.J. Ozawa, M. Newsom, E.M. Lucy, M.C y Hansen, P.J. (2011). Developmental changes in thermoprotective actions of insulin-like growth factor-1 on the preimplantation bovine embryo. **Molecular Cell Endocrinology**. 30: 170-179.
- Davies, S.P. Reddy, H. Caivano, M y Cohen, P. (2007). Specificity and mechanism of action of some commonly used protein kinase inhibitors. **Biochemistry Journal**. 351: 95–105.
- Demchenko, P.D. (2013). Beyond annexin V: fluorescence response of cellular membranes to apoptosis. **Cytotechnology**. 65(2): 157–172.
- Duan, C. (2002). Specifying the cellular responses to IGF signals: roles of IGF-binding proteins. **Journal Endocrinology**. 175(1): 41-54.
- Dupont, J. Holzenberger, M y Ducos, B. (2003). IGF-1 receptors regulates lifespan and resistance to oxidative stress in mice. **Nature**. 421:182-187.
- Calderón, E y Locke, R.F. (1992). A possible for adhesion molecules in asthma. **Journal Allergy Clinic Immunology**. 90: 852-865.
- Cai-Ping, Tan. Yi-Ying, Lu. Liang-Nian, Ji y Zong-Wan, Mao. (2014). Metallomics insights into the programmed cell death induced by metal-based anticancer compounds. **Metallomics**. 6(5): 978.
- Chihuailaf, R.H. Contreras, P.A y Wittwer, F.G. (2002). Patogénesis del estrés oxidativo: Consecuencias y evaluación en salud animal. **Veterinaria México**. 33(3) 265-283.
- Cornelissen, M. Philippé, J. De Sitter, S y De Ridder, L. (2002). Annexin V. expression in apoptotic peripheral blood lymphocytes. An electron microscopic evaluation. **Apoptosis**. 7: 41-47.
- Cox, O. O'Shea, S. Tresse, E. Bustamante-Garrido, M. Kiran-Deevi, R y O'Connor. R. (2015). IGF-1 Receptor and Adhesion Signaling: An Important Axis in Determining Cancer Cell Phenotype and Therapy Resistance. **Frontiers in Endocrinology**. 6: 106.

- Edwards, J.L y Hansen, P.J. (1997). Differential responses of bovine oocytes and preimplantation embryos to heat shock. **Molecular Reproduction and Development**. 46: 138–145.
- Evans, J.P. (2002). The molecular basis of sperm-oocyte membrane interactions during mammalian fertilization. **Human Reproduction Update**. 8(4): 297-311.
- Ferguson, S.S. Downey, W.E. Colapietro, A.M. Barak, L.S. Ménard, L y Caron, M.G. (1996). Role of beta-arrestin in mediating agonist-promoted G protein-coupled receptor internalization. **Science**. 271(5247): 363-366.
- Flach, G. Johnson, M.H. Braude, P.R. Taylor, R.A y Bolton, V.N. (1982). The transition from maternal to embryonic control in the two-cell mouse embryo. **European Molecular of Biology Organization Journal**. 1: 681–686.
- Fleming, T.P. Sheth, B y Fesenko, I. (2001). Cell adhesion in the preimplantation mammalian embryo and its role in trophectoderm differentiation and blastocyst morphogenesis. **Frontiers in Bioscience**. 1000-1007.
- Fleming, T. P. (1992). Trophectoderm biogenesis in the preimplantation mouse embryo. *Epithelial Organization and Development*. Chapman and Hall, London, pp. 111-134.
- Fuchs, J. Thiele, J y Ochsendorf, F. (1997). Oxidants, antioxidants and oxidative injury. **Oxidative Stress In Male Infertility**. Pp. 21-40.
- Fuerza Aérea Mexicana. (2012). Datos de temperatura y precipitación anual de la ciudad de Loma Bonita Oaxaca.
- Galina, C. (2006). Reproducción de animales domésticos. 2^{da} Edición. Ed. Limusa. México. Pp. 150-154.
- Gardiner, C.S y Reed, D.J. (1994). Status of glutathione during oxidant-induced oxidative stress in the preimplantation mouse embryo. **Biology Reproduction**. 51: 1307-1314.
- Gauthier-Rouvière, C. Causeret, M. Comunale, F y Charrasse, S. (2000). Cadherin-Mediated Cell-Cell Adhesion and the Microtubule. **Landes Bioscience**. Pp. 2000-2013.
- Gilbert, S.F. (1994). *Development Biology*. 4^o ed. Sinauer Associates. Massachusetts. USA. Pp. 725-746.
- Gómez, E. Caamaño, J.N. Bermejo-Alvarez, P. Díez, D. Muñoz, M. Martín, D. Carrocera, S y Gutiérrez-Adán, A. (2009). Gene expression in early expanded parthenogenetic and *in vitro* fertilized bovine blastocysts. **Journal Reproduction Development**. 55: 607-614.

- Gong, J. Traganos, F y Darzynkiewicz, Z. (1994). A selective procedure for DNA extraction from apoptotic cells applicable for gel electrophoresis and flow cytometry. **Analytical Biochemistry**. 218:314–319.
- Gonzales, M. Haan, K. Baker, S.E. Fitchmun, M.I. Todorov, I. Weitzman, S. y Jones, J.C.R. (1999). A cell signal pathway involving laminin-5, $\alpha 3\beta 1$ integrin, and mitogen-activated protein kinase can regulate epithelial cell proliferation. **Molecular Biology Cell**. 10: 259–270.
- González, A.R. Sánchez, F. (1999). Cell adhesion molecules: selectins and integrins. **Critical Reviews Immunology**. 19(5-6): 389-429.
- Goodwin, M y Yap, A.S. (2004). Classical cadherin adhesion molecules: coordinating cell adhesion, signaling and the cytoskeleton. **Journal of Molecular Histology**. 35: 839–844.
- Green, D.R. Mahboubi, A. Nishioka, W. Oja, S. Echeverri, F. Shi, Y. Glynn, J. Yang, Y. Ashwell, J y Bissommette, R. (1994). Promotion and inhibition of activation-induced apoptosis in T-cell hibridomas by oncogenes and related signals. **Immunology Review**. 142: 321-342.
- Green, C.J y Day, M.L. (2013). Insulin-like growth factor 1 acts as an autocrine factor to improve early embryogenesis *in vitro*. **International Journal Development Biology**. 57: 837-844.
- Gumbiner, B.M. (1996). Cell adhesion: the molecular basis of tissue architecture and morphogenesis. **Cell**. 84, 345-357.
- Hale, K. Gonzalez, A.M. Lluch, A. Neve, R.M. Kuo, W.L. Davies, M. Carey, M. Hu, Z. Guan, Y. Sahin, A. Symmans, W.F. Puztai, L. Nolden, L.K. Horlings, H. Berns, K. Hung, M.C. Van de Vijver, M.J. Valero, V. Gray, J.W. Bernards, R. Mills, G.B y Hennessy, B.T. (2008). An integrative genomic and proteomic analysis of PI3K and AKT mutations in breast cancer. **Cancer Research**. 68(15): 6084-6091.
- Halbleib, J.M y Nelson, W.J. (2006). Cadherins in development: cell adhesion, sorting, and tissue morphogenesis. **Genes Development**. 20(23): 3199-3214.
- Hamers-Casterman, C. Atarhouch, T. Muyldermans, S. Robinson, G. Hamers, C. Bajyana Songa, E. Bendahman, H y Hamers, R. (1993). Naturally occurring antibodies devoid of light chains. **Nature**. 363: 446-448.
- Handwerger, S.A.B.A. (2003). Dynamic changes in gene expression during human trophoblast differentiation. **Recent Progress in Hormone Research**. 58: 263-281.

- Harrison, O.J. Corps, E.M y Kilshaw, P.J. (2005). Cadherin adhesion depends on a salt bridge at the N-terminus. **Journal Cell Science**. 118(18): 4123-4130.
- Harvey, M.B y Kaye, P.L. (1992). Insulin-like growth factor-1 stimulates growth of mouse preimplantation embryos *in vitro*. **Molecular Reproduction and Development**. 31: 195-199.
- Hemler, M.E. (1998). Integrin associated proteins. **Current Opinion Cell Biology**. 10: 578-585.
- Hennessy, B.T. Smith, D.L. Ram, P.T. Lu, Y y Mills, G.B. (2005). Exploiting the PI3K/AKT pathway for cancer drug discovery. **Nature Reviews Drug Discovery**. 4: 988–1004.
- Heredia, N.L. García, R. Luevanos, R.G y García-Alvarado J.S. (1997). Elevation of the heat resistance of vegetative cells and spores of *Clostridium perfringens* type A by sublethal heat shock. **Journal of Food Protection**. 60(8): 998-1000.
- Hiles, I.D. Otsu, M. Volinia, S. Fry, M.J. Gout, I. Dhand, R. Panayotou, G. Ruiz-Larrea, F. Thompson, A y Totty, N.F. (1992). Phosphatidylinositol 3-kinase: structure and expression of the 110 kd catalytic subunit. **Cell**. 70: 419–29.
- Horwitz, A. (1997). Integrins and Health. **Scientific American**. Pp: 46-53.
- Hynes, R.O. (1994). The impact of Molecular Biology on Models for cell Adhesion. **BioEssays**. 16(9): 663-669.
- Ivanov, D.B. Philippova, M.P y Tkachuk, V.A. (2001). Structure and Functions of Classical Cadherins. **Biochemistry**. 66(10): 1174-1286.
- Josso, N y Di Clemente, N. (1997). Serine/Threonine kinase receptors and ligands. **Current Opinion in Genetics and Development**. 7: 371-377.
- Jousan, F.D y Hansen, P.J. (2004). Insulin-like growth factor-I as a survival factor for the bovine preimplantation embryo exposed to heat shock. **Biology Reproduction**. 71(5): 1665-1670.
- Jutila, M.A. Rorr, L. Berg, E.L y Butcher, E.C. (1989). Function and regulation of the neutrophil MEL-14 antigen *in vivo*: Comparison with LFA-1 and MAC-1. **Journal Immunology**. 143(3): 318-324.
- Kane, M. Morgan, P y Coonan, C. (1997). Peptide growth factors and preimplantation development. **Human Reproduction Update**. 3: 137-157.

- Kawai, Y. Yamaguchi, T. Yoden, T. Hanada, M y 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. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**. 25: 179-183.
- Kerr, J.F. Wyllie, A.H y Currie, A.R. (1972). Apoptosis: A basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. **British Journal in Cancer**. 26: 239–57.
- Kim, J.J y Fazleabas, A.T. (1999). Growth Factors. In: Encyclopedia of Reproduction Vol. 2. Academic Press, San Diego. pp: 573-583
- Kowalczyk, A.P. Bornslaeger, E.A. Norvell, S.M. Palka, H.L y Green K.J. (1999). Desmosomes: intercellular adhesive junctions specialized for attachment of intermediate filaments. **International Review in cytology**. 185: 237-302.
- Kroemer, G. Galluzzi, L. Vandenabeele, P. Abrams, J. Alnemri, E.S. Baehrecke, E.H. Blagosklonny, M.V. El-Deiry, W.S. Golstein, P y Green, D.R. (2009). Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death. **Cell Death Differentiation**. 16: 3-11.
- Kurzawa, R. Glabowski, W. Baczkowski, T y Brelik, P. (2002). Evaluation of mouse preimplantation embryos exposed to oxidative stress cultured with insulin-like growth factor I and II, epidermal growth factor, insulin, transferrin and selenium. **Reproduction Biology**. 2: 143–162.
- Latham, K.E y Schultz, R.M. (2001). Embryonic genome activation. **Frontiers Bioscience**: 6: 748-759.
- Levy, B.D. Fokin, V.V. Clark, J.M. Wakelam, M.J. Petasis, N.A y Serhan, C.N. (1999). Polyisoprenyl phosphate (PIPP) signaling regulates phospholipase D activity: a 'stop' signaling switch for aspirin-triggered lipoxin A 4. **Federation American Society in Experimental Biology Journal**. 13: 903-911
- Li, C.B. Hu, L.L. Wang, Z.D. Zhong, S.Q y Lei, L. (2009). Regulation of compaction initiation in mouse embryo. **Yi Chuan**. 31(12): 1177-1184.
- Liu, W.F. Nelson, C.M. Pirone, D.M y Chen, Ch.S. (2006). E-Cadherin engagement stimulates proliferation via Rac1. **Journal Cell Biology**. 173: 431-441.
- Liu, Y. Nusrat, A. Schnell, F.J. Reaves, T.A. Walsh, S. Pochet, M y Parkos, C.A. (2000). Human junction adhesion molecule regulates tight junction resealing in epithelia. **Journal Cell Science**. 113(13): 2363-2374.

- López-Gatius, F. (2003). Is fertility declining in dairy cattle? A retrospective study in northeastern Spain. **Theriogenology**. 60(1): 89-99.
- Macías, C. (2004). Moléculas de adhesión. Laboratorio Clínico. Editorial Ciencias Médicas. Cap. 11. La Habana.
- Mackay, C.R y Imhof B.A. (1993). Cell adhesion in the immune system. **Immunology Today**. 14: 99-102.
- Makarevich, A.V y Markkula, M. (2002). Apoptosis and cell proliferation potential of bovine embryos stimulated with insulin-like growth factor 1 during *in vitro* maturation and culture. **Biology Reproduction**. 66: 386-392.
- Mandl, M. (2002). Serum-dependent effects of IGF-I and insulin on proliferation and invasion of human first trimester trophoblast cell models. **Histochemical Cell Biology**. 117(5): 391-9.
- Mayor, R e Izquierdo, L. (1994). Morulae at compaction and the pattern of protein synthesis in mouse embryos. **Differentiation**: 55(3): 175-184.
- McCloskey, T. Oyaizu, N. Coronese, M y Pahwa, S. (1994). Use of flow cytometric assay to quantitate apoptosis in human lymphocytes. **Clinic Immunology Immunopathology**. 71: 14-18.
- Minami, N. Suzuki, T y Tsukamoto, S. (2007). Zygotic gene activation and maternal factors in mammals. **Journal Reproduction Development**. 53(4): 707-715.
- Modina, A.D. Giovanni, G. Leoni, B. Valentina, L. Odde, A. Salvatore, Naitana, C. Pirani, S. Succuc, S. Fiammetta Berlinguer, C. y Maria Luciano, A. (2010). Involvement of E-cadherin in early *in vitro* development of adult and juvenile sheep embryos. **Reproduction, Fertility and Development**. 22: 468–477.
- Morali, O.G. Delmas, V. Moore, R. Jeanney, C. Thiery, J.P y Larue, L. (2001). IGF-II induces rapid beta catenin relocation to the nucleus during epithelium to mesenchyme transition. **Oncogene**. 20: 4942-4950.
- Naoko, O. Nakamura, A. Miyado, M. Sato, M. Kawano, N. Yoshida, K. Harada, Y. Takezawa, Y. Kanai, S. Ono, C. Takahashi, Y. Kimura, K. Shida, T. Miyado, K y Umezawa, A. (2012). CD81 and CD9 work independently as extracellular components upon fusion of sperm and oocyte. **Biology Open**. 10:1242.
- Néant, I. Charbonneau, M y Guerrier, P. (1988). A requirement for protein phosphorylation in regulating the meiotic and mitotic cell cycles. **Developmental Biology**. 128(1):129-35.

- Neganova, I. E. Sekirina, G. G y Eichenlaub-Ritter, U. (2000). Surface-expressed E-Cadherin, and mitochondrial and microtubule distribution in rescue of mouse embryos from 2-cell block by aggregation. **Molecular Human Reproduction**. 6: 454-464.
- Negoescu, A. Lorimier, P. Labat-Moleur, F. Azoti, L. Robert, C. Guillermet, C. Brambilla, C y Brambilla, E. (1997). TUNEL: Improvement and evaluation of the method for in situ apoptotic cell identification. **Biochimica**. 2: 12-17.
- Nelson, W.J. (2008). Regulation of cell-cell adhesion by the cadherin-catenin complex. **Biochemistry Society Transactions**. 36(2): 149–155.
- Niessen, C.M. (2007). Tight junctions/adherens junctions: basic structure and function. **Journal Investigation Dermatology**. 127(11): 2525-2532.
- Nollet, F. Kools, P. y Van Roy, F. (2000). Phylogenetic analysis of the cadherin superfamily allows identification of six major subfamilies besides several solitary members. **Journal Molecular Biology**. 299: 551–572.
- Nose, A. Tsuji, K y Takeichi, M. (1990). Localization of specificity determining sites in cadherin cell adhesion molecules. **Cell**. 61(1): 147-55.
- Olivares y Arellano (2008). Bases Moleculares de las Acciones de la Insulina. **Revista de Educación Bioquímica**, 27(2): 9-18.
- Orfao, A. Ciudad, J. Lopez-Berges, M.C. Lopez, A. Vidriales, B y Caballero, M.D. (1994). Acute lymphoblastic leukemia (ALL): detection of minimal residual disease (MRD) at flow cytometry. **Leukemia Lymphoma**. 13: 87–90.
- Ohsugi, M. Butz, S. y Kemler, R. (1996). β -Catenin is a major tyrosine-phosphorylated protein during mouse oocyte maturation and preimplantation development. **Development Dynamic**. 206: 391–402.
- Osaki, M. Oshimura, M y Ito, H. (2004). PI3K-AKT pathway: Its functions and alterations in human cancer. **Apoptosis**. 9: 667-676.
- Overduin, M. Harvey, T.S. Bagby, S. Tong, K.I. Yau, P. Takeichi, M y Ikura, M. (1995). Solution structure of the epithelial cadherin domain responsible for selective cell adhesion. **Science**. 267(5196): 386-9.
- Pantaleon, M y Kaye, P.L. (1996). IGF-I and insulin regulate glucose transport in mouse blastocysts via IGF-I receptor. **Molecular Reproduction Development**. 1996(44): 71–76.

- Paula-Lopes, F.F y Hansen, P.J. (2002). Apoptosis is an adaptive response in bovine preimplantation embryos that facilitates survival after heat shock. **Biochemistry Biophysics Research Common.** 295: 37–42.
- Pece, S y Gutkind, J.S. (2000). Signaling from E-cadherins to the MAPK pathway by the recruitment and activation of epidermal growth factor receptors upon cell-cell contact formation. **Molecular Endocrinology.** 19(10):2564-2578.
- Playford, M.P. Bicknell, D. Bodmer, W.F y Macaulay, V.M. (2000). Insulin-like growth factor1 regulates the location, stability, and transcriptional activity of beta-catenin. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.** 97(22): 12103-12108.
- Pratt, H.P. Ziomek, C.A. Reeve, W.J y Johnson, M.H. (1982). Compaction of the mouse embryos: an analysis of its components. **Journal Embryology.** 70: 113-132.
- Ram, P.T y Schultz, R.M. (1993). Reporter gene expression in G2 of the 1-cell mouse embryo. **Development Biology.** Apr. 156(2): 552-556.
- Reddy, P. Liu, L. Ren, C. Lindgren, P. Boman, K. Shen, Y. Lundin, E. Ottander, U. Rytinky, M. y 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. **Molecular Endocrinology.** 19: 2564-2578.
- Rhoads, M.L. Meyer, J.P. Kolath, S.J. Lamberson, W.R y Lucy, M.C. (2008). Growth hormone receptor, insulin-like growth factor (IGF)-1, and IGF-binding protein2 expression in the reproductive tissues of early postpartum dairy cows. **Journal Dairy Science.** 91: 1802-1813.
- Rime, H. Neant, I. Guerrier, P y Ozon, R. (1989). 6-Dimethylaminopurine (6-DMAP), a reversible inhibitor of the transition to metaphase during the first meiotic cell division of the mouse oocyte. **Development Biology.** 133: 169-179.
- Rivera, R.M. Dahlgren, G.M. Paula, L.A. Kennedy, R.T y Hansen, P.J. (2004). Actions of thermal stress in two-cell bovine embryos: oxygen metabolism, glutathione and ATP content, and the time-course of development. **Society for Reproduction and Fertility.** Pp: 1741–7899.
- Rivera, R.M y Hansen, P.J. (2001). Development of cultured bovine embryos after exposure to high temperatures in the physiological range. **Reproduction.** 121: 107-115.

- Roth, Z y Hansen, P.J. (2004). Involvement of apoptosis in disruption of developmental competence of bovine oocytes by heat shock during maturation. **Biology of Reproduction**. 71: 1898-1906.
- Rothe, M.J y Falanga, V. (1992). Growth Factors and Wound Healing. **Clinics in Dermatology**. 9: 553-559.
- Rufas, O. Fisch, B. Ziv, S y Shalgi, R. (2000). Expression of cadherin adhesion molecules on human gametes. **Molecular and Human Reproduction**. 6: 163–169.
- Sartori, R. Sartor-Bergfelt, R. Mertens, S.A. Guenther, J.N. Parrish, J.J y Wiltbank, M.C. (2002). Fertilization and early embryonic development in heifers and lactating cows in summer and lactating and dry cows in winter. **Journal Dairy Science**. 85: 2803-12.
- Sakatani, M. Kobayashi, S y Takahashi, M. (2004). Effects of heat shock on *in vitro* development and intracellular oxidative state of bovine preimplantation embryos. **Molecular Reproduction Development**. 67: 77–82.
- Samaké, S y Smith, L.C. (1996). Synchronization of cell division in eight-cell bovine embryos produced *in vitro*: effects of nocodazole. **Molecular Reproduction Development**. 44(4): 486-492.
- Sato, A y Yanagimachi, R. (1972). Transplantation of preimplantation hamster embryos. **Journal Reproduction Fertility**. 30: 329-332.
- Schultz, R.M. (2002). The molecular foundations of the maternal to zygotic transition in the preimplantation embryo. **Human Reproduction Update**. 8: 323–331
- Schultz, R.M. (1993). Regulation of zygotic gene expression in the mouse. **Bioessays**. 8: 531-538.
- Shapiro, L. Fannon, A.M. Kwong, P.D. Thompson, A. Lehmann, M.S. Grübel. G. Legrand, J.F. Als-Nielsen, J. Colman, D.R y Hendrickson, W.A. (1995). Structural basis of cell-cell adhesion by cadherins. **Nature**. 374(6520): 327-37.
- Shasby, D.M. (2007). Cell-cell adhesion in lung endothelium. **Cell Molecular Physiology**. 292(3): 593-607.
- Sigma-Aldrich: (Internet). (Citado el 20 Jun 2015). <http://www.sigmaaldrich.com/life-science/metabolomics/enzyme-Explorer/learning-center/structural-proteins/cadherin.html>. USA.

- Silva, C.F. Sartorelli, E.S. Castilho, A.C. Satrapa, R.A. Puelker, R.Z. Razza, E.M. Ticianelli, J.S. Eduardo, H.P. Loureiro, B y Barros, C.M. (2013). Effects of heat stress on development, quality and survival of *Bos indicus* and *Bos taurus* embryos produced in vitro. **Theriogenology**, 79: 351-357.
- Smotrich, D.B. Stillman, R.J. Widra, E.A. Gindoff, P.R. Kaplan, P. Graubert, M y Johnson, K.E. (1996). Immunocytochemical localization of growth factors and their receptors in human pre-embryos and Fallopian tubes. **Human Reproduction**. 11: 184-190
- Spanos, S. Becker, D.L. Winston, R.M y Hardy, K. (2000). Anti-apoptotic action of insulin-like growth factor-I during human preimplantation embryo development. **Biology of Reproduction**. 63: 1413–1420.
- Statistical Analysis Systems. SAS User's Guide, version 6, 4th ed. Cary, NC: Statistical Analysis System Institute, Inc.; 1989.
- Stevens, N.R. Raposo, A.A. Basto, R. St Johnston, D y Raff, J.W. (2007). From stem cell to embryo without centrioles. **Current Biology**. 17: 1498-1503.
- Storey, B.T. 1995. Interactions between gametes leading to fertilization: the sperm is age view. **Reproduction Fertility Development**. 7(4): 927-942.
- Suzuki, H. Azuma, T. Koyama, H y Yang, X. (1999). Development of cellular polarity of hamster embryos during compaction. **Biology Reproduction**. 61: 521-526.
- Szöllösi, M.S. Borsuk, E y Szöllösi, D. (1993). Relationship between sperm nucleus remodelling and cell cycle progression of fragments of mouse parthenogenotes. **Molecular Reproduction and Development**. 37(2): 146-156.
- Takeichi, M. (1991). Cadherin cell adhesion receptors as a morphogenetic regulator. **Science**. 251(5000): 1451-1455.
- Tedder, T.F. Steeber, D.A. Chen, A y Engel, P. (1995). The selectins-in vascular cell adhesion molecule. **Federation American Society Experimental Biology Journal**. 9: 866-873.
- Trejo, C.A. Ambriz, D.G. Navarro-Maldonado, M.C. Mercado, E.P y Rosado, A.G. (2008). Presence and distribution of E-Cadherin in the 4-cell golden hamster embryo. Effect of maternal age and parity. **Zygote**. 16(3): 271-277.

- Trejo, C.A. Navarro-Maldonado, M.C. Jimenez, F y Rosado A.G. (2006). Effect of maternal age and parity on the presence and distribution of cadherin-E in hámster embryos during preimplantation development and transport. **Reproduction, Fertility and Development**. Proceedings of the Annual Conference of the International Embryo Transfer Society, Orlando, FL, USA. Pp.181.
- Tseng, J.K. Chen, C.H. Chou, P.C. Yeh, S.P y Ju, J.C. (2004). Influences of follicular size on parthenogenetic activation and *in vitro* heat shock on the cytoskeleton in cattle oocytes. **Reproduction Domestic Animal**. 39: 146–153.
- Tsukita, S y Furuse, M. (1999). Occludin and claudin in tight-junction strands: leading or supporting players? **Trends in Cell Biology**. 9: 268-273.
- Turner, C.E y Burridge, K. (1991). Transmembrane molecular assemblies in the cell-extracellular matrix interactions. **Current Opinion in Cell Biology**. 3(5): 849-53.
- Vermes, I. Clemens, H. Steffens-Nakken, H y Reutelingsperger, C. (1995). A novel assay for apoptosis Flow cytometric detection of phosphatidylserine early apoptotic cells using fluorescein labelled expression on Annexin V. **Journal of Immunological Methods**. 184: 39-51.
- Westweber, A. Gossler, K. Boller, R. Kemler. (1987). Expression and distribution of cell adhesion molecule uvomorulin in mouse preimplantation embryos. **Development Biology**. 124: 451-456.
- Wassarman, P.M. Jovine, L. Qi, H. Williams, Z. Dariel, C y Litscher, E.S. (2005). Recent aspects of mammalian fertilization research. **Molecular Cell Endocrinology**. 234: 95-103.
- Wee, G. Ko, D.B. Song, B.S. Kim, J.S. Kang, M.J y Moon, S.J. (2006). Inheritable histone H4 acetylation of somatic Chromatins in cloned embryos. **Journal Biology Chemistry**. 281(9): 6048-6057.
- Wyllie, A.H. (1997). Apoptosis: an overview. **British Medical Bulletin**. 53: 451-465.
- Xu, X. M. Hua, J. L. Jia, W.W. Huang, W. Yang, C.R y Dou, Z.Y. (2007). Parthenogenetic activation of porcine oocytes and isolation of embryonic stem cells-like derived from parthenogenetic blastocysts. **Journal Animal Science**. 20: 1510-1516.
- Yakar, S y Adamo, M.L. (2012). Insulin-Like Growth Factor 1 Physiology. Lessons from Mouse Models. **Endocrinology and Metabolism Clinics of North America**. 41(17): 231-247.

- Yang, B y Kumar, S. (2010). Nedd4 and Nedd4-2: closely related ubiquitin-protein ligases with distinct physiological functions. **Cell Death Differentiation**. 17: 68-77.
- Yoshida, Y. Miyamura, M. Hamano, S y Yoshida, M. (1998). Expression of growth factor ligand and their receptor mRNAs in bovine ova during in vitro maturation and after fertilization in vitro. **Journal Veterinary Medical Science**. 60: 549-554.
- Ylikoski, J. Xing-Qun, L. Virkkala, J y Pirvola, U. (2002). Blockade of c-Jun N-terminal kinase pathway attenuates gentamicin-induced cochlear and vestibular hair cell death. **Hearing Research**. 163: 71–81.
- Zuba-Surma, E.K. Kucia, M y Ratajczak, M.Z. (2007). Imagestream Technology A Step Further than Flow Cytometry. **Advances in Molecular and Cell Biology**. 34: 361–375.

13 ANEXOS

13.1 Comunicación derivada 1



**World Congress of
Reproductive Biology**

2-4 September 2014
EICC, Edinburgh
Programme and Abstract Book

www.wcrb2014.org

Sponsor:




The 2014 World Congress in Reproductive Biology is hosted by the Society for Reproduction and Fertility (SRF) in full partnership with the following international societies in the field of reproductive biology:



Society for
Reproduction
and Fertility



K.S.A.R.
KINGDOM SOCIETY OF APPLIED REPRODUCTIVE SCIENCE



CSRW



SSR
Society for the Study
of Reproduction



SRD



Society for
Reproductive
Biology

P047	Inhibition of DNMT2A2 impairs human female germline development in xeno-grafted ovaries M. Poulain, S. Tourpin, V. Muczynski, S. Messiaen, D. Moison, C. Duquenne, A. Benachi, V. Rouiller-Fabre, R. Habert, N. Frydman and G. Livera
P048	Abnormal behavior of lysine acetylation during one-cell stage mouse cloned embryos S. Kishigami, A.R. Lee, T.H. Le, K. Morimoto and Y. Hosoi
P049	Nucleoli are formed in developing mouse embryos without nucleolus precursor bodies (NPBs) H. Kyogoku, J. Fulka Jr., T.S. Kitajima, T. Wakayama and T. Miyano
P050	Fingerprints on oocyte and embryo lipid profiles caused by <i>in vitro</i> embryo production system and fatty acid diet supplementation in bovine A.F. González Serrano, C.R. Ferreira, V. Pirro, A. Lucas-Hahn, J. Heinzmann, K.-G. Hädeler, P. Aldag, U. Baulain, M. Piechotta, S. Dänicke, R.G. Cooks and H. Niemann
P051	Degradation of estrogen receptor α in activated blastocysts is associated with implantation in the mouse H. Matsumoto, K. Saito, E. Furukawa, M. Kobayashi, E. Fukui and M. Yoshizawa
P052	Production of prion gene knockout cow to prevent spontaneous bovine spongiform encephalopathy (BSE) N. Manabe, I. Onoyama, J. Li, Y. Sendai and Y. Aoyagi
P053	The effect of lysophosphatidic acid during <i>in vitro</i> maturation of bovine cumulus-oocyte complexes: cumulus expansion, glucose uptake and expression of expansion-related genes D. Boruszevska, E. Sinderewicz, I. Kowalczyk-Zleba and J. Woclawek-Potocka
P054	Essential roles of condensins in chromosome organization during mouse early embryogenesis J. Lee, M. Shimizu, K. Nishide and T. Hirano
P055	Effect of downregulating CDX2 transcript by RNA interference on early development of bovine embryos N. Sakurai, K. Takahashi, T. Hashizume and K. Sawai
P056	Fine cryopreservation method of porcine blastocysts produced by <i>in vitro</i> fertilization S.-H. Min, J.-W. Kim, Y.-H. Lee, J.-H. Ahn, G.-Y. Do, S.-K. Chae, H. Park and D.-B. Koo
P057	<i>In vitro</i> embryo production in queens treated with deslorelin acetate (Suprelorin®) C.L. Ackermann, L. Ferrari Crocorno, E. Trevisol, T. Silva Rascado, R. Volpato, C. Lopes, C.R. de Freitas Guaitolini, T. de Almeida Costa and M.D. Lopes
P058	O-GlcNAcylation in pig embryos during preimplantation development M. Shibusaki, T. Miyano and M. Miyake
P059	Importance of amino acids in the development of preimplantation mouse embryo R. Zamfirescu, S. Shreedharan, M. Zada, M. Morris and M.L. Day
P060	Thermoprotective action of insulin-like growth factor-1 in embryos hamster 4-cells subjected to heat stress <i>in vitro</i>: effect of the redistribution of E-cadherin A.C. Trejo, I.B. Abad, V.M. Villalvazo Meza, M. del Carmen Maldonado Navarro and D. García Ambríz
P061	Effect of blastocyst artificial collapse prior to vitrification on pluripotency-specific genes expression in mouse embryos M. Dashtizad, M. Shamsara, M. Daliri, G. Zandi, P. Fathalizadeh, E. Hashemi and H. Hajarian
P062	The role of histone H3 variants in the alteration of chromatin structure after fertilization M. Kawamura and F. Aoki
P063	Roles of the untranslated regions in the translational regulation of cyclin A2 in murine oocytes and embryos Y. Mori and F. Aoki

P060 Thermoprotective action of insulin-like growth factor-1 in embryos hamster 4-cells subjected to heat stress *in vitro*: effect of the redistribution of E-cadherin


**Trejo Córdova Alfredo¹, Abad Benitez Ismael¹,
Meza Villalvazo Víctor Manuel¹,
Navarro Maldonado María del Carmen² and
Ambriz García Demetrio²**

¹Universidad del Papaloapan, Loma Bonita, Mexico

²Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, Distrito Federal, Mexico

Introduction. IGF- 1 has been used as a thermoprotective during *in vitro* culture , however , its function is dependent on the cleavage embryos. Furthermore, the localization of E-cadherin dependent cleavage embryos. It is unknown whether there is a relationship between the thermoprotective action of the IGF-1 and localization of E-cadherin . Materials and Methods. 10 female hamster young were used. Hamster embryo 4-cells were obtained . Groups of embryos 4-cells were incubated in the presence or absence of 6-DAMP (compacted and uncompacted). Both groups of embryos were incubated for 24 hrs under conditions of heat stress. The medium was supplemented with IGF-1, the end of the culture period the development stage and the rate of apoptosis was determined. Results and Discussion. The percentage of embryos that reached the 6-cell stage embryos was significantly higher than 4-cells compacted or non-compacted (63.57 vs. 38.81 respectively). The intensity of Annexin-V (apoptosis) embryos was significantly higher than non-compacted compacted (33 vs 25 respectively). The anti-apoptotic activity of the IGF-1 is via the PI3K/Akt pathway, evidence of a relationship between the activation of this pathway and the formation of cell junctions dependent E-cadherin . In conclusion, the heat protection of the IGF-1 activity is favored by a change in the localization of E-cadherin in embryos of four cells when subjected to heat stress *in vitro*.

13.2 Comunicación derivada 2







IETS
INTERNATIONAL EMBRYO TRANSFER SOCIETY

**41st ANNUAL
CONFERENCE**

Program Book

**Au Palais des
Congrès de Versailles**

Versailles, France
January 10-13, 2015



IETS 2015
International Embryo Transfer Society

93. THE INVOLVEMENT OF E-CADHERIN IN THERMOPROTECTIVE FUNCTION OF INSULIN-LIKE GROWTH FACTOR-1 IN 4-CELL HAMSTER EMBRYOS

A. C. Trejo ^A, I. B. Abad ^A, V. M. V. Meza ^A, A. M. Villa ^B, J. Z. Abad ^C, M. C. Navarro-Maldonado ^C and D. G. Ambriz ^A

^A Univeridad del Papaloapan, Loma Bonita, Oaxaca, México;

^B Benemerita Universidad Autónoma de Puebla, Tecamachalco, Puebla, México;

^C Universidad Autónoma Metropolitana, Iztapalapa, Distrito Federal, México

***Reproduction, Fertility and Development* 27(1) 139-139**

<http://dx.doi.org/10.1071/RDv27n1Ab93>

Published: 4 December 2014

Abstract

Studies have demonstrated that the early pre-implantation embryo is very sensitive to effects of heat stress in vitro. Heat stress reduces the total cell number in blastocysts and increases apoptosis in blastomeres. Insulin-like growth factor-1 (IGF-1) has been widely studied as a thermoprotective agent for its anti-apoptotic actions. Addition of IGF-1 to the culture medium decreases the effects of heat stress on blastocysts but has no effects on 2-cell embryos. Molecular mechanisms by which IGF-1 decreases apoptosis involve activation of the PI3K/AKT pathway. It is also known that adherens junctions contribute to PI3K/AKT activation mediated by the transmembrane glycoprotein E-cadherin, which is involved in Ca(2+)-dependent cell-cell adhesion. Within 2- to 8-cell embryos, E-cadherin is mainly inactive and has cytoplasmic localization. 6-Dimethylaminopurine (6-DMAP) induces premature cell flattening and E-cadherin redistribution to adhesion sites in 4-cell embryos. The aim of this study was to induce E-cadherin redistribution in 4-cell hamster embryos and evaluate the thermoprotective function of IGF-1 in these embryos. Four-cell embryos were incubated in the presence of 6-DMAP to induce E-cadherin redistribution to adhesion sites and cultured for 24h under conditions of heat stress and compared with controls without 6-DMAP. Culture medium was supplemented with IGF-1. At the end of culture, developmental stage and rate of apoptosis were determined and analysed by ANOVA using the General Linear Model (GLM) of SAS (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) procedure with statistical significance at $P < 0.05$. E-Cadherin redistribution induced by 6-DMAP increased development to the 6-cell stage after 24h (63.57% vs. 38.81%, respectively; $P < 0.05$) and reduced apoptosis (25% v. 33%, respectively; $P < 0.05$) under heat-stress conditions. In conclusion, we hypothesise a role for E-cadherin-mediated cell flattening in promoting IGF-1-mediated thermoprotection in pre-compact 4-cell hamster embryos. Further studies are required to confirm this link.