

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA.

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
Unidad Iztapalapa.



Casa abierta al tiempo

ASINCRONÍA DEL DESARROLLO EMBRIONARIO TEMPRANO
EN HEMBRAS NULÍPARAS (JÓVENES Y ADULTAS) Y
MULTÍPARAS DE HÁMSTER SIRIO DORADO
(Mesocricetus auratus).

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN BIOLOGÍA DE LA
REPRODUCCIÓN ANIMAL

PRESENTA

LPA. ALFREDO TREJO CÓRDOVA

DIRECTOR DE TESIS:
MenC. DEMETRIO A. AMBRIZ GARCÍA

ASESORA:
DRA. MARÍA DEL CARMEN NAVARRO MALDONADO

MÉXICO, D.F. ABRIL DEL 2002.

AGRADECIMIENTOS.

A **DIOS** por estar conmigo en cada momento y enseñarme que el principio de la sabiduría es el **AMOR** a él.

Al MenC. Demetrio A. Ambriz García y a la Dra. Maria del Carmen Navarro Maldonado por su apoyo y confianza para la realización de estos estudios.

A la MenC. Yvonne Ducolomb por sus comentarios y sugerencias para mejorar este trabajo.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Desarrollo (CONACyT) por el apoyo financiero recibido a través de la beca-credito (Nº 153054).

DEDICATORIAS.

A mis padres, por todo el apoyo y amor que me han brindado durante mis estudios.

A Marilu, por su amor y confianza.

A mis hermanos Francisca, Cayetano, Angeles, Martín, Julian y Héctor.
Especialmente a Ana y Gabriel por su apoyo.

A toda mi familia, cuñados y sobrinos Sandra, Abraham, Nayelí, Daniel, Mariana, Ivan, Diego, Dayan y Marcos.

A mis compañeros de la maestría: José, Angel, Maru, Gladys, Abel, Gaby, Edelmiro, Juanita y Memo.

A mis compañeros del laboratorio: Lupita, Edith, Miguel, Román y Mundo.

RESUMEN.

En las hembras que tienen la capacidad de gestar varias crías a la vez (politocas) se ha reportado que existe un desfase de los embriones en cuanto a la etapa de segmentación, proceso conocido como *asincronía*. Al mismo tiempo que se realiza el proceso de segmentación el embrión es transportado a través del oviducto hasta el útero, donde se lleva a cabo el proceso de implantación. El embrión carece de movilidad propia por lo que utiliza las contracciones musculares, el movimiento de los cilios y del líquido oviductal. Estos mecanismos son regulados por hormonas ováricas y por factores que son producidos por el mismo embrión. Por otra parte, conforme aumenta la edad de las hembras se observa una disminución de la capacidad reproductiva, la cual está precedida por una pérdida de la ciclicidad, una disminución en la tasa de fertilidad y prolificidad. Fallas en el desarrollo embrionario temprano (disminución en el número de blastocistos normales disponibles para la implantación) han sido relacionadas con la disminución en la tasa de fertilidad y tamaño de la camada.

El objetivo de este trabajo es establecer si existe un efecto de la edad y/o número de partos sobre el desarrollo embrionario temprano y el transporte de los embriones hacia el útero.

Se utilizaron un total de 84 hembras hámster que fueron divididas en tres grupos experimentales, el primer grupo de 30 nulíparas jóvenes (3 meses de edad), el segundo grupo de 24 nulíparas adultas (8 meses de edad) y el tercer grupo de 24 hembras múltiparas (tres partos y 8 meses de edad). Todos los animales fueron mantenidos en ambiente controlado con fotoperíodo de 14 horas luz y 10 de oscuridad, 26°C de temperatura promedio y alimento y agua a libre acceso. El apareamiento se realizó en la fase de proestro con machos de fertilidad probada. Las hembras de los tres grupos fueron sacrificadas por dislocación cervical entre las 60 y 69 hrs postcoito (PC). Se diseccionó su aparato reproductor y los oviductos fueron seccionados con el bicel de una aguja (calibre 27) y posteriormente lavados con PBS suplementado con BSA al 0.3%. Los úteros fueron perfundidos con 1 ml de medio. Los embriones de oviductos y úteros se evaluaron bajo el microscopio invertido a 250X.

En las hembras nulíparas jóvenes se pudo observar una menor *asincronía* en las etapas de la segmentación, se recuperaron principalmente embriones en etapa de 8 blastómeros y mórulas. En las hembras nulíparas adultas y múltiparas se observó una mayor *asincronía* en las etapas de segmentación, se recuperaron embriones de 4, 6, 8 blastómeros y mórulas. Se observó un retraso en el desarrollo embrionario en las hembras nulíparas adultas y múltiparas en comparación con las hembras jóvenes, mientras que en las hembras jóvenes las mórulas aparecen desde las 62 hrs PC, en los otros dos grupos las mórulas aparecen hasta las 66 hrs PC. En cuanto al transporte, el porcentaje de embriones recuperados de los oviductos de las hembras nulíparas jóvenes fue significativamente diferente ($p < 0.05$) con respecto al de las hembras nulíparas adultas y múltiparas (12, 37 y 30%, respectivamente).

Al parecer la *asincronía* es una característica normal del desarrollo embrionario temprano en las hembras politocas. El comportamiento similar de los grupos de hembras múltiparas y nulíparas adultas permiten suponer que es la edad y lo que ello conlleva (desde un punto de vista fisiológico), más que el número de partos, lo que ocasiona un retraso en el transporte de sus embriones hacia el útero en comparación con las hembras nulíparas jóvenes.

INDICE.

	Pag.
1.- INTRODUCCIÓN.	3
1.1.- Fertilización.	3
1.1.1.- Reconocimiento y adhesión.	3
1.1.2.- Unión espermatozoide-ovocito.	4
1.1.3.- Reacción acrosomal.	4
1.1.4.- Fusión de membranas.	4
1.1.5.- Activación del ovocito y reacción cortical.	5
1.1.6.- Eventos post-fertilización.	6
1.2.- Proceso de segmentación.	6
1.2.1.- Compactación.	7
1.3.- Asincronía del desarrollo embrionario temprano.	8
1.4.- Transporte embrionario.	10
1.4.1.- Regulación endócrina.	11
1.4.2.- Regulación parácrina.	12
2.- JUSTIFICACIÓN.	14
3.- HIPOTESIS.	15
4.- OBJETIVOS.	16
5.- MATERIAL Y MÉTODOS.	17
5.1.- Animales.	17
5.2.- Grupos experimentales.	17
5.3.- Apareamientos.	18
5.4.- Obtención de embriones.	19
5.5.- Análisis estadístico.	20
6.- RESULTADOS.	21
7.- DISCUSIÓN.	27
8.- CONCLUSIONES.	34
9.- BIBLIOGRAFÍA.	35

1. INTRODUCCIÓN

1.1. FERTILIZACIÓN.

La fertilización es considerada como el primer paso para el desarrollo de un organismo multicelular (Gilbert, 1994), e incluye eventos que deben ocurrir de manera ordenada y precisa, entre éstos se encuentran el reconocimiento y adhesión de los gametos (Wassarman, 1992), la fijación del espermatozoide a la zona pelúcida (ZP) del ovocito (Dean, 1992), la reacción acrosomal, la penetración del espermatozoide al ovocito (Bedford, 1998; Loeser y Tulsiani, 1999), la fusión de las membranas plasmáticas de ambos gametos (Evans *et al.*, 1995), la reacción cortical del ovocito (Wassarman, 1987), la reanudación de la meiosis, la formación de los pronúcleos masculino y femenino (Storey, 1995) y el inicio de la segmentación (Gilbert, 1994).

1.1.1. RECONOCIMIENTO Y ADHESIÓN.

Cuando el espermatozoide pasa a través del epidídimo en el aparato reproductor masculino, tiene modificaciones estructurales y funcionales en un proceso conocido como maduración. Después del apareamiento, los espermatozoides que se encuentran ya en el aparato reproductor femenino, sufren otras modificaciones que les permiten adquirir su capacidad fertilizante (capacitación) (Tulsiani, *et al.*, 1998). Estos cambios son indispensables para que se lleve a cabo el primer evento en el proceso de fertilización, que consiste en la interacción del espermatozoide con la ZP del ovocito (Shalgi *et al.*, 1986).

La unión del espermatozoide con la ZP está mediada por una glicoproteína que forma parte de ella y que actúa como receptor espermático, la ZP3, y por la proteína quinasa-tirosina localizada en la membrana plasmática del espermatozoide (Barros *et al.*, 1996; Brandelli *et al.*, 1994). Esta asociación induce la reacción acrosomal (Thaler y Cardullo, 1996).

1.1.2. UNIÓN ESPERMATOZOIDE-OVOCITO.

Otra glicoproteína de la zona pelúcida conocida como ZP2, actúa como un segundo receptor del espermatozoide (Wassarman, 1992). A diferencia de la unión con la ZP3, esta segunda unión es irreversible, anclando al espermatozoide a la zona pelúcida (Dean, 1992)

1.1.3. REACCIÓN ACROSOMAL.

El acrosoma está ubicado en la región anterior de la cabeza del espermatozoide y se origina como producto del aparato de Golgi durante la espermatogénesis (Wassarman, 1987).

La interacción del espermatozoide con la ZP dispara la señal necesaria para la fusión de la membrana plasmática del espermatozoide con la membrana acrosomal externa, proceso conocido como reacción acrosomal (Brandelli *et al.*, 1994; Loeser y Tulsiani, 1999) permitiendo la liberación de enzimas proteolíticas, como la acrosina, la hialuronidasa y algunas lipasas (Bavister, 1980) que facilitan el paso del espermatozoide a través de la ZP (Herrera, 1995; Tulsiani *et al.*, 1998).

1.1.4. FUSIÓN DE MEMBRANAS.

Posterior a la reacción acrosomal, el espermatozoide penetra a través de la ZP hasta llegar al espacio perivitelino (zona intermedia entre la membrana del ovocito y la ZP). La membrana espermática de la región ecuatorial inicia el contacto y posterior fusión con la membrana plasmática del ovocito (Wassarman, 1987; Herrera, 1995).

Una proteína que se encuentra en la membrana espermática conocida como fertilina o PH-30, ha sido propuesta como mediadora de esta unión y de la fusión de membranas (Evans *et al.*, 1995; Waters y White, 1997).

La fertilina es una glicoproteína que consta de dos subunidades, alfa y beta, y que pertenece a una familia de proteínas transmembranales conocidas como ADAM (por sus siglas en inglés **A** Desintegrin **A**nd **M**etalloprotease) (Evans *et al.*, 1998; Myles y Primakoff, 1997; Chen *et al.*, 1999).

Se sabe que el dominio desintegrina de la fertilina beta funciona como un ligando a proteínas conocidas como integrinas que se encuentran en la superficie plasmática del ovocito (Bowen y Hunt, 2000).

1.1.5. ACTIVACIÓN DEL OVOCITO Y REACCIÓN CORTICAL.

Antes de la fertilización, el ovocito se encuentra detenido en la etapa de metafase de la segunda división meiótica. Al unirse con el espermatozoide, el ovocito tiene cambios metabólicos y estructurales que en conjunto se conocen como activación. Entre estos cambios se incluyen un aumento en la concentración de calcio intracelular (Ca^{2+}), aumento del pH intracelular, terminación de la segunda división meiótica, y la llamada reacción cortical (Wassarman, 1987).

La unión de los gametos propicia una despolarización en el sitio de contacto que posteriormente se propaga por toda la membrana plasmática. Esta despolarización cumple con dos objetivos, actúa como un bloqueo a la polispermia al desencadenar una despolarización en toda la membrana y activa a las proteínas G, que son las responsables de la transformación del fosfatidil inositol a inositol trifosfato (IP_3) (Ducibella *et al.*, 1993).

El IP_3 a su vez estimula la salida de Ca^{2+} a partir de las reservas celulares, aumentando la concentración de Ca^{2+} y el desplazamiento de los gránulos corticales hacia la parte interna de la membrana plasmática, debido a la polimerización de los microtúbulos dependientes de Ca^{2+} que están asociados con los gránulos, lo que conlleva a la fusión de las membranas y la liberación de las enzimas contenidas en los gránulos corticales (Herrera, 1995). Estas enzimas (proteasas y peroxidasas), llegan rápidamente al espacio perivitelino y posteriormente se dirigen a la ZP donde llevarán a cabo diferentes funciones catalíticas que modificarán la función y estructura de la ZP (Wassarman, 1987).

1.1.6. EVENTOS POST-FERTILIZACIÓN.

Poco después de que el espermatozoide se incorpora al citoplasma del ovocito, la envoltura nuclear del gameto masculino desaparece y la cromatina tiene un proceso de descondensación. La cromatina de ambos gametos es entonces encapsulada en una membrana nuclear, formándose los pronúcleos masculino y femenino. Cuando ambos pronúcleos entran en contacto, sus membranas se rompen facilitando la unión de los cromosomas materno y paterno (singamia). Estos cromosomas se organizan alrededor del huso acromático en preparación para iniciar una serie de divisiones mitóticas conocidas como segmentación (Wright, 1999).

1.2. PROCESO DE SEGMENTACIÓN.

La fertilización da por resultado la formación de un ovocito fertilizado o cigoto, que pasará por una serie de divisiones mitóticas en un proceso llamado segmentación. Una característica importante de este proceso es el aumento en el número de células (blastómeros) sin que aumente el tamaño del embrión completo (Gilbert, 1994).

1.2.1. COMPACTACIÓN.

En algunas especies de roedores como el hámster, cuando el embrión se segmenta hasta desarrollarse en un embrión de 8 blastómeros, es decir, después del tercer ciclo mitótico, comienzan a formarse uniones estrechas entre los blastómeros, aumentando su superficie de contacto dando origen a una estructura altamente compactada (Mayor e Izquierdo, 1994), por lo que este proceso se conoce como "compactación" (Kidder *et al.*, 1987). También ocurren cambios a nivel de la organización de las membranas blastoméricas originando su polarización (Suzuki *et al.*, 1999). Los blastómeros continúan dividiéndose de tal forma que un embrión se desarrolla alcanzando la etapa de mórula (de 16 a 32 blastómeros).

La compactación es necesaria para que se lleve a cabo la primera diferenciación en el desarrollo de embriones de mamíferos, esto implica que algunos blastómeros darán origen a las células de la masa celular interna que formará al embrión-feto, mientras que otras células se diferenciarán originando al trofoblasto, para formar la placenta (Johnson y Ziomek, 1981).

Se sabe que el ovocito posee todos los elementos necesarios para el desarrollo embrionario, con la excepción de un centro de división activo, el centrosoma, el cual se encuentra en el espermatozoide. Este centro consta de dos centriolos en un arreglo perpendicular con un material pericentriolar, considerado como el responsable de la nucleación de los microtúbulos para la formación del huso mitótico (Palermo *et al.*, 1997). Por lo tanto, durante la fertilización el espermatozoide proporciona al cigoto el centro director de la primera división mitótica (Moomjy *et al.*, 1999; Colombero *et al.*, 1999).

Durante la fusión de las membranas citoplasmáticas de los gametos, algunas proteínas de la membrana espermática son incorporadas a la membrana del ovocito. Una de estas proteínas, es la señal de segmentación uno

o CS1 (por sus siglas en inglés Cleavage Signal 1) que consta de dos subunidades de 14 y 18 kDa, y que es parte de un sistema de información extranuclear necesario para que el proceso de segmentación se desarrolle adecuadamente.

1.3. ASINCRONÍA DEL DESARROLLO EMBRIONARIO TEMPRANO.

En especies que tienen la capacidad de gestar varias crías a la vez (politocas) se puede llegar a presentar un desfase en las etapas tempranas de la segmentación entre los productos de esa gestación, este proceso es conocido como asincronía (Tsunoda *et al.*, 1985).

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

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

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

etapa de mórula, blastocisto e incluso de 4 y 8 blastómeros.

Recientemente, nuestro grupo de trabajo (Navarro *et al.*, 2000) estudió el desarrollo embrionario temprano en el hámster Sirio Dorado (*Mesocricetus auratus*) en hembras nulíparas (3 meses de edad) y múltiparas (2 o más partos), los resultados mostraron que a menor edad de las hembras hay menor asincronía en las etapas de segmentación, mientras que con dos o más partos hay mayor asincronía. Además, se encontró que existe un retraso en el patrón de segmentación en las hembras múltiparas en comparación con las hembras nulíparas.

Por otra parte, se conoce que en las hembras de algunos mamíferos, a mayor edad existe pérdida progresiva de la capacidad reproductiva, misma que se caracteriza por alteración de la regularidad de los ciclos estrales y la subsecuente disminución de la tasa de fertilidad y prolificidad (Vom Saal *et al.*, 1994).

LaPolt *et al.* (1990) encontraron que en ratas hembra de edad avanzada, la disminución de la fertilidad y el tamaño de la camada, está asociada a una reducción del número de blastocistos normales y disminución de su implantación.

Matt *et al.* (1987) y Anzalone *et al.* (2001) reportaron que la baja capacidad reproductiva de las hembras de edad avanzada se relaciona con la pérdida de la función ovárica y la alteración en el patrón de secreción de estradiol y progesterona.

Es conocido además, que la duración de la gestación aumenta conforme la edad de las hembras avanza. Soderwall *et al.* (1960) utilizaron hembras de hámster Sirio Dorado con edades desde 1 hasta 27 meses para determinar si existía relación entre la edad de las hembras, la duración de la gestación y el

tamaño de la camada, encontrando que después de los 14 meses de edad hay una disminución de la fertilidad y prolificidad, y que conforme aumenta la edad de las hembras, aumenta también la duración de la gestación. En el caso de las hembras de un mes de edad la duración de la gestación fue de 373 hrs, a los 5 meses de edad fue de 381 hrs, y a los 14 meses de edad de 402 hrs.

Por otro lado, las hormonas ováricas inducen cambios morfológicos, fisiológicos y bioquímicos en el oviducto, que incluyen cambios en la actividad biosintética y la liberación de proteínas por el epitelio oviductal. La presencia de proteínas derivadas del oviducto y de factores específicos en el microambiente del oviducto, facilitan la fertilización y el desarrollo de las primeras etapas de la segmentación (Buhi *et al.*, 1997).

1.4. TRANSPORTE EMBRIONARIO.

Una vez que se ha llevado a cabo la fertilización, en la región ampular del oviducto, el cigoto o embrión que carece de movilidad propia, tiene que ser transportado a través del oviducto hasta el sitio de implantación en el útero (Villalón *et al.*, 1999), utilizando para ello varios mecanismos entre los que se encuentran la contracción de la musculatura lisa, el movimiento de las células ciliadas y del fluido oviductal en dirección al útero (Rosselli *et al.*, 1994; Martínez *et al.*, 2000).

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

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

- 1) Regulación endócrina (de origen ovárico)
- 2) Regulación parácrina (de origen embrionario) (Villalón *et al.*, 1999).

1.4.1. REGULACIÓN ENDÓCRINA.

El estradiol y la progesterona secretadas por el ovario tienen un papel importante en la regulación del transporte embrionario (Wu *et al.*, 1971; Ortiz *et al.*, 1979) a través de receptores intracelulares oviductales que controlan la síntesis de proteínas (Rios *et al.*, 1997; Orihuela *et al.*, 2001a). El estradiol aumenta la velocidad del transporte embrionario, mientras que la progesterona ejerce un efecto contrario, sin embargo este comportamiento varía dependiendo de la especie, la dosis y el tiempo de administración (Villalón *et al.*, 1999).

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

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

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

hormona y el transporte, sin embargo, si se administra la progesterona antes de la ovulación acelera el transporte de los embriones.

1.4.2. REGULACIÓN PARÁCRINA.

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

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

A este respecto, Velasquez *et al.* (1995), realizando un trabajo para determinar la participación del factor activador de plaquetas o PAF (por sus siglas en inglés **Platelet-Activating Factor**) sobre el transporte embrionario, concluyeron que este factor que es producido y secretado por el embrión de hámster, actúa como señal reguladora para su transporte hacia el útero. Así mismo, se ha demostrado la existencia de receptores al PAF en las células del oviducto, localizadas en proximidad de los embriones y en cuanto a la expresión del RNAm del receptor del PAF, éste se produce principalmente en el endosálpinx, hecho que confirma que el PAF es un regulador parácrino del transporte (Velasquez *et al.*, 1997).

Este factor también tiene un papel importante en la regulación del transporte embrionario en otras especies, en donde se ha reportado la liberación del mismo durante el transporte embrionario por el oviducto. Por otra parte, si el PAF es la señal que facilita el transporte del embrión hacia el útero y esto se

realiza como en la rata, por el aumento de las contracciones del miosápinx, el endosápinx podría funcionar como una estación de relevo entre el embrión y las células del músculo liso (Villalón *et al.*, 1999; Martínez *et al.*, 2000).

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

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

2. JUSTIFICACIÓN

La asincronía en el desarrollo embrionario de las hembras adultas hámster de dos o más partos, encontrada en estudios previos de nuestro grupo de trabajo, contrasta ampliamente con la sincronía de los embriones de las hembras jóvenes, sin embargo no está claro si la asincronía embrionaria está en función de la edad de las hembras, al número de partos (paridad) o de ambos.

El abordaje de esta temática de estudio permitirá conocer la influencia de la condición reproductiva y fisiológica de la hembra sobre el desarrollo embrionario temprano y el transporte del embrión e inferir sobre aspectos de su causa, control y significancia.

3. HIPOTESIS

La asincronía del desarrollo embrionario temprano en el hámster está relacionada con la edad de las hembras más que con el número de partos.

4. OBJETIVOS

GENERAL:

Evaluar el desarrollo embrionario temprano en hembras hámster nulíparas jóvenes, nulíparas adultas y multíparas.

ESPECIFICOS:

Evaluar el desarrollo y el número de embriones obtenidos en cada uno de los grupos de estudio.

Determinar si existen diferencias en el transporte embrionario entre los grupos de estudio.

Conocer si existe una relación entre la edad y paridad con la asincronía embrionaria.

5. MATERIAL Y MÉTODOS.

5.1 ANIMALES.

Se utilizaron un total de 84 hembras hámster Sirio Dorado (*Mesocricetus auratus*) que fueron alojadas en el bioterio bajo las siguientes condiciones: 26°C de temperatura promedio, fotoperíodo de 14 hrs luz (encendidas a las 4:00 AM y apagadas a las 6:00 PM) por 10 hrs de oscuridad y alimentados *ad libitum* con nutricubos Purina y agua.

5.2. GRUPOS EXPERIMENTALES:

Las hembras fueron divididas en tres grupos experimentales con las siguientes características:

Grupo 1: 30 hembras nulíparas jóvenes de 3 meses de edad y peso de 136 ± 6.17 grs (promedio \pm DE).

Grupo 2: 24 hembras nulíparas adultas de 7 meses de edad y peso de 207 ± 7.67 grs.

Grupo 3: 30 hembras múltiparas (tres partos) y características similares a las del segundo grupo.

Para integrar cada grupo se utilizaron hembras que mostraron regularidad en la duración de sus ciclos estrales (4 días) (Ortíz *et al.*, 1986; Velasquez *et al.*, 1995), para lo cual previamente se les hizo un seguimiento a través de citología vaginal exfoliativa (CVE) durante 12 días consecutivos (Mizoguchi y Dukelow, 1981).

Las hembras de los grupos 1 y 2 fueron colocadas en grupos de 6 animales por cada caja (de acrílico de 60X15X10cm), mientras que las hembras del tercer grupo fueron alojadas en cajas individuales (de acrílico de 20X10X10cm), para que pudieran parir adecuadamente.

A las hembras nulíparas adultas se les hizo CVE durante 8 días cada 30 días para confirmar la regularidad de sus ciclos, hasta que fueron utilizadas para el experimento.

En las hembras múltiparas, se registró el número de crías nacidas y destetadas en cada uno de los tres partos.

5.3. APAREAMIENTOS.

El día de la secreción vaginal postovulatoria, se consideró como día 1 del ciclo estral (Villalón *et al.*, 1982).

El apareamiento se realizó en la tarde (6:00 PM) del tercer día del ciclo (fase de proestro), previamente se registró el peso de las hembras y se les efectuó CVE para confirmar su proestro, luego fueron colocadas en cajas individuales con machos de fertilidad comprobada siguiendo el esquema propuesto por Orsini (1961) y Velasquez *et al.* (1995).

El tiempo de apareamiento se limitó a 15 minutos (Navarro *et al.*, 2000) y fue confirmado al observar espermatozoides en el lavado vaginal que se realizó a la mañana siguiente, según lo descrito por Blaha (1964).

5.4. OBTENCIÓN DE EMBRIONES.

Entre las 60 y 69 horas postcoito (PC), las hembras fueron transportadas al laboratorio, en un tiempo aproximado de 10 minutos. Fueron sacrificadas por dislocación cervical. Se colocaron sobre una tabla de disección en posición decúbito dorsal, realizando una incisión por la línea media ventral, abarcando piel, músculo y peritoneo. Una vez localizado el aparato reproductor se procedió a extraerlo desde los ovarios hasta el cuello del útero. El aparato reproductor se colocó en un vidrio de reloj siliconizado y se lavó con solución buffer de fosfatos (PBS: NaCl 136mM; KCl 2.68mM; Na₂ HPO₄ 8.1mM y KH₂PO₄ 1.46mM) (J.T. Beaker) suplementado con 0.3% de albúmina sérica bovina (BSA) (Sigma A3059) (Hogan *et al.*, 1986). El tiempo promedio desde el sacrificio hasta la obtención del aparato reproductor fue de 5 minutos.

Se separaron ovarios y oviductos colocándolos en cajas de 4 pozos con PBS-BSA. Los oviductos fueron cortados con el bisel de una aguja calibre 25 bajo el microscopio estereoscópico, el tejido remanente se lavó con 0.5ml de PBS-BSA. En el microscopio invertido con aumento de 250X se localizaron los

desde la obtención del aparato reproductor hasta el análisis de los embriones fue de 10 minutos.

5.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

El análisis estadístico del total de embriones recuperados de oviductos y úteros, fue realizado mediante la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis. El número de embriones recuperados en los diferentes tiempos fue analizado mediante el análisis de varianza (ANOVA), un valor de $p < 0.05$ fue considerado estadísticamente significativo.

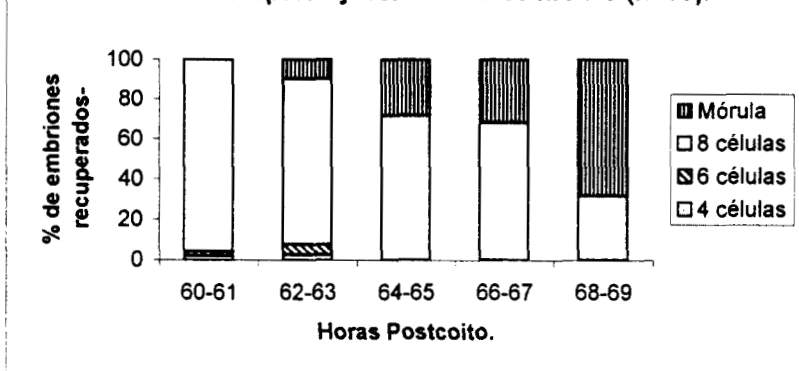
6. RESULTADOS.

El número de embriones recuperados en las hembras nulíparas jóvenes, nulíparas adultas y múltiparas fue 234, 158 y 225 respectivamente. El promedio (\pm DE) de cuerpos lúteos observado por hembras en cada grupo fue 5.2 (1.7), 7.0 (1.9) y 6.0 (1.9) respectivamente, mientras que el promedio (\pm DE) de embriones recuperados por hembra en cada grupo fue 7.8 (2.8), 6.6 (2.8) y 7.5 (3.3) en el mismo orden.

En las hembras múltiparas, el número de crías nacidas y destetadas al primer parto en promedio fue 9.4 (2.5) y 7.3 (3.7) respectivamente, en el segundo parto aumentaron ambos parámetros a 10.2 (3.4) y 8.5 (3.6) y al tercer parto el número de crías al nacimiento aumentó a 11.2 (2.1), mientras que el número de crías destetadas se mantuvo constante con 8.5 (2.3).

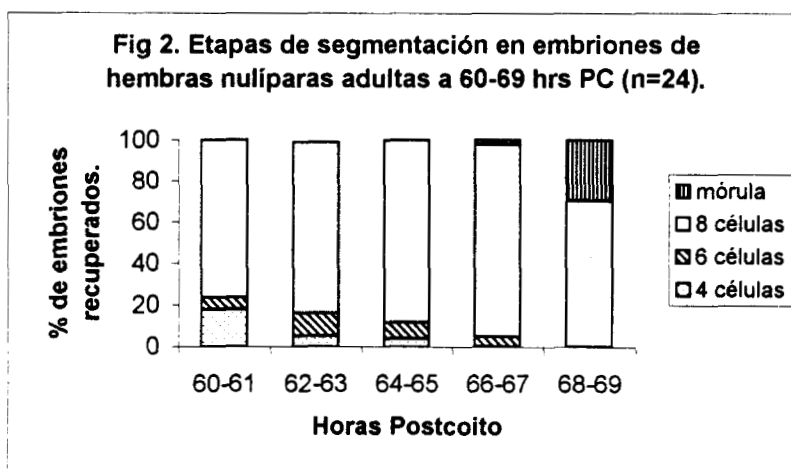
En las hembras nulíparas jóvenes a las 60-61 hrs PC se obtuvieron embriones en tres diferentes etapas de la segmentación (4, 6 y 8 blastómeros) predominando los embriones de 8 blastómeros (96%). A las 62-63 hrs PC, se recuperaron los primeros embriones en etapa de mórula (10%), sin embargo, continuaron predominando los embriones de 8 blastómeros (82.5%). Posteriormente a las 64-65, 66-67 y 68-69 hrs PC, solamente se recuperaron embriones en dos etapas de la segmentación (de 8 blastómeros y mórulas). Entre las 64 y 67 hrs PC el mayor porcentaje de embriones correspondió a la etapa de 8 células (82 y 72% respectivamente), mientras que a las 68-69 hrs PC se observó el mayor número de mórulas (70%) (Fig 1).

Fig 1. Etapas de segmentación en embriones de hembras nulíparas jóvenes a 60-69 hrs PC (n=30).

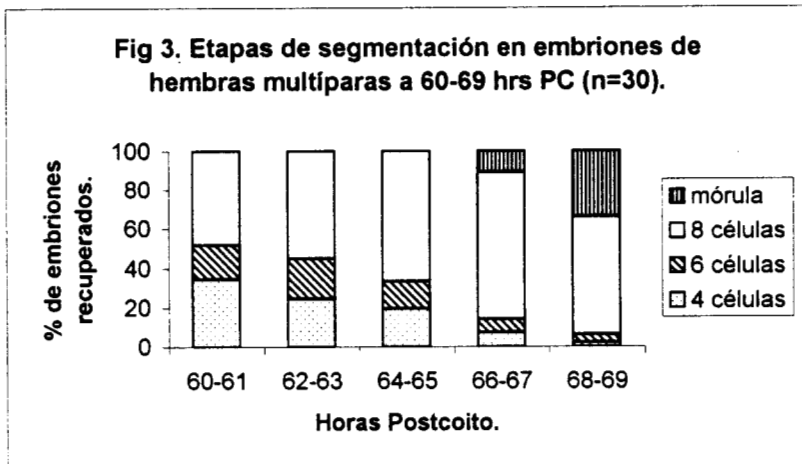


En las hembras nulíparas adultas a las 60-61, 62-63 y 64-65 hrs PC se obtuvieron embriones en etapas de 4, 6 y 8 blastómeros, predominando los embriones de 8 blastómeros (76.5, 81.3 y 86.4%, para cada uno de los tiempos estudiados) (Fig 2). A las 66-67 hrs PC aparecen las mórulas (2.4%), sin embargo, la etapa de desarrollo que predomina es la de 8 blastómeros (92.9%). A las 68-69 hrs PC, el 30% de los embriones recuperados se encuentra en estado de mórula y el resto en etapa de 8 blastómeros.

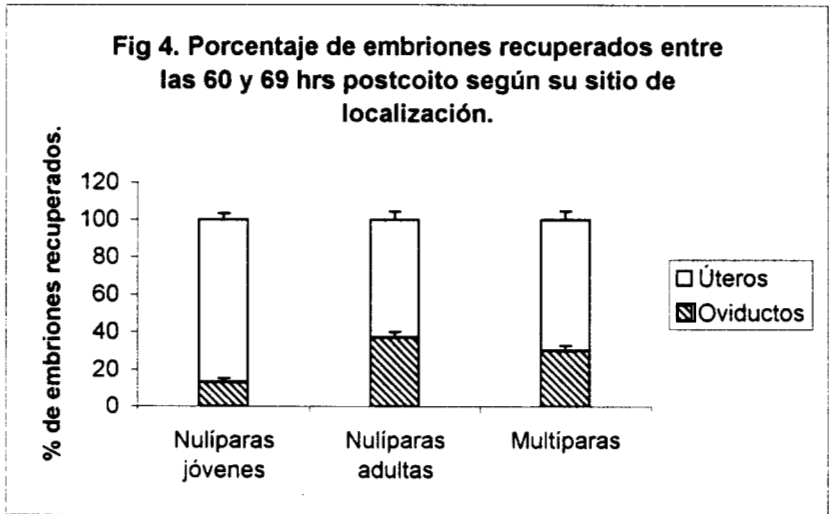
Fig 2. Etapas de segmentación en embriones de hembras nulíparas adultas a 60-69 hrs PC (n=24).



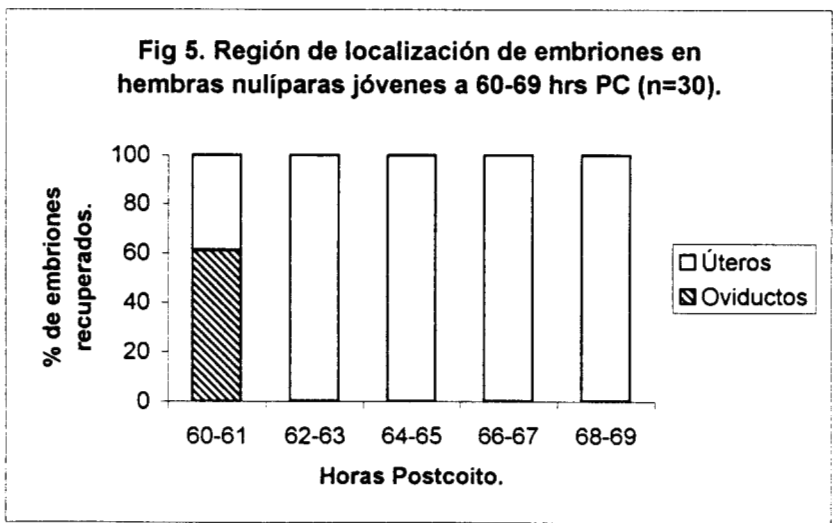
Las hembras múltiparas a las 60-61, 62-63 y 64-65 hrs PC, tuvieron embriones de 4, 6 y 8 blastómeros, predominando en los tres tiempos los embriones de 8 blastómeros (76.5, 81.3 y 86.4%, para cada uno de los tiempos estudiados). A las 66-67 hrs PC aparecen mórulas (11%), predominando los embriones de 8 blastómeros (75%). A las 68-69 hrs PC, el 34% de los embriones se encuentran en la etapa de mórula, mientras que el 60% se encuentra en etapa de 8 blastómeros y aún hay embriones de 4 y 6 blastómeros (2 y 4%) (Fig 3).



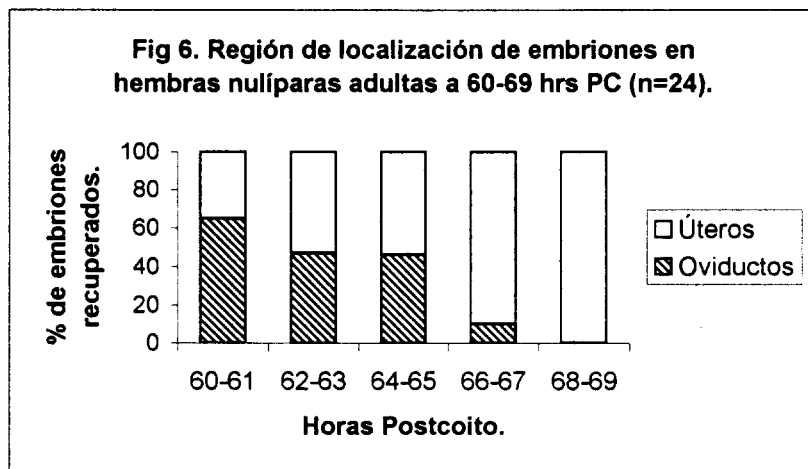
En la figura 4 se muestra el porcentaje de embriones recuperados en oviductos y úteros en los tres grupos estudiados. El porcentaje de embriones recuperados de los oviductos de las hembras nulíparas jóvenes fue significativamente diferente ($p < 0.05$) con respecto al de las hembras nulíparas adultas y múltiparas (12, 37 y 30%, respectivamente). El porcentaje de embriones recuperados de los oviductos de las hembras nulíparas adultas y múltiparas no tuvo diferencias significativas.



Por otro lado, en las hembras nulíparas jóvenes a las 60-61 hrs PC el 35% de sus embriones se recuperaron de los oviductos y a partir de las 62 hrs PC la totalidad de los embriones se recuperaron de los úteros, siendo esta diferencia significativa ($p < 0.05$) (Fig. 5).

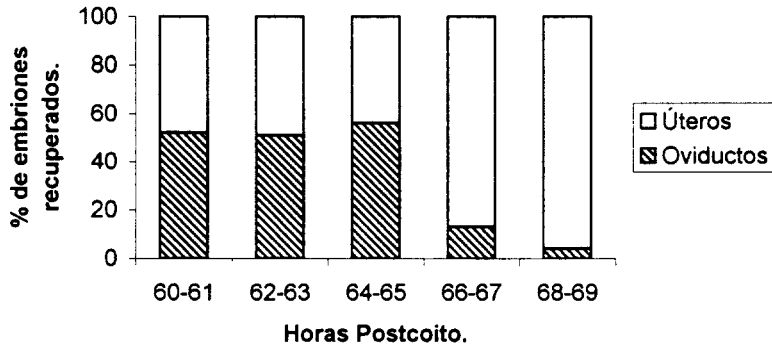


En las hembras nulíparas adultas se observó una disminución progresiva en el número de embriones recuperados de los oviductos a partir de las 60-61 hrs PC (65%); hasta alcanzar un mínimo a las 66-67 hrs PC (10%). A las 68-69 hrs PC la totalidad de los embriones se recuperaron de los úteros ($p < 0.05$) (Fig 6).



En las hembras múltiparas, el porcentaje de embriones recuperados de los oviductos a las 60-61, 62-63 y 64-65 hrs PC se mantuvo constante (52, 51 y 55%, respectivamente). A las 66-67 y 68-69 hrs PC disminuyó (13 y 4%, respectivamente) siendo esto estadísticamente significativo con respecto a los tiempos anteriores ($p < 0.05$) (Fig. 7).

Fig 7. Región de localización de embriones en hembras multiparas a 60-69 hrs PC (n=30).



7. DISCUSIÓN

Los resultados de la presente investigación confirman que existe asincronía en el desarrollo embrionario en todos los grupos de hembras estudiadas, lo cual coincide con lo reportado por Nieder y Caprio en 1990.

La asincronía en el desarrollo embrionario se acentúa en las hembras nulíparas adultas y aún más en las multíparas, lo cual podría relacionarse con los cambios anatómo-fisiológicos derivados de la edad y del desgaste reproductivo de estas hembras, que se manifiestan por cambios en el mecanismo de la ovulación, la maduración de gametos, el transporte de gametos y embriones, el ambiente hormonal y los cambios histológicos del aparato reproductor.

Los datos aquí obtenidos concuerdan con lo reportado anteriormente por nuestro grupo de trabajo (Navarro *et al.*, 2000) donde se determinó que a menor edad de las hembras había menor asincronía.

Uno de los factores críticos que determinan la asincronía en las etapas del desarrollo embrionario, es el ambiente del oviducto donde se llevan a cabo los primeros ciclos de división (Avery *et al.*, 1992). En él se proporcionan las condiciones necesarias para que ocurra la interacción entre gametos y para que el desarrollo embrionario temprano se realice de manera adecuada (Murray y Messinger, 1994), estas funciones son reguladas por el estradiol y la progesterona (Wijayagunawardene *et al.*, 1999b)

A este respecto Buti *et al.* (1997) determinaron que estas hormonas óvaricas inducen cambios morfológicos, fisiológicos y bioquímicos a nivel oviductal y una de estas alteraciones es la síntesis y liberación de proteínas por el epitelio oviductal.

En cuanto a la liberación de estas proteínas oviductales, Murray y Messinger (1994) determinaron que durante los tres primeros días de gestación, el oviducto de hámster, cuyo ambiente es predominantemente estrogénico, sintetiza y libera una glicoproteína de peso molecular de 200 kDa que se adhiere a la ZP y a la membrana plasmática de los blastómeros, y que participa en el proceso de segmentación y adhesión de los blastómeros.

Por otra parte, se sabe que en las hembras adultas ocurre una disminución progresiva de la capacidad para mantener ciclos estrales regulares (Matt *et al.*, 1987), así como una disminución de la tasa de fertilidad y prolificidad (Edwards *et al.*, 1998). Los mecanismos y factores responsables de esta disminución reproductiva relacionada con la edad no son totalmente conocidos, la pérdida de la ciclicidad ha sido relacionada con alteraciones en la regulación neuroendócrina de la secreción de gonadotrofinas y con una disminución de la reserva folicular (Anzalone *et al.*, 2001), además la disminución de la fertilidad y prolificidad en las hembras adultas, ha sido relacionada con una disminución en el número de blastocistos normales que se desarrollan (Matt *et al.*, 1987).

Por lo tanto, la asincronía observada en las hembras nulíparas adultas y multíparas podría servir para estudiar el mecanismo a través del cual la edad afecta la capacidad reproductiva de las hembras.

Los resultados aquí obtenidos en cuanto a la menor asincronía de las etapas de la segmentación en hembras nulíparas jóvenes, también concuerdan con lo reportado por Sato y Yanagimachi (1972) quienes recuperaron al tercer día de gestación, en hembras hámster de 2 a 3 meses de edad, solo embriones en dos etapas de segmentación (de 4 y 8 blastómeros).

Nieder y Caprio (1990) por su parte, reportaron en hembras de hámster Siberiano (*Phodopus sungorus*), una marcada asincronía en el desarrollo embrionario temprano, al recuperar embriones de 3 a 4 etapas de la

segmentación. Cabe mencionar que estos autores no especifican la edad de las hembras que utilizaron pero por lo aquí encontrado, podríamos suponer que eran nulíparas adultas o tal vez múltiparas.

Es posible que la asincronía sea un mecanismo relacionado con la sobrevivencia embrionaria por adaptación al ambiente oviductal y uterino, siendo importante mencionar, que durante el seguimiento reproductivo que se hizo de las hembras múltiparas en el presente trabajo, el número de crías al nacimiento aumentó en cada parto (9.4 crías en el primer parto, 10.2 en el segundo y 11.2 en el tercero) con lo cual se demuestra que la asincronía del desarrollo no es contrario a la eficiencia reproductiva en estas condiciones de estudio.

Sin embargo, ha sido reportado que después del quinto parto, existe una disminución en el tamaño de la camada, que ha sido relacionada con la disminución en el número de folículos ovulatorios (Edwards *et al.*, 1998).

Por su parte Matt *et al.* (1987) encontraron que la disminución en el tamaño de la camada en ratas adultas, también podría relacionarse con una disminución en el número de blastocistos normales presentes antes de la implantación. Este fenómeno ya ha sido reportado también para el hámster (Blaha, 1964; Parkening y Soderwall, 1975).

Dado que el presente estudio deriva de otro donde se determinó que entre las 62 y 63 hrs PC es el mejor momento para la recuperación de embriones de 8 blastómeros, no debe extrañar que en el presente, la mayoría de los embriones obtenidos entre las 60 y 68 hrs PC de los tres grupos de hembras fueron de 8 células, a excepción de los colectados a las 68-69 hrs PC del grupo de nulíparas jóvenes que fueron mórulas.

En la presente investigación se observó mayor desarrollo embrionario en las hembras nulíparas jóvenes, lo que se demuestra por la presentación de las

primeras mórulas, 4 hrs antes (62-63 hrs PC) en comparación con lo encontrado en las hembras nulíparas adultas y múltiparas (66-67 hrs PC) y por la rápida desaparición de las etapas de 4 y 6 blastómeros. Sin embargo, al igual que lo ocurrido con la asincronía en el desarrollo embrionario y al comparar las crías obtenidas en cada uno de los partos de las hembras múltiparas, no hay evidencia de que este retraso se relacione con la disminución del éxito reproductivo, sino al contrario.

Varios han sido las propuestas para entender el patrón de segmentación de los embriones de hembras adultas. Day *et al.* (1989) reportaron un retraso en el patrón de segmentación en las ratas hembras Long-Evans de 10 meses de edad, y determinaron que este retraso podría estar relacionado con la alteración del patrón de síntesis de RNAm del cigoto.

LaPolt *et al.* (1990, 1998) y Day *et al.* (1991) reportaron que un aumento en los niveles de estradiol o una disminución en la proporción de progesterona-estradiol, durante las etapas tempranas de la gestación afectan el patrón del desarrollo embrionario temprano en ratas hembras.

Por otro lado, el paso del embrión hacia el útero debe hacerse en el momento adecuado, ya que si lo hace anticipadamente puede llegar a causar una disminución en su viabilidad o incluso su expulsión a través de la vagina. En las hembras nulíparas adultas y múltiparas el 63 y 70% de los embriones fueron recuperados de los úteros, mientras que en las hembras nulíparas jóvenes fue el 82% ($p < 0.05$) (Fig 4). Es posible que los cambios histológicos (presencia de más pliegues epiteliales e invasión de tejido conectivo fibroso) causen una disminución de la respuesta del oviducto y útero a los estímulos hormonales y a la señalización embrionaria, conforme aumenta la edad de las hembras. Sin embargo y al igual que lo reportado para la asincronía en el desarrollo embrionario, esto no parece afectar la reproducción, sino al contrario, ya que en las hembras múltiparas que presentan un retraso en el momento de entrada de

los embriones al útero, no se observa una disminución en el tamaño de la camada (hasta la tercer camada). Estos datos concuerdan con los resultados obtenidos por Ortiz *et al.* (1986) y Velasquez *et al.* (1995) para esta misma especie.

Ortiz *et al.* (1986), encontraron que existe un transporte diferencial a través del oviducto de ovocitos y embriones en el hámster, lo que no es necesariamente debido al estado reproductivo de la hembra (gestante o no gestante), sino a características propias del embrión. Estos autores recuperaron el 85% de los embriones de los úteros al tercer día de gestación en las hembras nulíparas.

Velasquez *et al.* (1995) por su parte, reportaron que los embriones de hembras hámster nulíparas (3 meses de edad), entran al útero al tercer día de la gestación, lo cual coincide con los resultados obtenidos en este trabajo y que un factor de origen embrionario interviene en la regulación de este transporte.

Con respecto a los factores de origen embrionario que modulan su transporte, Hermoso *et al.* (1996) determinaron que los embriones de hámster en etapas previas a la implantación producen y liberan prostaglandinas (especialmente la PGE₂) y PAF, sugiriendo la participación de estos factores en la regulación de la tasa de transporte oviductal. También se ha establecido que el momento de la entrada de los embriones al útero está determinado por las concentraciones de estradiol y progesterona (Forcelledo *et al.*, 1981; Forcelledo *et al.*, 1986; Fuentealba *et al.*, 1988; Orihuela *et al.*, 2001b). Estas hormonas ejercen sus efectos sobre el transporte embrionario a través de receptores intracelulares que controlan la síntesis de RNA (mensajeros, ribosomales y de transferencia) específicos para ciertas proteínas, como las prostaglandinas (Rios *et al.*, 1997; Orihuela *et al.*, 2001a).

Por otra parte, Ortiz *et al.* (1989) en un trabajo sobre la tasa de transporte de embriones en la rata, determinaron que existe una diferencia en el momento de entrada de los embriones al útero y que ésta depende de la etapa de desarrollo del embrión, Ortega-Moreno (1995) determinó que los embriones en etapas avanzadas, liberan factores (prostaglandinas) que podrían estar actuando sobre el oviducto o a nivel de la unión útero-tubárica para favorecer su tránsito hacia el útero.

Por lo tanto, la diferencia en el porcentaje de embriones recuperados a partir de los oviductos entre hembras jóvenes, adultas y multíparas, podría estar relacionado con los cambios hormonales que ocurren conforme aumenta la edad de las hembras (Nass *et al.*, 1984; Anzalone *et al.*, 2001).

Otro aspecto importante, es el aumento en el tiempo de gestación que ocurre conforme aumenta la edad de las hembras (Soderwall *et al.*, 1960), aunque en este trabajo no se evaluó la duración de la gestación en ninguno de los grupos, los resultados obtenidos en cuanto al transporte embrionario nos permiten sugerir que este aumento ocurre desde la etapa inicial del desarrollo embrionario temprano.

Es importante mencionar que el embrión avanza algunas veces de manera pasiva, como es el caso del movimiento ciliar oviductal, de las contracciones musculares oviductales y por arrastre del líquido oviductal, mismas que se encuentran bajo control hormonal endógeno. Sin embargo, como se mencionó anteriormente existe una regulación para el transporte del embrión inducida por el mismo a través de la liberación de factores que actúan sobre el músculo liso oviductal. A este respecto, es importante realizar estudios para conocer si estos factores, influyen en el tránsito de embriones vecinos, porque de ser así, se podría explicar la presencia de embriones en etapas tempranas de desarrollo (anteriores a 8 blastómeros) en el útero de hembras nulíparas adultas y multíparas.

También es importante mencionar que durante la perfusión de los úteros era notoria la facilidad con que se podía hacer en aquellos procedentes de las hembras nulíparas jóvenes, en comparación a los de las hembras de los otros dos grupos, debido quizá a una mejor disposición anatómica.

Las hembras nulíparas adultas y multíparas, tuvieron similar porcentaje de embriones en los úteros y esto fue diferente a lo ocurrido con las nulíparas jóvenes. De nueva cuenta parece ser que la edad más que la condición reproductiva de las hembras, es el que más influye. Cabe también señalar que esta similitud entre los dos primeros grupos se dió a pesar de las diferencias en el patrón de desarrollo embrionario ya explicado, con lo que también surge la inquietud de conocer cómo se está dando la señalización para el transporte activo embrionario en los diferentes tipos de embriones y tipos de hembras.

8. CONCLUSIONES

1.- De acuerdo a los resultados obtenidos en este trabajo se puede concluir que la asincronía en el desarrollo embrionario existe en los tres grupos de hembras estudiadas, siendo más acentuada en las hembras adultas y multíparas, por lo que es posible que la edad influya más que la condición reproductiva en este fenómeno.

2.- Con relación al transporte del embrión en el oviducto no hubo diferencias significativas entre las hembras nulíparas adultas y multíparas y si las hubo ($p < 0.05$) al comparar estos dos grupos con las hembras nulíparas jóvenes, por lo que de nuevo se sugiere que es la edad el principal factor que influye.

3.- A pesar de la mayor asincronía en el desarrollo y el tiempo para llegar al útero, en los embriones de hembras multíparas, esto no se manifestó en reducción de la eficiencia reproductiva, a considerar por la cantidad de crías al nacimiento desde el primer parto hasta el tercero.

4.- Es posible que la asincronía en el desarrollo embrionario sea un proceso adaptativo para la sobrevivencia embrionaria en hembras politocas cuyo control y significado aún no están del todo entendidos.

5.- Es necesario continuar la investigación en puntos tales como los factores del transporte activo del embrión y su relación con las etapas de desarrollo embrionario y el tipo de hembra.

9. BIBLIOGRAFÍA.

- Anzalone, Ch.R.; Hong, L.S.; Lu, J.K.H.; LaPolt, P.S. 2001. **Influences of age and ovarian follicular reserve on estrous cycles patterns, ovulation, and hormone secretion in the Long-Evans rat.** *Biol. Reprod.* 64:1056-1062.
- Avery, B.; Jorgensen, C.B.; Madison, V.; Greve, T. 1992. **Morphological development and sex of bovine in vitro-fertilized embryos.** *Mol. Reprod and Develop.* 32: 264-270.
- Barros, C.; Crosby, J.A.; Moreno, R.D. 1996. **Early steps of sperm-egg interactions during mammalian fertilization.** *Cell Biol. Int.* 20(1): 33-39.
- Bavister, B.D. 1980. **Recent progress in the study of early events in mammalian.** *Develop. Growth and Differ.* 22(1): 385-402.
- Bedford, J.M. 1998. **Mammalian fertilization misread? Sperm penetration of eutherian zona pellucida unlikely to be a lytic event.** *Biol. Reprod.* 59:1257-1258.
- Blaha, G.C. 1964. **Effect of age of the donor and recipient on the development of transferred golden hamster ova.** *Anat. Rec.* 150 :413-416.
- Bowen, J.A.; Hunt, J.S. 2000. **The Role of Integrins in Reproduction.** *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* 223:331-343.
- Brandelli, A.; Miranda, P.V.; Tezon, J.G. 1994. **Participation of glycosylated residues in the human sperm acrosome reaction: possible role of N-acetylglucosaminidase.** *Biochim. Biophys. Acta* 1220(3):299-304.
- Buhi, W.C.; O'Brien, B.; Alvarez, I.M.; Erdos, G.; Dubois, D. 1997. **Immunogold localization of porcine oviductal secretory proteins within the zona pellucida, perivitelline space, and plasma membrane of oviductal and uterine oocytes and early embryos.** *Biol. Reprod.* 48:1274-1283.
- Colombero, L.T.; Moomjy, M.; Sills, E.S.; Rosenwaks, Z.; Palermo, G.D. 1999. **The role of structural integrity of the fertilising spermatozoon in early human embryogenesis.** *Zygote* 7(2):157-163.
- Chen, M.S.; Almeida, A.C.; Huovila, A.P.J.; Takahashi, Y.; Shaw, L.M.; Mercurio, A.M.; White, J.M. 1999. **Evidence the distinct states of the integrin alfa and beta interact with laminin and an ADAM.** *J. Cell. Biol.* 144(3):549-561.
- Day, J.R.; Lapolt, P.S.; Morales, T.H.; Lu, J.K.H. 1989. **An abnormal pattern of embryonic development during early pregnancy in aging rats.** *Biol. Reprod.* 41:933-939.

- Day, J.R.; Lapolt, P.S.; Lu, J.K.H. 1991. **Plasma patterns of prolactin, progesterone, and estradiol during early pregnancy in aging rats: relation to embryonic development.** *Biol. Reprod.* 44:786-790.
- Dean, J. 1992. **Biology of mammalian fertilization: role of the zona pellucida.** *J. Clin. Invest.* 89:1055-1059.
- Ducibella, T.; Shigeak; Kurasawa; Duffy, P.; Kopf, S.G; Schultz, M.R. 1993. **Regulation of the polyspermy block in the mouse egg: maturation-dependent differences in cortical granule exocytosis and zona pellucida modifications induced by inositol 1,4,5-trisphosphate and an activator of protein kinase C.** *Biol. Reprod.* 48:1252-1257.
- Edwards, H.E.; Tweedie, Ch. J.; Terranova, P.F.; Lisk, R.D.; Wynne-Edwards, K.E. 1998. **Reproductive aging in the Djungarian hamster, *Phodopus campbelli*.** *Biol. Reprod.* 58:842-848.
- Evans, J.P.; Schultz, R.M.; Kopf, G.S. 1995. **Mouse sperm-egg plasma membrane interaction: analysis of roles de egg integrins and the mouse sperm homologue of PH-30 (fertilin) beta.** *J. Cell Sci.* 108(10):3267-3278.
- Evans, J.P.; Shultz, R.M.; Kopf, G.S. 1998. **Roles of the disintegrin domains of mouse fertilins alfa and beta in fertilization.** *Biol. Reprod.* 59:145-152.
- Forcelledo, M.L.; Vera, R. Croxatto, H.B. 1981. **Ovum transport in pregnant, pseudopregnant, and cycle rats and its relationship to estradiol and progesterone blood levels.** *Biol. Reprod.* 24:760-765.
- Forcelledo, M.L.; De la Cerda, M.L.; Croxatto, H.B. 1986. **Effectiveness of different estrogen pulses in plasma for accelerating ovum transport and their relation to estradiol levels in the rat oviduct.** *Endocrinology* 119(3):1189-1194.
- Fuentealba, B.; Nieto, M.; Croxatto, H.B. 1988. **Estrogen and progesterone receptors in the oviduct during egg transport in cyclic and pregnant rats.** *Biol. Reprod.* 39(4):751-757.
- Gilbert, S.F. 1994. **Development Biology.** Sinauer Associates, Inc. Sunderland, Massachusetts. USA. 4^o ed. Pp 725-746.
- Hermoso, M.; Villalón, M.; Bavister, B.D.; Magness, R.R. 1996. **Preimplantation hamster embryos produce prostaglandin E2 and platelet activating factor.** *Biol. Reprod.* 54:80-86.
- Herrera, H.F. 1995. **Los gránulos corticales: el bloqueo a la polispermia en mamíferos.** *Ciencia* 46:371-381.

Day, J.R.; Lapolt, P.S.; Lu, J.K.H. 1991. **Plasma patterns of prolactin, progesterone, and estradiol during early pregnancy in aging rats: relation to embryonic development.** Biol Reprod. 44:786-790.

Dean, J. 1992. **Biology of mammalian fertilization: role of the zona pellucida.** J. Clin. Invest. 89:1055-1059.

Ducibella, T.; Shigeak; Kurasawa; Duffy, P.; Kopf, S.G; Schultz, M.R. 1993. **Regulation of the polyspermy block in the mouse egg: maturation-dependent differences in cortical granule exocytosis and zona pellucida modifications induced by inositol 1,4,5-trisphosphate and an activator of protein kinase C.** Biol. Reprod. 48:1252-1257.

Edwards, H.E.; Tweedie, Ch. J.; Terranova, P.F.; Lisk, R.D.; Wynne-Edwards, K.E. 1998. **Reproductive aging in the Djungarian hamster, Phodopus campbelli.** Biol. Reprod. 58:842-848.

Evans, J.P.; Schultz, R.M.; Kopf, G.S. 1995. **Mouse sperm-egg plasma membrane interaction: analysis of roles de egg integrins and the mouse sperm homologue of PH-30 (fertilin) beta.** J. Cell Sci. 108(10):3267-3278.

Evans, J.P.; Shultz, R.M.; Kopf, G.S. 1998. **Roles of the disintegrin domains of mouse fertilins alfa and beta in fertilization.** Biol. Reprod. 59:145-152.

Forcelledo, M.L.; Vera, R. Croxatto, H.B. 1981. **Ovum transport in pregnant, pseudopregnant, and cycle rats and its relationship to estradiol and progesterone blood levels.** Biol. Reprod. 24:760-765.

Forcelledo, M.L.; De la Cerda, M.L.; Croxatto, H.B. 1986. **Effectiveness of different estrogen pulses in plasma for accelerating ovum transport and their relation to estradiol levels in the rat oviduct.** Endocrinology 119(3):1189-1194.

Fuentealba, B.; Nieto, M.; Croxatto, H.B. 1988. **Estrogen and progesterone receptors in the oviduct during egg transport in cyclic and pregnant rats.** Biol. Reprod. 39(4):751-757.

Gilbert, S.F. 1994. **Development Biology.** Sinauer Associates, Inc. Sunderland, Massachusetts. USA. 4º ed. Pp 725-746.

Hermoso, M.; Villalón, M.; Bavister, B.D.; Magness, R.R. 1996. **Preimplantation hamster embryos produce prostaglandin E2 and platelet activating factor.** Biol. Reprod. 54:80-86.

Herrera, H.F. 1995. **Los gránulos corticales: el bloqueo a la polispermia en mamíferos.** Ciencia 46:371-381.

Hogan, B.; Constantini, F.; Lacy, E. 1986. **Manipulating the mouse embryos.** Cold Spring Harbor Laboratory, New York, EUA. 332 pp.

Johnson, M.H.; Ziomek, C.A. 1981. **Induction of polarity in mouse 8-cell blastomeres: specificity, geometry, and stability.** J. Cell Biology 91;303-308.

Kendle, K.E.; Lee, B. 1980. **Investigation of the influence of progesterone on mouse embryo transport by using antiprogestational steroids.** J. Reprod. Fert. 58: 252-258.

Kidder, G.M.; Rains, J.; McKeon, J. 1987. **Gap junction assembly in the preimplantation mouse conceptus is independent of microtubules, microfilaments, cell flattening, and cytokinesis.** Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 84(11):3718-3722.

Kozuka, M.; Ito, T.; Hirose, S.; Tkahashi, K.; Hagiwara, H. 1989. **Endothelin induces two types of contractions of rat uterus: phasic contractions by way of voltage-dependent calcium channels and developing contractions through a second type of calcium channels.** Biochem. and Biophys. Research Comm. 159(1):317-323.

LaPolt PS, Day JR, Lu JK. 1990. **Effects of estradiol and progesterone on early embryonic development in aging rats.** Biol. Reprod. 43(5):843-50

LaPolt, P.S; Matt, D.W.; Lu, J.K.H. 1998. **Progesterone implants delayed age-related declines in regular estrous cyclicity and the ovarian follicular reserve in Long-Evans rats.** Biol. Reprod. 59:197-201.

Loeser, Ch. R.; Tulsiani, D.R.P. 1999. **The role of carbohydrates in the induction of the acrosome reaction in mouse spermatozoa.** Biol. Reprod. 60:94-101.

Martinez, P.S.; Franchi, A.M.; Viggiano, J.M.; Herrero, M.B.; Gimeno, M. 1998. **Effect of prostaglandin F2 alpha (PGF2 alpha) on oviductal nitric oxide synthase (NOS) activity: possible role of endogenous NO on PGF2 alpha-induced contractions in rat oviduct.** Prostaglan. Other Lipid Mediat 56(2-3):155-166.

Martinez, S.P; Viggiano, M.; Franchi, A.M.; Herrero, M.B.; Ortiz, M.E.; Gimeno, M.F.; Villalón, M. 2000. **Effect of nitric oxide synthase inhibitors on ovum transport and oviductal smooth muscle activity in the rat oviduct.** J. Reprod. and Fert. 118: 111-117.

Matt, D.W.; Sarver, P.L.; Lu, J.K.L. 1987. **Relation of parity and estrous cyclicity to the biology of pregnancy in aging female rats.** Biol. Reprod. 37: 421-430.

Mayor, R.; Izquierdo, L. 1994. **Morulae at compaction and the pattern of protein synthesis in mouse embryos.** *Differentiation* 55(3):175-184.

Mizoguchi, H.; Dukelow, W.R. 1981. **Fertilizability of ova from young or old hamster after spontaneous or induced ovulation.** *Fert. and Ster.* 35(1): 79-83.

Moomjy, M.; Colombero, L.T.; Veeck, L.L.; Rosenwaks, Z.; Palermo, G.D. 1999. **Sperm integrity is critical for normal mitotic division and early embryonic development.** *Mol. Hum. Reprod.* 5(9):836-844.

Murray, M.K.; Messinger, S.M. 1994. **Early embryos development in the Djungarian hamster (*Phodopus sungorus*) is accompanied by alterations in the distribution and intensity of an estrogen (E2)-dependent oviduct glycoprotein in the blastomere membrane and zona pellucida and in its association with F-actin.** *Biol. Reprod.* 51:1126-1139.

Myles, D.G.; Primakoff, P. 1997. **Why did the sperm cross the cumulus? To get to the oocyte. Functions of the sperm surface proteins PH-20 and fertilin in arriving at, and fusing with, the egg.** *Biol. Reprod.* 56:320-327.

Nass, T.E.; Lapolt, P.S.; Judd, H.L.; Lu, J.K.H. 1984. **Alterations in ovarian steroid and gonadotrophin secretion preceding the cessation of regular oestrous cycles in ageing female rats.** *J. Endocr.* 100:43-50.

Navarro M., M.C., Ambriz, G.D., Mundo, R.E., Trejo, C. A., Hernández, P.O., Rosado, G.A. 2000. **Desarrollo embrionario temprano en el hámster sirio dorado.** *Acta Zool. Mex.(n.s)* 81:105-115.

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

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

Orihuela, A.P.; Croxatto, H.B. 2001b. **Acceleration of oviductal transport of oocytes induced by estradiol in cycling rats is mediated by nongenomic stimulation of protein phosphorylation in the oviduct.** *Biol. Reprod.* 65:1238-1245.

Orsini, M. 1961. **The external vaginal phenomena characterizing the stages of the estrous cycle, pregnancy, pseudopregnancy, lactation, and the anestrus hamster, *Mesocricetus auratus*.** *Water house. Proc. Anim. Care Panel* 11:193.

Ortega-Moreno, J. 1995. **Influence of prostaglandin E2 y F2 alpha on passage pressure across the uterotubal junction and isthmus in the rat.** Lab. Anim. 29(3):327-334.

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

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

Ortiz, M.E.; Lladós, C.; Croxatto, H.B. 1989. **Embryos of different ages transferred to the rat oviduct enter the uterus at different times.** Biol. Reprod. 41:381-384.

Palermo, G.D.; Colombero, L.T.; Rosenwaks, Z. 1997. **The human sperm centrosome is responsible for normal syngamy and early embryonic development.** Rev. Reprod. 2(1):19-27.

Palmer, R.M.J.; Ferrige, A.G; Moncada, S. 1987. **Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor.** Nature 327: 524-526.

Parkening, T.A.; Soderwall, A.L. 1975. **Delayed fertilization and preimplantation loss in senescent golden hamster.** Biol. Reprod. 12:618-631.

Rasweiler, J.J. 1979. **IV. Differential transport of embryos and degenerating ova by oviduct of the long-tongued bat *Glossophaga soricina*.** J. Reprod. Fertil. 55:329-334.

Ríos, M; Orihuela, A.P.; Croxatto, H.B. 1997. **Intraoviductal administration of ribonucleic acid from estrogen-treated rats mimics the effect of estrogen on ovum transport.** Biol. Reprod. 56:279-283.

Rosselli, M.; Imthurn, B.; Macas, E.; Keller, P.J. and Dubey, R.K. 1994. **Endogenous nitric oxide modulates endothelin-1 induced contraction of bovine oviduct.** Biochem. and Biophys. Research Comm. 201(1):143-148.

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

Shalgi, R.; Matityahu, A.; Nebel, L. 1986. **The role of carbohydrates in sperm-egg interaction in rat.** Biol. Reprod. 34:446-452.

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

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

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

Thaler, D.C.; Cardullo, A.R. 1996. **The initial molecular interaction between mouse sperm and zona pellucida is a complex binding event.** The American Society for Biochemistry and Molecular Biology 27(38):23289-23297.

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

Tulsiani, D.R.; Abou-Halia, A.; Loeser, C.R.; Pereira, B.M. 1998. **The biological and functional significance of the sperm acrosome and acrosomal enzymes in mammalian fertilization.** Exp. Cell Res. 240(2):151-164.

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

Velasquez, L.A.; Ojeda, S.R.; Croxatto, H.B. 1997. **Expression of platelet-activating factor receptor in the hamster oviduct: localization to the endosalpinx.** J. Reprod. Fertil. 109:439-354.

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

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

Vom Saal, F.S.; Finch, C.E.; Nelson, J.F. 1994. **Natural history and mechanisms of reproductive aging in humans, laboratory rodents, and other selected vertebrates.** En : Knobil, E, Neill, J.D (eds), The Physiology of Reproduction. New York: Raven Press; pp1213-1314.

Wassarman, P.M. 1987. **The biology and Chemistry of fertilization.** Science 235:553-560.

Wassarman, P.M. 1992. **Mouse gamete adhesion molecules.** Biol. Reprod. 46:

Wassarman, P.M. 1992. **Mouse gamete adhesion molecules**. Biol. Reprod. 46: 186-191.

Waters, S.I.; White. 1997. **Biochemical and molecular characterization of bovine fertilin alfa and beta (ADAM1 and ADAM2): a candidate sperm-egg binding/fusion complex**.

Weber, J.A.; Freeman, D.A.; Vanderwall, D.K.; Wooda, G.L. 1991. **Prostaglandin E2 hastens oviductual transport of equine embryos**. Biol. Reprod. 45:544-546.

Wijayagunawardane, M.P.; Choi, Y.H.; Miyamoto, A.; Kamishita, H.; Fujimoto, S. Takagi, M.; Sato, K. 1999a. **Effect of ovarian steroids and oxytocin on the production of prostaglandin E2, prostaglandin F2 alpha and endothelin-1 from cow oviductal epithelial cell monolayers in vitro**. Animal Reprod. Sci. 56:11-17.

Wijayagunawardane, M.P.; Miyamoto, A.; Sato, K. 1999b. **Prostaglandin E2, prostaglandin F2 alpha and endothelin-1 production by cow oviductal epithelial cell monolayers: effect of progesterone, estradiol 17 beta, oxyticin and luteinizing hormone**. Theriogenology 52(5):791-801.

Wright, S.J. 1999. **Sperm nuclear activation during fertilization**. Curr. Top Dev. Biol. 46: 133-178.

Wu, J.T.; Dickman, Z.; Johnson, D.C. 1971. **Effects of oestrogen and progesterone on the development, oviductual transport and uterine retention of eggs in hypophysectomized pregnant rats**. J. Endocrinol. 51:569-574.