

Efecto de la edad materna en la expresión de cadh-E en embriones de hámster de 4 y 6 células

Víctor Campos Neria¹, Alejandra Serrato Díaz², Francisco Fierro³, Alfredo Trejo Córdova⁴, Adolfo Rosado García⁴, Demetrio Ambriz García⁴ y María del Carmen Navarro Maldonado^{4*}

Departamento de Producción Agrícola y Animal¹, Laboratorio Divisional de Biología Molecular²,
Departamento de Biotecnología³, Departamento de Biología de la Reproducción⁴

Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco¹, Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa^{2,3,4}
Cd de México, DF; México

[lion_sharpey, atrejo109]@hotmail.com, [alej, deme] @xanum.uam.mx, [deffff, *carmen.navarro2006] @yahoo.com,
adolfo.rosado@gmail.com

Abstract— Adult Nulliparous (AN) hamster females show delayed asynchronous early embryo development vs. Young Nulliparous (YN), related to the distribution and location of E-cadherin (E-cadh), since 4 and 6-cell NA embryos have the third part of the distribution found in YN embryos. In order to know whether these differences relate the E-cadh expression, we evaluated it in YN and AN 4 and 6-cell embryos, by RT-PCR. Results showed that, expression of E-cadh is lower for NA 4-cell embryos (ratio 0.67), but similar for 6-cell embryos (ratio of 0.94). We concluded that E-cadh expression affect its location and distribution explaining the delay and asynchrony of early embryonic development.

Keyword— *adhesion, E-cadherin, asynchrony, embryo development, hamster*.

Resumen- Las hembras hamster nulíparas adultas (NA), muestran retraso y asincronía del desarrollo embrionario temprano vs. nulíparas jóvenes (NJ), relacionado con la distribución y localización de Cadherina-E (Cadh-E), pues los embriones de 4 y 6 células de NA tienen la tercera parte de la distribución encontrada en NJ. Para conocer si estas diferencias se relacionan con la expresión de Cadh-E, la evaluamos en embriones de 4 y 6 células de NJ y NA, por RT-PCR. Los resultados mostraron menor expression de Cadh-E en embriones de 4 células de NA (razón de 0.67), pero similar en embriones de 6 células (razón de 0.94). Concluimos que la expression de Cadh-E afecta su localización y distribución explicando el retraso y asincronía del desarrollo embrionario temprano.

Palabras clave- *adhesión, Cadherina-E, asincronía, desarrollo embrionario, hámster*

I. INTRODUCCIÓN

Durante el desarrollo embrionario preimplantacional, ocurren varios eventos importantes que tienen como consecuencia una adecuada comunicación intercelular para la interacción de los blastómeros en la construcción citoarquitectónica armónica y viable del embrión y posteriormente del feto. Uno de estos eventos es la compactación celular, que proporciona las condiciones adecuadas para que ocurra la primera diferenciación celular en el desarrollo de los mamíferos [1].

La compactación del embrión está precedida y seguida de cambios estructurales y funcionales entre cada blastómero. Por ejemplo, hay un aumento en los sitios de adhesión dependientes de moléculas de adhesión como la cadherina-E [2] y una marcada modificación en la distribución de diferentes componentes de la superficie celular (polarización), dando como resultado una unión más íntima entre blastómeros y, por ende, su compactación [3].

Dado que la compactación es un proceso que está relacionado con el adecuado desarrollo del embrión [4], su inicio es controlado y regulado a través de varias moléculas y estructuras celulares, tales como las moléculas de adhesión dependientes de calcio, conocidas como cadherinas. A través de estudios realizados tanto *in vitro* como *in vivo*, se ha establecido que la cadherina-E (Cadh-E), es una glicoproteína transmembranal de 120 kDa que es sintetizada por el embrión a partir de la etapa de la

segmentación embrionaria de dos blastómeros y se sabe que participa en las uniones adherentes entre ellos, restringiéndose su ubicación a los sitios de contacto entre blastómeros adyacentes [5].

La Cadh-E forma complejos de adhesión integrados por proteínas conocidas como cateninas (alfa, beta y gamma). A través de su dominio intracelular, la Cadh-E se une a la catenina β formando un complejo de adhesión, y a su vez se une con las otras cateninas que sirven como intermediarias para la unión de la cadherina con los filamentos de actina del citoesqueleto [6, 7]. En su dominio extracelular las moléculas de Cadh-E interaccionan entre sí en homodímeros que a su vez se unen a otros similares situados en células adyacentes, formando complejas redes de enlaces entre cadherinas. Para que estas uniones sean estables se necesita la presencia extracelular de una determinada concentración de calcio [8].

Además de actuar como molécula de adhesión, se ha propuesto que la Cadh-E participa en complejas acciones de señalización, probablemente a través de las vías de la familia Rho de pequeñas GTPasas, de la Wnt y de receptores tirosina-cinasa [9, 10]. En estudios realizados en nuestro laboratorio, se observó que las hembras hámster sirio dorado (*Mesocricetus auratus*) nulíparas adultas (NA) muestran un desarrollo embrionario temprano retrasado y asincrónico en comparación con las hembras nulíparas jóvenes (NJ). Trejo *et al.* [11, 12] publicaron que estas diferencias están relacionadas con la distribución y localización de la Cadh-E, ya que la distribución de esta molécula es irregular en los embriones de hembras hámster nulíparas adultas (NA) y multíparas (M) con respecto a los de hembras nulíparas jóvenes (NJ). En estas últimas, la molécula se localiza y distribuye específicamente en los sitios de unión entre las células de los embriones de 4, 6 y 8 blastómeros, mientras que en las primeras está localizada preferentemente en el citoplasma. Esto implica que, los cambios relacionados con la edad y paridad de la hembra, se correlacionan con los cambios en los procesos de adhesión celular durante la segmentación embrionaria temprana.

En los estudios de Trejo *et al.* [11, 12] se observó que, el desarrollo embrionario preimplantacional *in vivo* es diferente entre hembras adultas y jóvenes, nulíparas y multíparas. Dicho desarrollo es asincrónico tanto en hembras adultas nulíparas como multíparas y sincrónico en hembras jóvenes nulíparas. Esto porque, siendo el hámster una especie politoca, a las 62h de gestación en que fueron obtenidos los embriones, en las hembras adultas nulíparas y multíparas había embriones en 3 a 4 etapas de desarrollo embrionario simultáneas, mientras que en las hembras jóvenes nulíparas, solo se colectaban embriones en una sola etapa de la segmentación. También se observó que el transporte oviductal variaba entre tipos de hembras, ya que los embriones de 8 células se colectaban preferentemente de oviducto en las hembras jóvenes nulíparas y de útero en las adultas nulíparas y multíparas. Queriendo encontrar una posible explicación para estas diferencias observadas en la segmentación y el transporte embrionario según la edad y paridad de las hembras, se evaluaron los patrones de distribución y localización de una molécula responsable de la diferenciación embrionaria, la Cadh-E, y se encontró que también había diferencias relacionadas con la edad y paridad de las hembras. Con la finalidad de conocer si las diferencias establecidas en los patrones de distribución y localización de Cadh-E en los embriones de hembras jóvenes y adultas, se relacionan con la expresión del mensajero de Cadh-E, en el presente estudio se evaluó su expresión en embriones de 4 y 6 células de hembras hámster NJ (2 meses de edad) y NA (8 meses de edad), mediante RT-PCR.

II. MATERIAL Y METODOS

A. Animales, condiciones y monitoreo del ciclo estral

Se utilizaron 12 hembras hámster sirio dorado (*Mesocricetus auratus*) divididas en 2 grupos experimentales: El primero con 6 hembras nulíparas jóvenes (NJ) de 2 meses de edad y peso promedio de 128 g. El segundo con 6 hembras nulíparas adultas (NA) de 8 meses de edad y un peso promedio de 168 g. Se consideraron las edades (jóvenes y adultas) tomando como base que la vida promedio en cautiverio del hámster sirio dorado va de 1 año y medio a 2 años 4 meses de edad [13, 14]. Ambos grupos se mantuvieron a 26 °C, fotoperiodo de 14 horas luz por 10 de oscuridad y se alimentaron *ad libitum* con nutricubos Harlan y agua. Solo se utilizaron las hembras que mostraron estricta regularidad en la duración de sus ciclos estrales a través de análisis secuenciales de citología vaginal exfoliativa efectuada durante 12 días (3 ciclos de 4 días cada uno) y en las que, 10 horas después de la imagen clara del proestro, se produjo la aparición de abundante secreción vaginal postovulatoria indicadora del final de la fase de estro. Tres horas después del proestro (8 h antes de la aparición de secreción vaginal abundante) las hembras fueron colocadas individualmente con machos de fertilidad y experiencia comprobadas para el apareamiento durante 15 minutos. El momento de la ovulación fue determinado tomando como base la presencia clara del proestro. La ocurrencia del coito se estableció por observación directa de la conducta de la pareja y se verificó bajo el microscopio por la presencia de espermatozoides en el contenido vaginal [15, 16].

B. Obtención de embriones de 4 y 6 células

Siguiendo la metodología descrita por Navarro *et al.* (2000) y Trejo *et al.* (2008), a las 36 y 48 horas después del coito, las hembras fueron eutanasiazadas por dislocación cervical en el Laboratorio de Reproducción Animal Asistida. El manejo de los animales de bioterio se apegó estrictamente a los requisitos que figuran en el Documento del Comité de Ética de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa. Se disecaron sus oviductos (hasta el segmento intramural) y sus ovarios. Los oviductos-úteros fueron perfundidos bajo el microscopio estereoscópico, con una jeringa de insulina y aguja punta roma calibre 29, con 1 mL de una solución DPBS (*Dulbecco Phosphated Buffered Saline*, In Vitro, S.A.) 1x libre de Ca^{2+} y Mg^{2+} , colectando los embriones en cajas de cultivo de 4 pozos (Nunc) que contenían 200 μL de DPBS 1x por pozo. Los embriones se contaron y se determinó su etapa de segmentación bajo el microscopio invertido. Se lavaron tres veces en medio DPBS 1x nuevo y se colocaron 12 embriones por microtubo de centrífuga (0.2 mL) con 10 μL del buffer de resuspensión del kit SuperScriptTM III Platinum CellDirect Two-Step qRT-PCR (*InvitrogenTM, LifeTechnologies*). Los microtubos fueron colocados en hielo Frappé y trasportados al Laboratorio Divisional de Biología Molecular, donde se analizó la expresión de Cadh-E.

C. Lisis celular y tratamiento con DNasa I

Siguiendo las instrucciones del proveedor del kit SuperScriptTM III Platinum CellDirect Two-Step qRT-PCR (*InvitrogenTM, LifeTechnologies*), se lavaron los embriones centrifugándolos 2 veces a 500 x g durante 5 minutos y descartando el sobrenadante. Se adicionaron 10 μL del buffer de resuspensión en cada lavado y se efectuó la digestión enzimática con DNasa I grado amplificación (1 U/ μL) para eliminar trazas de ADN genómico. Se dejaron en 10 μL del buffer más 1 μL de solución Lisis Enhancer. Se incubaron los tubos en un termociclador Corbett Research precalentado a 75 °C por 10 minutos. A cada tubo se le añadieron 5 μL de DNasa I grado amplificación (1 U/ μL) más 1.6 μL de buffer DNasa I

10x, y 25 μ L de EDTA 25 mM, y se incubaron a 70 °C por 10 minutos, para proceder a continuación con la reacción de síntesis de ADNc.

D. Transcripción reversa para la síntesis de ADN complementario (ADNc)

Se realizó una transcripción reversa (RT) para obtener el ADNc a partir del ARNm (ARN mensajero) del gen que codifica para Cadh-E. A cada tubo se le agregaron 20 μ L de RT Reaction Mix más 2 μ L de RT Enzyme Mix, se colocaron en el termociclador precalentado a 25 °C durante 10 minutos y se incubaron a 50 °C por 20 minutos. La actividad retrotranscriptasa se detuvo aumentando la temperatura a 85 °C por 5 minutos. Se añadió 1 μ L de RNasa H (2 U/ μ L) a cada tubo y se incubaron a 37 °C por 20 minutos para eliminar restos de ARN contaminante. Se detuvo la reacción en hielo, se cuantificó el ADNc en un espectrofotómetro NanoDrop 2000, se diluyeron las muestras a 20 ng/ μ L y se almacenaron los tubos a -20 °C.

E. Cuantificación de la expresión génica por PCR

Utilizando cebadores específicos para el gen de Cadh-E, se llevaron a cabo reacciones de PCR con cada una de las muestras de ADNc para evaluar la cantidad de transcripto presente en las mismas. Se utilizó una mezcla de reacción a base de 10 μ L de Master Mix 2x qPCR (Kit Invitrogen), 5 μ L de agua grado biología molecular, 1 μ L de cebador forward y reverse para Cadherina-E y otro para GAPDH (Tabla 1), 1 μ L de MgCl₂ y 5 μ L del ADNc de cada muestra, para un volumen final de 20 μ L. En primer lugar se desnaturizó el ADNc mediante incubación a 50 °C por 2 minutos seguido de 95 °C por 5 minutos. El templado fue amplificado en 40 ciclos (95 °C por 15 s; 56 °C por 30 s; 72 °C por 15 s), en un termociclador Corbett Research. Para normalizar los resultados se utilizó el gen de expresión constitutiva Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) [17].

F. Coloración y visualización del ADN en gel de agarosa

El resultado de la PCR se visualizó por electroforesis en un gel de agarosa al 2 %, cargando en cada pozo del gel 3 μ L de tampón de carga y 6 μ L de la reacción de PCR de cada muestra. Las condiciones de electroforesis fueron: 90 volts, 500 mA, durante 110 minutos. Para la visualización de las bandas de ADN se utilizó 0.5 μ L de Gel Red Mix PCR en agarosa aún líquida, y un marcador de peso molecular de 50-2000 pares de bases para identificar el fragmento amplificado de 86 pb del gen Cadh-E. Una vez terminada la electroforesis, se visualizó el gel en un transiluminador con luz UV, y se analizaron cuantitativamente los resultados de la intensidad de la fluorescencia de cada muestra mediante el programa Image J (analizador de imagen que determina el área de cada curva que es proporcional a la intensidad de cada banda).

G. Análisis estadístico

Las reacciones de PCR de cada muestra se hicieron por triplicado, y se realizaron tres electroforesis diferentes con los ADN amplificados de cada repetición. Los resultados se sometieron a una prueba de Kruskall Wallis con un nivel de significancia de $p < 0.05$.

III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El objetivo de la investigación fue determinar si existen diferencias en la expresión del mensajero de Cadh-E, molécula determinante para la adhesión, compactación y diferenciación embrionaria, entre embriones de diferente etapa de segmentación (4 y 6 células) provenientes de hembras hámster sirio dorado de diferente edad, que pudieran explicar las diferencias en los patrones de distribución y

localización transmembranal de Cadh-E relacionadas con la edad y paridad de las hembras (nulíparas jóvenes NJ o nulíparas adultas NA), encontradas en estudios previos [11, 12]. Además de explicar el retraso en el transporte y la asincronía en el desarrollo embrionario *in vivo* observado en hembras adultas nulíparas y multíparas, al compararlas con las hembras jóvenes nulíparas [18].

Para lograrlo, el ADN complementario fue amplificado y analizado por densitometría en embriones de 4 y 6 células.

La tabla 1 muestra los cebadores utilizados en el análisis de la expresión **génica** de cadherina-E y del gen constitutivo (GAPDH). Se observó que todos los embriones expresan Cadh-E independientemente de la edad de las hembras (Figura 1). Los resultados integrados del análisis de todos los geles obtenidos se muestran en la Figura 2, Las barras muestran el promedio del área bajo la curva (\pm EE). Se observa diferencia significativa entre los embriones de 4-células de hembras NJ versus los embriones de 6-células en NJ y de 4- y 6-células en NA (Kruskall Wallis, $P < 0.05$), indicando que la expresión de Cadh-E fue significativamente menor ($p < 0.05$) en los embriones de 4 células de las hembras NA comparándolas con las NJ (razón de 0.67), sin embargo, fue similar para ambos tipos de hembras en los embriones de 6 células (razón de 0.94). El carril A indica el marcador de peso molecular, el carril B indica embriones de 4-células de hembras nulíparas jóvenes (NJ), el carril C indica embriones de 6-células de hembras nulíparas jóvenes (NJ), el carril D indica embriones de 4-células de hembras nulíparas adultas (NA) y el carril E indica embriones de 6-células de hembras nulíparas adultas (NA). (pb: pares de bases).

Tabla 1. Cebador PCR utilizado en el análisis de la expresión génica de cadherina-E.

| Gen | Secuencia del Cebador | |
|-------------|-----------------------|--------------------------------|
| Cadherina-E | Forward | 5' TCCCTGGCACCACTAATGG 3' |
| | Reverse | 5' TGCCAAATGAAGACCTGTTACAAG 3' |
| GAPDH | Forward | 5' AAGGCCATCACCATCTTCCA 3' |
| | Reverse | 5' AAGGCCATCACCATCTTCCA 3' |

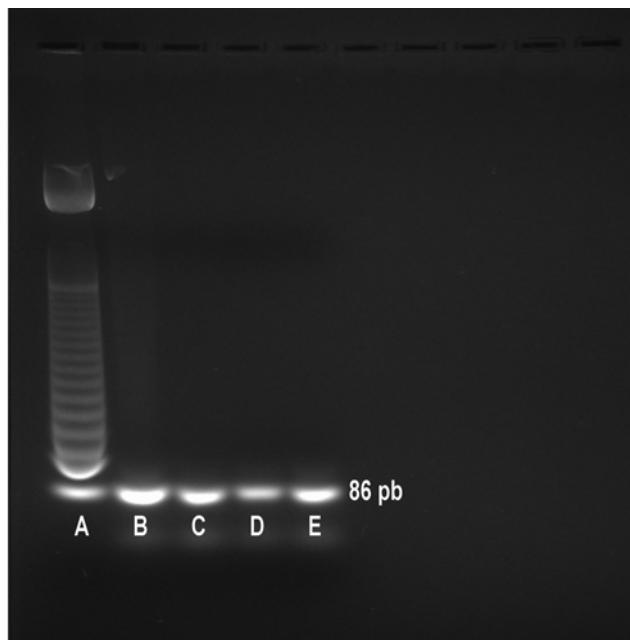


Fig. 1. Gel de agarosa que muestra resultado de PCR para medir la expresión de cadherina-E.

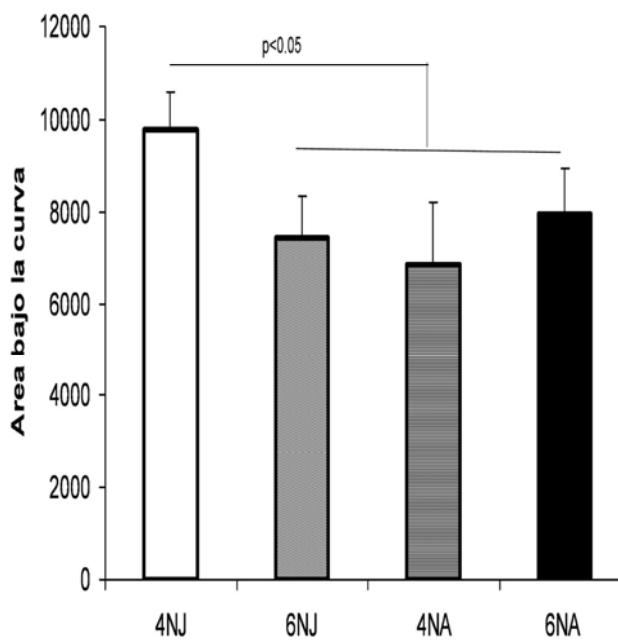


Figura 2. Expresión de cadherina-E en embriones de hámster nulíparas jóvenes (NJ) y adultas (NA).

Las cadherinas están relacionadas con diversos eventos que regulan el desarrollo embrionario, como la adhesión celular dependiente de calcio y la comunicación celular mecánica y química, la compactación embrionaria, la diferenciación celular y la morfogénesis, la segregación espacial de la masa celular interna y la formación del primer tejido diferenciado, el trofoectodermo. La regulación

adecuada de la adhesión celular es esencial para la formación de este último y la implantación del embrión en el útero [19, 20, 7].

A pesar de que el ovocito esté detenido en la Profase I de la segunda división meiótica, permanece transcripcionalmente activo almacenando gran cantidad de ARNm y las proteínas necesarias para su desarrollo temprano [21]. Durante la primera fase del desarrollo embrionario, el ARNm materno es reemplazado por transcriptos originados a partir del genoma embrionario [22]. Esta activación del genoma embrionario ocurre en la etapa de dos células en el hámster [23] y es esencial para sintetizar nuevas proteínas requeridas para que las siguientes divisiones celulares se lleven a cabo [24].

Es así que la Cadh-E es derivada maternalmente del ovocito, su expresión inicia en la etapa embrionaria de dos células y es esencial en el proceso de compactación del embrión de hámster en el estadio de ocho a diecisésis células [25]. Una vez ocurrida la activación del genoma embrionario, toma lugar la traducción del ARNm para la síntesis de proteínas. Una parte de la Cadh-E es almacenada en el citoplasma y otra parte es transportada a la membrana celular donde se establece como una proteína transmembranal con dominios citoplasmáticos y extracelulares, estos últimos, encargados de unirse a otras proteínas de las células adyacentes [26]. Su localización varía durante el desarrollo embrionario distribuyéndose en la membrana celular en las etapas previas a la de 8 células, para luego comenzar a acumularse en las uniones célula a célula preferentemente en las regiones basolaterales durante las etapas tardías en embriones de ratón [20].

Trejo *et al.* [11, 12] evidenciaron la presencia y distribución de Cadh-E en embriones de hámster sirio dorado (*Mesocricetus auratus*) de 4, 6 y 8 blastómeros procedentes de hembras NJ y NA, así como multíparas (M). Encontraron que las dos últimas tienen un comportamiento similar en esas variables de estudio, y que presentaron diferencias sustanciales con las primeras. Es de destacar de esos trabajos que, la integración de escaneos longitudinales de cuantificación de fluorescencia de microscopía confocal en los embriones de 4 y 6 células de hembras NJ, pasaron de 6.2 a 8.3 en promedio, lo que representa un aumento de 33 % en la síntesis de Cadh-E, para lo cual requiere utilizarse ARNm ya formado. En contraste, en el presente trabajo se observó que la expresión de Cadh-E disminuyó en embriones de 4 a 6 blastómeros en una proporción que correspondería a unos valores de intensidad de fluorescencia de 10,500 a 8,250, lo que supone una disminución del 20 %, indicando la necesidad de síntesis de nuevas moléculas producto de la activación temprana del genoma embrionario. Aunado a lo anterior, Trejo *et al.* [12] reportan que los embriones de hembras NA tienen una cantidad similar de Cadh-E desde 4 a 6 blastómeros (1,9 vs 2,3), lo que también contrasta con el presente trabajo para la expresión del gen (7,000 vs. 7,900).

En el presente trabajo se observa que la Cadh-E se expresa en embriones de hámster de 4 y 6 células, lo cual coincide con lo reportado para otras especies tales como bovino [27], rata [28] y humano [25].

Sin embargo, la expresión de Cadh-E es ligeramente mayor en los embriones de 4 blastómeros de las hembras NJ (0,5 veces) y prácticamente igual en los embriones de 6 blastómeros.

Durante el desarrollo embrionario, un número importante de transcriptos para la proliferación celular, cavitación y formación del blastocisto se acumulan durante la activación del genoma embrionario, estas proteínas servirán posteriormente para la compactación [29]. En este trabajo, la cantidad de Cadh-E expresada en la etapa de 4 células es menor en embriones de hembras NA que de hembras NJ, lo cual podría sugerir que la cantidad de esta molécula de adhesión no es la adecuada durante la activación del genoma embrionario.

Una expresión inadecuada de Cadh-E puede causar una adhesión celular disfuncional, afectar la compactación, diferenciación y pluripotencialidad embrionaria, como reportan Shirazi *et al.* [30] en embriones de ovino producidos *in vitro* a partir de ovocitos sometidos a criopreservación.

Es probable que las diferencias observadas en la expresión de Cadh-E entre embriones de hembras de diferente edad (jóvenes vs. adultas) pueda explicar las diferencias en la localización y distribución de

esta molécula, lo que a su vez explique la asincronía y retraso en el desarrollo y en el transporte de los embriones de hembras hámster de edad avanzada [16, 18, 11, 12]. Esto podría influir en el aumento de la duración del periodo total de gestación y la disminución de la eficiencia reproductiva, como lo señaló Soderwall *et al.* [31].

IV. CONCLUSIONES

Se concluye que la expresión de Cadh-E ocurre en las etapas de 4 y 6 células en embriones de hembras nulíparas jóvenes y adultas, que en embriones de 4 células de hembras nulíparas adultas la expresión de Cadh-E disminuye en comparación con las otras etapas, lo cual podría estar relacionado con las diferencias en la localización y distribución de esta molécula de adhesión embrionaria y que esto quizás explica el retraso y la asincronía en el desarrollo embrionario temprano observado en hembras hámster (*Mesocricetus auratus*) nulíparas adultas.

V. REFERENCIAS

- [1] Li, C.B., Hu, L.L., Wang, Z.D., Zhong, S.G. and Lei, L. 2009. Regulation of compaction initiation in mouse embryo. *Yi Chuan* 31(12): 1177-1184.
- [2] Fierro-González, J.C., White, M.D., Silva, J.C and Plachta, N. 2013. Cadherin-dependent filopodia control preimplantation embryo compaction. *Nature Cell Biology* 15: 1424-1433.
- [3] Nance, J. 2014. Getting to know your neighbour: cell polarization in early embryos. *Cell Biology in Development* 206: 823-832.
- [4] Le Cruquel, S., Ferré-L'Hôtellier, V., Morinière, C., Lemerle, S., Reynier, P., Descamps, P and May-Panloup, P. 2013. Early compaction at day 3 may be a useful additional criterion for embryo transfer. *Journal Assisted Reproduction and Genetics* 30: 683-690.
- [5] Nagafuchi, A., Shirayoshi, Y., Okazaki, K., Yasuda, K and Takeichi, M. 1987. Transformation of cell adhesion properties by exogenously introduced E-cadherin cDNA. *Nature* 329: 341-43.
- [6] Aberle, H.H and Schwartz, K.R. 1996. Cadherin-catenin complex: protein interactions and their implications for cadherin function. *Journal Cell Biochemistry* 61: 514-523.
- [7] Röper, K. 2015. Integration of cell-cell adhesion and contractile actomyosin activity during morphogenesis. *Current Topics in Developmental Biology*, Elsevier Inc (ed) 4: 103-127.
- [8] Koch, A.W., Manzur, K.L and Shan, W. 2004. Structure-based models of cadherin-mediated cell adhesion: The evolution continues. *Cell Molecule Life Science* 61: 1884-1895.
- [9] Ivanov, D.B., Philippova, M.P and Thachuk, V.A. 2001. Structure and functions of classical cadherins. *Biochemistry* 66: 1174-1186.
- [10] van Roy, F and Berx, G. 2008. The cell-cell adhesion molecule E-cadherin. *Cell Molecular Life Science* 65: 3756-88.
- [11] Trejo, C.A., Navarro, M.C.M., Jiménez, F and Rosado, A.G. 2006. Effect of maternal age and parity on the presence and distribution of E-cadherin in hamster embryos during preimplantation development and transport. *Reproduction, Fertility and Development* 18: 181.
- [12] Trejo, C.A., Ambriz, D.A.G., Navarro, M.C.M., Mercado, E.P and 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: 272-275.
- [13] Kamino, K., Tillmann, T and Mohr, U. 2001. Spectrum and age-related incidence of spontaneous tumours in a colony of Han: AURA hamsters. *Experimental and Toxicologic Pathology* 52: 539-544.
- [14] Gerrits, P. O., de Weerda, H., van der Want, J. J. L., Kortekaas, R., Luitend, P. G. M and Veening, J. G. 2010. Microvascular changes in estrogen- sensitive brainstem structures of aging female hamsters. *Neuroscience Research* 67: 267-274.

- [15] Blaha, G.C. 1964. Effect of age of the donor and recipient on the development of transferred golden hamster ova. *Anatomical Record* 150: 413-416.
- [16] Navarro, M.M.C., Ambríz, D.A.G., Mundo, E.R., Trejo, A.C., Hernández, O.P and Rosado, A.G. 2000. Desarrollo embrionario temprano en el hámster sirio dorado, *Mesocricetus auratus* (Mammalia: rodentia). *Acta Zoológica Mexicana* (Nueva Serie) 81: 105-115.
- [17] Cinar, M.U., Islam, M.A., Pröll, M., Kocamis, H., Tholen, E., Tesfaye, D., Looft, C., Schellander, K and Uddin, M.J. 2013. Evaluation of suitable reference genes for gene expression studies in porcine PBMCs in response to LPS and LTA. *BMC Research Notes* 6: 56.
- [18] Trejo, C.A., Navarro, M.C.M., Ambriz, D.A.G and Rosado, A.G. 2005. Effect of maternal age and parity on preimplantation embryo development and transport in the golden hamster (*Mesocricetus auratus*). *Laboratory Animal* 39: 290-297.
- [19] Wallinford, M.C., Jesse, R.A and Jesse, M. 2013. Morphogenetic analysis of peri-implantation development. *Developmental Dynamics* 242: 1110-1120.
- [20] White, M.D and Plachta, N. 2015. Adhesion in the early mouse embryo. *Current Topics in Developmental Biology*, Elsevier Inc (ed): 1-17.
- [21] Minami, N., Suzuki, T and Tsukamoto, S. 2007. Zygote gene activation and maternal factors in mammals. *Journal Reproduction Development* 53: 707-715.
- [22] Latham, K.E and Schultz, R.M. 2001. Embryonic genome activation. *Frontiers in Bioscience* 6: D748-759.
- [23] Seshagiri, P.B., Mckenzie, D.I., Bavister, B.D., Williamson, J.L and Aiken, J.M. 1992. Golden hamster embryonic genome activation occurs at the two-cell stage: Correlation with major developmental changes. *Molecular Reproduction and Development* 32: 229-235.
- [24] Memili, E and First, N.L. 2000. Zygotic and embryonic gene expression in cow: a review of timing and mechanisms of early gene expression as compared with other species. *Zygote* 8(1): 87-96.
- [25] Bloor, D.J., Mcalfe, A.D., Rutherford, A., Brison, D.R and Kimler, S.J. 2002. Expression of cell adhesion molecules during human preimplantation embryo development. *Molecular Human Reproduction* 8: 237-245.
- [26] Alikani, M. 2005. Epithelial cadherin distribution in abnormal human pre-implantation embryos. *Human Reproduction* 20: 3369-3375.
- [27] Nganvongpanit, K., Müller, H., Ring, F., Gilles, M., Jennen, D., Höller, M., Tholen, E., Schellander, K and Tesfaye, D. 2006. Targeted suppression of E-cadherin gene expression in bovine preimplantation embryo by RNA interference technology using double-stranded RNA. *Molecular Reproduction Development* 73: 153-163.
- [28] Harrouk, W., Codrington, A., Vinso, R., Robaire, B and Hales, B.F. 2000. Paternal exposure to cyclophosphamide induces DNA damage and alters the expression of DNA repair genes in the rat preimplantation embryo. *Mutation Research* 461: 229-241.
- [29] Kidder, G.M and McLachlin, J.R. 1985. Timing of transcription and protein synthesis underlying morphogenesis in preimplantation mouse embryos. *Developmental Biology* 112: 265-275.
- [30] Shirazi, A., Heidari, M., Shams-Esfandabadi, N., Momeni, A and Derafshian, Z. 2015. Overexpression of signal transducers and activators of transcription in embryos derived from vitrified oocytes negatively affect E-cadherin expression and embryo development. *Cryobiology* 70: 239-245.
- [31] Soderwall A.L., Kent, H.A., Turbyfill, C.L and Britenbaker, A. 1960. Variation in gestation length and litter size of the golden hamster *Mesocricetus auratus*. *Journal Gerontology* 15:246-8.