

00381  
30



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO**

**FACULTAD DE CIENCIAS**  
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

**"ACCION DEL TAMOXIFEN SOBRE EL  
DESARROLLO DEL OVARIO DE  
EMBRION DEL POLLO"**

**T E S I S**  
QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADEMICO DE

**DOCTOR EN BIOLOGIA**

**P R E S E N T A**  
**M. EN C. ALICIA MARTINEZ DORADO**

DIRECTOR DE TESIS:

DR. ENRIQUE ANTONIO PEDERNEA ASTEGIANO

278642

MEXICO, D.F.

2000



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



Este trabajo de tesis se llevó a cabo en el Departamento de Embriología de la Facultad de  
Medicina de la UNAM

Este trabajo está dedicado a la memoria de la Dra. Amelia Sámano Bishop, quien me introdujo y guió por el maravilloso campo de estudio de la Embriología y la Biología del Desarrollo, con todo mi cariño y agradecimiento.

\* \* \*

A la memoria del Lic. Luis Castillo Iglesias, que me enseñó con su ejemplo, el enorme valor de la palabra "profesor".

## AGRADECIMIENTOS.

Dra. Ma. Elena Castillo Romero

Jefa del Departamento de Embriología, por todo el apoyo y amistad que siempre me ha brindado.

Dr. Enrique Pedernera Astegiano.

Coordinador de Investigación del Departamento de Embriología, quien dirigió y revisó este trabajo aportando siempre una visión crítica basada en sus conocimientos y experiencia.

M. en C. Ana Hilda Figueroa Gutierrez

por todo el apoyo técnico y la amistad que me brindó siempre a través de la realización de este trabajo.

M. en C. Alejandro Martínez Mena.

Jefe del Laboratorio de Microcine de la Facultad de Ciencias. Por el difícil y excelente trabajo fotográfico realizado para la toma de las diapositivas de la presentación de esta tesis. Por su amistad y el apoyo que siempre me ha brindado.

Lic. en Diseño Gráfico Laura Gilabert Martínez

por su colaboración en el diseño de la presentación audiovisual de este trabajo y su presentación.

A todos mis compañeros de trabajo, por la amistad y el apoyo que me han mostrado en todos estos años que hemos convivido.

A mis hijos, Pedro José, Juan Carlos y Laura por ser mis mejores publicaciones de las cuales estoy orgullosa. Por su cariño, comprensión y darle sentido a todo lo que he hecho en mi vida.

A José María, mi F2, a través del cual sigo constatando, la expresión maravillosa de los genes, que además de manifestarse normalmente, le dieron inteligencia, belleza y simpatía, a Isabel que es la responsable del 50% de ellos.

A mi padre, quien me mostró desde pequeña cuan maravillosa es la naturaleza y sus manifestaciones.

A mi madre, por enseñarme lo importante que es perseverar, para lograr lo que deseas.

A Marilín, por estar viva y junto con Miguel Ángel, con cariño, compartir siempre conmigo, alegrías y tristezas.

A Carmela, Marisa y Carlos Vicente por su cariño y apoyo.

A la "Familia Martínez" por todo el cariño y apoyo que me han brindado siempre.

A los honorables miembros del Jurado:

PRESIDENTE: Dra. Ma. Del Carmen Uribe Aranzabal.

PRIMER VOCAL: Dra. Guadalupe Trinidad Zavala Padilla.

SEGUNDO VOCAL: Dra. Virginia Inclán Rubio.

TERCER VOCAL: Dra. Ma. Del Carmen Méndez Herrera.

SECRETARIO: Dr. Enrique Pedernera Astegiano.

SUPLENTE: Dra. Marcela Esperanza Aguilar Morales.

SUPLENTE : Dra. Maricela Villagrán Santa Cruz

## INDICE

|   |     |
|---|-----|
| I.-Resumen .....  | 9   |
| II.-Introducción .....  | 11  |
| II.1.- Generalidades del plasma germinal en los vertebrados.....                          | 11  |
| II.2.- Características de las células germinales primordiales en aves y en mamíferos..... | 12  |
| II.3.- Origen y formación de la gónada .....  | 14  |
| II.4.- Expresión génica en la diferenciación sexual.....                                  | 15  |
| II.5.- Diferenciación del ovario .....  | 23  |
| II.6.- Diferenciación del ovario en las aves .....  | 25  |
| II.7.-Ovogénesis.....   | 27  |
| II.8.- Biosíntesis de esteroides en ovario .....  | 28  |
| II.9.- Acción de los esteroides gonadales en el desarrollo del ovario de las aves.        | 32  |
| II.10.- Mecanismo molecular de la respuesta a estrógenos .....                            | 34  |
| II.11.- Receptor a estrógenos en el ovario.....   | 38  |
| II.12.- Características generales de los antiestrógenos.....                              | 40  |
| II.13.- Características, efectos y usos del tamoxifén.....                                | 46  |
| II.14.- Acción del tamoxifén sobre el ovario.....   | 54  |
| III.- Planteamiento del problema.....   | 58  |
| IV.- Objetivos general .....  | 59  |
| V.- Material y métodos.....   | 60  |
| VI.- Resultados.....  | 64  |
| VII.- Discusión.....  | 86  |
| VIII.- Conclusiones.....  | 103 |
| IX.- Perspectivas.....  | 104 |

X.- Anexo Tablas..... 105

XI.- Bibliografía..... 112

## RESUMEN

El tamoxifén es un antiestrógeno utilizado en el tratamiento del cáncer mamario, sin embargo se han descrito efectos agonistas con el  $17\beta$ -estradiol.

En el presente trabajo se evaluó la acción del tamoxifén y el  $17\beta$ -estradiol sobre las subpoblaciones de células de la corteza y la médula del ovario del embrión de pollo y su posible influencia sobre la secreción de hormonas esteroides en este órgano.

Se trataron embriones de pollo de cuatro, cinco y seis días de incubación, divididos en cuatro grupos, el testigo (etanol al 10%), el tratado con tamoxifén recibió  $10\mu\text{g}$  por embrión. Al tercer grupo se le aplicó una dosis de  $600\text{ng}$  por embrión de  $17\beta$ -estradiol y al último grupo se le aplicó un tratamiento combinado de tamoxifén y  $17\beta$ -estradiol en las dosis ya indicadas. Los embriones fueron sacrificados a los diecisiete días de incubación, cuando el ovario ha alcanzado la mayor cantidad de células germinales y secreta hormonas esteroides.

Se evaluaron las modificaciones en las subpoblaciones de células germinales, de células somáticas esteroideogénicas e indiferenciadas, por medio de conteo celular, observación morfológica y morfometría. La secreción hormonal se midió por medio de radioinmunoanálisis.

No se encontró efecto del tamoxifén sobre el peso ni anomalías externas, con  $17\beta$ -estradiol aumentaron las malformaciones en los embriones.

En ningún grupo se observó un efecto sobre las células germinales por lo que probablemente su desarrollo sea independiente de los estrógenos y el tamoxifén.

En el grupo tratado con tamoxifén se observó un aumento en el número de células esteroideogénicas en los embriones tratados en el 4 y 6 días de incubación. En estos mismos días y con el mismo tratamiento tuvimos un aumento significativo en las células indiferenciadas.

El grupo al que se le aplicó  $17\beta$ -estradiol en los diferentes días no mostró ninguna diferencia con respecto al testigo.

Con el tratamiento combinado de tamoxifén y  $17\beta$ -estradiol se encontró un aumento significativo en la población de células somáticas esteroidogénicas en embriones de 5 días y de células somáticas indiferenciadas en embriones de 6 días.

En los estudios morfométricos observamos un aumento en el tamaño de las células prefoliculares de los ovarios que al día 5 fueron tratados con tamoxifén,  $17\beta$ -estradiol y combinados. En las otras subpoblaciones celulares no se encontraron diferencias significativas con relación al grupo testigo en ninguno de los tratamientos.

La evaluación por radioinmunoanálisis de testosterona y  $17\beta$ -estradiol, en condiciones basales no refleja ninguna diferencia. En los estimulados con gonadotropina coriónica humana solamente el grupo tratado con tamoxifén y  $17\beta$ -estradiol combinado dio un aumento significativo en la secreción de  $17\beta$ -estradiol.

Los resultados sugieren que, en nuestro modelo, el tamoxifén tuvo una acción agonista o estrogénica sobre las células somáticas del ovario del embrión de pollo.

## INTRODUCCION.

### GENERALIDADES DE LAS CÉLULAS DEL PLASMA GERMINAL EN LOS VERTEBRADOS.

Las células germinales son las que van a dar la continuidad genética del individuo. En los vertebrados, es aventurado establecer el momento de diferenciación y determinación, pues posiblemente se realicen a distintos tiempos y se distingan de las demás poblaciones celulares, cuando ya están determinadas.

En el embrión de los vertebrados, las células germinales primordiales (CGPs) se originan tempranamente, tanto en el área embrionaria como en la extraembrionaria. Desde ahí se inicia su migración para establecerse en la región genital de la cresta urogenital, en donde se formará la gónada.

Su tamaño en promedio (según el tipo de célula) varía entre 10 y 20 $\mu$ , algunas son más grandes, pero al migrar reducen su talla, pues pierden reservas metabólicas y entran en mitosis. Durante la migración activa, presentan formas definidas, elípticas o esféricas con superficies lisas, que pueden cambiar al emitir procesos citoplásmicos.

Las CGPs, en general, presentan un núcleo vesicular con cromatina fina y numerosos poros, con uno o dos voluminosos nucleolos. En su citoplasma encontramos retículo endoplásmico, golgi, ribosomas y mitocondrias; que se modifican según el momento estacionario o migratorio en que se encuentren. Como reservas, presentan una cantidad variable de vitelo (según el tipo de organismo), formado por lípidos y glucógeno.

La migración se lleva a cabo por dos mecanismos: en el pasivo, los movimientos morfogenéticos en la parte caudal del embrión en crecimiento ayudan a transportar a las CGPs hasta las crestas urogenitales, y el activo que se puede dar por medio de los vasos sanguíneos a los que entran por diapedesis y/o por movimiento amiboideo, extendiendo filopodios o proyecciones citoplásmicas, en la superficie de la membrana basal de los tejidos sobre los que se desplazan.

Las CGPs, para migrar, deben expresar genes que sinteticen receptores, para poder reconocer las moléculas de la matriz extracelular sobre las que se desplazan, transferir metabolitos a través de la membrana, y sintetizar un receptor específico para las proteínas involucradas en el quimiotactismo que ejercen las crestas genitales sobre ellas.

#### CARACTERÍSTICAS DE LAS CELULAS GERMINALES PRIMORDIALES EN AVES Y MAMÍFEROS.

En las aves miden entre 10 y 18 $\mu$  en general, son semejantes a las de los demás vertebrados. Presentan retículo endoplásmico poco desarrollado en estados tempranos, que aumenta en el pollo a partir del 8° día y el complejo de Golgi sólo se incrementa cuando entran en los vasos sanguíneos. Las mitocondrias tienen crestas tubulares, centriolos en posición yuxtannuclear y ribosomas, que aumentan cuando las CGPs entran a las crestas genitales.

Pueden localizarse en el blastodermo temprano, utilizando la técnica de PAS (ac. periódico de Schiff), ya que contienen gran cantidad de glucógeno. Este polisacárido disminuye y finalmente desaparece, cuando las células llegan a colonizar la cresta genital.

En las aves, las CGPs se distinguen durante la gastrulación a las 18 horas de incubación.

Se originan de células del epiblasto, que son llevadas por movimientos morfogénicos a una zona de endodermo en forma de media luna (creciente germinal) que se encuentra en el borde cefálico de la zona pelúcida.

No se han elucidado por completo los factores que controlan su transporte en los vasos sanguíneos, ni las señales que las hacen abandonarlos. Una explicación sería el que fueran retenidas en los capilares de la gónada en desarrollo, ya sea por la presencia de una sustancia quimiotáctica, o por la síntesis de un receptor específico en las células endoteliales que hiciera que las CGPs se adhieran a ellas.

A las 48 horas de incubación se inicia su llegada al mesenterio dorsal, donde el mesodermo activa sus movimientos amiboideos. Se ha observado que el factor de atracción de la gónada no es exclusivo de cada especie, ya que la cresta genital de pollo, es capaz de atraer CGPs circulantes de pato, pavo y ratón (Simón, 1960; Raynaud, 1969)

En estadios tempranos presomíticos, se han encontrado alrededor de 100 células que se van a dividir por mitosis durante la migración. Se dirigen a la región media por debajo de la aorta y se distribuyen por igual en ambas crestas genitales, a su llegada son alrededor de 5000 (Makabe y cols. 1991; Godin y cols. 1990).

Cuando comienza la asimetría, las CGPs migran del lado derecho al izquierdo (Witschi, 1935; Stanley cols. 1940). Entre los factores que la condicionan, se han nombrado un índice diferencial de mitosis y atracción quimiotáctica de la cresta izquierda sobre las CGPs.

En los mamíferos la dificultad de seguir la ruta de migración de las CGPs cesó, cuando se observó que contenían una alta concentración de la enzima fosfatasa alcalina la cual se pudo evidenciar por medio de reacciones específicas de esta molécula. Observándose que las CGPs migran después de perder el vitelo y glucógeno, con un citoplasma con pocas reservas energéticas (McKay y cols. 1953).

Experimentos realizados en ratón, indican que las CGPs se pueden localizar en el endodermo del alantoides, para posteriormente ubicarse en la región cercana del saco vitelino, de donde parten dos poblaciones que suben por ambos lados de la pared del intestino posterior, hasta alcanzar el mesenterio dorsal invadiendo las crestas genitales. Al 11º día del desarrollo la mayoría de éstas células se encuentran en el primordio de la gónada.

Anteriormente se consideraba que la llegada de las CGPs a la cresta genital era el mecanismo disparador para la diferenciación de la gónada, pero actualmente se piensa

que no juegan un papel importante en la determinación de la estructura del testículo, ni en la organización de los distintos tipos de células somáticas que lo forman ya que en mutantes sin células germinales, el testículo desarrolla su estructura somática normal (Mintz y Russel 1957).

El ovario sin embargo necesita de la presencia de las células germinales para desarrollar y mantener los folículos en el ovario (Mc Laren, 1991).

#### ORIGEN Y FORMACIÓN DE LA GÓNADA.

En la diferenciación de la gónada interactúan factores genéticos, ambientales, hormonales y poblacionales.

Las crestas urogenitales son inducidas por el pronefros y en el embrión de pollo se encuentran a nivel de la 20 a la 27a somitas. La formación de la gónada indiferente se lleva a cabo en el embrión humano a la sexta semana del desarrollo, en este estadio, la diferenciación va a ser igual, tanto en el sexo masculino, como el femenino, ya que todavía no se expresa el sexo genético del embrión y en este momento tiene la posibilidad de diferenciarse a un testículo o a un ovario.

Existen tres teorías sobre la formación de la gónada. La primera sostiene (Witschi; 1956; Burns, 1961) que hay una proliferación temprana del mesénquima, que cubre al mesonefros que forma la médula y el epitelio celómico. Otros autores indican que el epitelio celómico prolifera y da dos poblaciones celulares, la primera forma los cordones medulares, mientras la segunda forma la corteza (Benoit, 1950). La última teoría indica que la gónada deriva de tejido mesonéfrico y que el epitelio celómico, aunque está relacionado, no tiene importancia, (Zamboni y Merchant-Larios, 1973).

Merchant-Larios, en 1976 y Merchant-Larios y cols. (1993), al experimentar en ratón concluyeron, que el blastema mesonéfrico es pluripotencial y forma, tanto el mesonefros, como la gónada, así mismo observa a las 72 horas de desarrollo un engrosamiento que

constituye el epitelio genital el cual se diferencia fácilmente del resto del epitelio celómico y en esta etapa ya existe atracción para las CGPs. Estudios realizados por el mismo autor en cultivo de tejidos de ratón, sostienen esta hipótesis, ya que se observó la migración de células del mesonefros a la cresta, en la que algunas de ellas se diferencian en mioides.

En el interior de la cresta genital y distribuidos irregularmente, existen agrupamientos celulares rodeados por células de mesénquima laxo que no están limitados por membrana basal, por lo que pueden pasar hasta ellos, células del epitelio genital.

Estos tipos de células de diferente origen (CGPs, epitelio genital y mesénquima mesonéfrico), en conjunto forman cordones epiteliales (primarios), que se encuentran entre el mesénquima adyacente, los cuales en la médula convergen en una estructura reticular de túbulos llamada red de Haller.

La gónada se encuentra separada del mesonefros por células de mesénquima laxo y vasos sanguíneos, pero la participación del mesonefros parece decisiva para la diferenciación gonadal, ya que si se coloca entre la cresta genital y el mesonefros una membrana impermeable, se inhibe la formación de cordones primarios (Buehr y McLaren, 1992 ; Merchant-Larios y cols. 1993).

La gónada indiferente va a ser influida para su posterior diferenciación por su posición en la cresta y la expresión de su sexo genético. Podríamos concluir que en la diferenciación de la gónada intervienen además de las CGPs tres líneas celulares somáticas: las células de Sertoli en el testículo y sus homólogas las células foliculares en el ovario; las esteroidogénicas, de Leydig en el testículo y de la teca interna en el ovario; y por último, las células del tejido conectivo que incluye células endoteliales y fibroblastos en gónadas. Se ha considerado que no existen diferencias fenotípicas en la especie humana entre los sexos hasta los 42 días del desarrollo (López y cols. 1996)

#### EXPRESIÓN GÉNICA EN LA DIFERENCIACIÓN SEXUAL

La diferenciación es un proceso ordenado y continuo que involucra la expresión de genes

en cascada. En el caso de la diferenciación gonadal, esta serie de eventos enlazados inhibirán la expresión de un sexo para favorecer la diferenciación del contrario. Se sugiere que se han conservado evolutivamente las vías para la diferenciación de las gónadas en los vertebrados.

En aves y en mamíferos, el sexo está determinado cromosómicamente desde el momento de la fertilización, con la diferencia de que en las aves, el sexo heterogamético corresponde a las hembras ZW, mientras que en los mamíferos determina al macho XY (Burgoyne, 1988).

El pollo tiene 39 pares de cromosomas. El cariotipo en el pollo está compuesto por 10 pares de macrosomas y 29 microsomas. El cromosoma Z en las aves es uno de los cromosomas grandes y contiene aproximadamente el 7% del material genético, el cromosoma W es un microsoma que contiene aproximadamente de 1.5% del genoma (Fechheimer, 1990).

En las aves y en los mamíferos se describen tres etapas para la diferenciación sexual, la primera, como ya lo hemos indicado, es la determinación genética del sexo; en la segunda, la gónada indiferenciada es determinada por la presencia o ausencia de la expresión del cromosoma Y y del cromosoma W; y en la tercera, la diferenciación es influenciada por la producción de hormonas del testículo o del ovario en desarrollo (Nordqvist y Lowell-Badge, 1994).

No hay una homología significativa entre el cromosoma Z en las aves y el X en los mamíferos, aunque hay fuertes sugerencias de que los cromosomas sexuales de las aves y los mamíferos provienen de diferente par de autosomas (Graves y Reed, 1993; Scherer, 1999). El cromosoma W quizá es más parecido al cromosoma Y, pues está formado por gran cantidad de ADN heterocromático, constituido en su mayor parte por dos familias con secuencias altamente repetitivas (Saitho y cols. 1991).

Parece ser, que en tiempo hay una expresión diferencial en los genes ligados al X y al Y. Los cigotos bovinos machos, se dividen más rápidamente (24-30hrs), mientras que las hembras lo hacen más lentamente (40-60 hrs) ( Yadav y cols. 1993).

También, según el sexo, se han encontrado diferencias metabólicas en la glucosa. La actividad en la vía de la pentosa monofosfato, es el doble y cuádruple respectivamente, en los embriones bovinos machos, que en los embriones hembras (Tiffin y cols.1991).

En 1990, en el ratón se aisló un gen, el Sry, ubicado en el brazo corto del cromosoma Y, que presenta un homólogo en la especie humana (SRY). Este gen codifica el factor determinante testicular (FDT) y es la región más pequeña de este cromosoma, que es capaz de inducir la diferenciación del testículo en el hombre y en el ratón (Gubbay y cols.1990). En este último, la expresión del gen y la presencia de sus transcritos, se da al mismo tiempo que la diferenciación de la gónada a testículo, aunque hasta ahora no se conocen los reguladores de la transcripción de este gen (Capel, 1998). Experimentos *in vitro*, indican que el Sry, es uno de los genes que se expresa más tempranamente después de la fecundación en bovinos (Yadav y cols.1993). Este gen no se encuentra en las aves y no se ha demostrado que exista un gen con una función parecida (Clinton y cols.1999). El Sry actúa como interruptor molecular, que inicia la cascada de eventos que van a hacer que la gónada indiferenciada forme un testículo, una prueba de esto es, que cuando se produce la mutación de este gen en el hombre o en el ratón, se induce el desarrollo hacia un ovario (Gubbay y cols.1992). En apoyo a lo anterior, Koopman y cols. en 1991, translocaron un segmento de ADN de 14kb, que incluía al gen, logrando el desarrollo de testículos en ratones transgénicos XX. Por último, algunas disgenesias gonadales puras en humanos, presentan mutaciones en el gen SRY (Berta, y cols.1990). El gen SRY (humano) presenta un solo exón, sin intrones, se ha comprobado que codifica una proteína no histónica de alta movilidad (HMG), la secuencia de esta región, se encuentra prácticamente en la parte central del SRY (Su y Lau,1993) y al parecer está

altamente conservada en todos los mamíferos (Capel, 1998). Esta caja o dominio HMG está formada por aproximadamente 80 aminoácidos con capacidad de unión al ADN lo cual indica su función en la regulación génica (López y cols.1996), como la regulación de la transcripción de genes en cascada que determinan el sexo (Harley y cols.1992).

Al probarse en el ratón, la homología de la caja HGM por medio de una biblioteca de ADNc, se encontró una gran familia de genes autosómicos llamados SOX con más del 60% de homología, que están evolutivamente muy conservados en los mamíferos y en otros vertebrados, por lo que resulta interesante su estudio para conocer la evolución que ha tenido el Sry en los mamíferos (Foster y Marshall, 1994).

Da Silva y cols. (1996), indican que el gen SOX9, se expresa en ambos sexos en un principio, pero a partir de la expresión de Sry se expresa en el núcleo de las futuras células de Sertoli, iniciándose entonces su diferenciación. Los resultados de estos autores indican que este gen, por lo menos en pollo y ratón desempeña un papel esencial en la determinación sexual al ser un factor crítico en la diferenciación de las células de Sertoli, y en el metabolismo de enzimas de esteroides incluyendo a la aromatasa, está regulado posiblemente por el Sry en los mamíferos, en las aves todavía no se ha dilucidado que gen o genes lo controlan. Este gen se expresa tanto en aves como en mamíferos durante la fase de determinación sexual, pero solo se expresa en los machos durante la diferenciación sexual (Clinton y Haines, 1999). Su locus se ha encontrado en el brazo largo del cromosoma 17, se relacionan las mutaciones de este gen con la displasia campomélica, síndrome que presenta alteraciones esqueléticas que, en ocasiones, se acompañan de defectos genitales e inclusive en disgenesia gonadal en individuos femeninos con cariotipo 46 XY (Da Silva y cols. 1996).

Se han identificado genes que actúan sobre la diferenciación de la gónada en ambos sexos antes de que se exprese el Sry, como son el SF1 (factor esteroideogénico 1), el WT1 (gen del tumor de Wilms) estos dos genes se expresan tanto en aves como en

mamíferos y dos homeodominios Lim1 o Lmx1 y Emx2. Todos actúan sobre el desarrollo de la cresta genital, probablemente en la proliferación celular y diferenciación de la gónada, pero a ninguno al parecer se le puede adjudicar el papel de factor activador para la expresión de Sry, que hasta ahora no se ha podido identificar.

La expresión de WT1, SF1 y SOX9 sugieren un alto grado de conservación en los mecanismos moleculares que actúan sobre el desarrollo gonadal de aves y mamíferos (Clinton y Haines, 1999). La función de estos genes se ha investigado usando ratones mutantes para cada uno de ellos. Si el SF1 es mutado, se desarrollan las fases iniciales para la formación de la gónada, pero después de los 12 días post coito; el primordio de la gónada degenera por apoptosis. Si la mutación es para el WT1, se observa que aunque se forma la cresta genital, en ella no se va a producir la proliferación del epitelio celómico y después de los 14.5 días post coito, la gónada degenera. Con mutaciones para Lim1, los embriones mueren antes del desarrollo de la gónada y si algunos sobreviven no presentan riñones ni gónadas. En el caso de Lmx2, las gónadas se desarrollan anormalmente después de los 11.5 días post coito (Capel, 1998).

Investigaciones realizadas sobre las funciones del Sry implican que éste actúa como un detonador morfogénico para la formación del testículo a través del desarrollo y mantenimiento de las células de Sertoli, remodelación de la matriz extracelular, además de inducir a otras líneas celulares al desarrollo masculino, esto probablemente por una interacción célula a célula, que modifica las asociaciones, movimientos celulares y vascularización. De la diferenciación completa de las células de Sertoli parece depender la reorganización estructural de la gónada hacia testículo (Magre y Jost, 1991).

En las células de Sertoli, el Sry al expresarse en la gónada indiferente, a su vez induce el que se transcriba un gen que se encuentra en el brazo corto del cromosoma 19 (19p13.3), que codifica la sustancia inhibidora de los conductos de Müller (FIM), que es una glucoproteína de 149 kDa, compuesta de dos subunidades idénticas de 70 kDa. En los

humanos presenta 2.75 kb, contiene cinco exones y el último de éstos presenta una gran homología interespecífica con el factor de transformación de crecimiento tumoral  $\beta$  (TGB- $\beta$ ), la inhibina y la activina.

La FIM es un factor importante en el desarrollo masculino pero no es necesaria para la formación del testículo (Bheringer y cols.1994). Mientras que la FIM se expresa únicamente en los mamíferos en el sexo masculino, en las aves se encuentra en los dos sexos, puesto que se necesita su efecto para que se de la regresión del conducto paramesonéfrico o de Müller derecho (Clinton y Haines, 1999).

Se ha encontrado en el gen que codifica a la FIM una secuencia reguladora que contiene un sitio de unión para la proteína SF1 que para expresarse adecuadamente, necesita el producto del gen SRY (Marx, 1995). Además su papel en el desarrollo temprano de la gónada, el SF1 actúa como un regulador esencial de la esteroidogénesis de la corteza suprarrenal y las gónadas, por lo que controla: la producción de andrógenos en las células de Leydig y la secreción de la FIM en las células de Sertoli. Es un factor regulador de la transcripción del citocromo P450 esteroide hidroxilasa en tejidos específicos (Shen y cols.1994; Wong y cols.1997; Ikeda, 1996). Para confirmar lo anterior se hicieron estudios en ratones mutantes inactivos para el SF1 y se observó agenesia en la glándulas suprarrenales, gónadas, reversión de sexo de masculino a femenino en genitales internos y externos, una función gonadotrópica deteriorada y agenesia del núcleo ventromedial del hipotálamo (Wong y cols.1997). Esto implica la importancia del SF1 en la regulación del desarrollo del eje hipotálamo hipófisis gónada, lo cual nos lleva a la necesidad de ampliar el conocimiento de las funciones de este factor y su acción sobre la diferenciación y desarrollo gonadal.

La FIM también actúa, inhibiendo la transcripción del gen CYP 19, que codifica el P450 aromatasa (P450 arom). Este gen es muy grande, ya que mide más de 50 Kbp, parece

ser que selectivamente sólo se transcribe parte de él, según el tipo de célula en que se expresa, puesto que su transcripción la determinan diferentes promotores, por ejemplo en el ovario se ha encontrado un promotor proximal, regulado por AMPc.

La aromatasa es el complejo enzimático que produce  $17\beta$ -estradiol a partir de testosterona. En las aves se expresa a partir de los 6.5 días del desarrollo. En la gónada indiferente, el cromosoma "Y", produce como factores de masculinización en las futuras células de Sertoli el FDT y FIM, que suprimen la acción de la P450 arom y bloquea completamente la acción del AMPc (Vigier y cols.1984) por lo que disminuye la síntesis  $17\beta$ - estradiol y la gónada se masculiniza ( Haqq y cols.1993). Esto fue corroborado por Elbrecht y Smith, en 1992 y Abinawato y cols.(1996), al usar un inhibidor de aromatasa en embriones de pollo hembra logrando su masculinización, la expresión de esta enzima está específicamente regulada al desarrollo y tipo de célula de que se trate.

Aunque todavía no se ha descrito completamente el proceso de la diferenciación sexual, es claro que la identificación del SRY como productor del FDT y su relación con otros genes autosómicos, es un paso importante para entender la cascada de genes involucrados en la diferenciación gonadal. Aun no se sabe por cuanto tiempo perdura la presencia del FDT, ya que en el ratón no se identifica con PCR (reacción en cadena de la polimerasa) a partir de los 13.5 días post-coito (Koopman y cols.1991).

En 1998 Swain y cols. identificaron, en el brazo corto del cromosoma X (Xp21), un gen conocido como DAX1, que se sugiere es necesario para el desarrollo del ovario e importante para la diferenciación sexual en el ratón. Goodfellow y Camerino en 1999, han encontrado que las proteínas que expresan los genes DAX1 del humano y del ratón parecen comportarse de una manera diferente.

Al investigar la presencia del DAX1 en otros mamíferos ( Pask y cols. 1997) encontraron que en los marsupiales, al clonar este gen se identificó en el brazo corto del cromosoma 5

que es un autosoma, por lo que los autores infieren que, por lo menos, en los mamíferos ancestrales y en los marsupiales, este gen no estaba ligado al X, ni de él dependía la diferenciación sexual.

Este gen es miembro de una gran familia de receptores nucleares a hormonas. Se encontró al mapear el locus DSS (dosage sensitive sex-reversal) en individuos que con dos de estos genes y con un gen SRY desarrollan fenotipo femenino, si falta el DDS se desarrolla un fenotipo masculino.

Sin embargo en ratones transgénicos XY, en que se ha duplicado el gén (DAX: DAX) no se produce reversión de sexo. Se usaron niveles exógenos altos de DAX1 en ratones XY, observando que si el Sry, era normal solo se retrasaba el desarrollo del testículo, mientras que si este alelo (Sry) usando un transgene se debilitaba, producía una reversión de sexo completa, lo que implica para los autores, que estos dos genes son antagonistas entre sí. Estos resultados, apoyan la relación del alelo humano del gen DAX1 con el DSS y sostienen, que el Sry solamente puede inhibir a una copia de este alelo, como sucede en el desarrollo normal (Swain y cols.1998).

Al relacionarse las mutaciones del DAX1 en humanos con la hipoplasia adrenal congénita (HAC) ligada al X, se están identificando las mutaciones en series de familias para elaborar un modelo de estas alteraciones, que permita interpretar que partes del gen cambian para producir la AHC y sus distintas manifestaciones ( Zhang y cols.1998).

La expresión del DAX1, se observa en los primeros estadios del desarrollo adrenal, gonadal y del hipotálamo. Según los autores, en un principio se expresa en las células indiferenciadas que van a dar a las células de Sertoli y posteriormente se manifiesta coincidiendo con la franca diferenciación de la gónada a testículo, pero no interviene en el desarrollo de éste, ya que si se muta el DAX1, se forma un testículo normal, lo cual confirma de nuevo, que este gen está reprimido durante la diferenciación testicular (Swain y Lowell-Bagde, 1997; Swain 1998).

Si no existe el Sry, no se modifica la transcripción del DAX1, pero se extingue la del SOX9. Los niveles en que se expresa este último gen y la FIM en las células de Sertoli, son semejantes al del DAX1 durante el desarrollo del ovario. Asimismo, se ha observado que el DAX1 puede formar heterodímeros con el SF1 actuando como supresor y modificando sus funciones reguladoras de la transcripción de genes como el FIM y el SOX9, que son indispensables como se ha indicado anteriormente para la formación del testículo fetal. Con base en lo anterior Swain y cols. (1998) y Goodfellow y Camerino en 1999, concluyen que el DAX1 es más bien un gen inhibidor del testículo que determinante del ovario.

#### DIFERENCIACION DEL OVARIO.

Los estudios tradicionales sobre el desarrollo de la gónada indiferente indican que la diferenciación hacia testículo se realiza antes que hacia ovario. En humano, la diferenciación del testículo se inicia a la séptima semana del desarrollo intrauterino mientras que la del ovario comienza una semana después.

La identificación de hormonas como la FIM y la testosterona en el testículo fetal, sugiere que la diferenciación del testículo es activa. La FIM inhibe al P450 arom. para que no se forme 17 $\beta$ -estradiol, mientras que la testosterona actúa sobre la masculinización, tanto de la gónada, como de los conductos sexuales produciendo dihidrotestosterona para la diferenciación de los genitales externos.

Hasta hace poco tiempo se pensaba que la diferenciación del ovario era un tanto pasiva. Actualmente, con el conocimiento del gen DAX1 se han producido varios modelos para interpretar su interacción con otros genes como el WT1 y el SF1. Si el gen DAX1 está ausente el WT1 actúa como estimulador del proceso por medio del cual el gen SF1 induce la transcripción del FIM por medio de la secuencia promotora AGGTCA. Si en cambio está presente el gen DAX1, éste forma un heterodímero con SF1 que le impide interactuar con

el promotor del FIM por lo que éste no se produce y la gónada se diferencia en ovario (Parker y cols.1999).

La identificación del sistema aromatasa del receptor a estrógeno y de la producción de estrógeno en el ovario de embriones de mamíferos parece tener influencia en la diferenciación del ovario (Scherer, 1999).

La proliferación de las CGPs y las células del epitelio celómico o superficial, van a formar cordones sexuales secundarios que se dispersan en el estroma formando acúmulos de ovogonias y células derivadas del epitelio celómico (foliculares) cerca de la región córtico medular.

La presencia de las células germinales no es esencial para el desarrollo de la cresta urogenital y la diferenciación de las estructuras no sexuales de la gónada.

A diferencia de los testículos, la presencia de CGPs viables es indispensable para la diferenciación de los ovarios. Si éstas no llegan a la cresta genital, los ovarios involucionan y degeneran (ovarios en banda) (Carlson, 2000). Sin embargo se ha descrito que CGPs genéticamente masculinas pueden dar óvulos funcionales, así como CGPs femeninas, pueden dar espermatozoides funcionales (Kagami y cols. 995). Esto demuestra que la diferenciación de estas células está influenciada por el ambiente hormonal.

Las ovogonias proliferan por mitosis y posteriormente entran en meiosis (oocitos), inducidas por un factor promotor de la meiosis, posiblemente producido por el mesonefros, lo cual parece asociarse con la presencia del remanente de la red de Haller llamada ahora rete-ovarii de origen mesonéfrico. Las ovogonias y los oocitos presentan puentes citoplásmicos que al parecer intervienen en la sincronía de su desarrollo.

El ovario fetal presenta una delgada túnica albugínea que forma la unión córtico-medular.

La corteza del ovario es la porción más desarrollada, en ella se encuentran la mayoría de los ovocitos. La médula presenta abundante estroma y gran cantidad de vasos

sanguíneos derivados del mesonefros. En el estroma también encontramos como derivados, tejido conectivo y tejido intersticial esteroidogénico.

El ovario al desarrollarse no mantiene relación con el mesonefros, cuyos conductos y túbulos degeneran por apoptosis, quedando sólo algunos remanentes.

#### DIFERENCIACION DEL OVARIO EN LAS AVES.

En el pollo se han analizado la expresión de los genes WT1, SF1, SOX9, FIM y aromatasa, en muestras de ARN aislados y analizados por análisis Northern (Clinton y cols..datos no publicados). Sus estudios indican que los genes WT1, SOX9 y FS1 se expresan en niveles altos en el desarrollo de testículos y ovarios a partir de los 6.5 días de incubación en adelante. Sin embargo la expresión del la FIM es a un nivel muy bajo a los 5.5 días incrementando su nivel a partir de los 6.5 días de incubación. En aves la FIM se expresa en los dos ovarios al mismo tiempo, posteriormente aumenta en el ovario derecho para que se efectúe la regresión de su oviducto. A partir del mesodermo intermedio se forma la cresta urogenital que entre los días 3 a 6 de incubación se desarrolla en una gónada indiferente. Al 4<sup>o</sup> día del desarrollo no se observa todavía la asimetría en la diferenciación, ya que ambos ovarios presentan una médula con cordones, revestidos por una lámina basal con invasión de vasos sanguíneos provenientes de mesodermo mesonéfrico (Richards,1978).

En el ovario derecho al día 6 de incubación, el epitelio de la corteza pierde su aspecto cúbico, se aplana, se separa de los cordones epiteliales internos y comienza a involucionar, mientras que el izquierdo aumenta tanto su corteza como la médula acompañado por un incremento de estroma y vascularización. En esta etapa ya se identifica el receptor nuclear a estrógenos (R-E) en células corticales y medulares

(Gasc, 1980), aunque estudios recientes identifican el R-E a los 3.5 días de incubación o sea en etapa de gónada indiferente (Smith y cols.1997).

Se puede determinar el sexo a nivel morfológico a los 6.5 días del desarrollo por observación del epitelio germinal, que ya contiene gran cantidad de células germinales. La expresión del gen de la aromatasa que es necesaria para la conversión de testosterona a  $17\beta$ -estradiol, se identifica a este tiempo en las gónadas femeninas, lo que parece indicar por la relación entre la expresión de la aromatasa y el  $17\beta$ -estradiol que la determinación de la gónada a ovario ocurre a más tardar al día 5.5 de incubación (Romanoff, 1960).

A los 6.5 días en el ovario derecho se observan cordones medulares con estroma y células germinales desplazadas de la corteza, en cambio el izquierdo, presenta una corteza engrosada por mitosis de las CGPs, que formarán nidos de ovogonias, los cuales están separados por una membrana basal de la médula poco desarrollada (Romanoff, 1960).

Al día 7 en el ovario izquierdo, la médula aumenta en grosor debido a la proliferación de células de los cordones, diferenciándose dos zonas; una por debajo de la corteza con cordones gruesos y canales lacunares reducidos y una profunda en la que se hacen mas largos los cordones que delimitan grandes espacios lacunares (Romanoff, 1960).

Al 8<sup>o</sup> día se detecta en ellos actividad esteroideogénica (Weniger y cols.. 1971) y estudios morfológicos e histoquímicos evidencian agrupamientos de células esteroideogénicas en la médula del ovario del embrión de pollo (Galli y Wassreman 1973; Scheib y Baulieu,1981: Woods y Erion, 1978).

Del día 9 al 13 hay una actividad mitótica exponencial de las ovogonias y las células indiferenciadas del epitelio celómico, que alcanza su máximo al día 17 del desarrollo. En esta misma etapa los ovarios derechos son aproximadamente de la mitad del tamaño. En el embrión de pollo a los 17 días de incubación, encontramos el mayor número de células

germinales que se van reduciendo posiblemente por un fenómeno de degeneración por apoptosis hasta el nacimiento (Hughes, 1963; Mendez y cols. 1993).

En la médula del ovario del embrión de 17 días al igual que en la del recién nacido se encuentra formado un compartimento de tipo epitelial con cordones de células y espacios lacunares delimitados por células epiteliales (Gonzalez del Pliego y cols. 1988).

Se han usado (Alvarez-Fernandez y cols. 1995), precursores marcados radioactivamente para analizar la síntesis de hormonas esteroides como estradiol y la estrona, estimulando al ovario de embriones de pollo entre 10 y 18 días con hormonas como la HL y la HGC.

Utilizando técnicas de gradiente de densidad, se separaron dos subpoblaciones celulares de la médula ovárica con actividad esteroidogénica; una con características morfológicas y estructurales de células esteroidogénicas productoras de testosterona, con muy poca actividad de aromatasa y otra de células poco diferenciadas con gran actividad de aromatasa que producen estrona y estradiol (Pedernera y cols. 1988; Alvarez- Fernández y cols. 1995) ,

#### OVOGENESIS.-

Al iniciarse la ovogénesis, se observan células sincronizadas en cuyo núcleo se encuentra un cuerpo heteropicnótico que es el cromosoma Z. Al marcarlas con timidina tritiada, se ha observado que la fase de multiplicación comienza el día 14 y alcanza su máximo en el 17. El día 16 ya hay ovocitos en leptóteno y el 17 en cigóteno y paquíteno. A un lado del núcleo se encuentra el cuerpo vitelino o de Balbiani, formado por complejo de Golgi rodeado de mitocondrias (Greenfield, 1966), en el cual se ha detectado un material basófilo rico en ARN, que se dispersa después del nacimiento (Guraya, 1962).

Los ovocitos que se encuentran en meiosis presentan puentes intercelulares (Skalko y cols. 1972), cuya función puede ser: la restricción para regular el exceso de ovocitos, la

transferencia de nutrientes y la determinación de la cantidad de ovocitos que entran a diplóteno.

La ovogénesis se completa en la época del nacimiento y la foliculogénesis se realiza postnatalmente.

#### BIOSÍNTESIS DE ESTEROIDES EN OVARIO.

Uno de los mecanismos más importantes de regulación corporal ó sistémica desde los insectos, hasta la especie humana, es el hormonal. Las células que sintetizan las hormonas están ubicadas selectivamente, ya que están cerca del lugar en donde se requiere mayor concentración de las mismas. Están en la proximidad de vasos sanguíneos, con su extremo apical hacia el extremo venoso del capilar, donde liberan las hormonas.

Las hormonas esteroides son liposolubles; son sintetizadas en el retículo endoplásmico liso. Se pueden producir y secretar en su forma final como el estriol, o presentar una conversión periférica, en la que las hormonas son modificadas a formas más activas en los tejidos de los órganos blanco, como es el caso de la conversión de la testosterona en dihidrotestosterona.

El núcleo químico primario de las hormonas esteroides, es el ciclopentanoperhidrofenantreno, que consta de tres anillos de hexano, A, B, C y uno de pentano D. Los diferentes tipos de esteroides se formarán al cambiar los radicales de los carbonos de los anillos, a la modificación de los mismos y la adición de cadenas laterales (Stryer, 1995).

Estas modificaciones dan diferentes tipos de compuestos, de los cuales, el que da origen a los demás es el colesterol con 27 carbonos (C27). Este es transportado por la sangre fijado a globulinas (acarreador) en forma de lipoproteína, de donde lo obtienen las células esteroideogénicas. También se encuentra como reserva en el retículo endoplásmico liso en

forma de ésteres y sintetizándose a partir de acetato, para dar las diferentes hormonas esteroides.

La secuencia de biosíntesis de esteroides a partir del colesterol es la siguiente: colesterol (C27) → progestinas (C21) → andrógenos (C19) → estrógenos (C18).

Las progestinas (C21) se forman a partir del colesterol, por la pérdida de una parte de la cadena lateral entre el carbono 20 y el 22. La pregnenolona es un progestágeno muy importante pues junto con la progesterona, son los precursores primordiales en la biosíntesis de los esteroides. A partir de ella, se forman la 17-hidroprogesterona, la 20-dihidroprogesterona y la progesterona. La conversión de colesterol en pregnenolona es igual en ovario, testículo y corteza suprarrenal.

La progesterona, condiciona la fase secretora del endometrio uterino preparando a éste para la implantación y la gestación. Se sintetiza en el folículo ovárico, el cuerpo lúteo y la placenta.

Como ya se indicó, los andrógenos son compuestos derivados de las progestinas, en general son los esteroides encargados de la masculinización y se producen en los ovarios, testículos y la corteza suprarrenal.

La dehidroepiandrosterona y la androstenediona, son producidas en el ovario y la suprarrenal, pueden ser convertidas en testosterona y 17 $\beta$ -estradiol en los tejidos periféricos. En general, la testosterona no es la forma activa de la hormona, sino que en la mayoría de los tejidos, es convertida por una 5-alfareductasa en una forma más activa, como la dihidrotestosterona.

A partir de los andrógenos se originan los estrógenos. Los precursores naturales inmediatos para su síntesis, son la androstenediona y la testosterona; la reacción más importante para esta síntesis es la aromatización del anillo A, que es mediada por la enzima P450 arom. En la primera parte de la reacción, se hidroxila el C19, formando un

grupo hidroximetilo que se pierde del núcleo, el anillo A se aromatiza, dando un hidroxilo fenólico en el C3.

De los tres estrógenos naturales, el más potente es el 17β-estradiol, que se puede oxidar fácilmente a estrona, y al hidratarse dá estriol.

A partir de la pregnenolona los esteroides se pueden sintetizar por medio de la Vía Δ<sup>5</sup> en la que se va a formar DHEA y la Vía Δ<sup>4</sup> en la que a partir de progesterona se va a sintetizar androstenediona. Esta que también se puede formar a partir de DHEA, da origen a la testosterona que por medio de P450 arom. origina el 17β-estradiol. En el siguiente diagrama se representa un resumen de la biosíntesis de los esteroides.

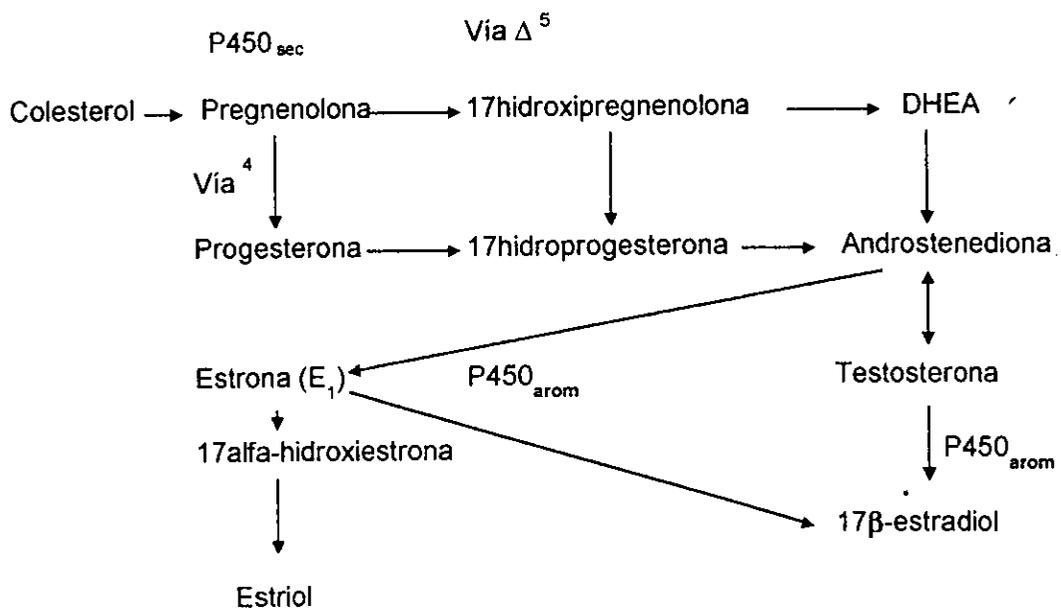


Diagrama elaborado con los datos obtenidos en (The Physiology of Reproduction.1994)

Los estrógenos actúan sobre la diferenciación de los caracteres sexuales secundarios femeninos, son la principal secreción del ovario durante todo su ciclo, regulan el ciclo

sexual, induciendo cambios en sus órganos blanco como son: el útero, oviductos, vagina, glándulas mamarias y cerebro.

Los estrógenos se sintetizan en los ovarios y testículos, la placenta y la corteza suprarrenal, aunque la estrona en particular, se puede formar en tejidos periféricos como el hígado, el tejido adiposo, el músculo esquelético y los folículos pilosos.

La producción de esteroides sexuales en los ovarios, está bajo el control de hormonas gonadotrópicas hipofisarias, HFE y HL.

Las funciones del  $17\beta$ -estradiol entre otras son: maduración de las CGPs, crecimiento del endometrio y reparación del mismo, control del ritmo hormonal para la ovulación, motilidad de los oviductos, contracción uterina, implantación del blastocisto, mantenimiento del embarazo, favorecimiento de un clima adecuado para el parto y la lactancia, ramificación de las glándulas mamarias, incremento de la velocidad de la síntesis de ADN, ARNm, ARNr, ARNt y de las proteínas. Produce efectos anabólicos sobre el hueso y el cartílago, tiene efectos sobre el crecimiento, actúa sobre los vasos periféricos produciendo vasodilatación y liberación de calor. También se han comunicado efectos teratogénicos del  $17\beta$ -estradiol sobre el sistema urogenital del feto de rata aumentando la incidencia de hipospadias ( Henry y cols. 1984)

La progesterona reduce la acción proliferativa de los estrógenos sobre el útero y la cambia a secretora, incrementa el desarrollo de los acinos mamarios, reduce el flujo sanguíneo y disminuye la pérdida de calor por lo que hay un aumento de temperatura corporal.

## ACCIÓN DE LOS ESTEROIDES GONADALES EN EL DESARROLLO DEL OVARIO DE LAS AVES.

La síntesis temprana y producción diferencial de hormonas sexuales en el embrión de pollo es más significativa que la presencia de ellas en un tiempo preciso. Igual que en los demás vertebrados, los esteroides juegan un papel preponderante en la diferenciación de la gónada a ovario.

Estudios clásicos como los de Wolff, en 1935, comprobaron que si se administraban estrógenos antes de la diferenciación gonadal, se feminizaba el testículo. Diversos trabajos evidencian la posibilidad que tienen las aves de reversión espontánea de sexo o por medio de modelos experimentales que incluyen: castración trasplante, administración de esteroides como estrógenos y andrógenos, además de otros compuestos como antiandrógenos, antiestrógenos, e inhibidores de aromatasa ( Elbrecht y Smith, 1992; Clinton y Haines, 1999). Estos trabajos evidencian que los esteroides tienen mayor ingerencia sobre la diferenciación gonadal en las aves que en los mamíferos, lo que podría sugerir una mayor plasticidad en el desarrollo gonadal de las aves que no existe en los mamíferos.

El  $17\beta$ -estradiol influye en la diferenciación sexual normal en la gónada (Weniger y cols. 1967 y Weniger, 1968), induce la diferenciación y el crecimiento de los derivados de los conductos de Müller, como los oviductos, lo que involucra duplicación del ADN, formación de ARNs y síntesis protéica.

Por medio de técnicas inmunocitoquímicas, se demostró la presencia de estrógenos y andrógenos, en la médula de las gónadas de ambos sexos a los 3.5 días del desarrollo embrionario, antes de que ocurra la diferenciación histológica (6.5 días), (Woods y cols. 1978).

La estrona se produce en el ovario izquierdo aproximadamente a los días 3.5 días, se incrementa a los 5.5 días y dá un pico a los 13.5 días siendo producida en un principio por

las células de los cordones primarios de la gónada y posteriormente en los cordones secundarios y células intersticiales de la corteza, descendiendo después significativamente (Woods y Erion, 1978).

Entre las hormonas femeninas que se forman en el ovario del embrión de pollo la progesterona se sintetiza partir de la pregnenolona a los 9 días de incubación (Imataka y cols. 1988). Se ha comprobado la secreción de  $17\beta$ -estradiol y estrona en embriones de pollo entre 5 y 6 días (Weniger y cols. 1967; Scheib, 1983), cuando la gónada se encuentra indiferenciada.

Parece ser que en un principio, la síntesis de esteroides gonadales en el ovario es autónoma. Estudios recientes sugieren la posibilidad de que la expresión temprana y posterior del R-E pueda tener gran influencia en la diferenciación y desarrollo del ovario, aunque desafortunadamente no se ha descrito la expresión temprana de genes que codifiquen enzimas que metabolicen esteroides sino hasta los 6.5 días de incubación. (Andrews y cols. 1997).

Más tarde a los 11.5 días, está bajo el control de la adenohipófisis, (Woods y Erion, 1978; Weniger, 1991). Con HL se ha podido estimular la secreción de  $17\beta$ -estradiol al día 7 y 8 de incubación (Woods y cols. 1982; Weniger y Chouraqui, 1988), y se observó la unión del  $17\beta$ -estradiol al epitelio superficial y médula del ovario del embrión de pollo (Gasc, 1980).

El ovario izquierdo secreta gran cantidad de estrógenos, estimulando su propia secreción al producir aromatasa P450, que aromatiza los andrógenos a estrógenos (Woods y Erion, 1978). El uso experimental de inhibidores de aromatasa puede dar reversión de sexo en hembras, con el consecuente descenso de niveles de ARNm para la aromatasa (ARN arom.). La administración al mismo tiempo de estrógeno e inhibidor, suprime la reversión de sexo y restablece los niveles normales de ARN arom. (Abinawanto y cols. 1996).

Se han hecho experimentos para conocer el papel de los estrógenos sobre las subpoblaciones que forman el ovario en el embrión de pollo y en el recién nacido. En experimentos con ovarios de embrión de pollo de 11 a 13 días de incubación, tratados con  $17\beta$ -estradiol, se ha encontrado, que no hay diferencia entre el número de células germinales de los controles y los tratados. Las células somáticas en cambio, aumentan hasta el día 17 en los testigos, mientras que los tratados aumentan su número hasta el nacimiento, siendo más notable el incremento de las somáticas indiferenciadas (Mendez y cols.1993).

#### MECANISMO MOLECULAR DE LA RESPUESTA A ESTROGENOS.

Los efectos que produce una hormona sobre las células blanco, son el balance entre la expresión de los genes que inducen y la falta de la transcripción de los que reprime. Varias hormonas se pueden unir a las mismas secuencias reguladoras del ADN, por lo que pueden tener el mismo efecto en un tipo celular en particular.

Durante la segunda mitad de la década de los sesentas se encontró, que el  $17\beta$ -estradiol se une con una gran especificidad y afinidad a una proteína intracelular, a la cual se le llamó receptor (Jensen y cols.1967 y 1969; O'Malley y cols. 1969; Yamamoto, 1985).

Se define como tejido blanco a estrógenos, al que tiene receptores para la unión y actividad fisiológica de estas hormonas (Jensen y Jacobson, 1960). Sus investigaciones sirvieron como base de estudios subsecuentes sobre el mecanismo de acción de los estrógenos y antiestrógenos.

Los estrógenos marcados se encontraron ligados a proteínas del citosol y en el núcleo, por lo que se infirió que existían receptores en ambas regiones celulares.

Se desarrollaron trabajos *in vitro* en células de cáncer mamario (MCF-7), de cuyos resultados surgieron modelos subcelulares que explican el mecanismo de acción del R-E

(Jensen y cols.1969), en este trabajo ellos proponen que el receptor actúa como una señal de transducción entre la hormona y la modificación de la expresión génica.

El  $17\beta$ -estradiol es el estrógeno más activo, su naturaleza lipídica, favorece que atraviese fácilmente por difusión las membranas celulares de los tejidos blanco. Puede tener una acción endocrina, paracrina o autocrina. La hormona se tiene que transportar por vía sanguínea ya sea ligada a una proteína específica como la albúmina fijadora de hormonas sexuales o con proteínas por las que no tiene gran afinidad y si alta disociación, ésto fisiológicamente se considera como si estuviera en estado libre.

El receptor, es codificado por una secuencia única de genes, que al copiarse y traducirse, producen un efecto que puede inducir diferentes respuestas dependiendo el tipo de células sobre las que la hormona actúa, puesto que no todas presentan la misma respuesta a la acción de la hormona.

Se ha inferido que la capacidad de una célula para responder a las hormonas, depende de la presencia del receptor, en el cual hay dominios que presentan alta especificidad y afinidad por el ligando (hormona), especificidad de unión al ADN y modulación transcripcional. El dominio más estudiado es el de unión al ADN que se caracteriza por presentar dedos de Zn (Evans, 1988).

El R-E, pertenece a una familia de receptores nucleares, con estructura modular con seis diferentes regiones (de la A, a la F); la región aminoterminal A, del receptor de estrógenos en el pollo está involucrada con la transcripción. La B da una máxima transcripción de genes de respuesta a estrógenos. La C corresponde al dominio de unión al ADN, la D separa los dominios de unión al ADN y a la hormona que es el dominio E y la F que es carboxi-terminal, regula la modulación de la magnitud de la transcripción del gen por estrógenos o antiestrógenos y determina la efectividad de los antiestrógenos en la supresión de la acción del estrógeno, que induce la transcripción del gen ( Montaña y cols. 1995).

Los receptores a esteroides no unidos a los ligandos, forman complejos con proteínas de choque térmico, como las HSP90 y la HSP70, estas uniones dan estabilidad y evitan la desnaturalización del receptor (Pratt 1993).

La activación del receptor involucra cambios conformacionales en las estructuras terciaria y cuaternaria formando dímeros o monómeros. Los receptores activados se unen a secuencias del ADN conocidas como elementos de respuesta a esteroides (EREs), que presentan una secuencia palindrómica (repeticiones invertidas) de 15pb separada en el centro a manera de eje de simetría por 3pb con lo que quedarían 6 pares de bases de cada lado. Los receptores a glucocorticoides progesterona y estrógeno se unen como un dímero a sus EREs con una molécula en cada lado del centro de simetría de la secuencia, en esta forma la unión al ADN presenta gran afinidad y estabilidad, controlando los genes de respuesta a hormonas sin embargo el R-E se puede unir también como monómero uniéndose a los elementos de respuesta tiroidea (ERT<sub>3</sub>), que consiste en un palíndrome invertido sin espacios, uniéndose solo a la mitad de la secuencia. Algunas antihormonas actúan inhibiendo la dimerización.

Los eventos de acción del R-E son los siguientes:

- Disociación del R-E de las proteínas de choque térmico.
- Dimerización (trans-activación).
- Unión a la secuencia del ADN, ERE.
- Interacción del R-E activado con factores fundamentales de transcripción.

Esta interacción, es necesaria para estabilizar el complejo de pre-iniciación del promotor que permite a la ARN polimerasa iniciar la transcripción del gen, iniciando la cascada de eventos que produce la respuesta celular al estrógeno.

El Tamoxifén (Tam), puede inhibir la activación del R-E, ya que se une al dominio de unión al ligando (DUL).

En la actualidad se han descrito dos subtipos de R-E, el R-E $\alpha$  y el R-E $\beta$ . El primero se conoce desde los años sesentas y el último se acaba de describir hace dos años, en tejidos como próstata, útero, ovario, testículo, vejiga, timo y bazo, de ratón y humano.

Están codificados por dos genes distintos, son parecidos funcionalmente, pero hay diferencias en sus mecanismos de regulación, transcripción y los órganos blanco en los que se localiza (Kuiper y cols.1997).

Se ha clonado y mapeado el gen homólogo del ratón (Estreb) en la región central del cromosoma 12 (Tremblay y cols.1997). Se aisló una proteína de 485 a.a. Se utilizó PCR para hacer la comparación entre la secuencia de aminoácidos de los dos R-Es. (Mosselman y cols.1996), que evidencian un alto grado de conservación de los dominios que se unen al ADN (97%) y al ligando (60%) (Tremblay y cols.1997).

La afinidad del 17 $\beta$ - estradiol hacia los dos R-E, es alta, pero ligeramente menor en el R-E $\beta$  con una constante de disociación (Kd) de 0.5nM, que en el R-E $\alpha$  es de 0.2nM.

El R-E $\beta$ , es funcional en la interacción con antiestrógenos y puede modular la expresión génica de la respuesta a 17 $\beta$ -estradiol (Mosselman y cols. 1996)

En estudios con ratones deficientes en R-E $\alpha$  (gen inactivado) se ha encontrado que en algunas funciones del 17 $\beta$ -estradiol, el R-E $\beta$ , puede sustituir al R-E $\alpha$ , pero también se ha encontrado en estos organismos, efectos del 17 $\beta$ -estradiol que inhiben el daño vascular y dan sensibilidad al tamoxifen mediados por el R-E $\beta$ . Lo anterior puede ser una explicación a los diferentes tipos de sensibilidad y respuestas en los tejidos a los estrógenos y sus antagonistas. Por ejemplo el hidroxitamoxifén (OHT) presenta una actividad parcialmente agonista con el R-E $\beta$  ésto no sucede con el R-E $\alpha$  (Tremblay y cols.1997).

Se ha podido establecer una homología del 80% entre el R-E del pollo y el humano gracias a la técnica de ADN complementario (ADNc) que ha permitido conocer el peso y número de aminoácidos de ambos (Krust y cols.1986).

#### RECEPTOR A ESTRÓGENOS EN EL OVARIO

Desde 1965 usando  $17\beta$ -estradiol marcado radioactivamente se localizó el receptor a estrógenos en el ovario del pollo. El R-E que se aisló primero, conocido ahora como R-E $\alpha$ , media las funciones del  $17\beta$ -estradiol en todos los tejidos reproductores, inclusive en el útero.

Stumpf en 1969 por medio de autorradiografía localiza el R-E en diferentes poblaciones celulares, como células foliculares, tecales (con menor intensidad) sin encontrar marcas en los ovocitos y células del estroma. Posteriormente se ha demostrado la existencia del R-E en ovocitos humanos, de ratón y pollo (Wu y cols.1992,1993; Méndez y cols. 1993).

En el ovario del pollo recién nacido se han localizado R-E en los ovocitos y en las células somáticas esteroideogénicas por lo que probablemente su presencia esté involucrada con el desarrollo y la función del ovario en etapa embrionaria (Mendez y cols.1999).

Se ha observado que es el  $17\beta$ -estradiol aumenta su propio receptor y que su síntesis está bajo el control de las gonadotropinas hipofisarias, puesto que experimentalmente se ha visto que la acción de la HFE, aumenta la cantidad de R-E mientras que la luteinizante lo disminuye (Richards, 1975).

La expresión del R-E $\beta$  en el ovario, disminuye durante el desarrollo folicular y la diferenciación, observándose una activación de receptores a HL.(R-HL). Los folículos pequeños expresan R-HL solo en la teca, mientras que el R-E $\beta$  se expresa en la granulosa (Kuiper y cols.1997).

La expresión de ambos receptores en los folículos ováricos sugiere que interactúan discriminando secuencias importantes para la respuesta diferencial a  $17\beta$ -estradiol.

En ratón se han desarrollado receptores de genes inactivados para R-E $\alpha$  y R-E $\beta$ , lo que ha permitido por medio de estos mutantes conocer el papel fisiológico de ambos tipos receptor a estrógeno, en adultos tanto los machos como las hembras tienen un tracto reproductor aparentemente normal pero son infértiles. En los ovarios adultos con genes inactivados para R-E $\alpha$  y R-E $\beta$ , se observan células foliculares con una diferenciación que se parece a los túbulos seminíferos, incluyendo células parecidas a las de Sertoli y expresión de la FIM. Parece ser que la pérdida de uno de los receptores da resultados diferentes a cuando no están presentes ninguno de los dos, lo que indica que se necesitan la presencia de los dos receptores para el desarrollo y mantenimiento de las células somáticas y germinales en el ovario después del nacimiento.

Aunque todavía hay muchos aspectos desconocidos sobre la acción de los R-Es  $\alpha$  y  $\beta$ , se sabe que el R-E $\alpha$  predomina en el estroma y en la teca mientras el R-E $\beta$  se encuentra en las células granulosas de los folículos maduros. (Couse y cols.1999).

## CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LOS ANTIESTRÓGENOS.

En los últimos veinte años, el desarrollo del estudio de las características bioquímicas, farmacológicas, metabolismo y función de las hormonas esteroides ha favorecido la investigación colateral de sus inhibidores.

Los antiestrógenos son moléculas que van a inhibir la actividad de los estrógenos como factores de crecimiento celular, impedir el aumento de peso del útero y la cornificación vaginal, que producen los estrógenos en ratas inmaduras ovariectomizadas (Emmens y Cox, 1958)

Originalmente, se utilizaron como anticonceptivos postcoitales (Emmens, 1970) o paradójicamente como inductores de la ovulación (Williamson y Ellis, 1973; Gerhard y Runnebaum, 1979), ya que muchos de estos compuestos pueden tener una acción agonista o antagonista a los estrógenos.

Su utilidad médica se ha desarrollado en tres campos principalmente: anticoncepción, aborto, y control de crecimiento de tumores dependientes de hormonas esteroides. También, se han usado en el tratamiento de hiperplasia endometrial, producida por la exposición prolongada a estrógenos.

La aplicación clínica en la que son más utilizados es en la quimioterapia del cáncer de mama (Sutherland y Murphy, 1980), con la ventaja de que parecen ser menos citotóxicos que otros compuestos. En oncología se estudia principalmente la acción de los antiestrógenos sobre la inactivación de los oncogenes homólogos, acoplamiento sobre los elementos de respuesta a esteroides e interferencia en las reacciones en cascada de la producción de factores de crecimiento (Spillane y Whitman, 1995).

Ya en 1938, Doods y cols. describen la actividad estrogénica de compuestos no esteroides como es dietilestilbestrol (DES), al estudiar esta sustancia, confirmaron, que además tiene una acción antagonista, que previene la cornificación de la vagina en ratones ovariectomizados cuando se administra al mismo tiempo que el 17 $\beta$ -estradiol.

El doble papel que presentan algunos de estos compuestos parece depender de su configuración química espacial, dosis y tejido receptor ( Katzenellengoben y cols.1995).

El estudio de los estrógenos y antiestrógenos sobre los tejidos blanco, se incrementó al sintetizarse compuestos marcados radiactivamente, como el hexestrol producido por tritización catalítica por reducción del DES, que se utilizó inicialmente para demostrar su acumulación selectiva en los órganos reproductores en cabras y ovejas (Doods y cols. 1958).

#### CLASIFICACIÓN DE LOS ANTIESTROGENOS..

Se clasifican según su estructura, en esteroides tanto naturales como sintéticos y no esteroides. entre los de tipo esteroide encontramos a la progesterona y derivados, que son los antiestrógenos por excelencia, al estriol, moxestrol y RU16117. Los no esteroides, en general son sintéticos, pudiendo ser de dos tipos, derivados etilénicos, que a su vez pueden ser trifeniletilénicos (clomifene, euclomifene, tamoxifén y, 40H- tamoxifén,entre otros), o difeniletilénicos (dimetil y dietilstilbestrol), los que conforman el segundo tipo presentan otras estructuras como la nafoxidina y el trifeno (Bloom y Boesen, 1974; Ward, 1973 ; Levín y Schuasberg,1990; DeFriend y cols.1994).

#### MECANISMOS DE ACCIÓN. DE LOS ANTIESTROGENOS.

En 1939, no se sabía si el efecto de los antiestrógenos era por inhibición o citotoxicidad, pero la viabilidad de las células después del tratamiento por antiestrógenos hicieron que las investigaciones se enfocaran al mecanismo de inhibición sobre el mecanismo de acción hormonal.

Se propuso que la unión del antiestrógeno al R-E desplazando a la hormona, se llevaba a cabo en el citoplasma, formando un complejo estable R-E--antiE, con un desplazamiento lento hacia el núcleo, en donde no se unía al ADN.

Actualmente se sabe que el receptor libre se encuentra en el compartimento nuclear, los complejos con los ligandos actúan en sitios receptores del ADN, (Clark y cols. 1983) y que la presencia por periodos prolongados de antiestrógenos evita la síntesis de R-E y por lo tanto, se inhibe la estimulación por estrógenos (Clark y cols. 1974; Wolf y Fucua 1995).

En el núcleo, se han encontrado distintos sitios de unión a estrógenos y antiestrógenos, con diferente grado de afinidad con el receptor (Sutherland y Murphy, 1980), que en un momento dado, plantearon la interrogante, de si existía relación entre el sitio de unión en el núcleo con los efectos agonistas y antagonistas que tienen algunos antiestrógenos, ya que inhiben el crecimiento y aumento de peso del útero (acción antagonista), al mismo tiempo que activan el inicio de la síntesis de receptores a progesterona (efecto estrogénico) (Leawitt y cols. 1977; Watts y cols. 1987; Calaf y cols. 1988).

Al unirse el estradiol al R-E, se produce un cambio conformacional (dimerización) que permite al complejo R-E- $17\beta$ -estradiol unirse a los EREs, el antiestrógeno, no produce este cambio, pero evita que entre la hormona al receptor, ya que se une al sitio de unión del ligando.

Al encontrarse las proteínas específicas que se unen a antiestrógenos se ha buscado el ligando natural que debe desempeñar un papel de importancia en las funciones celulares, en ellas se han encontrado similitudes con los receptores a esteroides, presentando un dominio C terminal de la molécula, que se une al ligando, la parte media de la molécula presenta los dominios que se unen al ADN y la región N terminal que es el dominio inmunológico.

Usando antiestrógenos marcados radioactivamente se identificaron sitios de unión, y proteínas del citosol que específicamente se unen a ellos. Por medio de  $17\beta$ -estradiol tritiado en ratón, se estudió la distribución y mecanismo de acción del complejo R-E, posteriormente se determinó su distribución después de administrar antiestrógenos

(Rochefort,1983). Se han encontrado en todos los tejidos humanos probados, excepto en el pulmón, parece ser que el ligando es característico de cada tejido.

Se han hecho estudios para probar diferentes moléculas (derivados colinérgicos como la acetilcolina, escopolamina, y atropina, así como derivados dopaminérgicos e histamina) que pudieran desplazar a los antiestrógenos de su receptor, pero aún se necesitan investigaciones más completas sobre los posibles ligandos naturales de los antiestrógenos.

El descubrimiento y estudio de los R-antiE, ha causado comparaciones entre su comportamiento y el del R-E, encontrándose que se han identificado R-antiE en tejidos de rata, sensibles y no sensibles a  $17\beta$ -estradiol (Sudo y cols.1983), éste no se puede unir al R-antiE, pero los antiE, si lo pueden hacer con el R-E. No se han encontrado diferencias sustanciales entre el contenido de R-antiE en tumores de mama de pacientes menopáusicas y postmenopáusicas por lo que parece que su síntesis no es dependiente de hormonas esteroides (Metha y Gupta.1987). Sin embargo se ha demostrado que por lo menos en el hígado y útero de rata, hay fluctuaciones en el contenido de R-antiE durante el ciclo estral, e incremento después del tratamiento con estrógeno (Winnecker y Clark,1983; Feye, 1987).

Altas concentraciones de antiestrógenos, inhiben el crecimiento celular en células cancerosas sin que se pueda revertir por medio de estrógenos.

En modelos *in vitro* e *in vivo* los antiestrógenos actúan sobre la síntesis de prolactina, la producción del receptor de progesterona, síntesis de proteínas, incremento del ADN, proliferación celular y bloqueo del ciclo celular en  $G_1$ . Los mecanismos por medio de los cuales funcionan los antiestrógenos son: afinidad y unión con el R-E, unión a los sitios de ligamiento a antiestrógenos y efecto sobre la calmodulina ( Gulino y cols.1986; Lopes y cols.1990).

## ESTRUCTURA QUÍMICA E ISÓMEROS DEL TAMOXIFEN

El Tam pertenece a un tipo de compuestos no esteroideos llamados trifeniletilenos, entre los cuales se presentan moléculas con actividad estrogénica, como el dietilestilbestrol (DES) que fue uno de los primeros compuestos, que se usó como estrógeno no esteroide en problemas de infertilidad (Dodds y cols. 1938 y Dodds, 1949), sus derivados tiene una acción a largo plazo ya que tienen la capacidad de depositarse en la grasa corporal.

Los trifeniletilenos, tienen una estructura general similar con el estrógeno pero se distinguen de él, por una sustitución de la cadena lateral, por un grupo alquilaminoetoxi, los antiestrógenos trifeniletilénicos con la posición correcta de los grupos hidroxilo y fenólico, tienen una afinidad al R-E semejante a la del  $17\beta$ -estradiol. En estudios realizados con cristalografía de rayos X, se ha observado que los trifeniletilenos presentan tres anillos fenólicos que son fijos aunque cada anillo presenta un cierto grado de rotación libre. De acuerdo con la posición de los grupos hidroxilo en estos compuestos, pueden superponer el anillo del trifeniletileno con el anillo A del estradiol, lo cual nos indica la analogía estructural entre los dos compuestos (Raynaud y cols. 1985).

Su capacidad de unión parece depender de la cadena lateral ya que trifenil etilenos que no la presentan no se unen al R-E, la cadena lateral con aminoéteres básicos se unen al receptor a antiestrógenos.

Uno de los problemas que ha presentado el estudio del Tam y el clomifene ha sido la interpretación de las propiedades farmacológicas de sus isómeros geométricos. El isómero *cis* (E) del Tam (ICI47699) tiene efectos estrogénicos, mientras que el isómero *trans* (Z) presenta función antiestrogénica y antitumoral, en el caso del clomifene es al revés lo cuál en un principio creó confusión.

La cadena lateral amino es esencial para la acción antiestrogénica (Jordan, 1984)

Se evaluó la actividad biológica de los isómetos geométricos del 4-hidroxitamoxifén encontrándose que ambos tiene función antiestrogénica, aunque es mucho más potente el

Z que el E. Se ha podido detectar en cultivo de tejidos con el isómero E marcado radioactivamente su conversión en Z. (Jordan, 1984).

Se ha especulado que el Tam es una prodroga y que el antiestrógeno activo es el 4-OH-Tam, pero la acción antineoplásica solo se ha encontrado en el tamoxifén y no en sus metabolitos.

#### METABOLISMO DEL TAMOXIFÉN.

El metabolismo del Tam se lleva a cabo en la vía de las enzimas de P-450 en los microsomas hepáticos (Jacolot y cols.1991) En los humanos involucra procesos de desmetilación, desaminación e hidroxilación en las posiciones clave de de los anillos fenólicos del Tam. El metabolito que se encuentra en mayor cantidad en el suero es el N-desmetiltamoxifén, si se sigue desmetilando da el N-N-didesmetiltamoxifén y una deaminación subsecuente da lugar al metabolito Y. Otra vía metabólica alternativa es la hidroxilación en posición 4, para dar el 4-hidroxitamoxifén que es un potente antiestrógeno, pero se encuentra en el suero en menor cantidad, aunque existe la posibilidad de que durante su extracción se convierta en fenantrenos. Los isómeros de los metabolitos del Tam pueden tener mayor actividad estrogénica o antiestrogénica según la colocación de sus sustituyentes en cadenas laterales.

Desde 1984 Tate y cols, elaboran un modelo de la interacción entre el  $17\beta$ -estradiol o el Tam con el R-E posteriormente fue adaptado por Johnston y cols.en 1996, en el que dos moléculas de  $17\beta$ -estradiol se unen al homodímero del R-E que a su vez se une con los EREs corriente arriba de los genes reguladores, al mismo tiempo conjunta proteínas accesorias, factores de transcripción (TFs) y ARN polimerasa que en conjunto producen la transcripción de los genes dependientes de estrógenos. El Tam baja la dimerización y la

unión al ADN alterando la conformación del R-E evitando que se active el complejo de transcripción.

Este modelo sin embargo no explica la respuesta de los distintos tejidos al Tam, aunque todavía no se conoce mucho al respecto, una posible explicación es que el receptor, active a través de factores de transcripción TF1 o TF2, la expresión de diferentes genes en cada tejido. Otra alternativa para explicar el efecto del tamoxifén sería, que la estructura del receptor fuera distinta en el tejido. (Johston y cols.1996).

La mayoría del Tam y sus metabolitos se encuentran ligados a proteína del suero y solo de un 2 a un 5% se encuentran libres en él (Daniels y cols.1981), y al ser una molécula pequeña puede inclusive atravesar la barrera hematoencefálica y llegar al líquido cerebro espinal (Noguchi y cols..1988). Su concentración es mucho más baja en el suero, que en muchos tejidos. En humano, rata y ratón, se ha probado que hay tejidos que presentan mayores niveles de Tam, como el hepático y uterino (Fromson y cols.1974) mientras que en el músculo esquelético éstos niveles son menores.

Existen diferencias entre la acción del Tam *in vitro* e *in vivo*, la mayor parte de los experimentos *in vivo* se han hecho en pacientes de cáncer mamario, son necesarios más estudios para dilucidar las diferentes respuestas de los tejidos al Tam en los dos modelos.

#### CARACTERISTICAS, EFECTOS Y USOS DEL TAMOXIFÉN.

Los estudios sobre el cáncer mamario, llegaron a un punto crítico al encontrarse que sus células presentaban concentraciones variables de estrógeno, la determinación de la unión de la hormona fué usada como prueba predictiva para preseleccionar pacientes sensibles a la terapia hormonal. Posteriormente, hace unos veinte años los estudios sobre el R-E, permitieron relacionar la unión del  $17\beta$ -estradiol a su receptor, con el efecto proliferativo de las células del cáncer de mama.

Lo anterior permitió que hicieran estudios estadísticos, clasificando a esta enfermedad en dos grandes grupos: los tumores R-E<sup>+</sup> y los R-E<sup>-</sup>. Aproximadamente el 60 % de los tumores de mama R-E<sup>+</sup> responden a la terapia hormonal, mientras que menos del 10% de los tumores que no presentan R-E son sensibles a la misma.

Los conocimientos anteriores abrieron un nuevo campo de investigación bioquímica y farmacológica, en busca de compuestos que pudieran bloquear o inactivar el R-E para que su ligando natural (17β-estradiol) no ejerciera su efecto proliferativo.

En el estudio de antiestrógenos y compuestos con actividad antiestrogénica (tratado anteriormente), se destaca el Tam entre las moléculas probadas clínicamente por ser de los antiestrógenos, el que presenta además de una gran efectividad, menos efectos colaterales (Cole y cols.1971), y menor citotoxicidad, lo cual hizo que este antiestrógeno, fuera probado con buenos resultados, en pacientes con cancer mamario avanzado.

Actualmente, se usa el Tam en la terapia hormonal, que se les administra a las pacientes de cancer mamario después de la mastectomía. Para evaluar clínicamente la terapia antihormonal se realizaron investigaciones en que se administraba el Tam solo o combinado con otros tipos de antiestrógenos (Vink-van Wijngaarden y cols.1994). Uno de los problemas que presenta la terapia con Tam, es que a la larga las células tumorales crean resistencia a su acción (Clarke y cols.1996), lo cual abre un campo de estudio sobre el mecanismo que produce la resistencia al antiestrógeno.

#### RESISTENCIA AL TAMOXIFÉN.

En la actualidad se sabe que el tratamiento con Tam sobre todo en el cáncer de mama puede llevar a un efecto de resistencia del tejido a la droga, en los últimos años se ha incrementado el número de investigaciones para descubrir él o los mecanismos que involucran la resistencia del tumor a este antiestrógeno.

El cáncer de mama resistente al Tam se ha clasificado en dos tipos, el primero lo constituye el 50% de tumores R-E positivos, que desde un principio de la exposición a la droga son resistentes a ella y el otro 50% son tumores que en un principio responden al Tam, pero tiempo después dejan de hacerlo presentando resistencia al tratamiento. No hay por qué pensar en que en ambos casos el mecanismo sea diferente pero sí que es importante los cambios fenotípicos que se dan en las células tumorales por la exposición al Tam (Horwitz, 1995).

El Tam es útil en el tratamiento del cáncer mamario temprano, pero desafortunadamente no lo es en el avanzado, que se caracteriza por aneuploidía e inestabilidad cromosómica, heterogenicidad en las células tumorales y aumento de número de mitosis, probablemente cambios como éstos en las líneas tumorales pueden crear la resistencia al Tam.

El mecanismo preciso por el cual se crea esta resistencia todavía se desconoce, puede que no sea el mismo para cada tumor o subpoblación celular, existiendo varios mecanismos de resistencia en los cuales se involucran factores génicos y no génicos, ya que el Tam no solo actúa sobre el R-E sino también sobre otros factores independientes de él (R-anti-E). Se sabe que pueden estar alterados mecanismos, por los cuales el Tam produce la inhibición de la proliferación tumoral, como son mutaciones que causen la pérdida o modificación de la estructura del R-E por lo que éste no se pudiera unir ni a estrógenos ni a antiestrógenos. Otro factor podría ser el cambio de sus propiedades farmacológicas y metabolismo, ya que como hemos dicho antes el Tam al metabolizarse en el hígado da compuestos, que pueden tener una acción antagonista o agonista a los estrógenos, la acumulación de estos últimos, alteraría la acción antitumoral del Tam, dando por el contrario un efecto proliferativo (Osborne y cols.1991). Otra posibilidad es que el Tam se metabolice en sustancias menos activas que tengan acción agonista a los estrógenos (Osborne y cols. 1991).

El Tam puede inhibir directamente a la calmodulina, que interviene en el metabolismo de los nucleótidos cíclicos, como el AMPc, que media algunos aspectos de la transcripción del gen que codifica para el R-E, por lo que puede a través de este mecanismo inhibir la síntesis del R-E, esta respuesta celular puede contribuir a la resistencia del tejido a la droga.

La resistencia al Tam involucra muchos procesos celulares además de los ya revisados como son: regulación hormonal del hipotálamo-hipófisis-gónada, mecanismos inmunológicos, modificación de la estructura y función de la membrana celular, modificación de la función de la proteinquinasa A y C, además de la secreción de factores de crecimiento entre otros (Clarke y Lipmann, 1996).

#### EFFECTOS TERATÓGENOS DEL TAMOXIFÉN.

En los humanos se han manifestado efectos teratogénos, cuando el producto es expuesto al Tam en la etapa neo y postnatal alterando tejidos en órganos reproductores, como oviducto y endometrio uterino y en tejidos no reproductores como el hueso (Iguchi, 1992)

#### EFFECTOS COLATERALES Y CARCINOGENICIDAD.

Aunque el Tam es el tratamiento más usado en la actualidad contra el cancer de mama, se han comunicado efectos colaterales iatrogénicos del Tam, en el sistema endócrino, ovario, hígado, ojo, hueso, riesgos de tromboembolia y enfermedades cardiovasculares.

La Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC) ha revisado datos de investigaciones experimentales y epidemiológicas que indican fuertes indicios hacia las propiedades carcinogénicas del Tam (Sasco y Grende, 1996).

Es importante conocer que aunque el tamoxifén es una droga muy usada en la quimioterapia del cáncer de mama, es un potente carcinógeno en rata y se asocia con

riesgo de cáncer endometrial y ovárico en humanos, por lo que en los tratamientos se tiene que poner atención en la dosis administrada, periodicidad y duración de los mismos. Se recomienda que la administración de Tam sea por cinco años máximo.

#### CARACTERIZACIÓN DE NUEVOS ANTIESTRÓGENOS Y SU EFECTO ANTITUMORAL

Los estudios sobre los antiestrógenos indican que la mayoría de ellos tienen actividad agonista y antagonista, se ha encontrado que el nuevo compuesto GW5638, presenta una acción antagonista en el útero de ratas ovariectomizadas tratadas con 17 $\beta$ -estradiol inhibiendo la acción del mismo, sin embargo presenta una acción agonista a esta hormona, en tejido óseo y sistema cardiovascular (Willson y cols.1997). De la misma forma el antiestrógeno Analog II, es un potente antitumoral contra el cáncer mamario (Jain y cols.1997).

Las investigaciones en la terapia sobre los tumores dependientes de estrógenos, como son el cáncer de mama y el de la próstata, han avanzado tratando de encontrar un antiestrógeno, que no tenga características agonistas y que no cree resistencia, además de no ser citotóxico. En esta dirección, se realizan estudios *in vivo* con antiestrógenos que no muestran actividad agonista, como el ICI-182.780 (DeFriend y cols. 1994) que parece ser un buen candidato para la terapia del cáncer mamario.

Recientemente se han encontrado moléculas con actividad antiestrogénica y baja citotoxicidad, como los interferones, que aumentan potencialmente los efectos de los antiestrógenos en el cáncer de mama dependiente de estrógenos (Miglietta y cols.1991). Uno de los últimos antiestrógenos sintetizados, el EM-652 es un compuesto (no esteroide), sin actividad agonista, que se considera el más potente de los antiestrógenos estudiados hasta ahora. Se ha caracterizado su unión al R-E, en el útero de rata. El EM-652, es el metabolito activo del antiestrógeno EM-800, cuya afinidad al R-E es de 7 a 11 veces más alta que la del 17 $\beta$ -estradiol, el ICI-182 780, y del OH-Tam (hidroxi-tamoxifén).

La acción de este nuevo compuesto es tan fuerte que puede desplazar al 3H 17 $\beta$ -estradiol del R-E, 20 veces más que el ICI-164 384 y el Droloxifene, y hasta 400 veces más que el Toremifene. Se ha probado la potente actividad de este compuesto en muchos sistemas por lo que es una excelente alternativa y un importante avance en la terapia del cáncer mamario, uterino y otras enfermedades dependiente de estrógenos (Martel y cols.1998).

#### ACCIÓN DEL TAMOXIFÉN SOBRE DIFERENTES TEJIDOS.

En un principio (Jordan y Gosden,1982) se pensó que la acción del Tam, era siempre a través de R-E pero en la actualidad se considera que varios de sus mecanismos de acción son independientes de él, ya que se une a diferentes moléculas claves del metabolismo celular.

En estudios realizados con Tam en células MCF7(cáncer mamario), se ha encontrado que éstas se detienen en la fase G1 del ciclo celular, por lo que no realizan fase S, inhibiéndose de esta forma la mitosis y la proliferación celular (Osborne y cols.1983). Al inhibir la acción estrogénica vía dependiente del receptor, se bloquean enzimas clave en la duplicación del ADN y el metabolismo celular, como son la ADN polimerasa y la ATPasa transportadora de Na / K.

Se ha encontrado que en células BT-20, línea tumoral independiente de la acción estrogénica no hay cambio por acción del Tam en la síntesis de componentes de la matriz extracelular involucradas en la migración celular, función de la que depende la invasividad de las células tumorales (Milton y cols.1989) por lo que en este caso el Tam posiblemente dependa del R-E.

Experimentalmente se ha encontrado que muchos de los efectos del Tam se producen en células R-E negativas o que presentan R-E, pero su unión es en otras moléculas diferentes al R-E, en la actualidad se trata de entender lo mejor posible las funciones del

Tam para optimizar su uso terapéutico y conocer mejor sus efectos colaterales indeseables.

Entre muchas de las funciones independientes de estrógenos, se ha encontrado, que el Tam influencia el metabolismo de las enzimas antioxidantes en el hígado, por lo que produce toxicidad en éste y estatohepatitis en mujeres, después de un tratamiento a largo plazo. Otro aspecto del metabolismo en que puede incidir es en la inhibición de la proteinquinasa C (PKC), esta enzima, es indispensable en la regulación del crecimiento celular y se une al Tam en un sitio específico en la región de su unión al ATP produciendo un efecto antiproliferativo y antitumoral, pudiendo producir apoptosis *in vitro* por este mecanismo (O'Brian y cols.1990).

El Tam presenta una acción independiente del R-E sobre la calmodulina, proteína dependiente del calcio, que actúa como un segundo mensajero clave, que interviene en numerosos procesos celulares, como la activación de la fosfodiesterasa del AMPc y la regulación del metabolismo de los nucleótidos cíclicos. Estas moléculas representan sitios de unión a antiestrogénos que compiten con el R-E por la captación de éstos.

Entre las propiedades agonistas del Tam, encontramos alteración de la forma y del citoesqueleto celular por una disposición diferente de los filamentos de actina ( Sapino y cols.1986). Algunas de las propiedades agonistas del Tam, son independientes del R-E, como la capacidad de disminuir la fluidez de la membrana, que parece resultar de la asociación de este compuesto con los dominios hidrofóbicos de la misma en su región intercelular, esta modificación membranal produce un efecto invasivo, que puede facilitar la metástasis del tumor (Clarke y cols.1990). Asimismo, una acción del Tam no completamente entendida, sobre la membrana, es la disminución o pérdida de su adhesividad a través de la regulación de la E-cadherina.

La catepsina D es una proteasa lisosomal que se produce en gran cantidad en tumores de cáncer mamario dependiente de estrógenos con nódulos y receptor a progesterona (R-P),

éste aspecto se utiliza como indicador y marcador para terapia en cáncer mamario primario con Tam (Maudelone y cols. 1994).

La búsqueda de otras moléculas que actúen como factores de crecimiento que sean dependientes del  $17\beta$ -estradiol se ha estudiado en tumores mamaros de rata, como es la síntesis de activador de plaminógeno del tipo uroquinasa (APu) (Ng y Wonh, 1986), que favorece la capacidad que tienen las células tumorales para invadir y multiplicarse en los tejidos, El Tam tiene un efecto agonista en la formación de APu, la determinación de la presencia o ausencia de esta molécula es predictiva para el uso de terapia con este antiestrógeno. Esto ha revestido tanta importancia, que en la actualidad se está estudiando la biología molecular del APu en células mutantes para el R-E de cáncer mamario (BC-2) (Levenson y cols. 1998), para poder determinar el mecanismo de síntesis a nivel genético.

El Tam también interviene modificando la respuesta inmune, inhibiendo el efecto estimulador que tiene el  $17\beta$ -estradiol sobre la fagocitosis, ya que impide que los monocitos se transformen en células gigantes, además de evitar la formación de  $H_2O_2$  en los neutrófilos, inhibe la acción sobre los linfocitos T en la que pueden bajo ciertas condiciones como la de respuesta a mitógenos, influir para que aumente la secreción de inmunoglobulinas. Los linfocitos T supresores y asesinos ( $CD8^+$ ) presentan un R-E clásico que para el Tam y toremifene actúa como un receptor a antiestrógenos, sin embargo los dos antiestrógenos, influyen sobre la proliferación de linfocitos independientemente de la presencia de  $17\beta$ -estradiol y R-E, produciendo lisis. Esto se ha probado en células R-E negativas, por lo que la destrucción celular debe ser mediada por otro tipo de receptor semejante al de estrógenos, éste se ha encontrado en varios tipos de linfomas murinos y en la mayoría de las células de carcinomas ováricos humanos (Baral y cols. 1996).

Además el Tam se ha usado en el tratamiento de fibrosis retroperitoneal, en un modelo de lupus eritematoso en roedores, en la artritis psoriática y como antifúngica (Kellen, 1996).

#### ACCION DEL TAMOXIFÉN SOBRE EL OVARIO

Los estudios del Tam dentro de los antiestrógenos indican que tiene efectos inhibitorios sobre el desarrollo morfológico, el crecimiento folicular, la ovulación y la esteroidogénesis, aunque como ya hemos visto también tiene funciones de estimulación, al funcionar como agonista del 17 $\beta$ -estradiol (Weniger y cols. 1982).

Las investigaciones de la acción que tiene el Tam sobre el ovario, han presentado dos vertientes: la primera se relaciona con la influencia que puede tener la quimioterapia con Tam sobre este órgano y la segunda implica la investigación sobre el desarrollo del ovario, que involucra la regulación de este proceso por el 17- $\beta$  estradiol, por lo que se ha usado para comprobarlo.

Se han realizado estudios sobre la acción del Tam en el desarrollo del ovario embrionario en aves (Scheib y Baulieu, 1981).

Se usaron embriones de aves como modelo experimental ya que se desarrollan dentro de un sistema cerrado constituido por el huevo, que da oportunidad para modificar específicamente el sistema endócrino del embrión. Este modelo tiene la ventaja sobre el uso de embriones de mamíferos que están influenciados en el desarrollo por la placenta y las características maternas.

La hipótesis de como actúa el Tam sobre el desarrollo y diferenciación del ovario por inhibición de los estrógenos endógenos fué el inicio de distintas líneas de investigación.

Numerosos estudios (Salzgeber y cols.1981; Scheib, 1983; Koo y cols.1985), confirmaron que el Tam no presenta efectos citotóxicos ni teratógenos en el ovario del embrión de

pollo. Salzgeber y Scheib, por separado, estudian el efecto de Tam sobre el desarrollo del ovario en los embriones tempranos de codorniz y pollo respectivamente. Sus resultados indican una inhibición sobre los estrógenos endógenos que modifican la estructura del ovario izquierdo. Con respecto a los testigos en los embriones tratados la corteza de los ovarios izquierdos es muy delgada y en algunos lugares del ovario no existe. La médula ovárica según los autores está muy organizada y los cordones más diferenciados, entre ellos se encuentran islotes de voluminosas células esteroidogénicas llenas de gotas lipídicas, lo que interpretan como una morfología neutra, incluso testicular. Salzgeber y cols. (1981), en su trabajo indican que el Tam no funciona como agonista del 17- $\beta$  estradiol, ya que presenta una acción claramente masculinizante en el ovario y que administrado al mismo tiempo que el Tam no revierte este efecto.

Estos experimentos demuestran que la diferenciación del ovario por lo menos en el embrión de pollo no es pasiva. La proliferación cortical y la inhibición medular están bajo el control de los estrógenos, por lo tanto la acción de un antiestrógeno como el Tam puede inhibirla.

En estudios *in vitro* de células granulosas de rata (Knecht y cols.1985), describe un efecto del Tam similar al del 17- $\beta$  estradiol al estimular significativamente al AMPc y los receptores a HL, que es una acción claramente estimuladora y agonista, este efecto se inhibe con dosis altas del Tam.

Koo y cols. (1985), investigaron por medio de radioinmunoensayo el efecto del Tam en la expresión del antígeno H-W (H-Y) en el desarrollo gonadal del embrión de pollo. Al obtener los ovarios y testículos presentaron una morfología aparentemente normal. En el estudio histológico los tratados con respecto a los testigos, no presentaron alteraciones en los testículos ni el ovario izquierdo. En algunos ovarios derechos se presentaban túbulos que recuerdan a los espermáticos, lo que en parte confirma los resultados de Salzgeber y

cols. (1981), respecto al ovario derecho, pero no está de acuerdo con él, en que se masculiniza el ovario izquierdo por acción del Tam. Con respecto a la secreción de esteroides gonadales sus resultados concuerdan con los de Weniger y cols. (1982), ya que no hay diferencias entre las gónadas testigo y las tratadas.

Koo y cols. (1985) también indican que el ovario izquierdo se sintetiza más  $17\beta$ -estradiol y menos testosterona, que en el derecho y en los testículos, los cuales producen la misma cantidad de testosterona que los ovarios pero menor cantidad de  $17\beta$  estradiol. Ellos identificaron por medio de anticuerpos monoclonales la presencia del antígeno H-W en los ovarios y el hígado de los embriones femeninos testigos, en los masculinos del mismo grupo la respuesta fue muy baja, no saben si debido a la menor cantidad de antígeno en estos tejidos o porque hubo contaminación con heteroanticuerpos. Después del tratamiento con Tam, ambos ovarios y el hígado redujeron su nivel de anticuerpo H-W al nivel de los testículos. Los autores concluyen que la presencia de H-W es inducida por  $17\beta$ -estradiol. Esto concuerda con la aparente masculinización de la gónada derecha, pero no con la estructura normal de la izquierda.

En 1989, Didier y Croisille, con base en los estudios de Samsel y cols. (1986), por medio de electroforesis bidimensional identifican proteínas sexuales específicas ligadas a la membrana plasmática en el embrión de pollo, su hipótesis es que estas moléculas dependen del  $17\beta$ -estradiol. En su modelo experimental para comprobarlo usan benzoato de Estradiol y Tam. Encontraron tres polipéptidos asociados al ovario, dos en el citosol (01 y 02) y el otro asociado a la membrana (03). Las proteínas específicas masculinas solo se encontraron en el citosol. Los ovarios tratados con Tam se observaron más pequeños, la corteza más reducida y la médula sin cambios con respecto a los testigos. En la identificación de las proteínas, no se encontraron cambios cualitativos con respecto a los testigos, se identificaron los tres tipos de proteínas, aunque la cantidad de los

polipéptidos 02 y 03 estaban disminuídos (sobre todo el 02). En los testículos, los testigos presentan cuatro polipéptidos (T1 a T4), los tratados con benzoato de estradiol presentan solo T1, mientras que se identifican en el testículo izquierdo los polipéptidos 02 y 03 que no están presentes normalmente en los testículos. Esto probaría que los ovarios no se masculinizan en presencia de Tam, mientras que los testículos si presentan un grado de feminización, por lo menos a nivel molecular. Esto refuerza la observación tisular de los testículos que se transforman en un ovotestis con una gran corteza que contiene células germinales, la médula contiene estructuras testiculares con espermatogonias.

Los resultados de Didier y Croisille, (1989), difieren de los de (Salgeber y cols.1981; Scheib y Baulieu,1981; Weniger y cols. 1981,1982, 1984 y 1985 y Koo y cols. 1985), ya que en los ovarios tratados con Tam, no se observan cambios histológicos distinguibles, ni masculinización del ovario.

En 1993 Stoll y cols. usaron tratamientos de  $17\beta$ -estradiol y Tam por separado y combinados en testículos de embriones de 13 días de edad que se implantaron en el celoma extraembrionario de embriones femeninos en el periodo en el que todavía no hay diferenciación sexual (3 días de incubación), en estos embriones no tratados o testigos se logró una reversión completa de sexo. El tratamiento previo al implante de los órganos donadores con  $17\beta$ -estradiol, entre los días 11 y 13 inhibe la actividad inductora testicular de los implantes. Esto no sucede cuando se administran  $17\beta$ -estradiol y Tam combinados en que se restaura la actividad masculinizante, sin embargo si se tratan los testículos de tres días con  $17\beta$ -estradiol, se desarrolla la gónada izquierda del receptor en un ovotestis. Adicionalmente al tratar con Tam a los hospederos no modificaron los resultados obtenidos al pretratar a los donadores con  $17\beta$ -estradiol. Los investigadores (Stoll y cols. 1993), concluyen que la pérdida del poder masculinizante no es debida a la acción protectora de los estrógenos endógenos del hospedero.

## PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En la diferenciación sexual de los vertebrados participa la expresión de los genes en factores hormonales y de crecimiento que en conjunto producen el desarrollo normal del ovario. Se ha descrito que el  $17\beta$ -estradiol aparece tempranamente en el ovario del embrión de pollo, influyendo en el desarrollo normal del mismo.

Para conocer la acción del  $17\beta$ -estradiol se han utilizado compuestos inhibidores como los antiestrógenos. De estos compuestos el Tam ha sido uno de los más usados, tanto en la investigación sobre el desarrollo del ovario como en el tratamiento del cáncer de mama dependiente de estrógenos. El Tam presenta efectos agonistas y antagonistas a los estrógenos.

Además se describe un efecto masculinizante del Tam sobre el ovario del embrión de pollo.

En este trabajo se pretende analizar el efecto del Tam, el  $17\beta$ -estradiol y un tratamiento combinado de los dos sobre el desarrollo de las subpoblaciones celulares de la corteza y la médula del ovario del embrión de pollo. Se analizarán las diferentes subpoblaciones celulares del ovario con microscopía de luz, morfometría en cortes semifinos, cuantificación de células y secreción de  $17\beta$ -estradiol y testosterona *in vitro*.

## OBJETIVO GENERAL.

El objetivo central de este trabajo es conocer la acción del Tam y del  $17\beta$  estradiol sobre las subpoblaciones de la corteza y médula del ovario del embrión de pollo en los días previos a su diferenciación a través de:

-Estudiar los efectos del  $17\beta$ -estradiol y el Tam administrados los días 4, 5 y 6 del desarrollo por separado y combinados secuencialmente, observando los cambios producidos en el embrión de pollo a los diecisiete días de incubación.

-Verificar si los tratamientos disminuyen el peso del embrión, la presencia de malformaciones externas y la viabilidad de los embriones.

-Evaluar la acción del  $17\beta$ -estradiol y el Tam sobre la corteza y la médula subcortical del ovario del embrión de pollo de 17 días.

-Detectar la acción de los diferentes tratamientos al compararlos contra el testigo en relación al número de células de las subpoblaciones de: germinales (ovocitos), células somáticas esteroidogénicas y células somáticas indiferenciadas.

-Analizar morfométricamente cambios en el tamaño y el número de células germinales y somáticas en cortes histológicos de ovarios testigos y tratados con Tam y  $17\beta$ -estradiol.

-Medir en animales testigos y tratados la secreción de testosterona y  $17\beta$ -estradiol por ovario en condiciones basales y estimulados con HGC.

## MATERIAL Y METODO.

Se usaron huevos fértiles de gallinas de raza White Leghorn, Babcock B 300, procedentes de Alpes S.A. Tehuacán Pue. Para su desarrollo se utilizó una incubadora Jamesway con circulación de aire forzado a una temperatura de 37.8 °C y 80% de humedad relativa.

Se incubaron aproximadamente 160 huevos por experimento, a los cuales se les administró el tratamiento en una dosis única depositada sobre la membrana corialantoidea usando el procedimiento de cámara falsa, en condiciones estériles bajo campana de flujo laminar. La técnica de cámara falsa consiste en perforar primero la cámara de aire; con una segueta se corta un pequeño triángulo en la región media de la cáscara del huevo. Se coloca mediante una pipeta Pasteur una gota de agua estéril sobre la membrana papirácea, perforando la membrana por medio de una aguja de disección, con un bulbo de gotero se aspira el aire por el orificio practicado en la cámara para hacer el vacío, provocando que el embrión baje y se separe de la membrana papirácea, se remueve esta membrana de la ventana y después del tratamiento se cubren ambos orificios (el de la región media y la perforación de la cámara de aire) con cinta adhesiva transparente.

Para llevar un registro de la mortalidad se realizó ovoscopia durante la incubación.

Los embriones fueron tratados con 17 $\beta$ -estradiol y Tam por separado y combinados.

La dosis de 17 $\beta$ -estradiol se calculó con base en la bibliografía consultada (Salzgeber y cols.1981; Weniger y Samsel.1985 y Didier y Croisille,1989,) se fijó en 600 ng por huevo en solución etanólica al 4%. Para determinar la dosis de Tam se realizó un experimento previo en el cual los embriones se dividieron en 4 grupos: un testigo y 3 problemas, al testigo se le administró una solución alcohólica al 10%, y cada uno los tres grupos problema fueron tratados con una concentración diferente (0.1  $\mu$ g /100 $\mu$ l, 1.0  $\mu$ g /100 $\mu$ l y 10  $\mu$ g /100 $\mu$ l) de citrato de Tam (Steraloids Inc.), en el 5° día del desarrollo. La dosis de Tam que se utilizó fue de 10 $\mu$ g /100 $\mu$ l.

Se incubaron huevos que fueron tratados los días 4, 5, 6 y 7 para establecer los tiempos de mayor respuesta.

Los embriones se obtuvieron al día 17 de incubación y fueron sacrificados por decapitación procesándose sólo las hembras con un peso de 10 gms. o más, que no tuvieran malformaciones externas ni retraso en el crecimiento.

Con ayuda de un microscopio estereoscópico, los embriones fueron sexados y disecados los ovarios izquierdos, de tal manera de no perder material gonadal, ni contaminar la muestra con tejido mesonéfrico. Se colocaron en una caja de Petri con una solución salina de fosfatos libre de  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$  (PBS). Se hicieron grupos de tres ovarios, los cuales se incubaron en viales de vidrio en 3 ml. (1 ml. x ovario) en una solución al 0.25 % de tripsina (Sigma) en PBS, durante 20 minutos aproximadamente en un baño maría con agitación de 90 ciclos/min.

Todo en material de vidrio que se usó se siliconizó previamente con Sigmacote, (Sigma). Para disociar las células, el tejido se pasó repetidamente durante 5 min. a través de pipetas Pasteur con la punta flameada, hasta su disgregación total. A continuación se detuvo la acción enzimática agregando a cada frasco inhibidor de tripsina de frijol de soya (Gibco), disuelto en medio de cultivo Dulbecco modificado de Eagle (DMEM; Gibco) con 0.1% de albúmina sérica bovina (BSA; Sigma), al doble de la concentración de la tripsina. Los volúmenes se ajustaron hasta obtener una dilución total de 4ml. de solución por ovario.

De las suspensiones se tomaron alícuotas para la identificación y cuantificación de las células ováricas por medio de un hemocitómetro, resuspendiéndose las soluciones inmediatamente antes de cargar la cámara; se revisaron dos muestras de cada vial utilizando un microscopio óptico, a un aumento de 40x. El conteo celular se realizó por el

método de doble ciego, identificándose y cuantificándose tres tipos de poblaciones celulares: germinales, con inclusiones de lípidos y sin inclusiones lipídicas.

Las células se identificaron tomando en cuenta las siguientes características:

a) Células germinales: son de forma ovalada de mayor tamaño (20 $\mu$ ), núcleo excéntrico y con un cuerpo de Balbiani en posición yuxtannuclear.

b) Células somáticas: de menos de 25 $\mu$  de diámetro con inclusiones de lípidos ( con más de cinco gotas de lípidos en el citoplasma).

c) Células somáticas sin inclusiones de lípidos: de menos de 20  $\mu$  de diámetro.

Estudio morfométrico Los fragmentos de ovario se fijaron en glutaraldehído al 2.5%, se postfijaron en tetróxido de osmio al 1% y se incluyeron en resinas plásticas (Poly Bed 812, Polysciences). Se hicieron cortes semifinos (0.5- $\mu$ m de grosor) con un ultramicrotomo Reichert-Jung, Ultracut (automático), y se tiñeron con azul de toluidina.

La observación se realizó a 1000x, el microscopio está conectado a una cámara de video que manda la señal a una computadora con monitor policromático, las mediciones se llevaron a cabo por medio del programa para digitalización de imágenes, Image Proplus (versión II).

Las mediciones se hicieron en 10 células de cada tipo por triplicado en campos diferentes por laminilla y tres preparaciones de cada caso (total 90 células). En la corteza se midieron ovocitos y células prefoliculares; en la médula subcortical, células indiferenciadas con inclusiones de lípidos, e indiferenciadas sin inclusiones lipídicas.

Para evaluar el número de células se delimitó el área promedio como estimación del volumen celular de 2640  $\mu^2$ , restando las áreas ocupadas por los vasos sanguíneos y espacios lacunares y contando la cantidad de células por área de las subpoblaciones de células de la médula subcortical, los ovocitos y las células se midieron directamente.

Se hizo radioinmunoanálisis para cuantificar la producción de  $17\beta$ -estradiol y testosterona en los ovarios izquierdos de embriones testigos y tratados incubados durante dos horas.

Los ovarios de embriones de 17 días, testigos y grupos experimentales, se obtuvieron y disgregaron según la técnica ya descrita. Terminada la incubación, se pasaron las suspensiones celulares por una malla de nylon; se lavaron las células centrifugando las suspensiones, se desechó el sobrenadante, resuspendiendo el botón con medio de cultivo. Este procedimiento se realizó tres veces; se hizo la prueba de viabilidad por exclusión de azul de tripano. Se contaron las células y se calculó el volumen que contenía  $1 \times 10^6$ . Se trabajaron dos grupos de viales experimentales, uno en condiciones basales y otro estimulado con 2 UI/ml. de gonadotropina coriónica humana (hCG, Sigma). Se sembraron  $1 \times 10^6$  de células por vial en un medio de cultivo DMEM, suplementado con BSA al 0.1 %, se agregó 1  $\mu$ g de MIX (metilisobutil-xantina) y se incubaron en una atmósfera compuesta por 95% de aire con 5% de CO<sub>2</sub>, a 37°C durante 2 horas. Se pasa el contenido de los viales a tubos de vidrio y se centrifugan a 800g a 4°C durante 15 min. El sobrenadante se mantuvo en congelación hasta realizar el radioinmunoanálisis y cuantificar las hormonas esteroides.

Se obtuvo el [ 1, 2, 6-<sup>3</sup> H(N) ]-estradiol (98  $\mu$ Ci/mM) en New England Nuclear, Dupont y el  $17\beta$ -estradiol radioinerte de Steraloids Inc., el anticuerpo utilizado fué de Radioassay Inc. La 1, 2, 6, 7, <sup>3</sup> H N-testosterona (99.3 Ci/mM), fué adquirida en Du Pont Co NEN Research Product (Boston M.A.). La cuantificación de la hormona marcada unida al anticuerpo se realizó por medio de un contador de centelleo Beckman Ls 6000 IC.

Los resultados fueron tratados estadísticamente, por medio de un análisis de varianza de ANOVA seguido de la prueba de Tukey. Se consideró una diferencia significativa con una  $P < 0.05\%$ .

## RESULTADOS

### Curva dosis-respuesta

Para elegir la dosis que se iba a utilizar, se realizó un experimento previo (referido en el material y métodos) con Tam en tres diferentes concentraciones 0.1, 1.0 y 10  $\mu\text{g}/100\mu\text{l}$ , obteniéndose con la dosis de 10  $\mu\text{g}/100\mu\text{l}$  una mayor respuesta al presentarse un aumento en el número de células esteroideogénicas e indiferenciadas con respecto al testigo no observándose cambios en la cantidad de células germinales con relación al testigo como se muestra en las Figs. 1, 2 y 3. (En los resultados el  $17\beta$ -estradiol se abreviará como E2)

Peso corporal.- En la evaluación de los pesos de hembras y machos tratados (T5, T6, E2, T-E) con respecto a los de los testigos, no se encontraron diferencias significativas con cada uno de los tratamientos como se observa en las tablas I, II y III.

Porcentaje de embriones malformados.- En nuestros experimentos el Tam no mostró actividad teratogénica como se puede concluir al evaluar el número de embriones procesados. Con el tratamiento con E2 al día 5 se encontró una diferencia significativa con una  $p$  de  $< 0.05$  para la prueba de  $\text{CHI}^2$  (Figs. 4, 5 y 6).

Número de células.- Al contar el número total de células por ovario se observó que en las células germinales no hubo diferencia significativa ni en los tratados con Tam, ni con E2, ni el tratamiento combinado con ambas sustancias (Figs. 7, 8 y 9; tablas IV, V y VI), comparados con el testigo.

En las células esteroideogénicas presentaron diferencias significativas con el testigo en los tratamientos con Tam al día 4 y 6, y al día 5 de tratamiento combinado de Tam y E2, el número de células aumentó dando una  $p$  de  $< 0.05$  (Figs. 10, 11 y 12).

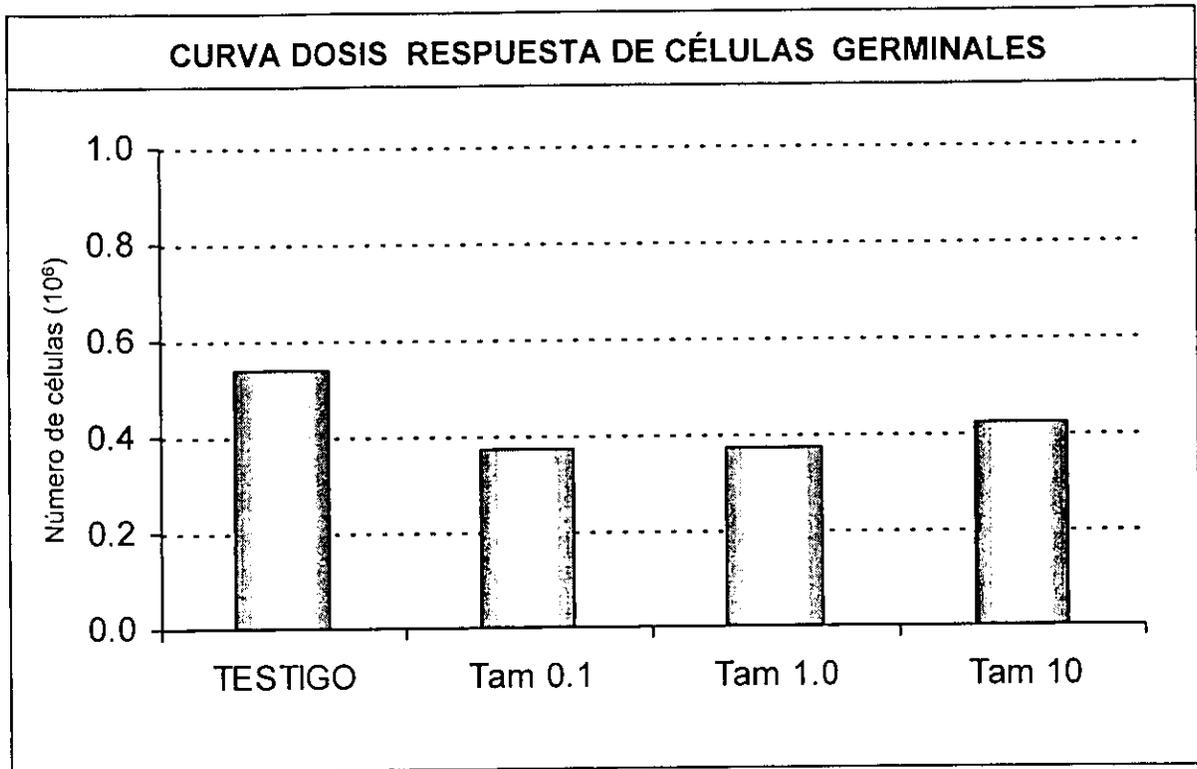


Fig 1.- Número total de células germinales del ovario izquierdo de embrión de pollo de 17 días de desarrollo tratado en el 5<sup>o</sup> día de incubación con diferentes concentraciones de tamoxifén

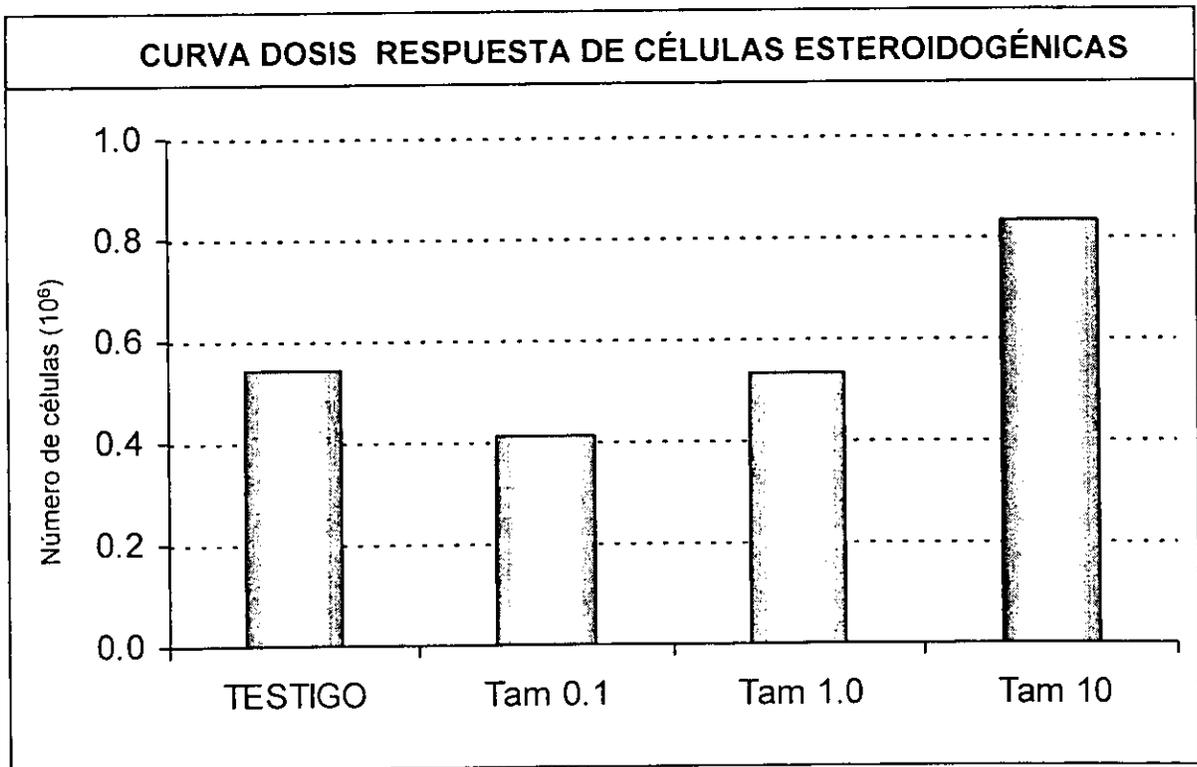


Fig 2.- Número total de células somáticas esteroideogénicas del ovario izquierdo de embrión de pollo de 17 días de desarrollo tratado en el 5<sup>o</sup> día de incubación con diferentes dosis de tamoxifén

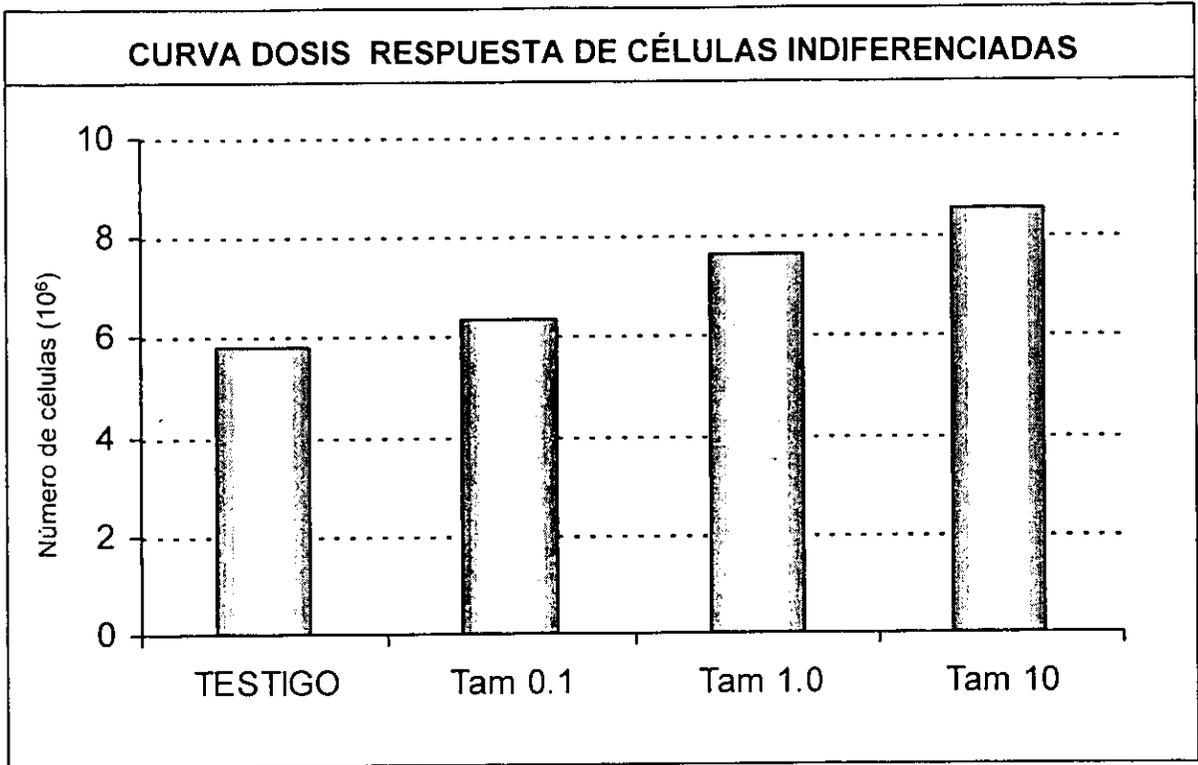


Fig 3.- Número total de células somáticas indiferenciadas del ovario izquierdo de embrión de pollo de 17 días de desarrollo tratado en el 5<sup>o</sup> día de incubación con diferentes concentraciones de tamoxifén

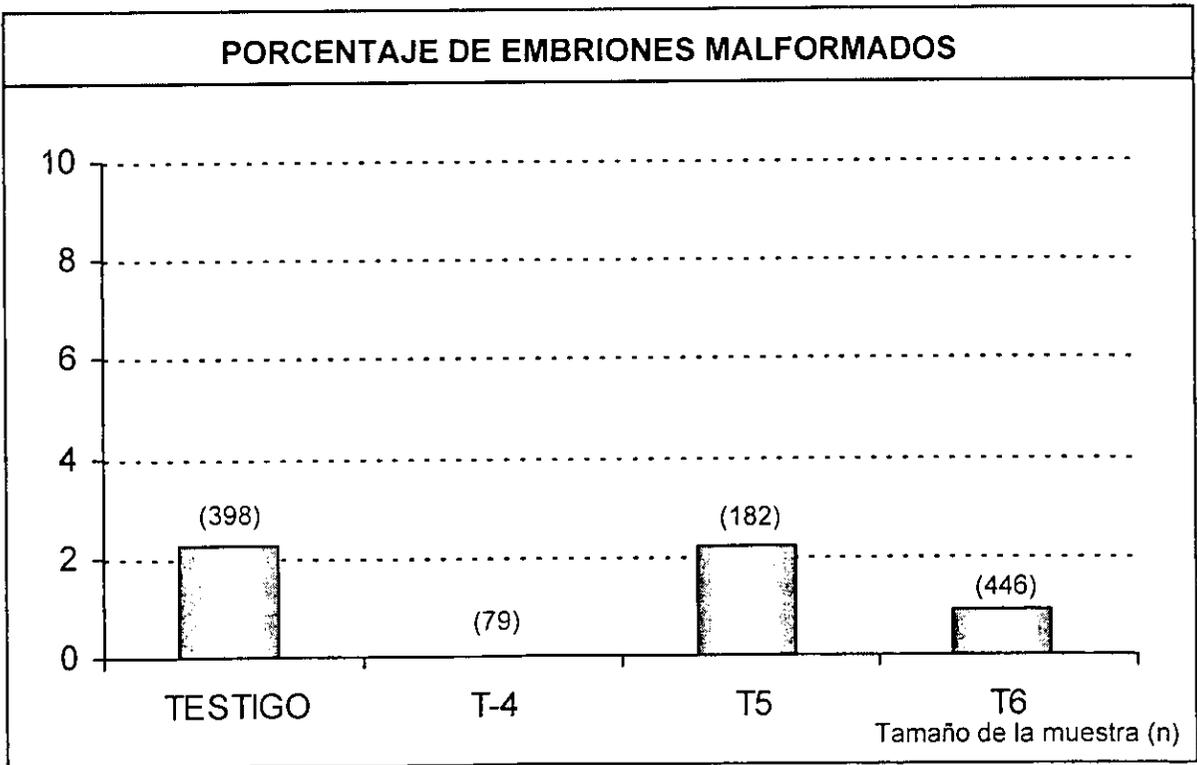


Fig 4.- Porcentaje de embriones malformados de 17 días de desarrollo, testigo y tratados con tamoxifén en los días 4, 5 y 6 de incubación

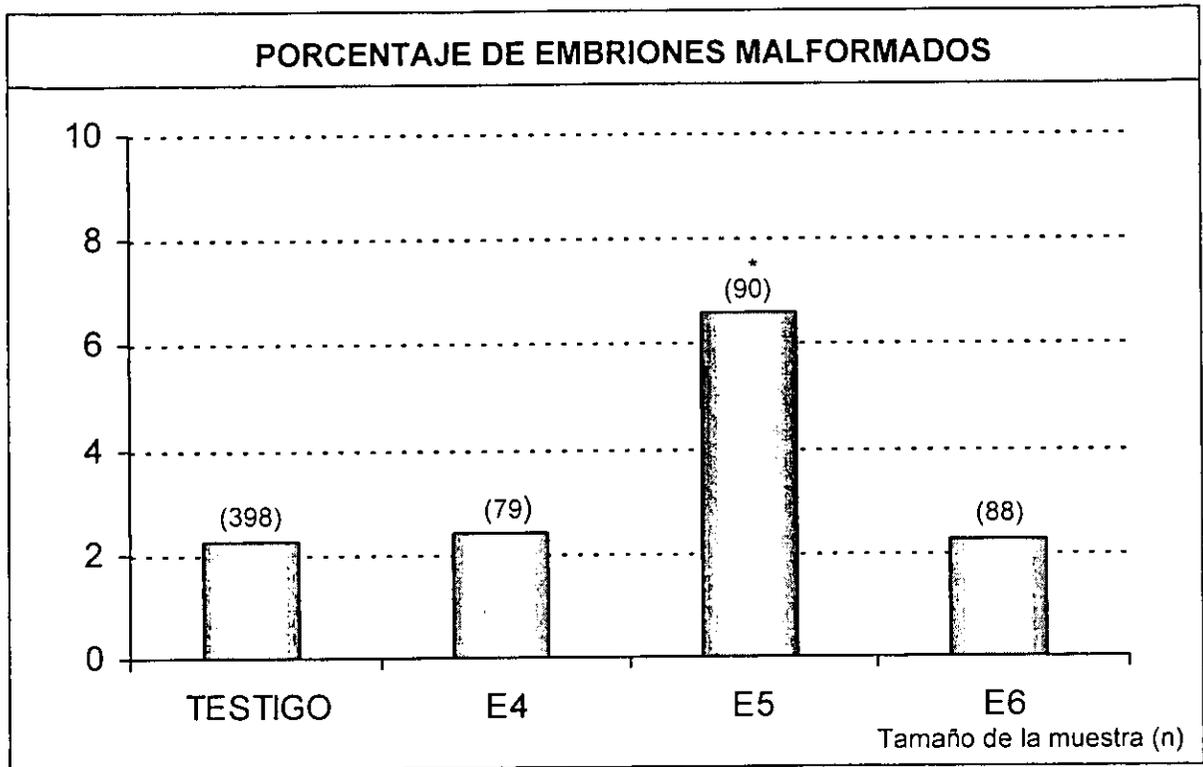


Fig 5.- Porcentaje de embriones malformados de 17 días de desarrollo, testigo y tratados con 17B-estradiol en los días 4, 5 y 6 de incubación. Se observa una diferencia significativa con el tratamiento en el día 5 con una  $*p < 0.05$ , prueba de  $\chi^2$

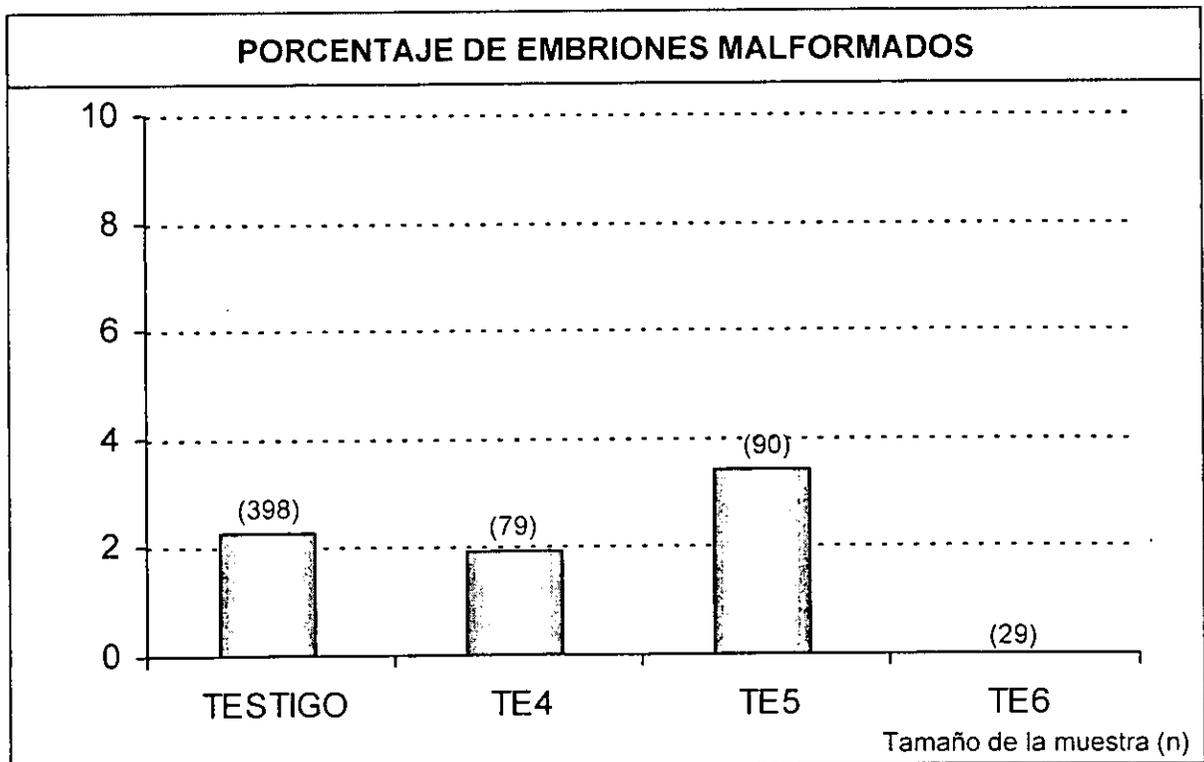


Fig 6.- Porcentaje de embriones malformados de 17 días de desarrollo, testigos y tratados con tamoxifén y 17B estradiol combinados en los días 4, 5 y 6 de incubación

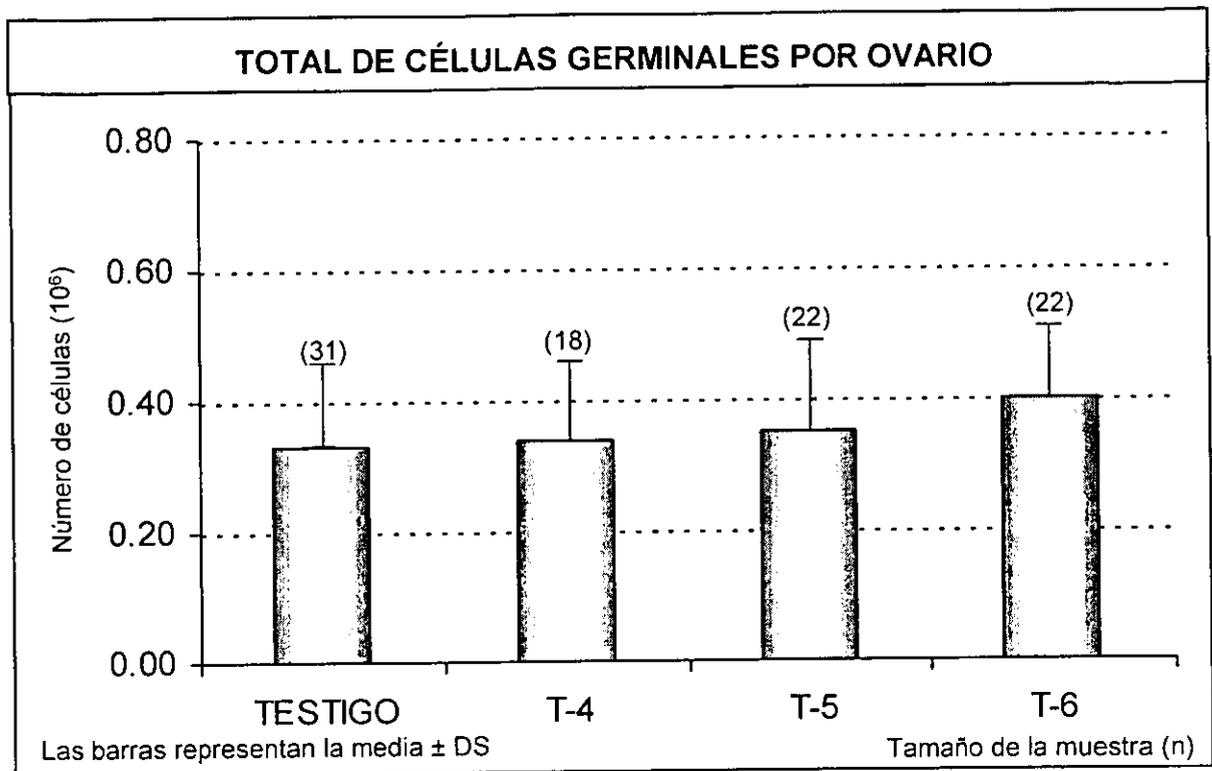


Fig 7.- Número total de células germinales del ovario izquierdo de embrión de pollo de 17 días de desarrollo, testigo y tratados con tamoxifén en los días 4,5 y 6 de incubación.

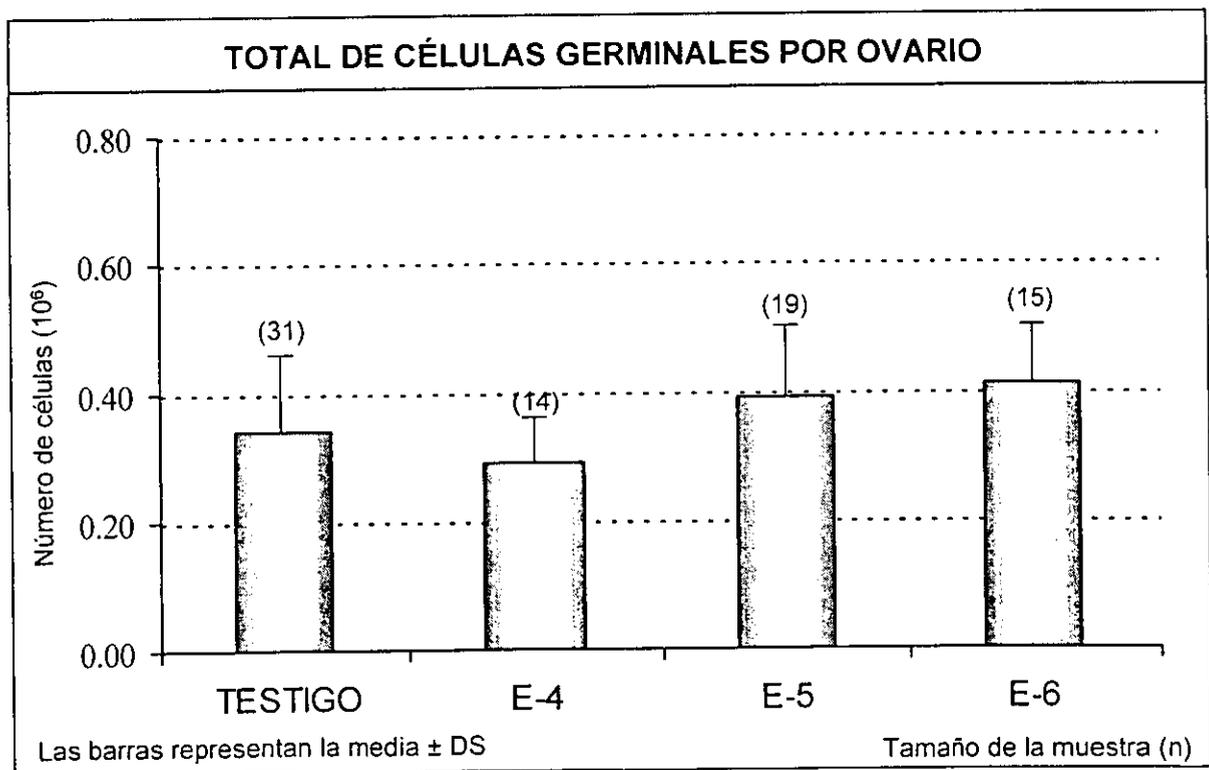


Fig 8.- Número total de células germinales del ovario izquierdo de embrión de pollo de 17 días de desarrollo, testigo y tratados con 17B-estradiol en los días 4,5 y 6 de incubación.

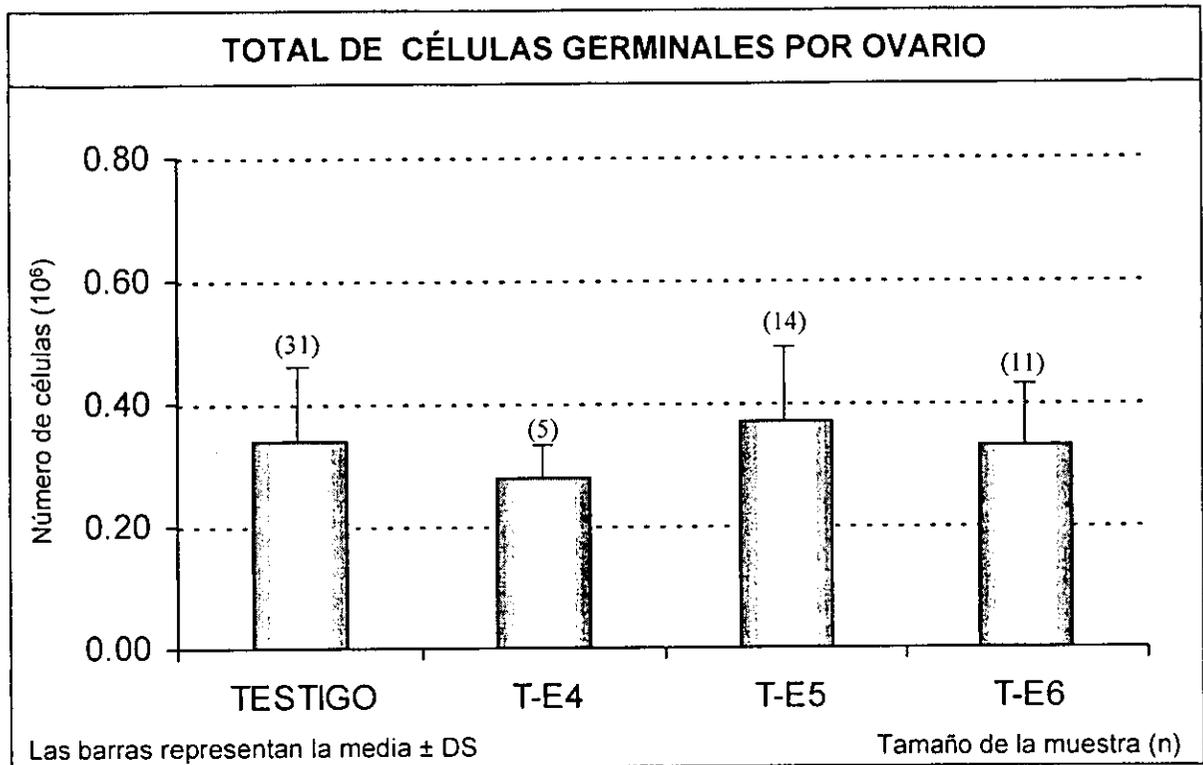


Fig 9.- Número total de células germinales del ovario izquierdo de embrión de pollo de 17 días de desarrollo, testigo y tratados con tamoxifén y 17 $\beta$ -estradiol combinados en los días 4,5 y 6 de incubación.

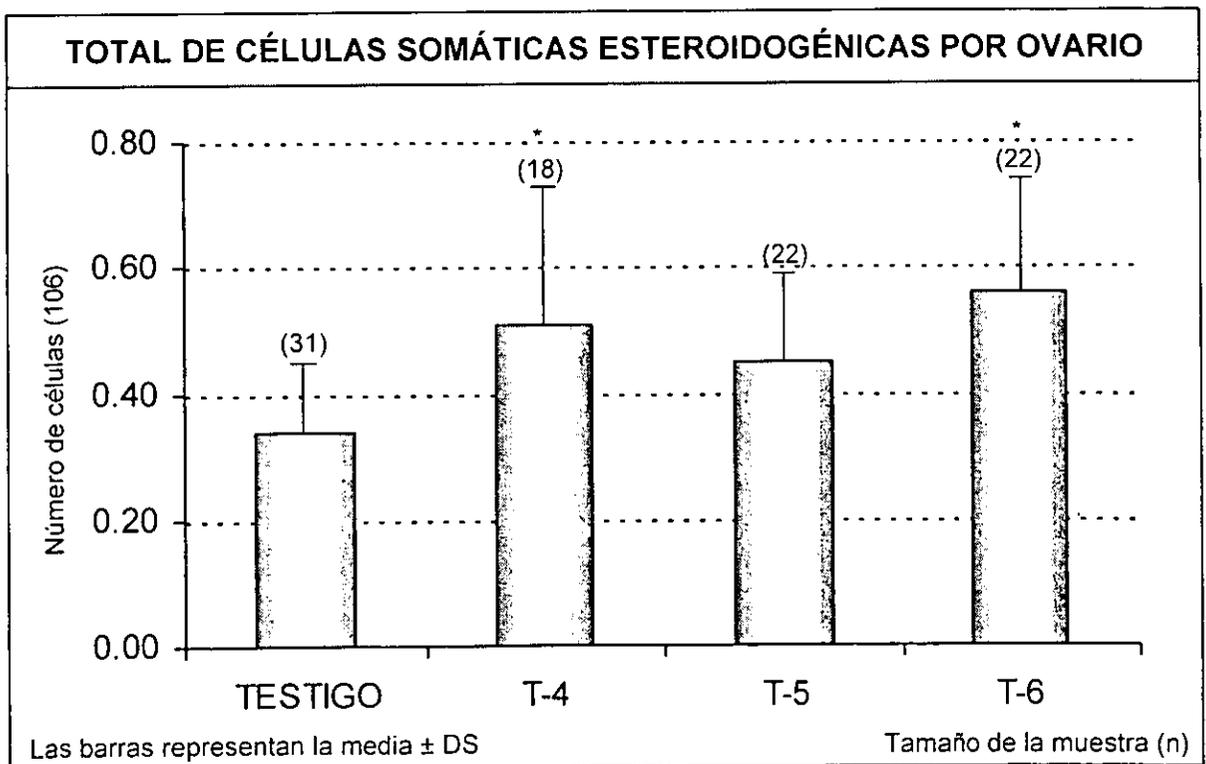


Fig 10.- Número total de células somáticas esteroideogénicas de ovario izquierdo de embrión de pollo de 17 días de desarrollo, testigo y tratado con tamoxifén en los días 4,5 y 6 de incubación. Se observó una diferencia significativa en el día 4 y 6 con una  $p < 0.05$  vs el testigo

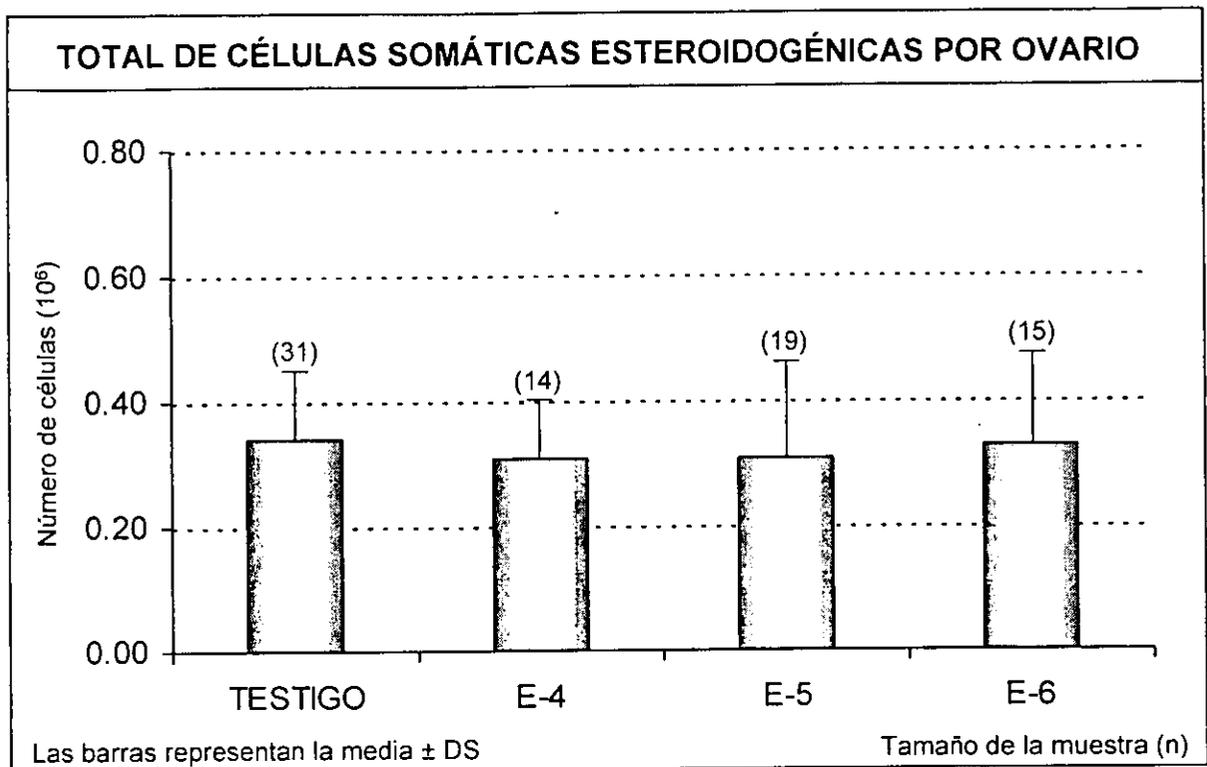


Fig 11.- Número total de células somáticas esteroideogénicas del ovario izquierdo de embrión de pollo de 17 días de desarrollo, testigo y tratados 17B-estradiol en los días 4,5 y 6 de incubación.

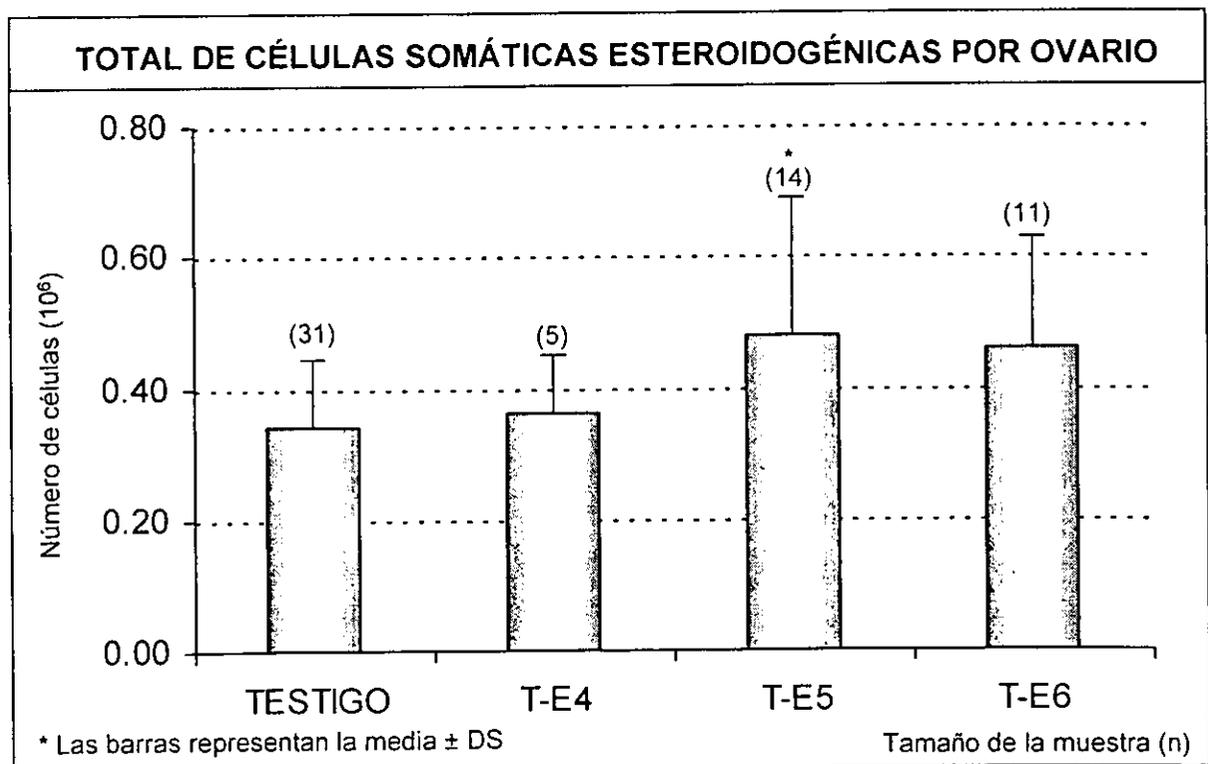


Fig 12.- Número total de células somáticas esteroideogénicas del ovario izquierdo de embrión de pollo de 17 días de desarrollo, testigo, tratados con Tamoxifén y 17B-estradiol combinado en los días 4,5 y 6 de incubación. Se observó una diferencia significativa con una  $p < 0.05$  de T-E5 vs. testigo

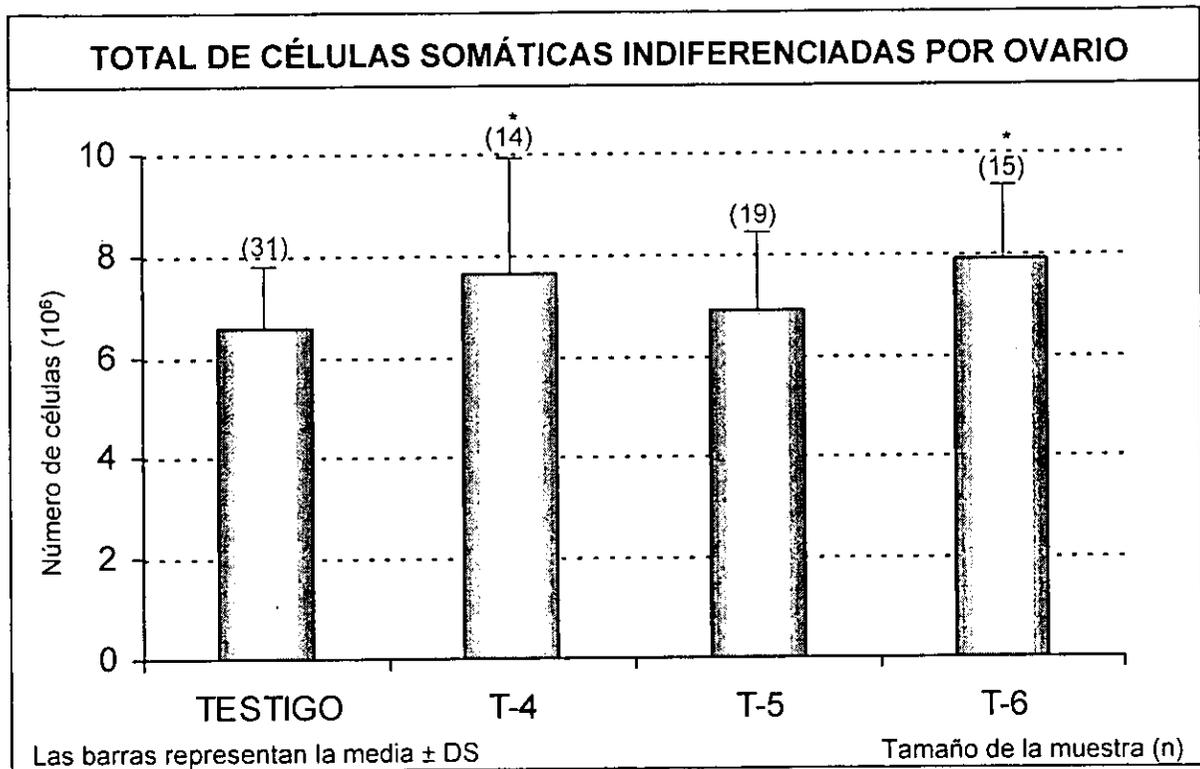


Fig 13.- Número total de células somáticas indiferenciadas del ovario izquierdo de embrión de pollo de 17 días de desarrollo, testigo y tratados con tamoxifén a los días 4,5 y 6 de incubación. Se observó diferencia significativa con una \*  $p < 0.05$  de T4 y T6 vs. testigo

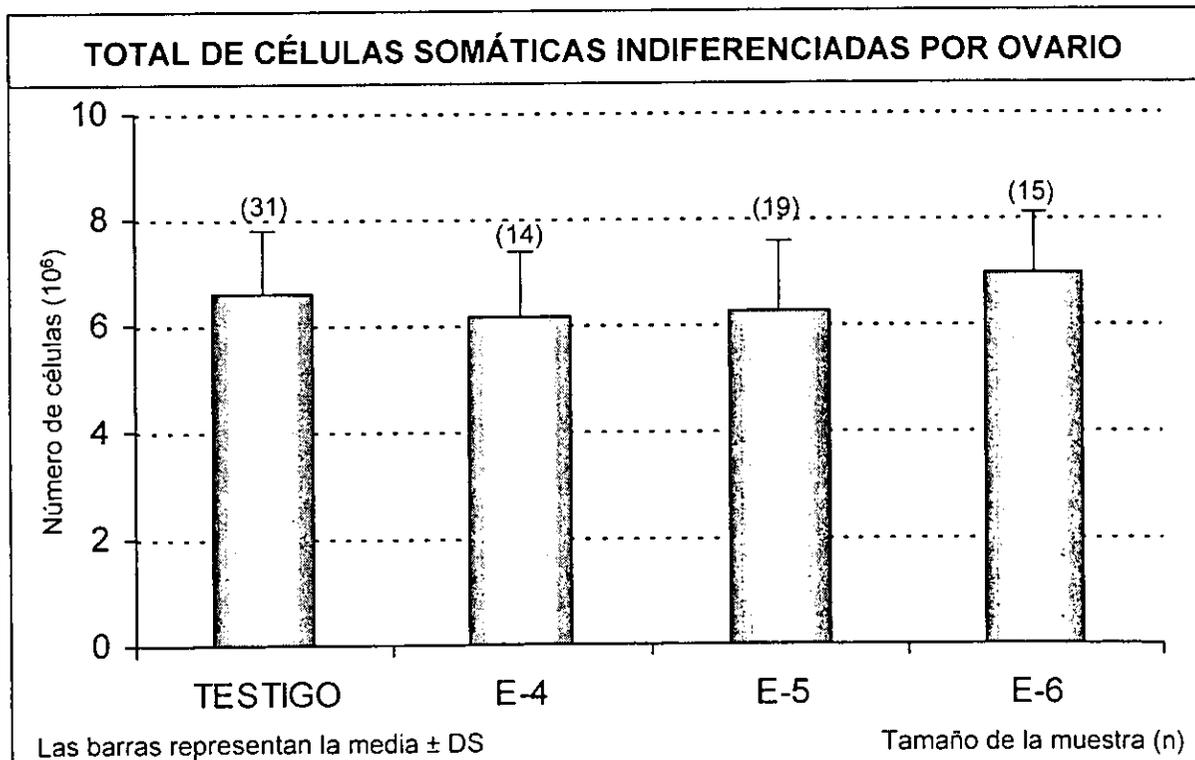


Fig 14.- Número total de células somáticas indiferenciadas del ovario izquierdo de embrión de pollo de 17 días de desarrollo, testigo y tratados con 17B-estradiol a los días 4,5 y 6 de incubación

(Tablas VII, VIII y IX). No hubo aumento de células esteroideogénicas en los ovarios tratados con E2 ni al día 5 tratados con Tam.

En las células somáticas indiferenciadas se obtuvieron diferencias significativas con respecto al testigo en los tratamientos de Tam al día 4 y 6. A estas edades el número de células se observó aumentado. En el tratamiento combinado de Tam y E2 se encontró un aumento significativo cuando el tratamiento se aplicó al día 6 de incubación, con una  $p$  de  $< 0.05$ . No se mostraron diferencias significativas en el número de células somáticas en los tratamientos con Tam al día 5 ni con E2 en los diferentes días (Figs.13, 14 y 15; tablas X, XI, XII).

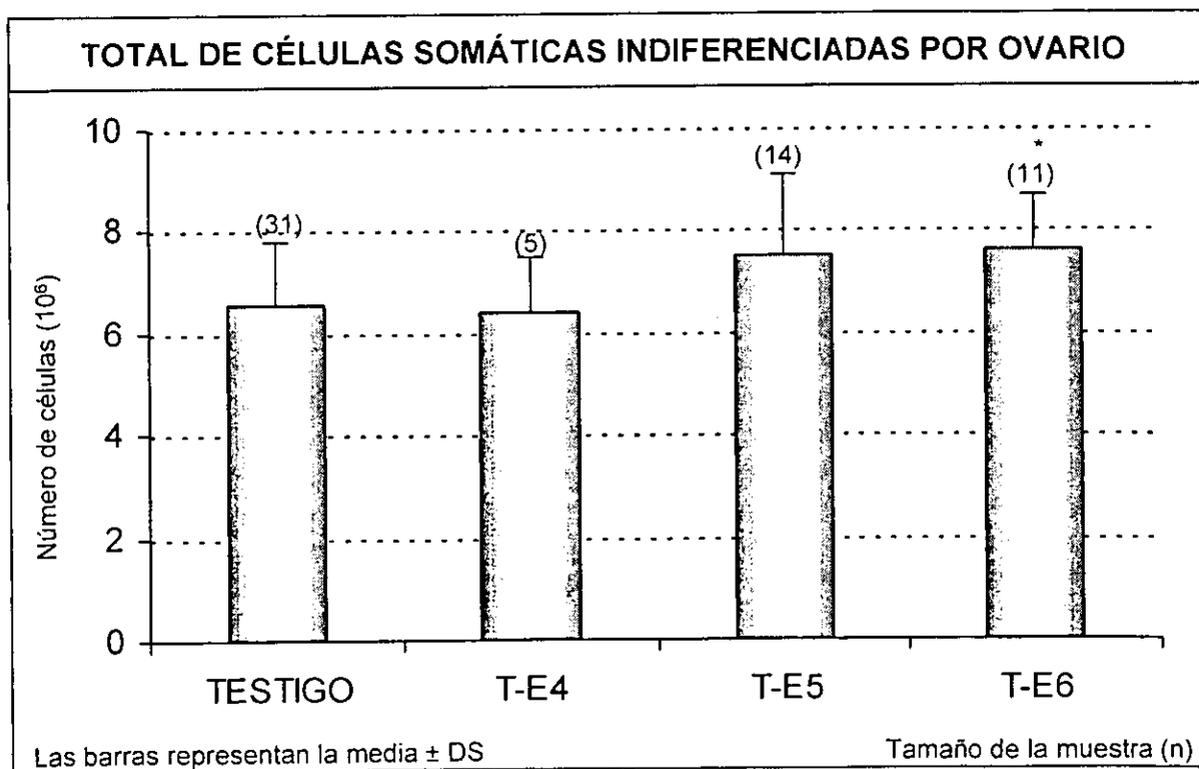


Fig 15.- Número total de células somáticas indiferenciadas del ovario izquierdo de embrión de pollo de 17 días de desarrollo, testigo y tratados con tamoxifén y 17 $\beta$ -estradiol combinados en los días 4,5 y 6 de incubación . Se observó diferencia significativa con una \*  $p < 0.05$  de T-E6 vs. testigo

### Descripción morfológica.

El ovario del embrión de pollo de diecisiete días de incubación histológicamente presenta dos áreas definidas: corteza y médula.

La corteza está formada por un epitelio germinal monoestratificado, el mesénquima subyacente presenta un aspecto laxo formado por fibroblastos y escasos elementos fibrilares. En la cara interna del epitelio se observan células que posteriormente se encuentran como prefoliculares. Las células prefoliculares están distribuidas entre los ovocitos primarios, algunos de los cuales se encuentran unidos por puentes citoplásmicos celulares (Fig.16). En la región medular podemos encontrar ovocitos en la vecindad de las lagunas sanguíneas o incluso en su interior, que al parecer están vías de degeneración (Fig.17).

La médula se divide en dos áreas, una subcortical y una profunda. En la primera se observan islotes de células esteroideogénicas de distinta extensión, caracterizadas por presentar en su citoplasma inclusiones de gotas lipídicas de diferente diámetro, que enmascaran a núcleos pequeños y oscuros, (su función es sintetizar andrógenos). El resto de las células conforma una población mixta de células indiferenciadas entre las que encontramos células con núcleo grande con dos o tres nucleolos y citoplasma sin inclusiones lipídicas (que sintetizan E2), fibroblastos y células que limitan grandes espacios lagunares. Las lagunas se observan de mayor tamaño en la región profunda de la médula (Fig.17).

Se observaron vasos sanguíneos tanto en la corteza como en la médula pero en esta última son más numerosos ( Fig. 18).

Los ovarios obtenidos de los embriones tratados con Tam sobre todo al día 6 presentaron a la observación macroscópica, tamaño grande y aspecto esponjoso.

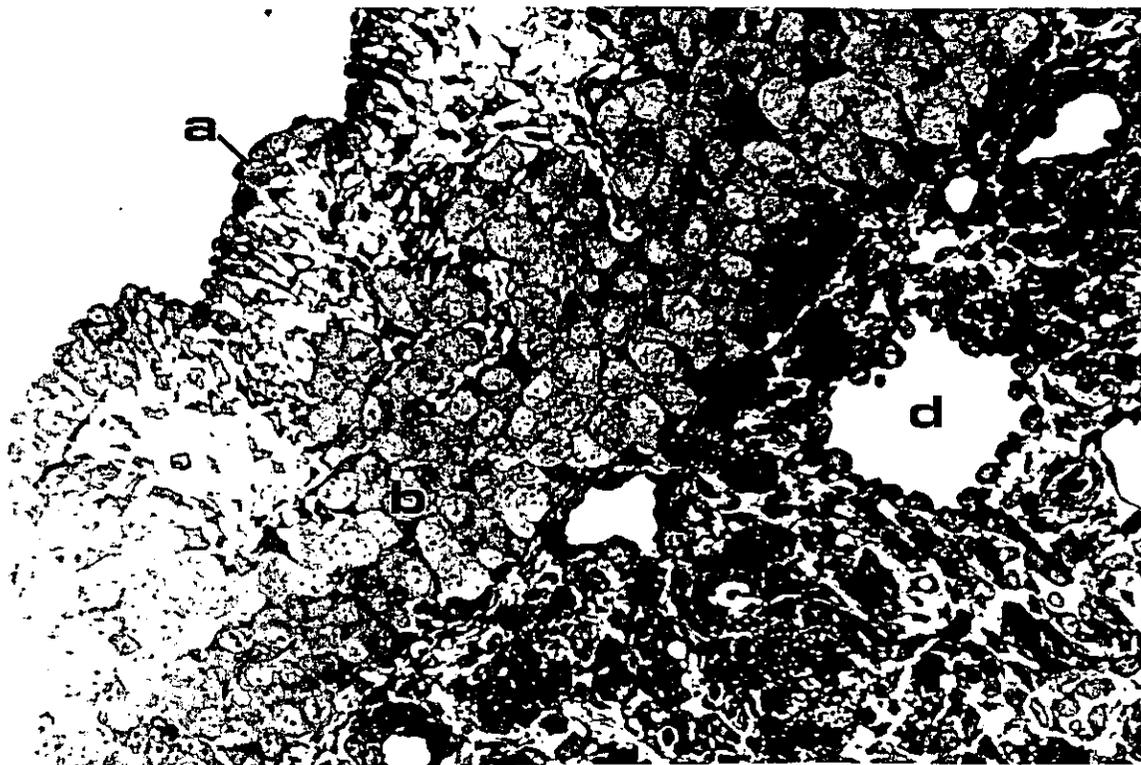


Fig.16.- Corte semifino de ovario del grupo testigo teñido con azul de toluidina, en el que se observan la corteza y la médula subcortical en donde se señalan: a) epitelio germinal. b) nidos de células germinales. c) médula. d) lagunas, (400 x).

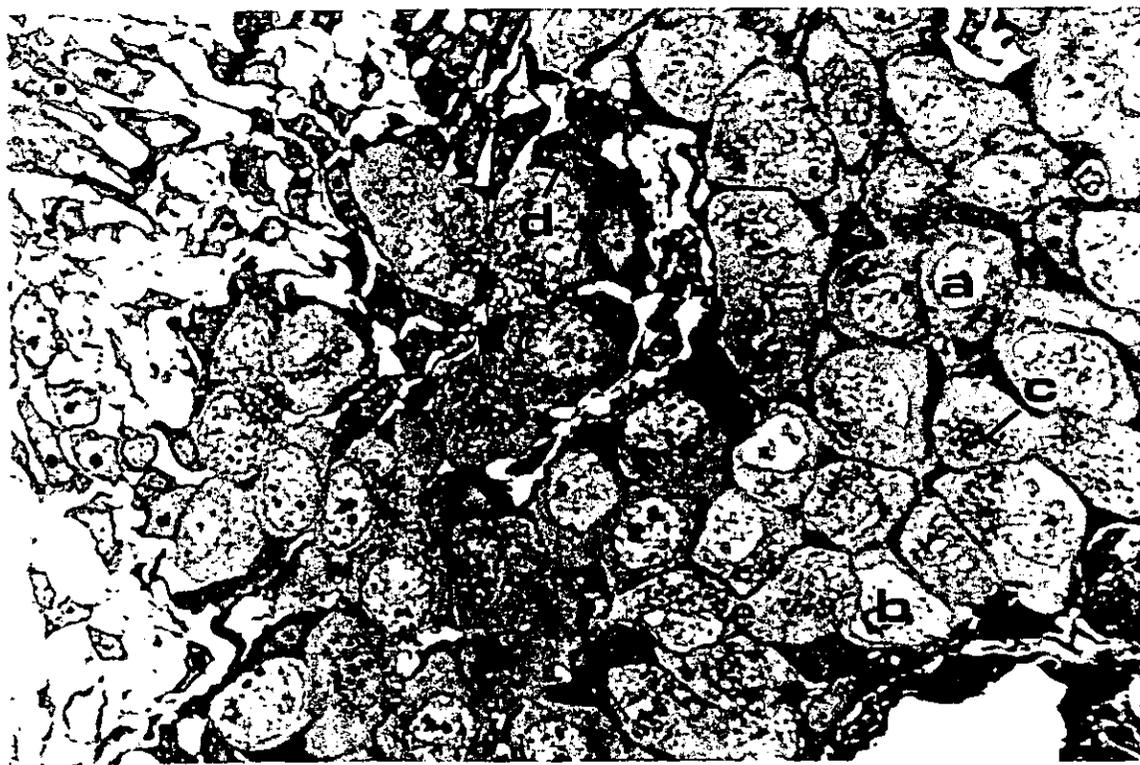


Fig. 16 A.- Corte semifino de ovario del grupo testigo, teñido con azul de toluidina, en el que se observan: a) nidos de células germinales. En las células germinales encontramos: b) núcleo vesiculoso. c) cuerpo de Balbiani. d) células prefolliculares. e) puentes intercitoplásmicos. (1200x)

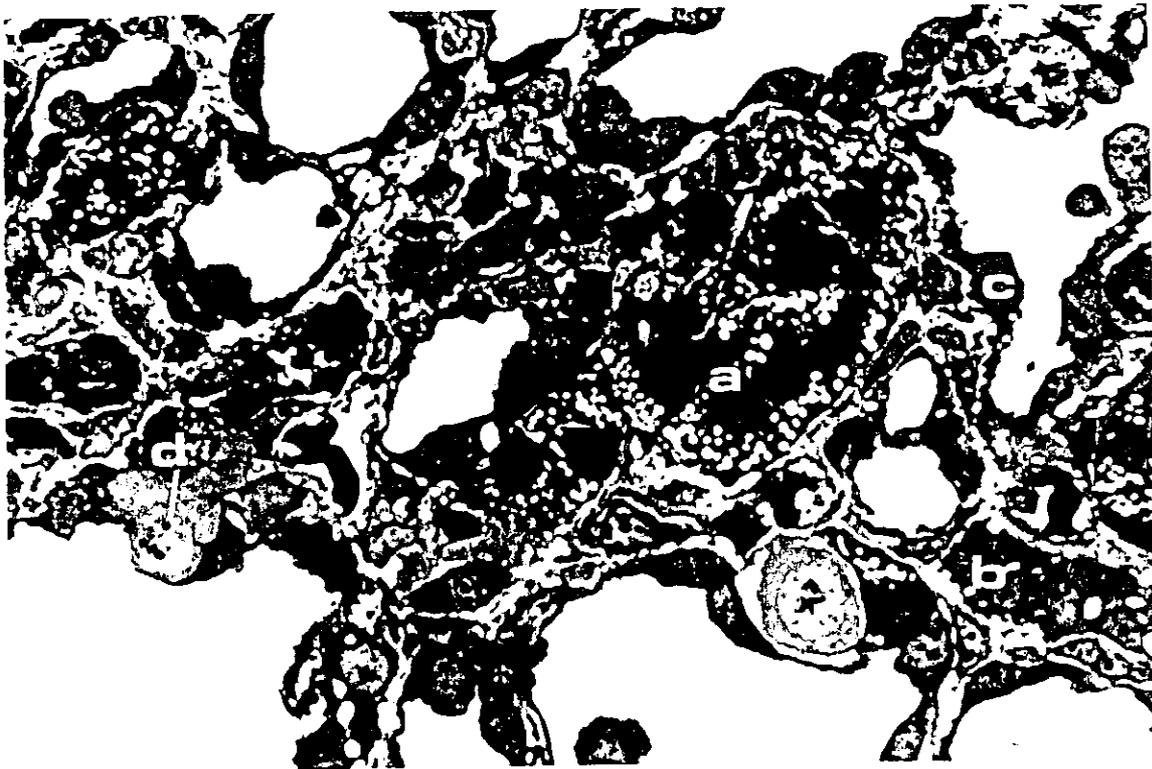


Fig 17.-Corte semifino de médula del ovario del grupo testigo teñido con azul de toluidina, en donde se distinguen: a) islotes de células somáticas esteroidogénicas. b) células somáticas indiferenciadas entre los islotes c) células somáticas rodeando a las lagunas d) células germinales dentro de las lagunas en vía de degeneración (1200X).

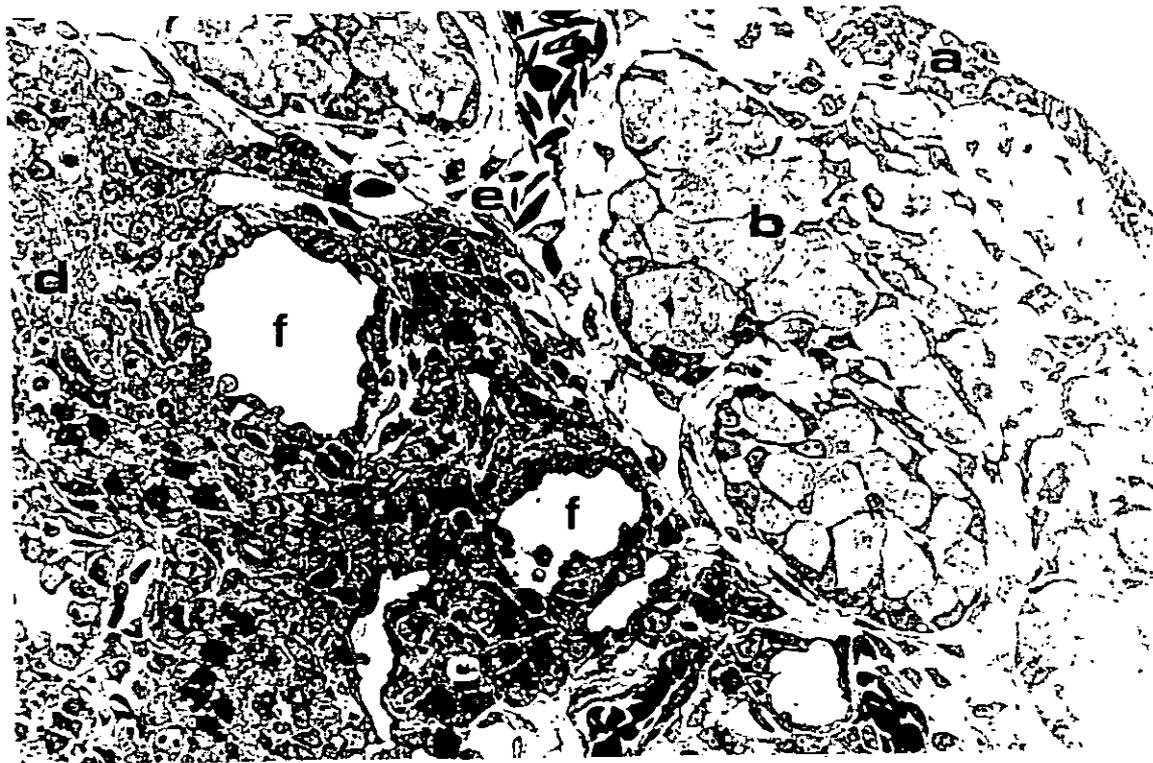


Fig.18.- Corte semifino de ovario teñido con azul de toluidina, tratado con tamoxifén al día 5 de incubación en la corteza se observa: a) epitelio germinal. b) nidos de células germinales. En la médula c) islotes de células somáticas esteroidogénicas. d) células somáticas indiferenciadas. e) vaso sanguíneo. f) lagunas.(400X)

Morfológicamente los diferentes tratamientos, tuvieron los siguientes efectos sobre la histología del ovario.

Los tratados con tamoxifén al 5° día (T5), presentaron un epitelio celómico grueso, en los ovocitos se observó un citoplasma vacuolado y algunos "nidios" aparecían vacíos, formados por células prefoliculares grandes con muchas ramificaciones ( Fig.18 ).

En los ovarios tratados con Tam a 6 días (T6) encontramos la corteza desde un tamaño normal a hipertrofiada, con un epitelio celómico de un grosor variable. Se observan abundantes ovocitos con núcleos y cuerpos de Balbiani grandes (Fig.19) no se observan los límites entre los ovocitos, y las células prefoliculares presentan el mismo aspecto hipertrofiado que en T5.

En el ovario de los embriones tratados con E2 en el día 5 del desarrollo (E-5), encontramos un epitelio celómico engrosado con ovocitos que presentan grandes cuerpos de Balbiani y células prefoliculares con núcleos grandes con uno a tres nucleolos (Fig.20).

En los ovarios tratados con E2 y Tam al día 5 (T-E5), encontramos un epitelio celómico semejante a T6, los ovocitos se asemejan a los de los tratamientos anteriores y las células prefoliculares presentan un tamaño mayor a las del testigo (Fig.21)

En la médula de los ovarios tratados con T5 los islotes de células esteroideogénicas tienen un aspecto parecido a los del testigo, los núcleos tienen aspecto normal y las inclusiones lipídicas parecen ser de mayor tamaño. En T6 los islotes presentan el mismo aspecto que en los grupos anteriores las gotas lipídicas parecen ser semejantes a las de T5 pero las células esteroideogénicas aparentemente presentan dos tipos de núcleos unos pequeños más condensados y otros de mayor tamaño de color claro (Fig.22).

Los ovarios tratados con E2 presentan islotes de células esteroideogénicas grandes con núcleos voluminosos que poseen de uno a tres nucleolos y en su citoplasma muestran grandes gotas de naturaleza lipídica (Fig. 23).



Fig. 19.- Corte semifino de corteza de ovario teñido con azul de toluidina, tratado con tamoxifén al día 6 incubación en el que se observan: a) epitelio germinal. b) nidos de células germinales c) células prefolliculares. d) fibroblastos e) vaso sanguíneo. (1200 X)

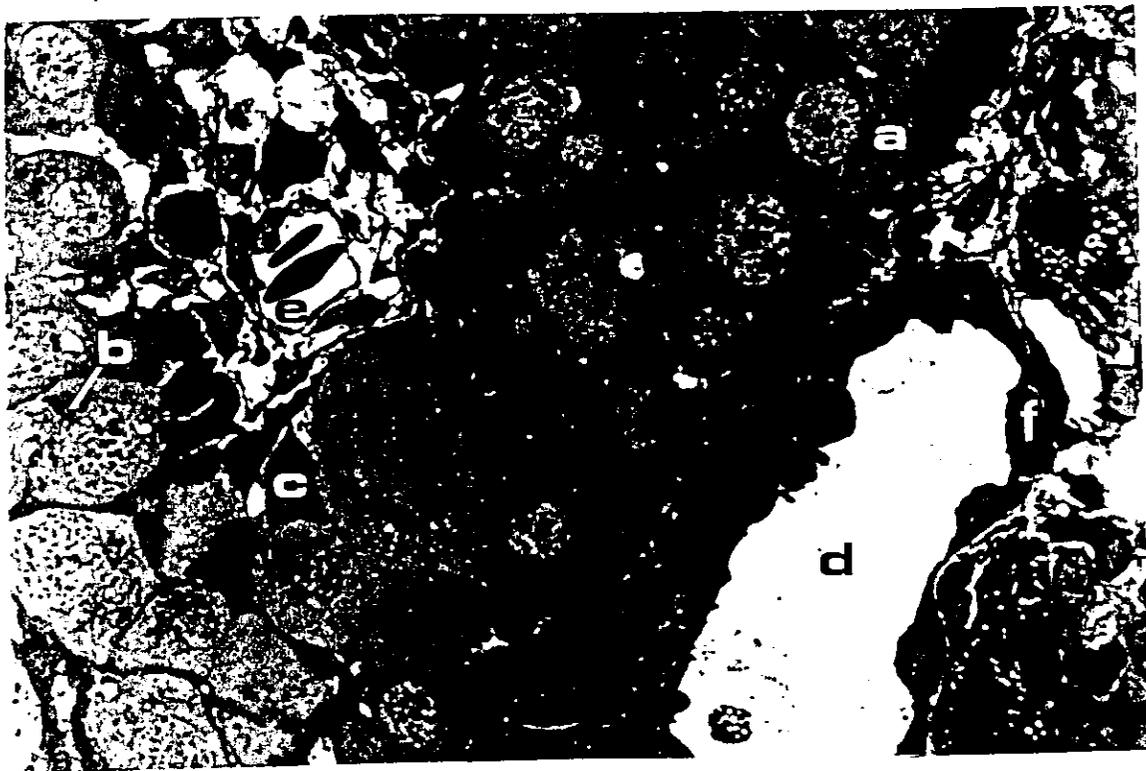


Fig. 20.- Corte semifino de ovario teñido con azul de toluidina, tratado con  $17\beta$ -estradiol al día 5 incubación en el que se observa: a) célula germinal. b) cuerpo de Balbiani. c) célula prefollicular. d) laguna. e) vaso sanguíneo. f) célula indiferenciada que delimita la laguna (1200 X)

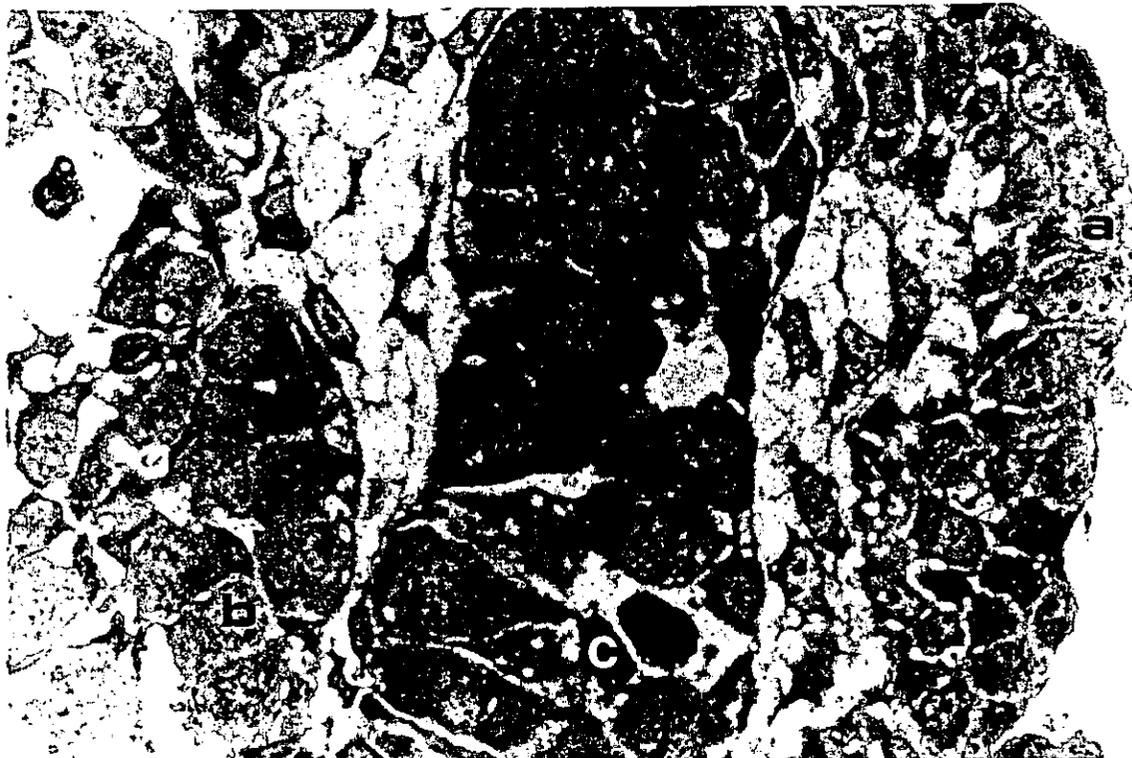


Fig. 21.- Corte semifino de corteza de ovario teñido con azul de toluidina, tratado con tamoxifén y  $17\beta$ -estradiol al día 5 incubación, en el que se observan: a) epitelio germinal b) nido de células germinales c) células prefolliculares. (1200 X)

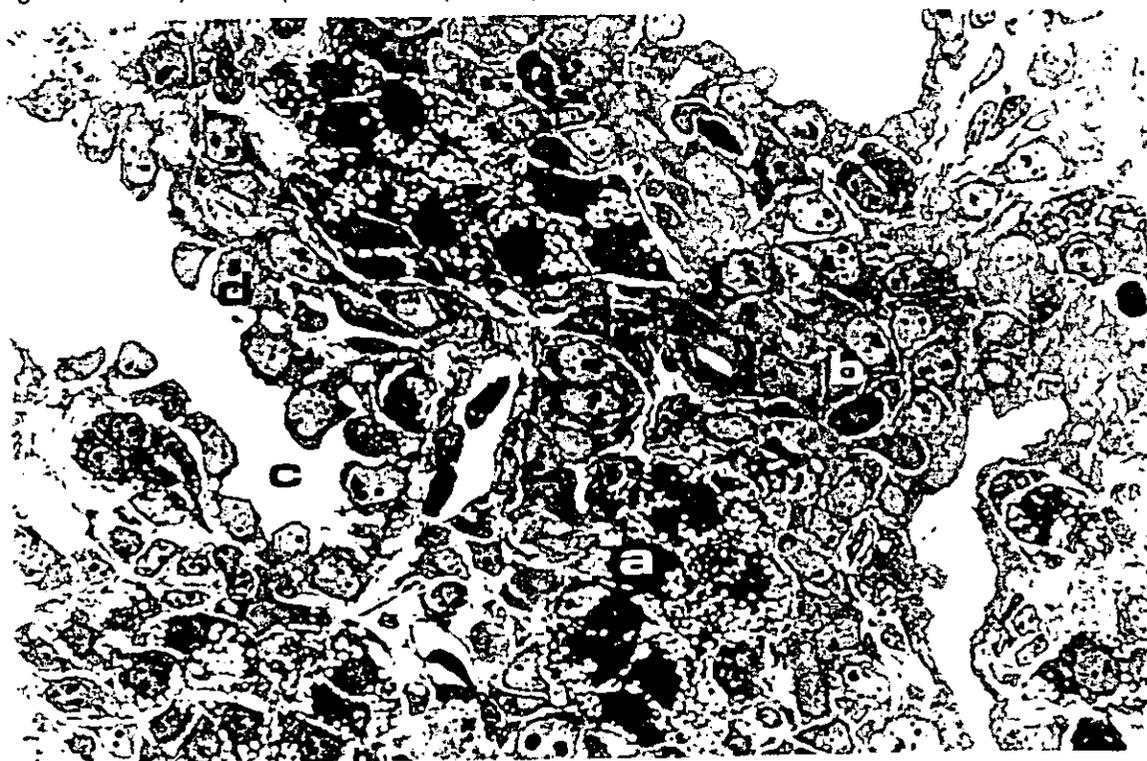


Fig. 22.- Corte semifino de médula de ovario teñido con azul de toluidina, tratado con tamoxifén en el día 6 incubación se observan: a) islotes de células somáticas esteroidogénicas. b) células somáticas indiferenciadas. c) laguna. d) células hipertrofiadas que delimitan las lagunas. (1200 X).

En T-E los islotes son de diferentes tamaños y las células esteroidogénicas muestran como en los tratamientos anteriores células grandes con gotas lipídicas (Fig 24).

En el grupo testigo se observan células indiferenciadas grandes con núcleos de diferente tamaño y con algunas gotas lipídicas en el citoplasma, en T5 y T6 el tamaño de las células es variable pero también presentan gotas en el citoplasma. En los ovarios tratados con E2, las células indiferenciadas parecen de mayor volumen con núcleos de diferentes tipos y sin gotas en el citoplasma (Fig. 24).

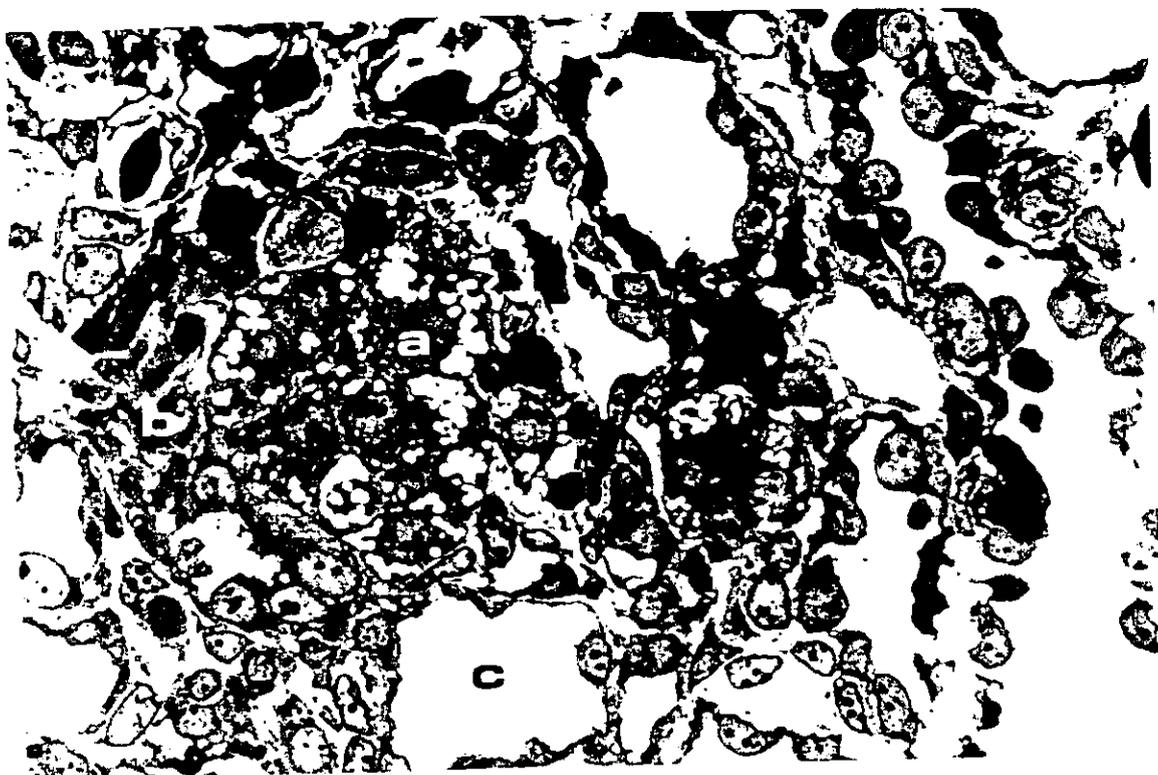


Fig. 23.- Corte semifino de médula de ovario teñido con azul de toluidina, tratado con  $17\beta$ -estradiol en el día 5 de incubación, se observan: a) islotes de células somáticas esteroidogénicas. b) células somáticas indiferenciadas. c) laguna (1200 X).

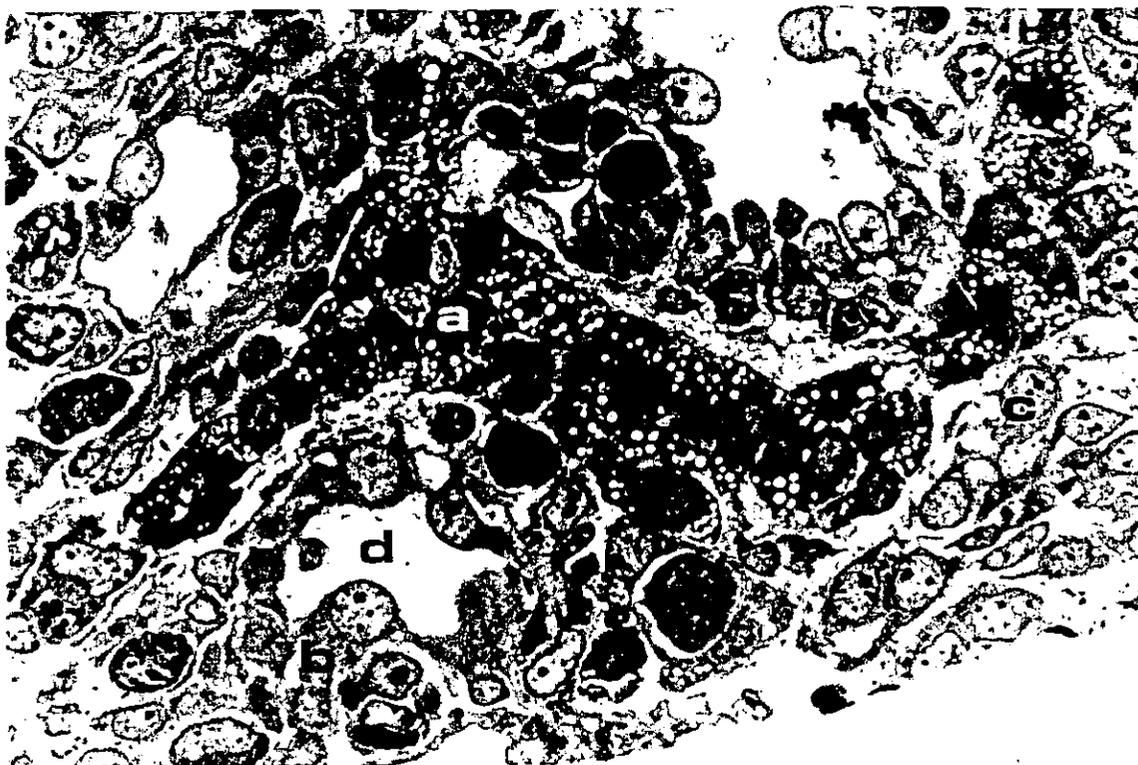


Fig. 24.- Corte semifino de médula de ovario teñido con azul de toluidina, tratado con tamoxifén y  $17\beta$ -estradiol en el día 5 de incubación, se observan: a) islotes de células somáticas esteroideogénicas. b) células somáticas hipertrofiadas que limitan a las lagunas. c) células somáticas indiferenciadas. d) lagunas. (1200 X)

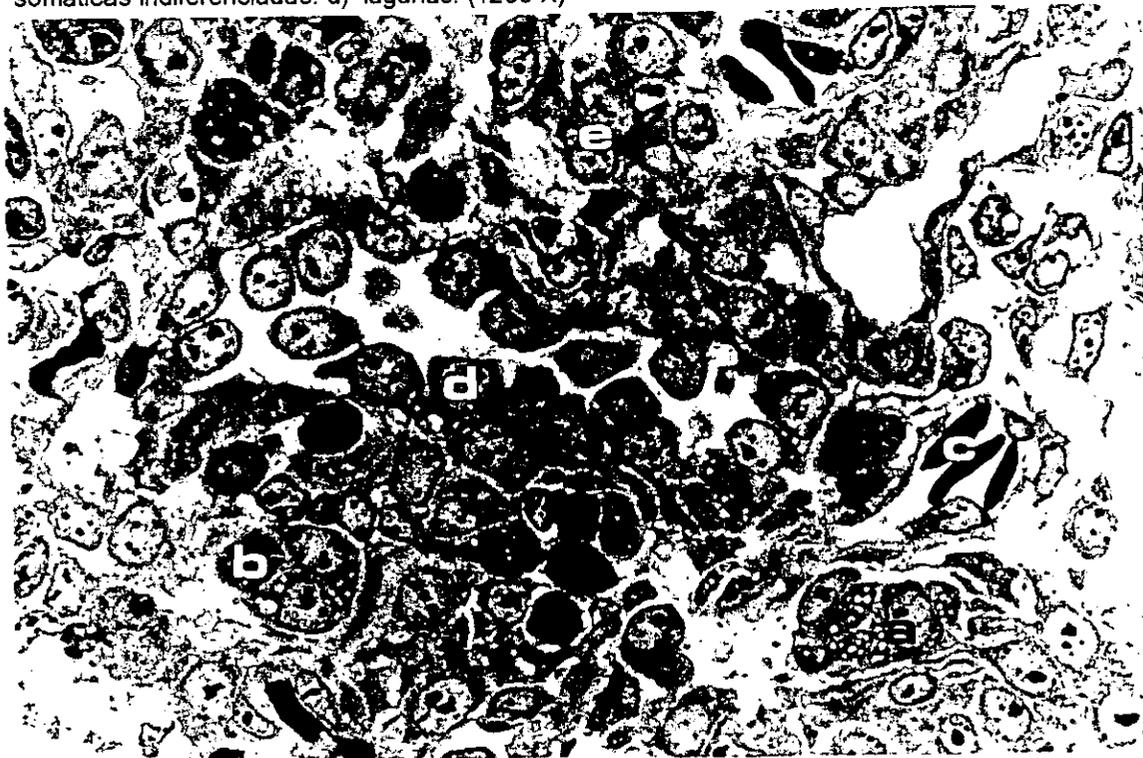


Fig. 25.- Corte semifino de médula de ovario teñido con azul de toluidina, tratado con tamoxifén y  $17\beta$ -estradiol en el día 5 de incubación se observan: a) islotes de células somáticas esteroideogénicas. b) células en transición. c) vaso sanguíneo. d) células somáticas hipertrofiadas que rodean a las lagunas. e) células somáticas indiferenciadas (1200 X).

Las células indiferenciadas que fueron tratadas con T-E son grandes, con núcleos que presentan entre 1 y 3 nucleolos, algunas con gotas dentro del citoplasma, por lo que parecería ser estados de transición entre células indiferenciadas y células esteroideogénicas (Fig. 25).

El sistema lacunar tanto en embriones testigo como en los tratados presenta un aspecto semejante, con espacios de diferente extensión limitados por células. Los ovarios tratados con Tam (T5 y T6) al igual que los tratados con Tam y E2 ( T-E), mostraron un aumento de tamaño en las células que rodean a las lagunas. (Figs. 16,17,18,22, 24 y 25)

#### Morfometría.

Al realizar la morfometría no se encontraron diferencias estadísticas significativas entre el tamaño de las células germinales, esteroideogénicas e indiferenciadas del grupo testigo y los diferentes tipos de tratamiento (Figs. 26, 27 y 28).

Para observar si había incremento en el tamaño de las células prefoliculares se midieron las áreas de éstas por nido de ovocitos (10 células por nido). Se observó un aumento significativo de tamaño en éstas células en los tratamientos con Tam, E2 y combinado al día 5 (T-E5). El tratamiento con Tam al día 6 no dio una diferencia estadística significativa (Fig. 29).

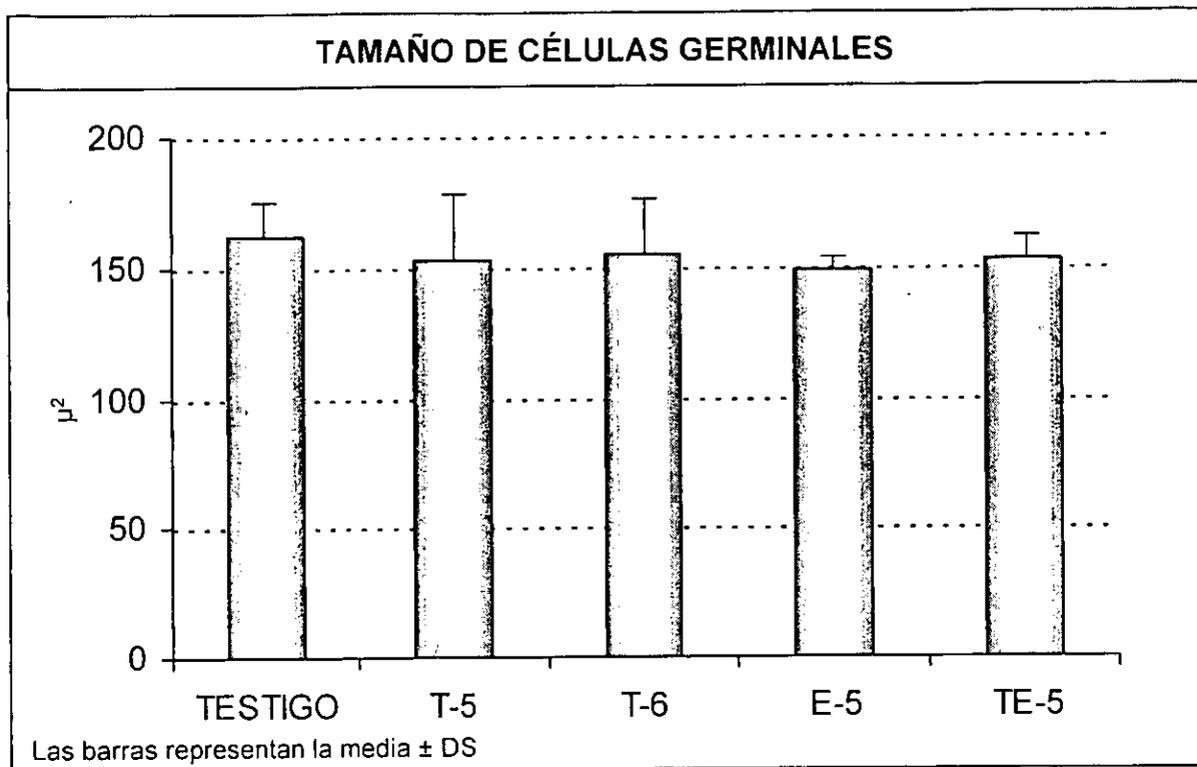


Fig 26.- Tamaño de las células germinales del ovario izquierdo del embrión de pollo de 17 días de desarrollo, medidas por morfometría, testigo de 5 días de incubación y tratados con tamoxifén al día 5 y 6. con 17B-estradiol día 5 y tratamiento de tamoxifén y 17B-estradiol al día 5 de incubación

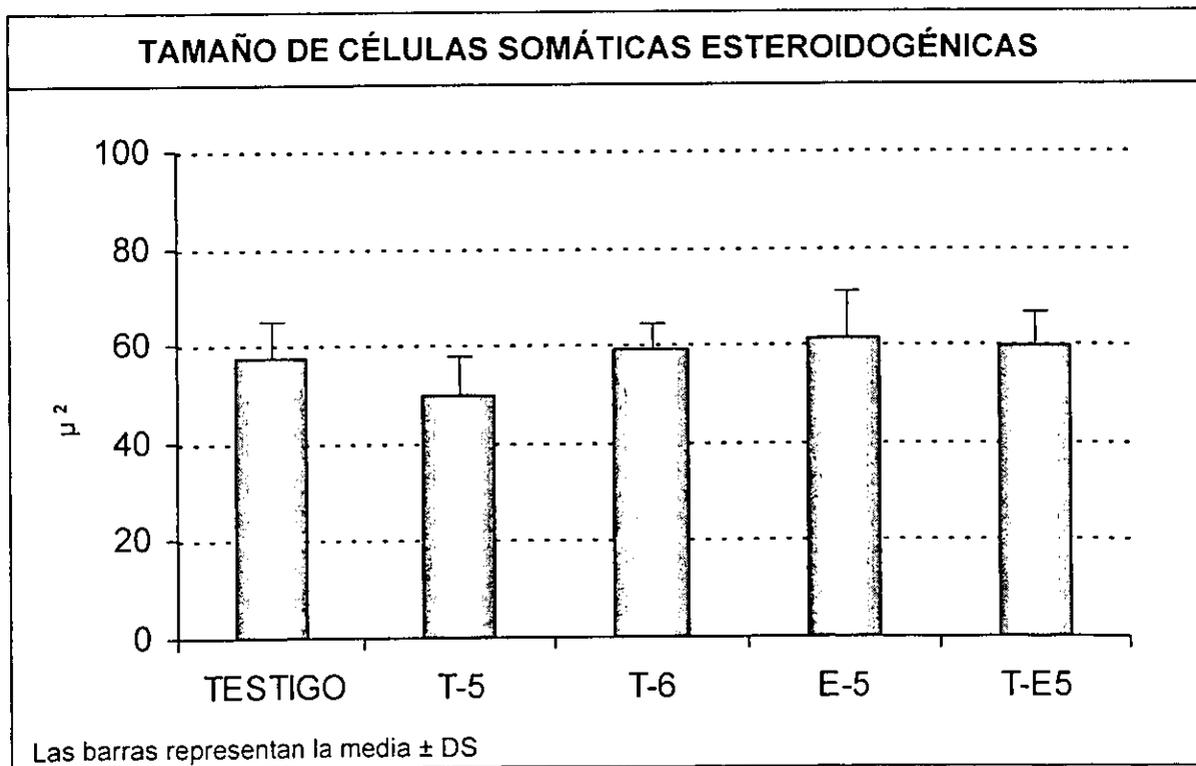


Fig 27.- Tamaño de las células somáticas esteroideogénicas del ovario izquierdo de embrión de pollo de 17 días de desarrollo, medidas por morfometría. El testigo de 5 días de incubación y tratados con 17B-estradiol y con tamoxifén y 17B-estradiol combinados en el día 5 de incubación

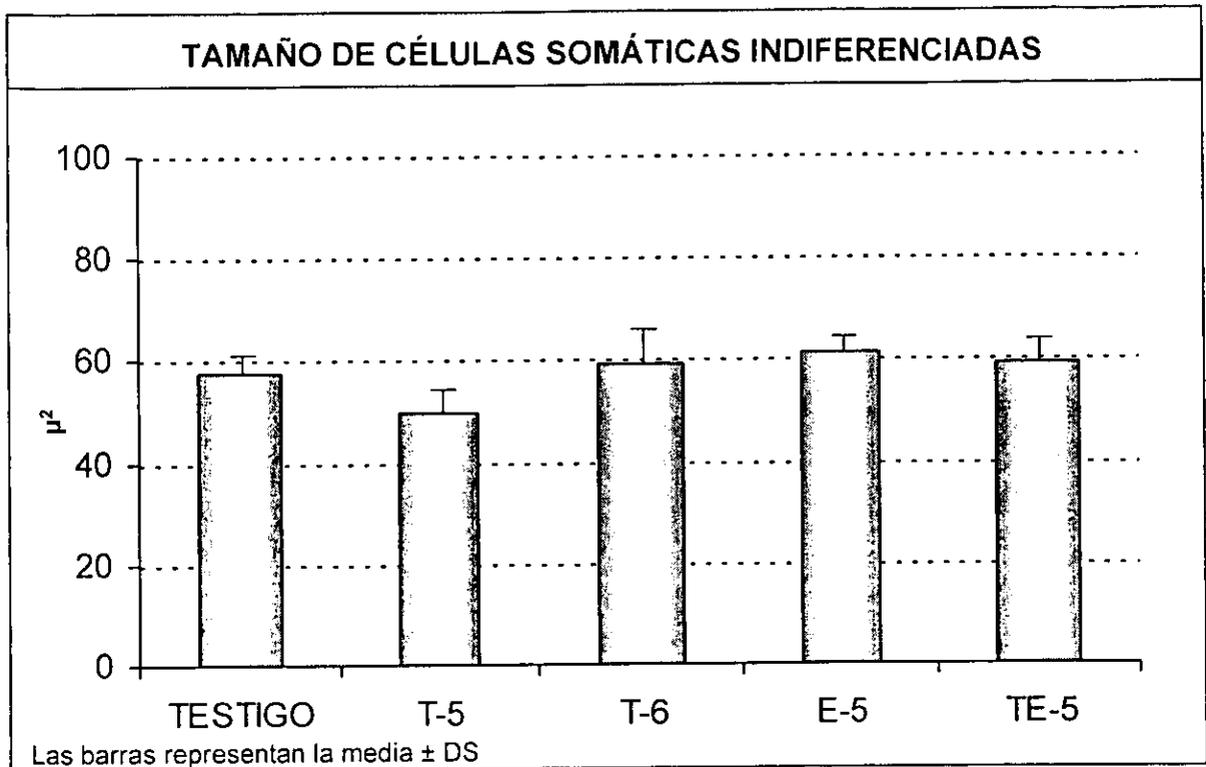


Fig 28.- Tamaño de las células somáticas indiferenciadas del ovario izquierdo del embrión de pollo de 17 días de desarrollo, medidas por morfometría. Testigo de 5 días de incubación y tratados con tamoxifén en los 5 y 6 días de incubación y con 17B-estradiol y tamoxifén y 17B-estradiol combinados al día 5 de incubación

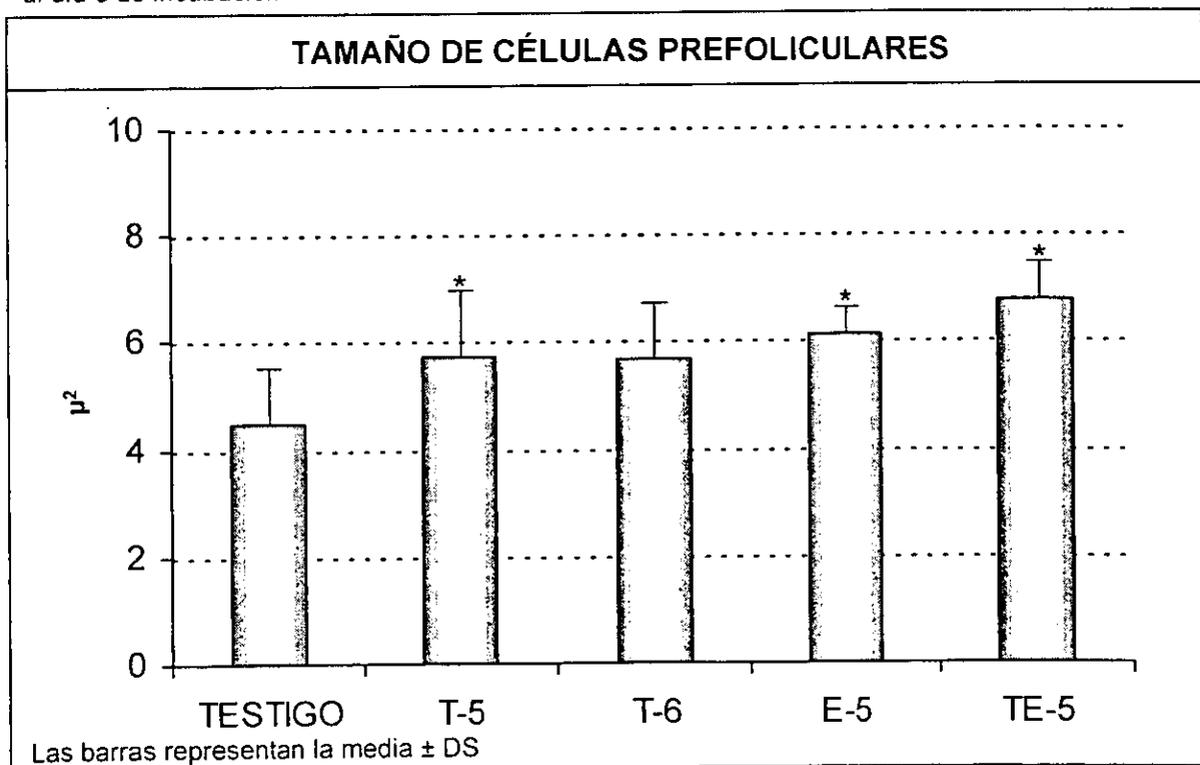


Fig 29.- Tamaño de las células prefolliculares de ovario izquierdo del embrión de pollo de 17 días de desarrollo medidas por morfometría. El testigo de 5 días de incubación y tratados con tamoxifén a los días 5 y 6 de incubación. Se observaron diferencias significativas con una \*  $p < 0.05$  de T5, E-5 y TE-5 vs. testigo

### Radioinmunoanálisis.-

Se evaluó la secreción hormonal de los ovarios *in vitro* midiendo la cantidad de testosterona y de E2, en el grupo testigo, tratados con Tam, E2 y Tam- E2 en condiciones basales y estimulados con hCG.

La producción de testosterona no dio ningún aumento significativo en los testigos ni en ningún tratamiento tanto en los ovarios en condiciones basales como en los estimulados con hCG ( resultados no ilustrados).

La evaluación del E2 en condiciones basales para el testigo y diferentes tipos de tratamientos no dio diferencias significativas ( Fig. 30 y tabla XIII).

En los ovarios estimulados con hCG al medir el E2 no se obtuvo un aumento significativo entre el testigo y los tratados con Tam y E2 por separado. En los ovarios tratados con Tam y E2 combinados al evaluar la secreción de E2 dió un aumento estadísticamente significativo con relación al testigo ( Fig. 31 y tabla XIV).

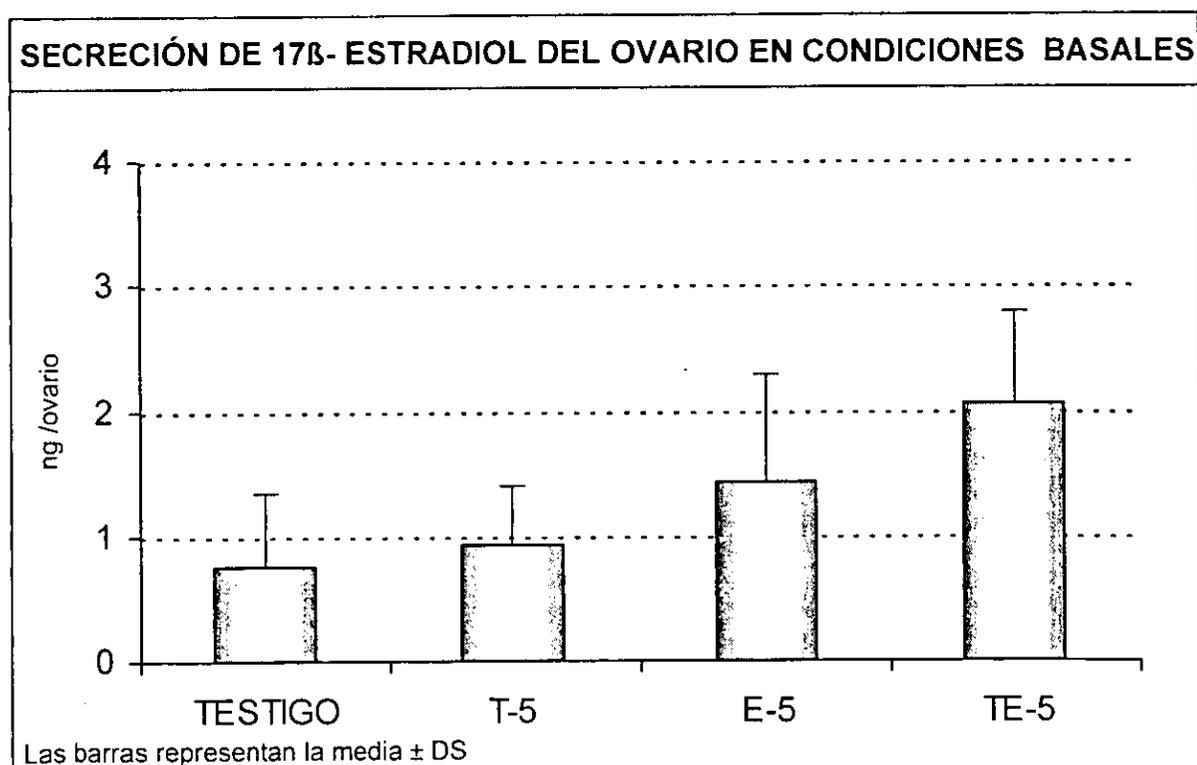


Fig 30.- Medición por RIA de 17 $\beta$ -estradiol en condiciones basales en el ovario izquierdo del embrión de pollo de 17 días de desarrollo. Los embriones fueron tratados con tamoxifén, 17 $\beta$ -estradiol y tamoxifén y 17 $\beta$ -estradiol combinados en el día 5 de incubación

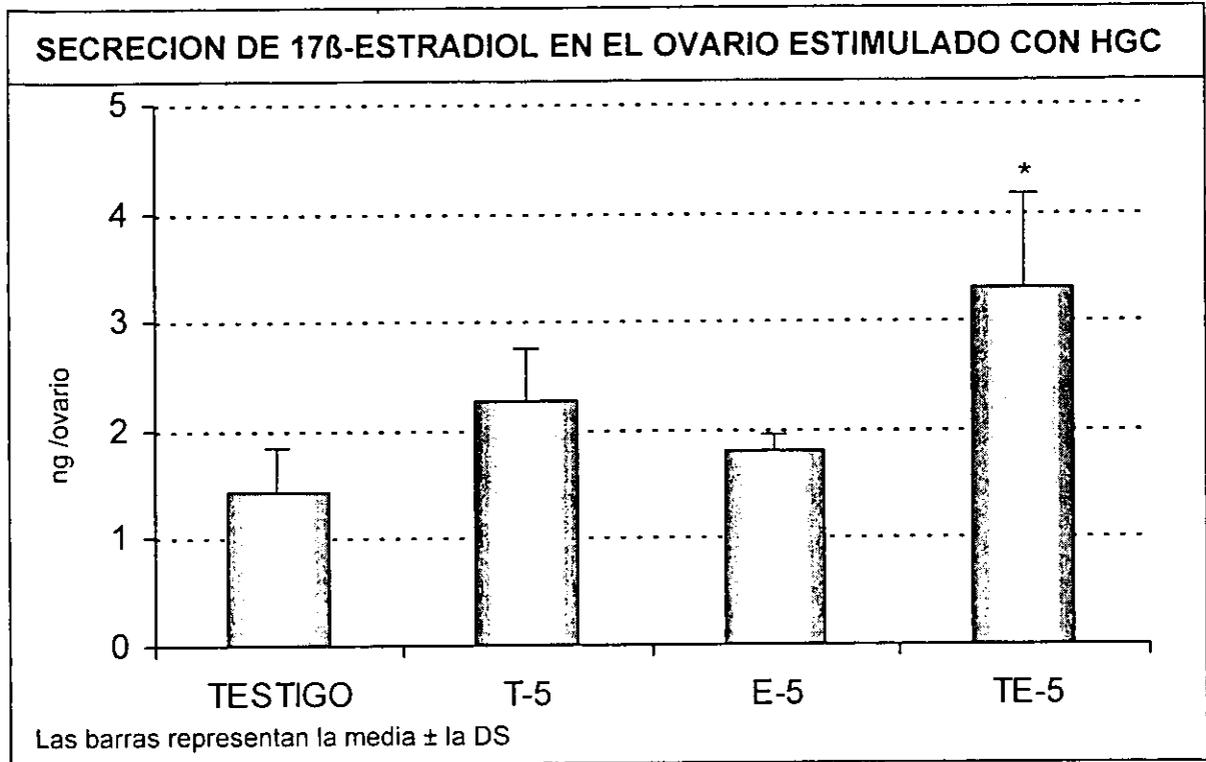


Fig 31.- Medición por RIA de 17 $\beta$ -estradiol en condiciones estimuladas en el ovario izquierdo del embrión de pollo de 17 días de desarrollo. Los embriones fueron tratados con tamoxifén, 17 $\beta$ -estradiol y tamoxifén y 17 $\beta$ -estradiol combinados en el día 5 de incubación. Se observó con el tratamiento de tamoxifén y 17 $\beta$ -estradiol una diferencia significativa con una  $*p < 0.05$  vs el testigo

## DISCUSIÓN.

Los resultados obtenidos nos dan la evidencia de que para este modelo experimental el Tam no tuvo un efecto antiestrogénico ni masculinizante, sino una acción estimulante sobre el ovario. Por otra parte dicho efecto es similar al del E2 sobre el ovario, además tiene particularidades propias como se discutirá más adelante.

La casi totalidad de los embriones tratados no mostraron alteraciones morfológicas en su desarrollo, por lo que podemos concluir que en este caso el Tam no tuvo un efecto teratogéno sobre el desarrollo de los embriones, como han descrito Salzgeber y cols. (1981), Scheib y Baulieu. (1981) y Koo y cols. (1985), quienes al usar Tam en sus trabajos, no encontraron que este compuesto aumentara la mortalidad ni produjera malformaciones externas en los embriones.

La exposición prenatal al Tam en los humanos, altera y desorganiza el endometrio uterino, produce hiperplasia y modificaciones del epitelio en el oviducto. La mayor parte de las alteraciones se producen cuando la exposición es en etapa neonatal y postnatales tempranas, probablemente periodos críticos para la acción del Tam.

Entre las alteraciones descritas están la infertilidad por modificación del eje hipotálamo-hipófisis-ovario, disgenesia ovárica, atrofia de la vesícula seminal. Además se han encontrado alteraciones en tejidos no pertenecientes al sistema reproductor, como el hueso en pelvis y femur (Iguchi, 1992). A partir de la información anterior podemos considerar que posiblemente la teratogenicidad de Tam depende del tipo de organismo en que se utilice y sería importante conocer la dosis que se usó.

La mayoría de los datos en mamíferos se han obtenido en ratón, pero las evidencias indican recomendar ante un embarazo, se detenga de inmediato el tratamiento y no se exponga el producto a la droga (Jordan y Murphy, 1990)

La forma de administración y dosis de Tam difieren según lo revisado en la literatura. Scheib y Baulieu (1981), utilizó una solución alcohólica de 400mg/100ml con la que trató por inmersión huevos de codorniz de 4 días de incubación. Salzgeber y cols. (1981), lo hizo sobre la membrana corialantoidea del embrión de pollo con una solución de Tam en aceite de oliva, a una concentración de 10-40 mg/ml. Koo y cols. (1985), introdujo en la cámara de aire una dosis de 0.25-2.0mg de Tam por huevo inmediatamente antes de la incubación. Didier y Croisille (1989), introduce en el saco vitelino de embriones de pollo de 3.5 días, 1.5 ml de Tam disuelto en aceite de oliva. Coco y cols. (1992), administró una concentración semejante a la de Koo de 0.2mg/ml por huevo al inicio de la incubación en albúmina.

En nuestro experimento previo para fijar la dosis de Tam la concentración en la que encontramos un aumento en el número de las células esteroideogénicas e indiferenciadas con respecto al testigo, fue la de 10µg / 100µl por huevo, que equivale a la mitad de la usada por Cocoy cols.. (1992), 30 veces menor que la utilizada por Salzgeber y cols. (1981) y 25 veces más pequeña de aplicada por Koo y cols. (1985).

Nosotros usamos como técnica de administración la de la cámara falsa con aplicación sobre el disco vascular lo que asegura una buena absorción ( Salzgeber y cols. 1981; Mendez y cols.1993).

Las pruebas preliminares se realizaron en embriones de 5 días con base en lo descrito por Scheib y Baulieu (1981), quienes desde el día 4 de incubación encuentran modificaciones causadas por el Tam en el ovario izquierdo en embriones de codorniz.

Los embriones se sacrificaron para estudiar los ovarios izquierdos a los 17 días de incubación, ya que Hughes, (1963) describe en este día el mayor número de células germinales (ovogonias y ovocitos).

La técnica de disgregación enzimática y conteo celular que utilizamos fue previamente validada (Pedernera y cols. 1988; Méndez y cols.1993).

Una vez fijada la dosis se inyectaron grupos de embriones de los 3 a los 7 días de incubación eligiéndose los de 4, 5 y 6 días para el modelo experimental, puesto que son los días previos a la diferenciación del ovario que sucede a los 7 días.

Dentro de nuestros grupos experimentales incluimos embriones tratados con Tam, E2 y con la combinación de ambos, lo cual nos permitió evaluar efectos agonistas y antagonistas de estos compuestos sugeridos por estudios previos (Salzgeber y cols.1981; Scheib y cols. 1983 y Koo y cols.1985), los que sugirieron que el Tam actuaba inhibiendo los estrógenos endógenos durante el desarrollo del ovario del embrión de pollo.

Nuestros embriones tanto testigos como tratados no dieron ninguna diferencia significativa con respecto al peso corporal, por lo podemos suponer que no hay cambios importantes en el crecimiento del embrión.

En estudios realizados con Tam en células MCF7 (células de cáncer de mama), éstas eran detenidas en fase S debido a lo cual se inhibía la mitosis y la proliferación celular (Osborne y cols.1983), lo que eventualmente podría alterar el crecimiento del embrión, lo cual no concuerda con nuestros resultados.

Los embriones tratados con Tam sólo o combinado con E2 no mostraron malformaciones externas significativas, pero si encontramos un aumento de embriones malformados en el grupo tratado al 5º día con E2 (E5). Se han descrito alteraciones causadas por E2 en sistema urogenital de primates y roedores ( Henry y cols.1984).

Encontramos que los ovarios tratados con Tam presentan un aspecto más voluminoso y esponjoso que el de los testigos, esto no ha sido descrito en la bibliografía consultada.

En general la disposición de las células en la corteza está de acuerdo con lo descrito por Romanoff en 1960.

Desde el punto de vista histológico Koo y cols. (1985) al obtener ovarios izquierdos tratados con Tam, indican que son morfológicamente normales, formados por una corteza consistente en un epitelio germinal monoestratificado. Nosotros diferimos con estos

autores, ya que en los ovarios de grupo tratado con Tam y con el tratamiento combinado observamos la corteza del ovario con un epitelio germinal de mayor grosor que el de los ovarios del grupo testigo.

Debajo del epitelio germinal encontramos abundantes ovocitos conectados entre sí por puentes citoplásmicos y células prefoliculares más voluminosas que las observadas en los testigos. Estas características nos sugieren un efecto estrogénico del Tam ya que los ovarios tratados con E2 muestran una morfología semejante con células prefoliculares de gran tamaño (Mendez y cols.1993).

En los ovarios tratados con Tam, los ovocitos presentan cuerpos de Balbiani voluminosos, en ovarios tratados con E2 a los cuales se les realizó análisis morfométrico indican que la estructura de éstos no se modifica (Greenfield, 1966; Mendez y cols.. 1993).

Por otra parte nuestros resultados no están de acuerdo con Salzgeber y cols. (1981), Scheib y cols. (1983) y Didier y Croisille (1989) que en sus trabajos describen un efecto inhibitorio del Tam nsobre el desarrollo de la corteza del ovario (ovocitos y células prefoliculares) a la que describen como inexistente e inclusive con aspecto testicular.

La diferencia entre nuestros resultados y los de estos autores podría deberse a la dosis puesto que las que usaron ellos fueron mucho mayores ( 30, 300 y 10 veces), que la utilizada por nosotros y pudiera ser que el Tam a dosis más pequeñas indujera una acción agonista.

Knecht y cols. en 1985, en estudios *in vitro* de células granulosas de rata, encuentra que el Tam en forma semejante al E2, estimula la producción de AMPc y receptores a HL en una acción claramente estimuladora y agonista. Altas concentraciones de Tam inhiben este efecto y previenen la acción de otros ligandos, que activan a la adenilciclase. El Tam también reduce la estimulación del E2 bajo la acción de la hormona HFE. Esta hormona *in vitro* produce un aumento en el nivel de AMPc asociado con el incremento de receptores a

gonadotropinas y la esteroidogénesis, el Tam inhibe el aumento de AMPc. Lo anterior puede explicarse por inhibición del R-E, o por la presencia de sitios de unión a antiestrógenos, aunque Knecht piensa que en este caso, el mecanismo de acción del tamoxifén sería a través del R-E hacia el que presenta mayor afinidad.

Otro de los posibles mecanismos que pudiera explicar la acción del Tam podría basarse en la propiedad que tiene de formar un complejo R-E-AntiE. Estos se pueden unir a genes de ERE con diferente grado de afinidad, que cuando es baja puede producir un efecto inhibitorio, mientras que si es alta puede dar una acción agonista (Rochefort y cols. 1983). Lo anterior nos indicaría considerar que probablemente en nuestro modelo que dio un efecto agonista, si el mecanismo de respuesta fue mediante el R-E-AntiE, debió presentar un alto grado de afinidad por los genes de ERE.

Estos estudios dieron lugar a la discusión, de sí la capacidad de producir efectos agonistas o antagonistas depende, de la velocidad de disociación del receptor, que a su vez está determinada por la capacidad de la molécula de transformar al receptor; el E2, se disocia o separa rápidamente de un receptor no transformado. Un receptor transformado tiene una baja velocidad de disociación y por lo tanto una alta afinidad por el estradiol.

La acción del Tam puede deberse, a que tienen acceso a sitios nucleares diferentes que pueden transcribir mensajeros que codifiquen proteínas, que tengan efectos inhibitorios sobre la transcripción de los genes regulados por estrógenos o directamente bloquear la acción bioquímica de las moléculas inducidas por éstos. La existencia de estos sitios de unión a anti-E (R-antiE) en el núcleo, pueden explicar también la acción agonista de ellos en tejidos que presentan R-E, ya que los anti-E, pudieran no actuar, al estar retenidos por sus proteínas específicas (Levin y cols.1990).

En este aspecto, revestiría gran importancia la dosis que se use, ya que para producir un efecto antagonista, tendría primero que saturar sus sitios de unión naturales y el exceso,

entonces inhibiría la acción estrogénica vía R-E (Lavín y cols.1988). Lo anterior podría explicar los resultados antagonistas del Tam al ser usado en dosis altas (Salzgeber y col. 1981; Scheib, 1983) y los agonistas al usar dosis más bajas como en nuestro modelo.

Sería importante profundizar en este tema, sobre todo en los antiestrógenos que como el Tam se utilizan a nivel terapéutico (Duax 1985).

Coincidimos con Weniger y Zeis (1984), y con Weniger y Samsel (1985) y Koo y cols. (1985) quienes indican que el ovario izquierdo sintetiza más E2 y menos testosterona, que el derecho y los testículos, los cuales producen la misma cantidad de testosterona que los ovarios pero mucha menos cantidad de E2 y en distintos experimentos tampoco observaron una acción antagonista del Tam con el E2 en el ovario del embrión de pollo.

En el grupo tratado con Tam y E2 combinados, también se aprecia un posible efecto estrogénico y no una inversión del efecto del E2 como proponen Koo y cols.(1985).

La edad del embrión en la que se administró el tratamiento, pudiera ser otro factor que condicionara la diferencia entre los resultados encontrados en la literatura y los nuestros. Todos los tratamientos se administraron en distintas edades antes de los 7 días que es cuando se diferencia el ovario. Koo y cols. (1985) antes de la incubación, Didier y Croisille (1989) a los 3.5 y Scheib y cols. (1983) a los 4 días de incubación. En nuestro experimento administramos el tratamiento de los 4 a los 6 días de incubación por lo tanto coincidimos con el trabajo de Scheib en este aspecto, aunque sus resultados son completamente diferentes a los nuestros por lo que probablemente no tenga importancia la edad en que se aplique el tratamiento, siempre y cuando sea antes de la diferenciación del ovario.

En los trabajos consultados los embriones fueron sacrificados a los 14 y 19 días, nosotros los sacrificamos a los 17 días, lo que posiblemente nos pudiera dar diferente número de células pero no permitiría explicar una disminución o inexistencia de la corteza del ovario.

En la región medular cerca o en el interior de las lagunas sanguíneas encontramos ovocitos con núcleo en degeneración y citoplasma reducido como se observa en la Fig. 2. Estas células parecen presentar un proceso de atresia ya descrito por Hughes, (1963), Gondós, (1978) y Mendez y cols. (1993), el que todavía no se conoce completamente. Probablemente sean ovocitos que se desechan al sistema lacunar de la médula ovárica para ser desintegrados y sus componentes ser excretados o reciclados.

Nosotros también observamos en los ovarios tratados con E2 a los ovocitos en vías de degeneración en las lagunas medulares. Goldenberg y cols.(1972) trabajando en ratas hipofisectomizadas inmaduras describe un efecto del E2 que disminuye la atresia folicular. En los tratados con Tam solo y combinado con E2 las observaciones microscópicas sugerían una disminución de estas células, por lo que pudiera haber la posibilidad de que el Tam tuviera un efecto mayor que el estrógeno sobre este fenómeno y que en las aves fuera necesaria una acción estrogénica mayor para producir este efecto.

Las células somáticas observadas en la médula subcortical tanto la población de esteroideogénicas con inclusiones de gotas lipídicas, como la de células indiferenciadas sin inclusiones lipídicas que rodean a las lagunas corresponden a la morfología descrita por González del Pliego y cols.(1988 ).

La médula de los ovarios tratados con Tam al día 6, no difiere en su aspecto con el testigo pero en las células esteroideogénicas encontramos dos tipos de núcleos, unos pequeños más condensados y otros de mayor tamaño de color claro, lo que no se observó ni en el grupo tratado con E2 ni en los de tratamiento combinado con Tam, esto no lo hemos encontrado descrito en la literatura. Es difícil hacer una interpretación de la presencia de estos dos tipos de núcleos por lo que se necesitarían más experimentos para determinar si estas diferencias morfológicas son causadas por el Tam.

Con relación a las células esteroideogénicas Salzgeber y cols. (1981) y Scheib y cols. (1983), describen grandes islotes de células esteroideogénicas que interpretan como una

morfología neutra e incluso testicular, nosotros le damos una interpretación diferente ya que parecería que estas células están estimuladas e hipertrofiadas por el Tam pero no hacia una estructura testicular. Las dosis utilizadas son diferentes, esto podría sugerir como ya dijimos al discutir la estructura de la corteza ovárica una distinta acción del Tam en diferentes concentraciones sobre los tejidos.

Las células esteroideogénicas tratadas con Tam y E2 combinados presentan grandes vacuolas lipídicas en su citoplasma por lo que en este caso parece ser que el Tam no revierte el efecto del E2 sobre esta subpoblación celular sino que lo aumenta en lo que también diferimos de lo encontrado por Koo y cols.(1985). Salzgeber (1981) que al administrar Tam y E2 al mismo tiempo indican que el E2 no revierte el efecto masculinizante del Tam lo que no encontramos en nuestros resultados.

Las células indiferenciadas constituyen una subpoblación formada por células sin inclusiones de lípidos (González del Pliego y cols. 1988) que se disponen entre los islotes de células esteroideogénicas. En los ovarios testigos las células indiferenciadas son grandes con algunas gotas lipídicas en el citoplasma. La observación de estas células en ovarios tratados con Tam al día 5 y 6 no sugieren ningún cambio con respecto a las del grupo testigo. En los ovarios tratados con E2 solo y combinado con Tam, se aprecia un aumento en el tamaño de los núcleos que presentan entre 1 y 3 nucleolos, en su citoplasma es más común la presencia de gotas de lípidos. Lo anterior podría sugerir un efecto que posiblemente aumenta la conversión de estas células en esteroideogénicas.

Las lagunas medulares son de diferentes tamaños tanto en los ovarios testigos como en los tratados, las células que las rodean, en los testigos son aplanadas de aspecto alargado con núcleos que sobresalen hacia la luz de las lagunas. En los ovarios tratados con Tam al día 5, estas células presentan un aspecto semejante a las de los testigos, en los grupos tratados al día 6 solo con Tam y con Tam y E2 se observa un claro efecto de estimulación, ya que los núcleos son de mayor tamaño y aumenta la cantidad de

citoplasma, saliendo la mayor parte de la célula hacia la luz de la laguna. Este efecto posiblemente, propio del Tam no lo hemos encontrado descrito en la bibliografía consultada.

Varios investigadores han cuantificado células germinales en el ovario como Hughes, (1983) y MacCarrey y Abbout (1982), el número de células fue semejante al obtenido por Mendez y cols.(1993). Estos autores estudiaron el efecto del E2 sobre las subpoblaciones celulares del ovario del embrión de pollo, no encontrando ningún efecto del sobre las células germinales ( ovocitos ). Nuestros resultados concuerdan con los de estos autores ya que en ninguno de los tratamientos con E2, Tam y Tam con E2 en las distintas edades encontramos una diferencia significativa entre los testigos y los tratados. El Tam tampoco en este caso produce un efecto inhibitorio como el descrito por Salzgeber y cols. (1981) y Scheib y cols. (1983) quienes describen una disminución del número de ovocitos y aún ausencia de ellos en una corteza ovárica muy delgada o sin formarse. En este caso el Tam no interfiere con el número de ovocitos.

Las células esteroideogénicas forman una subpoblación pura de la médula ovárica, al contarlas encontramos que presentaban diferencias significativas con respecto al testigo en los tratamientos con Tam al día 4, 6 y con la combinación de Tam y E2 en el día 5. Este aumento de células esteroideogénicas nosotros lo consideramos como un efecto del Tam, puesto que aumenta el número de células y por consecuencia el crecimiento del tejido. Posiblemente este sea un efecto no mediado por el receptor a estrógenos (R-E) pues se ha comprobado que el Tam al tener un efecto inhibitorio sobre el R-E detiene la actividad de enzimas como la ADN polimerasa y la ATPasa transportadora de Na y K, que son indispensables para la duplicación del ADN y el metabolismo celular (Osborne y cols.1983).

En estos casos y en el aumento de células esteroidogénicas que se observó en los ovarios tratados con Tam en nuestros experimentos es posible se una a sitios receptores a antiestrógenos (Sudo y cols.1983).

Las células esteroidogénicas tratadas con E2 al día 5 de incubacion no mostraron aumento significativo con respecto al testigo con lo que concordamos con lo observado por Mendez y cols. (1993) que no encontraron diferencias significativas en esta población después de la administración de E2. En los grupos tratados con Tam en el día 4 y 6, como ya dijimos, encontramos un aumento de las células esteroidogénicas con respecto al testigo, esto no se detecto con el mismo tratamiento en el día 5, lo que nos llamó la atención de la necesidad de un mayor número de experimentos, para explicar esa aparente disminución de respuesta al Tam en este día. También observamos un aumento significativo en estas mismas células en el grupo tratado con los dos compuestos combinados (T-E) en el día 5 por lo que parece ser que el aumento de células se da por la acción agonista del Tam sumada a la del E2, lo que refuerza la necesidad de investigar el efecto del Tam y el E2 a esta edad.

La subpoblación de células somáticas indiferenciadas es una población mixta ya que contiene fibroblastos, células epiteliales poco diferenciadas de la médula y células pregranulosas. Al contar estas células se encontró un aumento de los grupos tratados con relación a los testigos. En los tratamientos con Tam al día 4 y 6, lo mismo que con la administración combinada de Tam y E2 pero en el día 6 de incubación, por lo que parece que el efecto del Tam sobre el ovario es semejante en las dos poblaciones celulares de la médula, por lo que insistimos que el efecto del Tam en este caso no es inhibitorio del desarrollo del ovario ni masculinizante como afirman Salzgeber y cols. (1981) y Scheib y cols.(1983).

En experimentos llevados a cabo por Mendez y cols. (1993), encontraron que en pollos recién nacidos hay un aumento de células somáticas indiferenciadas en ovarios tratados

con E2 nosotros diferimos con estos resultados, ya que en nuestros experimentos los ovarios tratados con este mismo compuesto no presentaron un aumento en el número de estas células, aunque esto podría deberse a que nosotros disociamos los ovarios a los 17 días de incubación y pudiera haber un efecto mayor del E2 sobre esta subpoblación celular entre el día 17 de incubación y el de la eclosión. Cuando el Tam se administró en el día 5, al igual que en las células esteroidogénicas no hubo un aumento significativo con respecto al testigo.

Al medirse el tamaño de los ovocitos, células esteroidogénicas y células indiferenciadas en los distintos tratamientos, no se encontraron diferencias significativas con el grupo testigo, lo que sugeriría que en este caso ni el E2 ni Tam tienen efecto sobre la síntesis protéica en estos tipos celulares.

Se midieron las células prefoliculares y se observó un incremento en su tamaño en los grupos tratados con E2, Tam y combinados (T-E) en el día 5. Investigaciones previas realizadas por Mendez y cols.(1993) en embrión de pollo describen a la población de células prefoliculares como células sensibles a la acción del E2, que induce en ellas una marcada hipertrofia del citoplasma. El grupo tratado con E2 confirmaría los resultados de esta autora, en los otros tratamientos las células prefoliculares también están aumentadas de tamaño, esto sugeriría un efecto agonista del Tam al E2.

No se conocen bien todavía la forma en que influyen el E2 y el Tam sobre el crecimiento de las células prefoliculares por lo que sería necesario un mayor número de experimentos.

Los trabajos desarrollados por Pasqualini y cols. en 1986 en hamsters tratados con Tam, E2 y tratamiento combinado, muestran un aumento de peso del útero y de la cornificación del epitelio vaginal que son efectos claramente estrogénicos; el tratamiento combinado fue más efectivo y agonista respecto a los de Tam y E2 por separado. Aunque el modelo experimental es en mamíferos, sus resultados se asemejan a los encontrados por

nosotros con ese mismo tratamiento, lo que sugeriría que el Tam incrementa la acción del E2 y en este caso podría inclusive inducir un desarrollo tumoral.

El uso cada vez mayor del Tam en la terapia del cáncer mamario, ha creado la necesidad de conocer la acción que tiene sobre los órganos del sistema reproductor. Los estudios que se han realizado, han sido en su mayoría en modelos *in vitro* de células de líneas tumorales. Se investigan los efectos colaterales del tratamiento del cáncer mamario, sobre las funciones del ovario y su influencia sobre el cáncer ovárico, a través del efecto inhibitor que tiene sobre la protein-quinasa C ( PKC). Esta interviene en la migración y capacidad invasiva de las células tumorales. Szaniawska, y cols. (1998) experimentaron en ellas, y encontraron que el Tam actúa como inhibidor de los tres procesos involucrados en la invasión tumoral: la adhesión, la migración y la degradación de la matriz extracelular. Sin embargo estudios más detallados muestran que las habilidades de adhesión y degradación no son anuladas por los inhibidores de la PKC (O'Brian y cols.1990). Se ha especulado con la posible acción cancerígena del Tam sobre el ovario en pacientes con cáncer de mama, sujetas a una terapia prolongada con este fármaco. La investigación de este aspecto del Tam, presenta la dificultad de la baja incidencia de cáncer de ovario. En las pacientes jóvenes existe discrepancia por las diferentes formas en que se heredan el cancer de ovario y el de mama. Los resultados que relacionan el uso prolongado del Tam, con el carcinoma endometroide de ovario (Kuo et al, 1997), no son hasta ahora significativos (por la cantidad de casos reportados), pero constituyen una llamada de atención sobre los efectos que producen estos tratamientos, aunque también se han reportado casos con poco tiempo de medicación (Gherman y cols.1994), de todas maneras son un indicio de la influencia que pudiera tener el Tam sobre la proliferación y crecimiento del ovario y sería interesante hacer un estudio epidemiológico para conocer realmente si son poco frecuentes o no son reportados.

El Tam presenta acciones independientes del R-E como la capacidad de disminuir la fluidez de la membrana, esta modificación de la membrana produce un efecto invasivo que en células tumorales puede favorecer la metástasis (Clarke y cols.1990).

Se han realizado estudios *in vitro* en líneas de células de tumores cancerígenos de endometrio y mama, utilizando células de la línea Ishikawa (cancer endometrial), tratadas con el isómero trans del 4OH-Tam que induce un gran incremento celular en relación al grupo R-E testigo, similar al producido por E2. Por otra parte, en una variante de esta misma línea celular, el efecto proliferativo del 4OH-Tam fue muy intenso mientras que este efecto no se obtuvo con E2; asimismo se encontró que la composición del medio de cultivo tiene efecto sobre la actividad agonista o antagonista del Tam. En otras líneas celulares de cancer endometrial UMC-1, RL95-2, HEC-1 y KLE el Tam inhibió la proliferación, este efecto fue reversible cuando se administró E2, o combinados el Tam y el E2 (Grenman y cols.1988). El Tam es capaz de a bajas dosis producir un efecto proliferativo en células de cancer cervical (SFR) y también de estimular la transcripción del gen de la proteína E7, que produce el tipo 16 del virus del papiloma humano (Hwang y cols.1992), que son efectos totalmente agonistas al E2 y pueden producir tumores cancerosos secundarios.

Por medio de técnicas inmunocitoquímicas se demostró la presencia de andrógenos y estrógenos en las gónadas de los dos sexos entre los 3.5 y los 6.5 días antes de que ocurra la diferenciación histológica (Woods y cols., 1978; Weniger y cols. 1971; Scheib y cols. 1983) apoyan estos resultados al comprobar la presencia de E2 en embriones de 5 y 6 días de incubación cuando la gónada no se ha diferenciado todavía.

Koo y cols. (1985) al evaluar la secreción de esteroides gonadales en embriones de pollo de 14 días, testigos y tratados con Tam no encontraron cambios en la testosterona, coincidiendo sus resultados con los de Weniger y cols. (1982) ya que no hay diferencias

en la producción de esta hormona, tanto en las gónadas del grupo testigo y de los que recibieron tratamiento.

Nosotros evaluamos la secreción hormonal de la testosterona y el E2 en condiciones basales y estimulados con hGC. La producción de testosterona no dio ningún aumento significativo en los testigos ni en ningún tratamiento en condiciones basales o estimulados, esto confirma los resultados de Koo y cols. (1985).

En la evaluación de E2 en los testigos y diferentes tratamientos no produjo ningún incremento en condiciones basales. En los estimulados con hGC, los tratamientos por separado tampoco nos dieron diferencia significativa, pero sí el tratamiento combinado de E2 y Tam; estos resultados no concuerdan con los de Koo y col. (1985) que encuentran un aumento en la secreción de E2 en el ovario tratado con Tam. Estos autores con base en sus resultados indican que el Tam no tiene ningún efecto sobre la concentración de ningún esteroide.

Nosotros encontramos que en el grupo tratado con Tam y E2 combinados al evaluar la secreción de E2, en condiciones estimuladas, hubo un aumento significativo; lo que sugiere en este caso que el Tam en el tratamiento combinado tiene un efecto agonista al E2; esto no fue evaluado por Koo (1985) ya que el tratamiento fue solo con Tam.

Estudios más recientes, desarrollados por Coco y cols. (1992), buscan conocer la acción del E2 y del Tam sobre la diferenciación sexual y los genitales externos. Para su modelo experimental, se basan en el conocimiento de que el desarrollo morfológico y neuroendócrino, están bajo el control de la secreción de hormonas del embrión; éstas en etapas específicas del desarrollo, controlan la diferenciación de la conducta sexual. Existe la evidencia de un periodo crítico, que se define como el periodo en el cual los esteroides pueden eliminar el patrón de conducta masculina para el apareamiento, en el desarrollo del pollo. Se identifica un periodo anterior a la diferenciación sexual completa durante el cual, se puede manipular el hipotálamo para abolir las funciones sexuales. Este

periodo termina en el embrión de pollo a los 13 días del desarrollo, después ya la manipulación endócrina no afecta la conducta sexual, por lo que se diferencia la posibilidad de cambios al inyectar E2, en los dos diferentes periodos. Estos investigadores eligen el Tam ya que Koo y cols.(1985) indican que baja el nivel del antígeno H-W (H-Y) a niveles masculinos, lo que se traduciría en una alteración importante en el fenotipo, tanto en las gónadas como en los genitales externos, desviación en el sexo genético y manifestación de otros parámetros característicos del dimorfismo sexual como son el depósito de grasa y crecimiento. Coco y cols. (1992) consiguen con el uso de hormonas seleccionar el sexo y proponen su uso para incrementar la economía de la producción de los pollos. Realmente no consideramos que lo anterior sea una opción por todos los efectos colaterales que conllevan los tratamientos hormonales, por ser esta producción para el consumo humano.

A partir de la importancia que tiene el Tam, nuevos estudios y la búsqueda de un metabolito análogo natural que se una a los R-Anti-E han dado lugar al desarrollo de los siguientes proyectos de investigación.

La Vitamina D3 también presenta acción antiestrogénica pero su uso terapéutico está limitado por su fuerte acción calcemiente, debido a esto se desarrollaron análogos (CB966, EB1089, KH1060 y 22-oxa calcitriol) con el mismo poder inhibitorio del crecimiento, pero con un efecto calcémico menor. Estos análogos se han utilizado en dosis bajas, combinados con Tam, en células MCF-7 (cancer mamario humano). Para conocer los efectos independientes de los dos tipos de antiestrógenos se experimentó en clonas de células ZR-75-1 (resistentes al Tam), las cuales, sí responden a la acción de los compuestos análogos de la vitamina D. Se pensó que éstos compuestos actuaban sobre la regulación del crecimiento tumoral en dos niveles: en el ARNm del oncogen c-myc, o sobre el R-E; los resultados indican, que al parecer ninguno de estos mecanismos está

relacionado con la acción antiproliferativa de la vitamina D3 y sus análogos (Vink-van Wijngaarden y cols. 1994).

Usando tecnología basada en la estereoquímica del ADN, y la producción de modelos por computadora, se ha podido diseñar un nuevo compuesto llamado piperidinedione (PP); al examinarse el complejo PP-ADN, se encontró que el Tam puede fijarse al ADN en el mismo sitio que el PP (Hendry y cols.1994 a y b). Es importante esta nueva tecnología en el estudio de los antiestrógenos, ya que da mayores posibilidades sobre el diseño y la investigación de nuevos antiestrógenos que se puedan usar en la terapia del cancer.

Se ha comparado la actividad de compuestos esteroides con actividad antiestrogénica como el EM-139, con nuevos compuestos antiestrógenicos, no esteroides, derivados del 17diarylthioether, encontrándose que tiene aproximadamente 100 veces menos afinidad por el R-E (Poirier y cols. 1994).

Investigaciones de la acción de nuevos antiestrógenos no esteroides, como el ZK119010 combinado con Tam, en células de cancer mamario (MCF-7); con o sin tratamiento previo de E2, muestran el grado de inhibición que pueden ejercer sobre la expresión del gen pS2, inducido en gran parte por acción de los estrógenos en estas células tumorales (Shutze y cols.1994).

Se han ensayado los antiestrógenos en otros tipos de carcinomas además del mamario; en el neuroblastoma se han usado experimentalmente Tam y su análogo Toremifene (Díaz y cols.1996), lo cual abre camino para investigación de la acción de los antiestrógenos en otros tipos de tumoraciones.

El MDL 101 906, es un nuevo antiestrógeno que se ha probado en células CMF-7, encontrándose que existía un decremento de la unión del R-E a sus ERE, sin que otros factores de transcripción se vieran afectados; se probó la disminución, al unir a los ERE un gén reportero para la luciferasa ( Bitonti. 1996).

El estudio de los antiestrógenos tiene un gran futuro, no solamente para encontrar compuestos menos citotóxicos, sin reacciones colaterales y más efectivos en su acción antitumoral, sino para poder descubrir muchas incógnitas que todavía rodean a estos compuestos y su papel en el control del metabolismo celular.

El uso del tamoxifén con sus propiedades agonistas y antagonistas al E2, abre un amplio campo de investigación sobre el conocimiento de los procesos metabólicos mediados por E2 y por un ligando natural, análogo al Tam, que pudieran influir en la cascada de eventos que producen el desarrollo del ovario.

## CONCLUSIONES.

- La aplicación del tamoxifén tiene efecto sobre la población de células somáticas, esteroideogénicas e indiferenciadas del ovario del embrión de pollo. Estas células aumentan en número cuando el tratamiento se realiza en los días 4 y 6 del desarrollo, sin embargo el 17 $\beta$ -estradiol en estos mismos días, no produce ninguna acción sobre las células somáticas esteroideogénicas e indiferenciadas.
- Con el tratamiento combinado de tamoxifén y 17 $\beta$ -estradiol aplicado a los 5 días se produjo un aumento de células esteroideogénicas. Con el mismo tratamiento aumentaron las células somáticas indiferenciadas en embriones tratados al día 6 del desarrollo.
- Las células germinales no respondieron a ninguno de los tratamientos en las edades estudiadas y en las concentraciones utilizadas.
- Las células prefoliculares se encontraron hipertrofiadas en los embriones tratados al día 5 con tamoxifén, 17 $\beta$ -estradiol y con los dos compuestos combinados. Los demás tipos celulares no mostraron cambios en su tamaño.
- La secreción del 17 $\beta$ -estradiol en los ovarios aumentó en los embriones tratados con tamoxifén más 17 $\beta$ -estradiol en el día 5 de incubación.
- Nuestros resultados indican que el tamoxifén en la dosis usada no produce un efecto masculinizante, por el contrario tiene un efecto propio o agonista a los estrógenos sobre las células somáticas de la corteza y la médula del embrión de pollo.

## PERSPECTIVAS.

La acción del tamoxifén descrita sobre el desarrollo de las subpoblaciones celulares del ovario del embrión de pollo, en este estudio fue agonista al  $17\beta$ -estradiol. De estos resultados surgen varias preguntas, que pueden originar otros proyectos experimentales, para conocer mejor el mecanismo de acción antagonista y agonista del tamoxifén.

Para complementar la observación morfológica y morfométrica, sería importante hacer la microscopía electrónica de las subpoblaciones ováricas estudiadas para observar si el tamoxifén no modifica la estructura de los organelos celulares.

Por otra parte sería interesante por medio de técnicas de biología molecular discriminar en que día del desarrollo del ovario del embrión de pollo y a que dosis el tamoxifén desplaza al  $17\beta$ -estradiol de su receptor, así como conocer la unión del tamoxifén a los sitios

R-AntiE y en que día y a que dosis se lleva a cabo. Esto se podría complementar diseñando un experimento para conocer el efecto del tamoxifén en células en que esté inactivado en gen que codifica el R-E.

Nuestro modelo muestra una acción proliferativa sobre las subpoblaciones estudiadas del ovario, que podría reproducirse en un mamífero como el ratón, para conocer si la acción del tamoxifén es semejante, e investigar algunos aspectos que permitieran comprender más claramente el efecto proliferativo y tumoral, que en algunas pacientes produce un tratamiento a largo plazo con tamoxifén.

**TABLA I**

| <b>PESO HÚMEDO DE EMBRIONES DE POLLO DE 17 DÍAS DE INCUBACIÓN TESTIGOS Y TRATADOS CON TAMOXIFÉN</b> |                      |                     |                       |                      |
|---|----------------------|---------------------|-----------------------|----------------------|
|   | <b>TESTIGO</b>       | <b>T4</b>           | <b>T5</b>             | <b>T6</b>            |
| <b>HEMBRAS</b>  | 14.27±2.25<br>(182)  | 12.05±1.96<br>(36)  | 14.55 ± 2.38<br>(192) | 14.15 ± 2.62<br>(36) |
| <b>MACHOS</b>   | 15.14 ±2.54<br>(216) | 13.39 ±2.35<br>(43) | 14.76 ±2.46<br>(254)  | 14.08 ±2.19<br>(54)  |

Media ± desviación estándar  
(n).

**TABLA II**

| <b>PESO HÚMEDO DE EMBRIONES DE POLLO DE 17 DÍAS DE INCUBACIÓN TESTIGOS Y TRATADOS CON 17β- ESTRADIOL</b> |                      |                     |                       |                      |
|--|----------------------|---------------------|-----------------------|----------------------|
|  | <b>TESTIGO</b>       | <b>E4</b>           | <b>E5</b>             | <b>E6</b>            |
| <b>HEMBRAS</b>   | 14.27±2.25<br>(182)  | 13.46±2.31<br>(411) | 14.55 ± 2.38<br>(192) | 13.44 ± 2.90<br>(46) |
| <b>MACHOS</b>  | 15.14 ±2.54<br>(216) | 13.39 ±2.35<br>(43) | 14.76 ±2.46<br>(254)  | 14.39 ±2.47<br>(42)  |

Media ± desviación estándar  
(n).

TABLA III

| PESO HÚMEDO DE EMBRIONES DE POLLO DE 17 DÍAS DE INCUBACIÓN<br>TESTIGOS Y TRATADOS CON TAMOXIFÉN Y 17 $\beta$ - ESTRADIOL |                           |                           |                           |                          |
|--|---------------------------|---------------------------|---------------------------|--------------------------|
|  | TESTIGO                   | TE4                       | TE5                       | TE6                      |
| HEMBRAS  | 14.27 $\pm$ 2.25<br>(182) | 13.47 $\pm$ 2.54<br>(411) | 14.55 $\pm$ 2.38<br>(192) | 13.02 $\pm$ 2.01<br>(17) |
| MACHOS   | 15.14 $\pm$ 2.54<br>(216) | 12.22 $\pm$ 2.51<br>(30)  | 14.76 $\pm$ 2.46<br>(254) | 14.39 $\pm$ 2.47<br>(12) |

Media  $\pm$  desviación estándar  
(n).

TABLA IV

| NÚMERO TOTAL DE CÉLULAS GERMINALES EN EL<br>OVARIO IZQUIERDO DE EMBRIONES DE POLLO DE 17 DÍAS<br>DE INCUBACIÓN TRATADOS CON TAMOXIFÉN |         |      |      |      |
|---|---------|------|------|------|
|   | TESTIGO | T4   | T5   | T6   |
| MEDIA   | 0.33    | 0.34 | 0.35 | 0.40 |
| DESV. STD   | 0.13    | 0.12 | 0.14 | 0.11 |
| n   | 31      | 18   | 22   | 22   |

Número de células (10<sup>6</sup>)

**TABLA V**

| <b>NÚMERO TOTAL DE CÉLULAS GERMINALES EN EL OVARIO IZQUIERDO DE EMBRIONES DE POLLO DE 17 DÍAS DE INCUBACIÓN TRATADOS CON 17<math>\beta</math>-ESTRADIOL</b> |         |      |      |      |
|---|---------|------|------|------|
|   | TESTIGO | E4   | E5   | E6   |
| <b>MEDIA</b>  | 0.33    | 0.29 | 0.39 | 0.41 |
| <b>DESV. STD</b>  | 0.13    | 0.07 | 0.11 | 0.10 |
| <b>n</b>  | 31      | 14   | 19   | 15   |

Número de células (10<sup>6</sup>)

**TABLA VI**

| <b>NÚMERO TOTAL DE CÉLULAS GERMINALES EN EL OVARIO IZQUIERDO DE EMBRIONES DE POLLO DE 17 DÍAS DE INCUBACIÓN TRATADOS CON TAMOXIFÉN Y 17<math>\beta</math>-ESTRADIOL</b> |         |      |      |      |
|---|---------|------|------|------|
|   | TESTIGO | TE-4 | TE-5 | TE-6 |
| <b>MEDIA</b>  | 0.33    | 0.28 | 0.37 | 0.33 |
| <b>DESV. STD</b>  | 0.13    | 0.05 | 0.12 | 0.09 |
| <b>n</b>  | 31      | 5    | 14   | 11   |

Número de células (10<sup>6</sup>)

TABLA VII

| NÚMERO TOTAL DE CÉLULAS SOMÁTICAS ESTEROIDOGENICAS EN EL OVARIO IZQUIERDO DE EMBRIONES DE POLLO DE 17 DÍAS DE INCUBACIÓN TRATADOS CON TAMOXIFÉN |         |      |     |      |
|---|---------|------|-----|------|
|   | TESTIGO | T4   | T5  | T6   |
| MEDIA   | .34     | .51* | .45 | .56* |
| DESV. STD   | .11     | .22  | .14 | .18  |
| n   | 31      | 18   | 22  | 22   |

Número de células ( $10^6$ ).

p< 0.05 de T4 y T6 vs. TESTIGO

TABLA VIII

| NÚMERO TOTAL DE CÉLULAS SOMÁTICAS ESTEROIDOGÉNICAS EN EL OVARIO IZQUIERDO DE EMBRIONES DE POLLO DE 17 DÍAS DE INCUBACIÓN TRATADOS CON 17 $\beta$ -ESTRADIOL |         |     |     |     |
|---|---------|-----|-----|-----|
|   | TESTIGO | E4  | E5  | E6  |
| MEDIA   | .34     | .31 | .31 | .33 |
| DESV. STD   | .11     | .09 | .15 | .14 |
| n   | 31      | 14  | 19  | 15  |

Número de células ( $10^6$ )

TABLA IX

| <b>NÚMERO TOTAL DE CÉLULAS SOMÁTICAS ESTEROIDOGÉNICAS EN EL OVARIO IZQUIERDO DE EMBRIONES DE POLLO DE 17 DÍAS DE INCUBACIÓN TRATADOS CON TAMOXIFÉN Y 17<math>\beta</math>-ESTRADIOL</b> |         |     |      |     |
|---|---------|-----|------|-----|
|   | TESTIGO | TE4 | TE5  | TE6 |
| <b>MEDIA</b>  | .34     | .33 | .48* | .46 |
| <b>DESV. STD</b>  | .11     | .12 | .21  | .17 |
| <b>n</b>  | 31      | 5   | 14   | 11  |

Número de células (10<sup>6</sup>)

\* p < 0.05 T-5 vs. TESTIGO

TABLA X

| <b>NÚMERO TOTAL DE CÉLULAS SOMÁTICAS INDIFERENCIADAS EN EL OVARIO IZQUIERDO DE EMBRIONES DE POLLO DE 17 DÍAS DE INCUBACIÓN TRATADOS CON TAMOXIFÉN</b> |         |       |      |       |
|---|---------|-------|------|-------|
|   | TESTIGO | T4    | T5   | T6    |
| <b>MEDIA</b>  | 6.58    | 7.60* | 6.92 | 7.99* |
| <b>DESV. STD</b>  | 1.28    | 1.86  | 1.54 | 1.45  |
| <b>n</b>  | 31      | 14    | 19   | 15    |

Número de células (10<sup>6</sup>)

\* p < 0.05 T4 y T6 vs TESTIGO

TABLA XI

| NÚMERO TOTAL DE CÉLULAS SOMÁTICAS INDIFERENCIADAS EN EL OVARIO IZQUIERDO DE EMBRIONES DE POLLO DE 17 DÍAS DE INCUBACIÓN TRATADOS CON 17 $\beta$ -ESTRADIOL |         |      |      |      |
|--|---------|------|------|------|
|  | TESTIGO | E4   | E5   | E6   |
| <b>MEDIA</b>   | 6.58    | 6.14 | 6.26 | 6.96 |
| <b>DESV. STD</b>   | 1.28    | 1.31 | 1.35 | 1.14 |
| <b>n</b>   | 31      | 14   | 19   | 15   |

Número de células (10<sup>6</sup>)

TABLA XII

| NÚMERO TOTAL DE CÉLULAS SOMÁTICAS INDIFERENCIADAS EN EL OVARIO IZQUIERDO DE EMBRIONES DE POLLO DE 17 DÍAS DE INCUBACIÓN TRATADOS CON TAMOXIFÉN Y 17 $\beta$ -ESTRADIOL |         |      |      |        |
|--|---------|------|------|--------|
|  | TESTIGO | T-E4 | T-E5 | T-E6   |
| <b>MEDIA</b>   | 6.58    | 6.39 | 7.51 | 7.62 * |
| <b>DESV. STD</b>   | 1.28    | 1.18 | 1.76 | 1.08   |
| <b>n</b>   | 31      | 5    | 14   | 11     |

Número de células (10<sup>6</sup>)

\* p < 0.05 T-E6 vs TESTIGO

TABLA XIII

| <b>RESULTADOS DE RIA PARA E2 EN CONDICIONES BASALES EN OVARIO IZQUIERDO DEL EMBRIÓN DE POLLO DE 17 DÍAS DE DESARROLLO DE TESTIGOS Y TRATADOS CON TAMOXIFEN, 17B ESTRADIOL Y TRATAMIENTO COMBINADO AL DÍA 5 DE INCUBACIÓN</b> |      |      |      |      |
|--|------|------|------|------|
| TRATAMIENTO  | Co   | T5   | E5   | T-E5 |
|  | 0.06 | 0.71 | 0.58 | 2.86 |
|  | 0.71 | 0.39 | 0.37 | 2.71 |
|  | 0.48 | 0.87 | 2.77 | 0.95 |
|  | 0.63 | 0.82 | 2.08 | 0.97 |
|  | 1.65 | 1.85 | 1.28 | 2.74 |
| <b>MEDIA</b>   | 0.75 | 0.93 | 1.42 | 2.05 |
| <b>DES.STD</b>   | 0.60 | 0.49 | 0.90 | 0.89 |

TABLA XIV

| <b>RESULTADOS DE RIA PARA E2 ESTIMULADO CON HGC EN OVARIO IZQUIERDO DEL EMBRIÓN DE POLLO DE 17 DÍAS DE DESARROLLO DE TESTIGOS Y TRATADOS CON TAMOXIFEN, 17B ESTRADIOL Y TRATAMIENTO COMBINADO AL DÍA 5 DE INCUBACIÓN</b> |         |      |      |       |
|--|---------|------|------|-------|
| TRATAMIENTO  | Testigo | T5   | E5   | T-E5  |
|  | 1.70    | 1.49 | 1.26 | 3.86  |
|  | 2.20    | 1.57 | 1.07 | 4.49  |
|  | 0.87    | 0.87 | 2.93 | 2.04  |
|  | 0.78    | 2.81 | 2.18 | 2.18  |
|  | 1.62    | 2.28 | 1.59 | 4.00  |
| <b>MEDIA</b>   | 1.43    | 2.27 | 1.81 | 3.31* |
| <b>BIBLIOGRAFIA.</b>   |         |      |      |       |
| <b>DES.STD</b>   | 0.54    | 0.67 | 0.68 | 1.01  |

## BIBLIOGRAFIA.

Abinawanto, Shimada. K., Yoshida, K., Saito, N. (1996): Effects of a aromatase inhibitor on sex differentiation and level of P450 and P450 messenger ribonucleic acid of gonads in chicken embryos. 102 (2) 241-6.

Alvarez-Fernandez G., Juarez-Oropeza MA, Velázquez P., González del Pliego M, Méndez- Herrera MC, Pedemera E. (1995): Newly hatched chick ovarian cellsubpopulations metabolize distintively progestins and androgens precursors. Gen. Comp. Endocrinol 97:31-41.

Andrews J. E., Smith C. A. and Sinclair A. H. (1997): Sites of the estrogen receptor and aromatasa expression in the chicken embryo. Gen. Comp. Endocrinol.108: 182-190.

Baral E., Nagy E., Berczi I. (1996): The effect of tamoxifén in the immune response. Tamoxifén:Beyond the Antiestrogen John Kellen Editor. Birkhäuser Boston. Pags. 137-178

Berta P, Hawkins JR, Sinclair AH,Taylor A, Griffiths BL, Goodfellow PN (1990): "Genetic evidence equating SRY and the testis determining-factor" nature, 348: 448-450.

Bheringer RR, Finegold MJ, Cate RL.(1994): Müllerian inhibiting sustance function during mammalian sexual development Cell 79: 415-425.

Bitonti A. J., Dumont J.A., Salituro D.G., y cols.(1996) Depletion of estrogen receptor in human breast tumorcells by a novel substituted indole that does not bind to the hormone binding domain. J. Steroid. Biochem. Mol. Biol. 58 (1) 21-30.||||

Bloom H.J.G.and Boesen E. ( 1974): Antiestrogensin treatment of breast cancer :Value by nafoxidina in 52 advances cases. Br. Med. J. 2:7-10.

Burgoyne, P.S., (1988): Role of mamalian y cromosome in sex determination. Phil. Trans. R. Lond. B 322: 63-72.

Buehr, M.,Gu S., Mc Laren A.(1992): Mesonephric contribution to testis differentiation in the fetal mouse. Development 117:273-281.

Burns R.K.,( 1961): Role of the hormones in the differentiation of sex in :sex and internal secretions.(C, W. Young Edit. )76- 151.Williams ans Wilkins .Baltimore.

Calaf, G. (1988, Oct.): A study of model of estrogens and antiestrogens analysis. Rev Med. Chil. Ang.115 (8): 777-82.

Capel B (1998) " Sex un the 90s: SRY and de switch to the male pathway" Annu.Rev. Physiol. 60:497-523.

Carlson B. (2000): Embriología Humana y Biología del desarrollo. Edit Hancourt. Madrid.Cap. 15, pp 379.

Clark J.H., Peck E.J, and Anderson J.N. (1974): Oestrogen receptor and antagonising steroid hormone action . Nature 251: 446-8.

Clark J.H. Winneker R.C, Gurthie S.C and Markaverich B.,(1983): And endogenous ligand for the fenyltriethylenes antiestrogen binding site. *Endocrinology* 113: 1167-8.

Clarke R. Van der Berg HW, Murphy R.F. (1990): Reduccion of the membrane fluidity of human breast cancer cells by tamoxifén and 17 $\beta$ -estradiol. *J.Natl.Cancer Inst.* 82: 1702-5

Clarke R, Lipman M.E. (1996): Mechanisms of Resistance to Antiestrogens and Implications, en Tamoxifén:Beyond the Antiestrogen John Kellen Editor. Birkhäuser Boston. Pags. 93-122.

Clinton y M. Haines, L.C. (1999): An overview of factors influencing sex determination and gonadal development in birds. *CLMS.Cel Mol.Life Sci.* 55: 876-886.

Coco C.M. , Hargis B.M., Hargis P.S., (1992): Effect of *in ovo* 17 $\beta$ -estradiol or tamoxifén Administration on sexual differentiation of the external genitalia Research notes.

Cole M.P., Jones C.T.A., Todd I.D.H.(1971): A new anti-oestrogenic agent in late breast cancer. *Br.J.Cancer.* 25: 270-275.

Couse J.F., Curtis S., Bunch D.O., 1999): Postnatal sex reversal of the ovaries in mice lacking estrogen receptors y . *Science* vol 286:2328-31.

Da Silva SM. Hacker A, Harley V, Goodfellow P, Swain A, Lowell-Bagde R. (1996): Sox9 expression during gonadal development implies a conserved rol for the gene in testis differentiation in mammals and birds.*Nat Gent.* 14: 62-68.

Daniels P,Bishop H, ampbell c, Nicholson I, (1981): Determination of tamoxifén and biologically active metabolites in human breast tumors and plasma. *Eur J Cancer Clin Oncols.* 17:1183-1189.

DeFriend D.J.,Howell A., Nicholson R.A., (1994): Investigation of new pure antiestrogen (ICI182780) in women with primary breast cancer. *Cancer Res.* 54 ( 2) 408-14.

Díaz M (1996): Volume -activated chloride channels in neuroblastoma cells are blocked by antiestrogen toremifene.*Cell. Mol. Neurobiol.* 16 (3) 403-9.

Didier R., Croisille Y.( 1989): Detection of sex-specific proteins in chick embryo gonads and mesonephros :effects of estradiol benzoato or tamoxifén on their expression. *Int.J. Dev. Biol.(Spain)* 33 (4): 467-75.

Doods E.C. Goldberg L. Lawson W., Noble R.I., Robinson R (1938): Oestrogenic activity of certain sintetics compounds .*Nature* 141: 247-8.

Doods E.C (1949): Syntetics oestrogens .*J .Pharm. Pharmacols.* 1: 137-47.

Doods E.C. Folley S.J. Glascock R.F., Lawson W (1958): The excetion of micrograms doses of hexestrol by rabbitsa and rats. *Biochem J.* 68: 161 -7.

Duax, W. L., (1985): Structural bases for chemotherapentie action of antiestrogens. *Prog. Clin. Biol. Res.* 172b, 263-73.

- Elbrecht, A., Smith, R. G. (1992): Aromatase enzyme activity and sex determination in chickens. *Sanc Acad. Sci. Paris* 200, 1983-1985 *Science*, 255, 467-470.
- Emmes C W. Cox RI (1958): Dimethyloestrol as an oestrogen inhibitor. *J Endocrinol.* 17: 265.
- Emmes C W.(1970): Post-coital contraception. *Br. Med. Bull* 26: 45-51.
- Evans R.M. (1988): The steroid and Thyroid hormone receptor superfamily *Science* 240:889.
- Fechheimer.N.S.(1990): "Chromosomes of chicken ". Academic Press. London
- Feye J. C. (1987): Antiestrogens, different sites of action than estrogen receptor. *Horm. res.* 28 (2-4) 202-11. (49 ref).
- Foster J W, Marshall GJA, (1994): And SRY- related sequence on the marsupial X chromosome :Implications for the evolution of the mammalian testis-determining gene. *Proc.Natl. Acad. Sci. USA.*
- Fromson JM, Sharp DS.(1974): The selective uptake of tamoxifen by human uterine tissue. *J obstet. Gynecol Br. Commonwealth* 81:321.
- Galli, F. E., and Wassremann, G.F (1973): Steroids biosynthesis by gonads of 7-and 10-days-old chick embryos. *Gen. Comp. Endocrinol.* 21, 77-83.
- Gasc, J. M. (1980): Estrogen targets cells in gonads of the chicken embryo during sexual differentiation. *J. Embryol. exp. Morphol.* 55: 331-342.
- Gerhard I., Runnebaum B., (1979): Comparison between tamoxifen and clomiphene therapy in women with anovulation. *Arch Gynaekol.* 227: 274-88.
- Gherman R.B., Parker M.F. Macri C.I. ( 1994). Granulosa cell tumor of the ovary associated with antecedent tamoxifen use.*Obstet.Gynecol.* 84 ( 4 Pt 2) 717-9
- Goldbenger R:L; Vaitukaitis J.L. Ross G.T., (1972): Estrogen and follicle stimulating hormone interactions on follicle growth in rats. *Endocrinology* 120: 1942-50.
- Gondos B.(1978): Oogonia and oocytes in mammals En: *The vertebrate Ovary Comparative Biology and Evolution.* Jones RE. (ed) Plenum Press New York 378.
- González del Pliego, M., González Morn, G., and Pedernera, E. (1988): Ultrastructure of ovarian medulla in the newly hatched chick treated with human chorionic gonadotropin. *Cell and Tissue Res.* 253: 665-670.
- Goodfellow P.N. and Camerino G.(1999): DAX-1, an antitestis gene. *Cell. Mol. Life. Sci.* 55: 857-863.
- Greenfield, M.L. (1966): The oocyte of the domestic chicken shortly after hatching. studied by electron microscopy. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 15: 297-316.

Grenman SE, Roberts JA, England BG, Gröroos M, Carey Te. (1988): *In vitro* growth regulation of endometrial carcinoma cells by tamoxifén and medroxyprogesterone acetato. *Gynecols. Oncols.* 30:239-250.

Gubbay J, Cols.lignon j, Koopman P, Capel B, Economou A, Münsterberg (1990): A gene mapping to sex-determining region of the mouse Y chromosome is a member of a novel family of embryonically expressed genes. *Nature* 346: 245-250.

Gubbay J, Vivian N, Economou A., Jackson D., Goodfellow P., Lovell-Badge R., (1992): Inverted repeat structure of the Sry locus in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 89: 7953-7.

Gulino A., Barrera G., Vacca A., (1986): Calmodulin antagonism and growth inhibiting activity of triphenylethylene antiestrogens in MCF-7 human breast cancer cells. *Cancer Res.* 46: 6274..

Guraya, S.S. (1962): The structure and function of the so-called yolk nucleus in the oogenesis of birds. *Q.J. Microscopy Sci.* 103:411-415.

Haqq CM, King CY, Donahoe PK, Weiss MA, (1993): SRY recognizes conserved DNA sites in sex-specific promoters. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA;* 90: 1097-101.

Harley VR, Jackson DL, Hextal PJ, Hawkins JR, Berkovitz GD (1992): DNA binding activity of recombinant SRY from normal males and XY females. *Science* 225: 453-56.

Hedden A., Muller, V., Jensen EV. (Jun 12, 1995:) A new interpretation of antiestrogen action. *Ann N Y Acad Sci (United States)* 761 109-20

Hendry LB. Chu C.K. Copland j.A., Mahesh V.B., (1994a): Antiestrogens piperidinediones designed prospectively using computer graphics and energy calculations of DNA-ligand complexes. *J. Steroid Biochem.* 48 (5-6) 495-505.

Hendry LB. Chu C.K., Rosser M.L., Copland j.A., Wood J.C., Mahesh V.B., (1994b): Design of novel antiestrogens. *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.* 49 (4-6) 269-80

Henry EC., Miller RK., Baggs RB. (1984): *Teratology* 29:2 297-304.

Horwitz, K.B. (1995) When the tamoxifén turns bad: *Endocrinology: Vol 136.3* :821-823.

Hughes C. G. (1963): The population of germ cells in developing female chick. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 11(3): 513-536.

Hwang J-Y, Lin B-Y, Tang F-M, Yu WCY (1992): Tamoxifén stimulates human papilloma virus type expression and cell proliferation in a cancer cervical cell line. *Cancer Res* 52:6848-6852.

Ikeda Y. (1996): SF1: a key regulator of development and function in the mammalian reproductive system. *Act. Paediatr. Jnp.* 38 (4) 412-9.

Iguchi T (1992): Cellular effects of early exposure to sex hormones and antihormones. *Inv. Rev. Cytol.* 139:1-57.

Imataka Hiroaki, Suzuki,K., Inano,H., Kohmoto, K., and Tamaoki, B. (1988): Developmental Changes of Steroidogenic Enzyme Activities in the Embryonic Gonads of the Chicken: The Sexual Difference", *General and Comparative Endocrinology* 71, 413-418

Jacolot F, Simon I,Dreano Y,Beaune P. Riche ,Berthou F(1991): Identification of the cytochrome P-450 III a family as enzymes involved in the N-demethylation of tamoxifen in human liver microsomes.*Bochem.Pharmacols.* 41: 1911-1919.

Jain P.T., Rajah T.T., Pento J.T., (1997): Antitumour activity of a novel antiestrogen (Analog II) on human breast cancer cells.

Jensen E.V., and Jacobson, H.I. (1960): Fate of steroid estrogens in target tissues .In *biological activities of steroids in relation to cancer* , edited by G. Pincus and E.P. Voll. Mer. pp161-178. Academic Press New York.

Jensen E.V.,De Sombre , E.R, and Jungblut P.W.( 1967): Estrogens receptors in the hormone responsive tissues and tumors in : *Endogenous factors influencing hosts- tumor balance* , edited by R.W. Wissler , T.L. Dao , and S Wood pp 15-30 University Press of Chicago. Chicago.

Jensen E.V Suzuki , T. Numata , M. Smith, S. and De Sombre E.R.(1969): Estrogen binding of target tissues , *Steroids* , 13: 417- 427.

Johston S., Dowsett M. (1996): tamoxifen Metabolism and oestrogen receptor function-Implication for Mechanisms of Resistance in Breast Cancer. *Tam:Beyond the Antiestrogen* John Kellen Editor. Birkhäuser Boston. Pags. 231-266.

Jordan V. C. and Gosden B. (1982): Importance of the alkylaminoethoxy side chain for the estrogenic and antiestrogenic actions of tamoxifen and trioxifene in immature rat uterus. *Mol. Cell. Endocrinol.* 27:291-306.

Jordan,V. C. (1984 Dic): *Biochemical Pharmacology of Antiestrogen Action.* *Pharmacols. Rev.:* 36 (4) 245-76.

Kagami,H., Clark, ME., Verrinder Gibbins, AM., Etches, R.J:( 1995): Sexual differentiation of chimeric chickens containing ZZ and ZW cells in the germline. *Mol Reprod Dev (United States)* 42 (4). 379-87

Katzenellengoben, S, Montaña, MM., Le Goff P., (Jun 1995): Antiestrogens: mechanisms and actions in target cells. *J. Steroid Biochem Mol. Biol. (England)* 53 (1-6) 387-93

Katzenellenbogen,. BS, (Feb.1996): Estrogen receptors: bioactivities and interactions with cell signaling pathways. *Biol. Reprod. (United States)* 54 (2) 287-93

Kellen J.A (1996): The enigma of tamoxifen *Tam:Beyond the Antiestrogen.* John Kellen Editor. Birkhäuser Boston. Pags 1-16..

Koo C.G., Allen H.L.,Long R.A., Serio-Dunn R., Goggin B.Weppelman R.M.(1985): Effect of tamoxifen on H-Y antigen expression and gonadal development in chicken embryo. *Differentiation* 29: 140-144.

Koopman P, Gubbay j, Vivian N, Goodfellow PN, Lowel-Badge R (1991): Male development of chromosomally female mice transgenic for SRY. *Nature*;351:117-121.

Koopman P. (1999): Sry and Sox9: mammalian testis-determining genes. *Cell Mol. Life Sci.*55: 839-856

Knecht M, Tsai-Morris CH y Catt KJ. (1985): Estrogen dependence of luteinizing hormone receptor expression in cultured rat granulosa cells. Inhibition of granulosa cells development by the antiestrogens tamoxifén y keoxifene. *Endocrinology*: Vol 116(5) 1771-1777

Krust A, Green S, Argos P, Kumar V, Walter P, Bornert JM, Chambon P (1986): The chicken oestrogen receptor sequence: homology with v-erbA and human oestrogen and glucocorticoids receptor *EMBO J.* 5:891-7.

Kuiper G.G., Carlsson B., Grandien K, Enmarck E., Haggbland J., Nilsson S., Gustafsson J.A. (1997): Comparison of the ligand binding specificity and transcrip tissue distribution of estrogen receptors alpha y beta . *Endocrinology.* 138 (3) 863- 70.

Kuo D.Y. Jones J., Fields A.L., Runovicz C.D. Goldberg G.L. (1997): Endometroid adenocarcinoma of the ovary and long-term tamoxifén therapy: a coincidence or a cause for concern?. *Eur. J. Gynaecols.. Oncols..* 18 (6) 457-60.

Leawitt W, Chen J, Allen T.C, ( 1977): Regulation of progesterone receptor formation by estrogen action .*Ann. N.Y. Acad. Sci.* 286: 210-25.

Levenson A.S., Svoboda K.M. Kwaan H.c., Jordan V.C. ( 1998): Agonistic activity of antiestrogen receptor complexes to regulate urokinase plasminogen activator (uPA) and plasminogen inhibitor type 1 PAI-1) endogenous gene expression in breast cancer cells. *Cancer Lett.* 125 (1-2) 215-20.

Levín E., Lopez., Tomschinsky S.(1988): Displacement of the estradiol receptor binding by tamoxifén as a pronostic indicator in cancer of the breast. V International Congress of Breast Diseases .

Levín E., Schuasrzberg (1990): receptores a estrógenos ¿para que sirven? .*Medicina (Buenos Aires)* 50: 74-80.

Lopes MCF, Vale MGP, Carvalho AT.(1990): Ca<sup>2</sup> dependent binding of tamoxifén to calmodulin isolated to bovine brain. *Cancer Res.* 50:2753-8

López M, Cervantes A, Koffman S. (1996): Avances en el conocimiento del proceso genético en la diferenciación sexual en el humano. Artículo de revisión. *Rev. Inv. Clin.*48:129-137.

Magre S, Jost A .(1991): Sertoli cells and testicular differentiation in the rat foetus.*J electron. Micros.Tech.* 19: 172-88.

Makabe S. (1991): Migration of germ cells, development of the ovary and folliculogenesis. En Carlson B. (2000): Embriología Humana y Biología del desarrollo. Edit Hancourt. Madrid. Cap. 15, pp.395.

Martel C., Provencher., Li X., St Pierre A., Leblenc G. (1998): Binding characteristics of novel nonsteroidal antiestrogens to the rat uterine estrogen receptors. J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.

Marx J. (1995): Snaring the genes that divide the sexes for mammals. Science; 269:1824-5.

Maudelone T., Escot C., Pujol P., Rouanet P- y cols. (1994) *In vivo* stimulation by tamoxifén of cathepsin D RNA levels in breast cancer. Europ. J. Cancer. 30 A: 2049-53.

Mc Carey J.R., ,About K.U., (1982): Functional differentiation of chicks gonads following depletion of primordial and germ cells. J. Embryo. Exp. Morphol. 68:161-74.

Méndez, C., Hofmann, P. Pedernera, E., (1993): Effect of 17 $\alpha$ -estradiol on somatic and germ cell subpopulations in the ovary of the newly hatched chick. Gen. Comp. Endocrinol., 89, 182-188.

Méndez, C. Chavez B., Echeverría O., Vázquez-Nin G.H., Pedernera E. ( 1999): Evidence for estrogen receptor expression in germ cell and somatic cell subpopulations in the ovary of the newly hatched chicken. Cell Tissue Res. 298: 145-152.

Merchant-Larios H. (1976): The role of the germs cells in the morphogenesis and cytodifferentiation of the rat ovary. en Progress in Differentiation Research (Muller-Bérat, ed) p. 453-62. North Holland Amsterdam.

Merchant-Larios H, Moreno Mendoza N, Buerh M (1993): The role of the mesonephros in cell differentiation and morphogenesis of the mouse fetal testis. Int. J. Dev. Biol. 37:407-15.

Metha RR., Gupta TK. (1987): Antiestrogens binding sites in microsomal fraction of malignant and no malignant human breast tissues. Breast cancer Rest Tret 9: 61

Miglietta. L. Repetto. L. Gardin G. (1991): Tam and alpha interferon in advanced breast cancer. J. Chemother. 3:383-6.

Millon R., Nicora F., Muller D., Ever M., (1989 ): Modulation of human breast cancer adhesion by estrogens and antiestrogens. Clin. Expl. Metast. 7: 405-15.

Mintz B, Roussel ES. (1957): Gene-induced embryological modifications of primordial germ cells in the mouse. J. Exp. Zool. 134: 207-37.

Montaño M.M., Müller V., Trobaugh A., y Katzenellenbogen B.S (1995): The carboxy-terminal F domain of the human receptor: estrogen role in the transcriptional activity of the receptor and the effectiveness of Antiestrogens as estrogen antagonists. Mol. Endocrinol. P :814-825.

Mosselman S., Polaman J., Dijkema R. (1996): Identification and characterization of a novel human estrogen receptor. Febs. Lett. 392: 49-53.

- Ng R., Kallen J.A. Wonh AHC., (1986): The effect of the estrogen and anti-estrogen on plasminogen activator levels in an experimental tumor model *J.Nutri. Grow cancer*.
- Noguchi S., Miyauchi K., Imaoka S., Koyama H. (1988): Inability of tamoxifén to penetrate into cerebrospinal fluid. *Breast Cancer Reas Treat*. 12: 317-318
- Nordqvist K, Lowell-Badge R (1994) Setbacks on the road to sexual fulfillment". *Nat.Genet*. 779.
- O'Brian C.A. ,Ioannides CG.Ward N.E., Liskamp RM (1990) Inhibition of protein kinasa C and calmodulin by the geometrics isomers Cis and trans-tamoxifén.*Biopolymers* 29: 97-104..
- O'Malley B.W. MacGuire W.L. Kholer P.O., Korenmen S.G., (1969): Studies on the mechanism of the steroids specific proteins.in Aswood E.B. (Ed) *Recent progress in hormone research*. Academic Press New York, pp105-160.
- ONEILL, M.J. and Sinclair A.H. (1997): Identification of novel sex specific transcripts in the chick genital ridge by Representation Difference Analysis .1st International Symposium on the Biology of Vertebrate Sex Determination May 1997.pag. 43, Hawaii.
- Osborne CK, Boldt DH.,Clark GM., Trent JM.,(1983): Efectts of tamoxifén on human breast cancer cells cycle Kinetics accumulation of cells in early phase G1. *Cancer Res*. 43: 3583-3855.
- Osborne CK., Corona EB., Wiebe B., De Gregorio M. (1991): Adquired tamoxifén resistance correlates with reduced breast tumor levels of tamoxifén and isomeritation os trans-4-hydroxy-tamoxifén .*J.Natl. Cancer Inst*.34: 1477-1482.
- Parker K. L.,Schimmer B.P., and Schedl A. (1999) Genes essential for early events in gonadal development" *Cell. Mol. Life. Sci*. 55: 831-838.
- Pask A, Toder R, Wilcox SA, Cametrino G, Graves JA.( 1997): The candidate sex-reversing DAX1 gene is autosomal in marsupials: implications for the evolution of sex determination in mammals.*Genomics* 41 (3):442-46.
- Pasqualini J.R, Nguyen B-L, Sumida C, Giambiagui N y Mayrand C. (1986): Tamoxifen and progesterone effects in target tissues during the perinatal period. *J. Steroid. Biochem*. 25: 853-57.
- Pedernera, E., Gómez, Y., Velazquez, P., Juárez-Oroperza, M. A., and González del Pliego, M. (1988): Identification of steroidogenic cell subpopulations in the ovary of the newly hatched chicken. *Gen. Comp. Endocrinol*. 71, 153-162.
- Poirier D, Auger s., Merand Y, Simard j., Labrie F. (1994): Sintesis and antiesrtrogenic activity of diaryl thioeter derivatives .*J. Med. Chem*. 37 (8) 1115-1125.
- Pratt W.B. (1993): Role of heat-shock proteins in steroid receptor function. *Stroid Hormone Acction Edit for Malcols.m G. Parker Oxford University Press*. Pp64-91.

Raynaud, J.P., Ojasoo, T. (1985): The design and use of sex-steroid. *J. Steroids. Biochem* 25: 5B, 811-833.

Raynaud, G (1969): Transfert de cellules germinales de Didon a l'embryon de Poulet par injection intravasculaires, *J. Embryol. Exp. Morphol.* 21: 485-507.

Richards JS (1975) Estradiol receptor content in rat granulosa cells during follicular development: Modification by estradiol and gonadotropins. *Endocrinology* 97: 1174-1184.

Rocheffort H. (1983): Non Steroidal antiestrogens are estrogen-receptor-targeted growth inhibitors that can act in the absence of estrogens, *Horm. Res.* 1987, 28 (2-4) 196-201 (31 ref.)

Romanoff AL (1960) *The avian embryo.* Mc Millan, New York.

Saitho Y., Saitho H., Ohtomo K., Mizuno S. (1991) Occupancy of the majority of DNA in the chicken W- chromosome by bent-repetitive sequences, *Cromosoma* 101: 32-40.

Salzgeber, B., Reyss-Brion, M., and Baulieu, E. E. (1981): Modifications des gonades femelles de l'embryon de Poulet apres action du Tame. *C. R. Acad. Sci. (Paris) Ser. III* 293, 133-138.

Samsel J., Lober B., Petit, A. and Weniger, J.P (1986): Analysis of the cytosolic proteins of chick embryo gonads by two-dimensional gel electrophoresis. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 94: 221-230.

Sapino A., Pietribiasi F., Bussolati G., Marschio P.C., (1986): Estrogen-and tamoxifen-induced Rearrangements of Cytoskeletal and Adhesion Structures in Breast Cancer MCF-7 cells. *cancer Res* 46: 2526-2531.

Sasco A.J. Grende I. (1996): Carcinogenicity of the Tamoxifen. *Tamoxifen: Beyond the Antiestrogen* John Kellen Editor. Birkhäuser Boston. Pags 59-92.

Scheib, D., Baulieu, E. E., (1981): Action antagoniste do tamoxifene sur la differenciation normale des gonades femelles de l'embryon de Caille. *C. R. Acad. Sci. Paris, 293, Ser. III,* 513-518.

Scheib, D. (1983): Effect and role of the estrogens in avian gonadal differentiation. *Differentiation Suppl.:* 23. 87-92.

Scherer G. (1999): Introduction: vertebrate sex determination and gonadal differentiation. *Cell. Mol. Life.* 55:821-823.

Shen W-H, Moore C, Ikeda T, Parker K, Ingraham H. (1994): Receptor steroidogenic factor 1 regulates the Müllerian inhibiting substance gene: a link to sex determination cascade. *Cell* 77: 651-61.

Shutze N., Schneider M.R., Knuppen R., Vollmer G.(1994): Tamoxifen and ZK119010 exert mixed agonistic and antagonistic effects on pS2 expression in MCF-7 cells. *Cancer.Detect. Prev.* 18 (6) 479-83.

Skalko, R.G., Kerrigan,J.M. and Dyer, R.F.(1972): Intercellular bridges between oocytes yn the chicken ovary.*Z.Zellforsch. Mikrosk.Anat.* 128:31-41.

Smith. C. A., Andrews J. E., and Sinclairs A. H. (1997): Gonadal sex differentiation in chicken embryos: expression of estrogen receptor and aromatasa genes. *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.* 60: 295-302.

Spillane R.M., Whitman G. J.(1995): Treatment of retroperitoneal fibrosis with tamoxifén. *A. J. R.* 164: 515-6.

Stanley A.J. y Witchi E (1940): Germ cells migration in relation to asymmetry in the sex gland of hawks. *Anat. Rec.* 76:329-42.

Stoll R; Ichas F; Faucounau N; Maraud R. (1993): Action of estradiol and tamoxifén on the testis-inducing activity of the chick embryonic testis grafted to the female embryo. *Jour. Anat. Embryol.( Berl) (Germany)* 188 (6): 587-92.

Stumpf.W.E., (1969): Nuclear concentration on [<sup>3</sup>H] 17β-estradiol in target tissues dry-amount autorradiography of vagina, oviduct, ovary, testis. Mammary tumor, liver and adrenal. *Endocrinology* 85:31.

Su H, Lau YC.( 1993): Identification of the transcripcional unit, structural organization, and promoter sequence of human sex-determining region Y( SRY) gene, using a reverse genetic approach. *Am. J. Hum. Gen.* 52: 24-38.

Sudo K .Monsma FJ. Katzenellenbogen BS.(1983): Antietrogens binding sites distintics from the estrogen receptor subcellular localization , ligand specificity and distribution in tissues of the rat. *Endocrinology* 112: 425.

Sutherland. RL., Murphy L.C., (1980): The binding of tamoxifén to human mammary carcinoma cytosol.*Eur. J. Cancer.* 16: 1141.

Swain A, Lovell-Bagde R.(1997): A molecular approach to sex determination in mammals. *Acta Paediatr. Suppl.* 423: 46-9.

Swain A, Narvaez V, Burgoyne P, Camerino G, Lovell-Bagde R.(1998): DAX1 antagonizes Sry action in mammal sex determination. *Nature* 391( 6669): 761-7.

Szaniawska B .Gawrychowski K., Janik P. (1998): The effect of protein kinasa C inhibitors on invasion of human ovary cancer cells. *Neoplasma (Czech Republic)* 45 (1) 7-11.

Tate A.C.,Greene G.L. , DeSombre E. R., Jensen V. C. (1984) : Differences between estrogen and anti-estrogens receptor complexes from human breast tumors identified with an antibody raised against the estrogen receptor. *Cancer Res.* 44: 1012- 18.

Tiffin GJ, Rieger D, Betteridge KJ, Yadav BR, King WA. (1991): Glucose and glutamine metabolism, in pre-attachment cattle embryos in relation to sex and stage of development" J Reprod Fert. 93: 125-132.

Tremblay G.B., Tremblay A., Copeland N.G. Gilbert, D.J., Jenkins, N.A., Labrie F., Giguere V. (1997): Cloning, chromosomal localization, and functional analysis of the murine estrogen receptor beta. Mol. Endocrinol. 11(3) 353-65.

Vigier, B, Picard JY, Tran D, Legeai L, Josso N, (1984): Production of Anti-Müllerian hormone; another homology between Sertoli and granulosa cells". Endocrinology 114:1315-20.

Vigier, B. (1989): Anti-Müllerian hormone produces endocrine sex reversal of fetal ovaries. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 86, 3684-88.

Vink-van Wijngaarden T, Pols H.A., Buurman y cols. (1994): Inhibition of breast cancer grow with vitamin D3 analoges and tamoxifén. Cancer Res. 54 (21) 5711-7.

Ward H. W. C (1973): Antioestrogens therapy for breast cancer-A trial of tamoxifenat two dose levels. Br. Med.J. 1:13-14.

Watts C. K., (1987). Studies of the ligand specificity and potential identity of microsomal antiestrogen binding sites. Mol Pharmacol May, 31 (5): 541-51.

Weniger J. P. (1962): Diffusion des hormones gonadiques de 1' embryon de Poulet dans le milieu de culture. Arch. Anat. micr. Morphol. exp. 51, 325-336.

Weniger J. P. (1966) Activit oestrogene de la fraction "oestrone-oestradiol" de lillieux incubés avec les gonades d' embryon de Poulet femelles. C. R. Acad. Sci. 262. Serie D. 578-580.

Weniger J. P. Ehrhardt, J. P., Friting, B. (1967): Sur la formation d'oestrone et d'oestradiol par las gonades de 1' embryon de Poulet femelle cultivees in vitro C. R. Acad. Sci., Paris, Serie D 264: 838-841.

Weniger J. P. (1968): Sur la precocite de la secretion d'oestrogenes par les gonades embryonnaires de Poulet cultivees in vitro. C. R. Acad. Sci. Paris, Serie D 266: 2277-2279.

Weniger J. P. Zeis, A., (1971): Biosynthese d' oestrogenes par les bauches ganadiques de Poulet.gen. comp. Endocrinol., 16, 391-397.

Weniger J. P., Chouraqui, J., Zeis, A., Samsel, J., (1981): Action anti-oestrogene du tamoxifene chez l'embryon de Poulet. C. R. Acad. Sci. Paris 280, Serie III. 927-928.

Weniger J. P., Chouraqui, J., Zeis, A., (1982): Estrogen secretion d'oestrogenes par l'ovarie d'embryon de poulet traite par le tamoxifene .C.R.Seances Acad. Sci. (III)294:1025-1027.

Weniger J. P. Zeis, A., (1984): Tamoxiféne et differenciation sexuelle des gonades chez l'embryon de poulet . Arch. Anat.micr. Morphol.esp. 73: 217-22.

- Weniger J. P., Samsel J. (1985): Tamoxifen and ovarian differentiation in birds. Arch. Anat.micr. Morphol.esp.74:50-1.
- Weniger J. P. Chouraqui, J. (1988): Action de la LH sur la sécrétion d'œstradiol par l'ovaire embryonnaire de poulet en culture in vitro .Reprod.Nutr. Dévelop. 28(IA): 1473-77.
- Weniger J. P. (1991): Estrogen secretion by the chick embryo ovary. Exp. Clin. Endocrinol. 98 (1), 9-14.
- Williansom J., Ellis G.P., (1973): The induction of ovulation by tamoxifén. J. Obstet. Gynaekol. 80: 844-7.
- Willson T.M. Norris J.D., Wagner B.L. Asplin I., Baer P.,(1997): Dissection of the molecular mechanism of action of GW5638, a novel estrogen receptor ligand , provides insights into the role of estrogen receptor in bone. Endocrinology 138 (9) 3901-11
- Winnecker R.C., Clark JH. (1983): Estrogenic stimulation of the antiestrogen specific binding site in rat uterus and liver. Endocrinology112:1910.
- Witschi E.(1931): Range of the cortx-medulla antagonism in parabiotic twins of ranidae and Hylidae .J. Esp. Zool 58:113-145.
- Witschi E.(1935): De anisexualitat der embryonaler Keindrüsen des hausperlings Passer domesticus (Linnaeus) Biol. Centr.BL. 55:168-174.
- Wolf, DM., Fuqua, SA. (May 1995): Mechanisms of action of antiestrogens. Cancer Treat Rev (England) May 1995 21 (3) 247-71.
- Wolff, et al., Gingliner, A., (1935): Sur la transformation des Poulets males in inresexus par injection d' hormone femelle (folliculine) aux embryons. Arch. Anat. His. Embr. 20, 219-278.
- Wong M, Ikeda Y, Luo X, Caron KM, Weber TJ, Swain A, Schimer BP, Parker KL. (1997) "Steroidogenic factor 1 plays multiple roles in endocrine development and function". Recent. Prog Horm Res.52: 167-182.
- Woods , J.E., Erion,L.H., (1978): The sinthesis of estrogens in the gonads of the chick embryo. General and Comparative Endocrinology 36. 360-70
- Woods, J. E., Congoran, D. D., and Thomas, R. C. (1982): Plasma estrone levels in the chick Embryo. Poult Sci. 61, 1729-1733.
- Wu TC.,Wang L., Wang YJ (1992): Expression of estrogen receptor gene in mouse oocytes during the embryogenesis. Mol.Rep.Dev. 33(4):407-412.
- Wu TC.,Wang L., Wang YJ (1993): Detection of estrogen receptor messenger ribonucleic acid in human oocytes and cumulus oocytes complexes using reverse transcritase-polymerase chain reaction.Fertil Steril 59: 54-59

Yadav BR, King WA, Betteridge KJ, (1993): Relationships between the completion on first cleavage and the chromosomal complement sex , and developmental rates of bovine embryos generated in vitro. *Mol Reprod Dev.* 36: 434- 9.

Yamamoto K.(1985): Steroid receptor regulated transcription of specific genes and gene networks. *Annu. Rev.Genet.* 19:209.

Zamboni, L., and Merchant ,H ( 1973): The fine morphology of mouse primordial germ cells in extra gonadal locations.*Am.J.Anat.* 137:299-336.

Zhang YH, Guo G, Wagner RL, Huang BL, McCabe L (1998): "DAX1 mutation map to putative structural domains in a deduced three dimensional model". *Am J Hum Genet.* 62 (4): 855-64.