



01674

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE
MÉXICO

MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN
Y DE LA SALUD ANIMAL

"EXPRESIÓN DE LA P450 AROMATASA EN LA PLACENTA
DE LA CABRA"

T E S I S

PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS

P R E S E N T A

JOSÉ ANTONIO MONDRAGÓN HERRERA

TUTOR:

DRA. MARTA C. ROMANO PARDO

COMITÉ TUTORAL:

DRA. ANA MARÍA ROSALES TORRES

DR. CARLOS GUTIÉRREZ AGUILAR

MÉXICO D. F.

2005

M:350213



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MEXICO

Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias de la Producción y de la Salud Animal

SECRETARIA ESCOLAR
OFICIO FMVZ/SE/167/05.

ASUNTO: jurado

BIOL. FRANCISCO JAVIER INCERA UGALDE
JEFE DE LA UNIDAD DE ADMON.
DE POSGRADO DE LA DGAE
P R E S E N T E .

Me permito enviar a usted los nombres de los profesores designados para integrar el Jurado de Examen de Grado de **Maestría en Ciencias** que deberá sustentar él (la) pasante **MVZ. José Antonio Mondragón Herrera**.

PRESIDENTE:	DR. JAVIER VALENCIA MENDEZ
SECRETARIO:	DRA. ANA MARIA ROSALES TORRES
VOCAL:	DR. CARLOS GUTIERREZ AGUILAR
SUPLENTE:	DR. ANDRES DUCOING WATTY
SUPLENTE:	DRA. MARTA ROMANO PARDO

ATENTAMENTE.
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Ciudad Universitaria, D.F., a 2 de agosto de 2005.
COORDINADOR DEL PROGRAMA

DR. FRANCISCO SUAREZ GUEMES

FSG/EAS/*rmrz.

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: José Antonio Mondragón Herrera

FECHA: 21/08/2005

FIRMA:

Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia
Circuito Exterior s/n, Ciudad Universitaria Deleg. Coyoacán, C.P. 04510, México D.F.
Tels. 5622 58 54 al 57 Fax: 5616 23 42 y 5616 71 97

Este proyecto fue financiado en parte con el donativo 4/423-Q de CONACYT otorgado a la Dra. Marta C. Romano Pardo del Departamento de Fisiología Biofísica y Neurociencias del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN.

El trabajo experimental fue realizado en el Laboratorio de la Dra. Marta Romano Pardo del Departamento de Fisiología, Biofísica y Neurociencias del CINVESTAV. Parte de los estudios se realizaron en el Laboratorio 24 del Departamento de Genética y Biología Molecular del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados, dirigido por el Dr. Patricio Gariglio Vidal.

DEDICATORIA.

*A MIS PADRES ANTONIO Y ROSY CON CARIÑO, RESPETO Y
GRATITUD POR EL APOYO BRINDADO DURANTE TODA MI
VIDA PROFESIONAL.*

*A MIS HERMANOS CARINA Y OLIVER CON MI INMENSO
CARIÑO.*

*A MI ESPOSA LAURA CON AMOR Y AGRADECIMIENTO POR SU
APOYO Y COMPRESIÓN INCONDICIONAL.*

A MI HIJA AMY CON TODO MI AMOR.

AGRADECIMIENTOS.

Quiero agradecer a aquellas personas que compartieron sus conocimientos conmigo para hacer posible la conclusión de esta tesis:

Dra. Marta C. Romano Pardo

Dr. Patricio Gariglio Vidal

Dra. Ana María Rosales Torres

Dr. Carlos Gutiérrez Aguilar

Por todas las oportunidades y enseñanzas que me han brindado.

Muy especialmente al Q.B.P. Rodolfo Ocádiz Delgado (Wilox) por su asesoría y asistencia técnica en la metodología necesaria para realizar la RT-PCR *in situ*, además de su gran amistad que fueron muy valiosas para mí y para la realización de esta tesis.

A los miembros del Jurado del examen por su empeño en la revisión de la Tesis y sus sugerencias para mejorarla.

Dr. Javier Valencia Méndez

Dra. Ana María Rosales Torres.

Dr. Carlos Gutiérrez Aguilar

Dr. Andres Ducoing Watty

Dra. Marta C. Romano Pardo

A Carolina Miranda por su asesoría y asistencia técnica en la realización de la metodología de RT-PCR *in vitro* que fue de gran ayuda para la realización de esta tesis.

Al Dr. Javier Valencia Méndez por proporcionarnos las placentas posparto y guiarme en la clasificación de los fetos.

Al CONACYT por concederme beca de Maestría con número de registro 169749

A los técnicos de laboratorio Jesús S. Velásquez Lozano, Armando Vargas Sánchez y a la Sra. Guadalupe Villasana Hernández por su asistencia técnica en las metodologías utilizadas en el Laboratorio y por su esmerado apoyo con el material requerido.

A Luz María Buendía por su apoyo en la realización de cartas, memorandos, así como en la solicitud del material requerido.

Al Ganadero Sr. Iñigo García Manzanares por proporcionarnos el material biológico necesario para la realización de la tesis.

A mis amigos del laboratorio de Genética José Luis Cruz, Cesar Pacheco y Elizabeth Álvarez por los momentos y enseñanzas compartidas.

A mis Amigos de Maestría Agustín, Nicolás, Wilfredo, Martín, Everardo, Fetter, Henry, Eduardo, Iván, Hortensia, Maria, Simone, Paulina, Esperanza, Jahel, Adriana, Paula e Ysabel por todos aquellos momentos compartidos.

Y a todas aquellas personas que a lo largo de tantos años de estudio han estado involucrados en una parte importante de mi vida y que siempre los recuerdo con mucho cariño.

INDICE

	Página
Índice.....	I
Resumen.....	1
Summary.....	2
Introducción.....	3-6
Aspectos de la fisiología reproductiva de la cabra doméstica.....	7-9
Cambios endocrinos asociados a la gestación de la cabra.....	10
Embriología.....	11
Placenta.....	12
Placentación en rumiantes.....	13
Clasificación de la placenta.....	13
Origen vascular.....	13
Relación feto materna.....	14
Clasificación morfológica.....	14
Estructura microscópica.....	14-15
Estructura macroscópica.....	16-17
Biosíntesis de estrógenos.....	18-23
P450 placentaria.....	23-27
Justificación.....	28
Hipótesis.....	28
Objetivos.....	29
General.....	29
Particular.....	29
Materiales y Métodos.....	29
Obtención y clasificación de las placentas.....	29-31
RT-PCR <i>in vitro</i>	32
Extracción del RNA total.....	32-33
Síntesis del cDNA.....	33-34
Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	34-35
RT-PCR <i>in situ</i>	35
Obtención y tratamiento de las muestras.....	35
RT <i>in situ</i> (síntesis de cDNA).....	35-36
PCR <i>in situ</i> (amplificación).....	37
Detección de la señal.....	37-38
Resultados.....	38
Detección de aromatasa <i>in vitro</i>	38-40
Expresión de P450 aromatasa <i>in situ</i>	41-48
Discusión.....	49-53
Conclusiones.....	53-54
Literatura citada.....	54-63

RESUMEN

El propósito del presente estudio fue estudiar la expresión de la P450 aromatasa en la placenta de la cabra a través de la gestación así como su distribución tisular por RT-PCR *in vitro* y RT-PCR *in situ*. Para tal fin se extrajo el RNA total de placentas de cabra en diferentes estadios de la gestación utilizando TriReagent. Se sintetizó el cDNA utilizando transcriptasa reversa, y se amplificó por PCR a los mensajeros de interés utilizando una sonda diseñada a partir de la secuencia obtenida en el laboratorio. Por otra parte se estudió la expresión y distribución tisular de mRNA para aromatasa en el tejido fijado utilizando la técnica de RT-PCR *in situ*. Se encontró *in vitro* la expresión de la enzima en placentas correspondientes a los 4 y 5 meses de gestación y en placentas posparto. Los estudios de RT-PCR *in situ* mostraron expresión de aromatasa en las células del sincitiotrofoblasto de los cotiledones placentarios a partir del 1^{er} mes de la gestación y hasta el posparto con niveles variables de expresión en las distintas etapas de la gestación. No se detectó expresión de aromatasa en la carúncula. Además se observó que la distribución tisular de la expresión de aromatasa cambia durante el desarrollo de la placenta de la cabra. Los resultados obtenidos en este trabajo muestran que la aromatasa se expresa desde etapas tempranas de la gestación en la placenta de la cabra y que continúa presente hasta el parto.

SUMMARY

The purpose of the present study was to study the expression of the P450 aromatase in the placenta of the goat throughout pregnancy by *in vitro* and *in situ* RT-PCR. For this purpose total RNA was extracted from goat placentas of different stages of pregnancy using TriReagent. The cDNA was synthesized utilizing reverse transcriptase, and the messengers of interest amplified by PCR using probes designed from the sequence obtained in the laboratory. The expression and tissue distribution of aromatase mRNA was investigated in the weaving set by the RT-PCR *in situ* technique. *In vitro* expression of the enzyme was found in placenta corresponding to 4 and 5 months of pregnancy and in the pospartum placenta. The *in situ* RT-PCR technique showed the expression of aromatasa in the syncytiotrophoblast cells of the placental cotyledons from the first month of pregnancy onwards. The *in situ* expression of aromatase increased with the progress of pregnancy. No expression of aromatase was found in the caruncule. The tissue distribution of the enzyme changed throughout the placenta development. Present results showed that aromatase is expressed very early in the goat placenta and is still present by the end of pregnancy.

INTRODUCCION

En las diversas especies vertebradas, los signos endocrinos y paracrinicos mediados por los estrógenos son críticos para las funciones biológicas y/o el desarrollo apropiado de múltiples tejidos que van desde las gónadas embrionarias hasta el cerebro adulto (Graddy, et al. 2000). La biosíntesis de estrógenos al parecer ocurre en todos los vertebrados. Estos incluyen las aves, reptiles, anfibios y mamíferos (Simpson, et al. 1994; Simpson, et al 2002). Los andrógenos son catalizados a estrógenos por el citocromo P450 aromatasa, producto del gen *CYP19* y enzima terminal en la vía biosintética de estrógenos (Graddy, et al. 2000).

En varias especies, la biosíntesis de estrógenos en el cerebro se ha relacionado con la conducta y la diferenciación sexual. Frecuentemente se ha demostrado una marcada diferencia dimórfica sexual en el Sistema Nervioso Central (SNC), por ejemplo, en especies de aves en las cuales el canto del macho es importante en la conducta del cortejo (Simpson, et al. 1994, 2002). La distribución de la aromatasa en los humanos y otros primates superiores es muy diferente de la de los mamíferos inferiores, en los que la expresión se restringe al cerebro y gónadas (Simpson, et al. 2002).

Varios tejidos tienen la capacidad de expresar aromatasa y sintetizar estrógenos. Estos incluyen células ováricas, testiculares tanto Sertolli como Leydig, endometrio, el sincitiotrofoblasto de la placenta e hígado fetal (pero no en el del adulto), intestino, piel, tejido adiposo, condrocitos, osteoblastos, vasculatura

del músculo liso, y numerosos sitios en el cerebro, incluyendo varias áreas del hipotálamo, sistema límbico, y corteza cerebral (Simpson, et al. 1994; Yamada, et al. 1995; Agarwal, et al. 1997; Jeffery, et al. 1997; Kamat, et al. 1998; Kamat, et al. 1999; Simpson, et al. 2002). Asimismo, se la encuentra en la zona de peri-implantación del embrión de cerdo y otros mamíferos. Esta síntesis se da con niveles variables y tiene un papel fundamental en los eventos de gestación (Graddy, et al. 2000). El gen *CYP19*, es principalmente activo en las células ováricas de la granulosa y en la placenta de humanos y varias especies de ungulados como las vacas, cerdos, caballos, ovejas y cabras (Simpson, et al. 1994; Kamat, et al. 1999; Vanselow, et al. 1999; Simpson, et al. 2002; Bobes, et al. 2004). Ambos tejidos son órganos endocrinos conocidos por una producción temporal de estrógenos (Vanselow, et al. 1999). Por otra parte, la biosíntesis de estrógenos no se ha reportado en animales invertebrados, aunque la familia del gen P450 aromatasa parece tener un linaje antiguo de genes, divergiendo aproximadamente hace 10^9 años (Simpson, et al. 2002).

Los estrógenos no son sólo un factor endocrino ya que también se producen localmente en varios sitios extragonadales actuando de manera paracrina e intracrina. Estos sitios incluyen el seno, hueso, vasculatura, y cerebro; en estos órganos la acción de la aromatasa puede generar localmente concentraciones altas de estradiol, sin afectar los niveles circulantes (Simpson, et al. 2002). Los esteroides C19 circulantes son substratos esenciales para la síntesis de estrógenos gonadales y extragonadales. La expresión de aromatasa

en los diferentes sitios está bajo el control de promotores tejido-específicos regulados por grupos de factores de transcripción diferentes (Fürbass, et al. 1997; Simpson, et al. 2002). Por ejemplo la expresión en la placenta se produce por un promotor que es regulado por retinoides, mientras que en el caso del ovario es regulado por cAMP y en el caso del tejido adiposo son las citocinas clase I las que activan el correspondiente promotor (Simpson, et al. 2002).

El gen *CYP19*, es activo principalmente en células ováricas de la granulosa, y en humanos así como en varias especies unguladas (bovinos, cerdos, ovejas y cabras) también en el sistema nervioso, adrenal y placenta (Simpson, et al. 2002).

Recientemente hemos estado interesados en el estudio de aspectos endocrinos en la cabra doméstica con especial atención en los estrógenos. Se ha demostrado que en este pequeño rumiante se encuentran cantidades importantes de estrona en la etapa peripuberal, mientras que en la cabra adulta se detecta tanto estrona como estradiol (Pérez, et al. 1999). Por otra parte se ha estudiado la producción de andrógenos y estrógenos así como la regulación por gonadotropinas en folículos aislados del ovario de la cabra (Bobes, et al. 2003).

La cabra doméstica es una especie de gran importancia económica para México. Debido a su capacidad de adaptación a condiciones ambientales adversas, es un animal utilizado ampliamente para la obtención de carne y leche en diferentes Estados de la República. Esta especie está expuesta a la acción de diversos agentes infecciosos que afectan el buen funcionamiento del aparato reproductor, causando alteraciones como abortos y disminución de la tasa de

preñez entre otras (Ramón, 1997). Entre los factores involucrados en la muerte embrionaria se mencionan las disfunciones endocrinas, alteraciones en el ambiente uterino y endometritis (Thatcher, et al. 1994).

Simpson y colaboradores (2002) han usado la Transcriptasa Reversa (RT) y la reacción en cadena de polimerasa (PCR) para amplificar secuencias correspondientes a varios exones no traducidos de RNA extraídos de estos tejidos. Además, se han preparado bibliotecas de cDNA usando RNA de estos tejidos por el método de amplificación rápida de extremos de cDNA. La secuenciación de clones derivados de estas bibliotecas se han empleado para confirmar la presencia de secuencias correspondientes a exones no traducidos de los extremos 5' de transcripciones de P450 aromatasa (Simpson et al. 2002).

La aromatasa de la cabra ha sido clonada a partir de una biblioteca de cDNA de ovario (GenBank número de acceso AY14883) por Bobes y colaboradores (2004). Dado que se ha demostrado que la placenta transforma andrógenos a estrógenos, es posible entonces encontrar la expresión del mRNA de P450 aromatasa en este órgano. Asimismo debería encontrarse el mRNA de esta enzima desde las fases iniciales de la formación de la placenta con variaciones dependientes del período de gestación en que se obtenga. El objetivo del presente estudio fue estudiar la expresión de la P450 aromatasa en la placenta de la cabra a través de la gestación así como su distribución tisular por RT-PCR *in vitro* y RT-PCR *in situ*.

ASPECTOS DE LA FISIOLÓGIA REPRODUCTIVA DE LA CABRA DOMESTICA

Una de las limitantes más serias en la reproducción de la cabra es la estacionalidad reproductiva (Valencia, et al. 1986), es decir, que presenta actividad sexual durante temporadas específicas del año, por lo que se le clasifica desde el punto de vista reproductivo como una especie del tipo poliéstrica estacional (Valencia, et al 1990; Lindsay, 1991; Chemineau, et al. 2003); dicha característica funcional, está determinada por el número de horas-luz (fotoperiodo) que existe durante el día. En esta especie, la actividad ovárica con la consecuente manifestación del estro, se inicia cuando el número de horas-luz al día disminuye, lo que ocurre durante el otoño e invierno (Lindsay, 1991, Chemineau, et al. 2003).

Algunas poblaciones de cabras, principalmente las razas lecheras de climas templados, responden a cambios en el fotoperiodo presentando estacionalmente sus ciclos estrales cuando los periodos de luz son más cortos y los periodos de oscuridad más largas (Valencia, et al. 1986), mientras que rebaños de cabras criollas originarias de regiones tropicales, en particular de la Isla Guadalupe, evidencian una actividad sexual permanente a lo largo de todo el año, sin variación o con mínimas variaciones en la actividad sexual (Chemineau, et al. 2003). Las concepciones ocurren en todos los meses del año con periodos de mayor fertilidad, ligados a la disponibilidad de forraje (Chemineau, et al. 2003).

Sin embargo, en las zonas tropicales de México es posible encontrar tanto razas con actividad reproductiva estacional como continua. México se encuentra

localizado entre los 14 y 32° latitud Norte y posee una población caprina, constituida principalmente por animales criollos (Valencia, et al. 1986).

En México independientemente de su ubicación geográfica, la cabra criolla se reproduce durante una gran parte del año, su actividad se inicia en mayo y declina después de octubre; y en algunas zonas del país, como en el Estado de Sinaloa y de Guerrero, bajo clima tropical seco o subhúmedo, las cabras son capaces de concebir casi durante todo el año, existiendo una relación coincidente del inicio de la actividad reproductiva, con el inicio de la temporada de lluvias de verano. Dicha actividad precede a la disminución del fotoperiodo , y en ocasiones se hace más manifiesta esta prolongación de la actividad reproductiva hasta los meses de enero-febrero por su relación con la disponibilidad alimenticia, que es favorecida por la presentación de lluvias de invierno en los meses anteriores (Gamboa, 1986). En un estudio realizado por Valencia y colaboradores (1986) indican una clara influencia de la estación del año sobre la actividad reproductiva con un periodo de mayor actividad en los meses de junio a diciembre. Silva y colaboradores (1998), encontraron también que la estación reproductiva en la cabra inicia en junio, incluso antes del solsticio de verano. En el subtrópico mexicano, y en particular en la Comarca Lagunera (26° N), se observa una estacionalidad de los partos en las hembras locales mantenidas en condiciones extensivas, con un alto porcentaje de ellos entre noviembre y febrero, lo que indica que el inicio de la actividad sexual ocurre en junio (Delgadillo, et al. 2003).

La melatonina, que es una hormona producida por la glándula pineal en respuesta a las señales luminosas, ha sido utilizada para la inducción de actividad sexual, como también se ha hecho con modificaciones artificiales del fotoperiodo durante el anestro en cabras, obteniéndose resultados positivos (BonDurant, et al. 1981; Chemineau, et al. 1986). En ovejas, se ha reportado que para obtener un efecto estimulador, ya sea por la modificación del fotoperiodo y/o por la administración de melatonina, es necesario que el animal pase por un "periodo crítico" de exposición a días con un mayor número de horas luz, y es entonces, que se promueve una actividad ovárica, tanto durante la pubertad como en el anestro estacional, ya que incluso se puede retardar el inicio de la actividad reproductiva, si no se permite el desarrollo y/o reacomodo del ritmo circadiano sensible a la melatonina (Yellon y Foster, 1985; Nowak y Rodway, 1985). La actividad reproductiva de la cabra antes del solsticio de verano (cuando inicia la disminución del fotoperiodo), se ha relacionado a la existencia de un período "refractario" a los efectos de los días con más luz, como se reporta para la oveja (Valencia, et al. 1986; Chemineau, et al. 1986). De tal manera que el papel del fotoperiodo y el efecto de la nutrición en el control de la actividad reproductiva en la cabra, aun no se comprenden del todo.

CAMBIOS ENDOCRINOS ASOCIADOS A LA GESTACION DE LA CABRA

La gestación en esta especie tiene una duración promedio de 145 ± 4 días (Lindsay, 1991). La condición hormonal, especialmente la concentración de progesterona (P_4), es crítica para la gestación (Lindsay, 1991). La progesterona es esencial para la iniciación y mantenimiento de la preñez en los mamíferos. Sin embargo en la cabra, a diferencia de otras especies, la placenta no produce suficientes cantidades de P_4 , por lo tanto, esta especie es completamente dependiente de la progesterona lútea para el mantenimiento de la preñez (Lindsay, 1991; Smith and Sherman, 1994; Ford, et al. 1999; Jayasekara, et al. 2004). Por lo tanto, si se practica la ovariectomía en la cabra, en cualquier momento de la gestación, se produce el aborto (Lindsay, 1991). Se ha informado que en la cabra pigmea, una raza muy utilizada en investigación biomédica, ocurren cambios importantes en las concentraciones sistémicas de estrona, 17β -estradiol y 17α -estradiol durante la gestación. Los niveles plasmáticos de estrona se mantienen bajos entre los días 10 y 30 de gestación y registran un incremento significativo hasta el día 40, alcanzando valores máximos de 450 ± 60 ng/ml, en el día 120 de la gestación. Los niveles séricos de 17β -estradiol, son sumamente bajos del día 10 al día 60 de la gestación. El primer aumento significativo en los niveles plasmáticos de 17β -estradiol, ocurre en el día 60 de la gestación. Se incrementan luego notoriamente hasta alcanzar valores máximos de 32 ± 9 pg/ml, y en el día 140 comienzan a decaer, poco antes del parto (Dhindsa, et al. 1981).

EMBRIOLOGIA

La fusión de un gameto femenino con otro masculino da lugar a la formación de un *cigoto*. Tras divisiones repetidas durante su transporte a lo largo de la trompa uterina a la cavidad uterina, se transforma en una vesícula llena de fluido, *el blastocisto*, con una pared de epitelio simple, *el trofoblasto* y una *masa celular interna* localizada excéntricamente. El blastocisto de vida independiente es nutrido por la secreción de las glándulas endometriales (leche uterina). Debido a las demandas cada vez mayores del embrión en desarrollo se hace necesario un mecanismo nutritivo más eficiente, es decir, un sistema de transporte vascular, para lo cual el embrión produce membranas en un proceso denominado *implantación* que lo fija gradualmente al epitelio endometrial y con ello se establece una estrecha relación entre los sistemas circulatorios, fetal y materno necesarios para los cambios fisiológicos. Como resultado, se forma un órgano combinado, la *placenta fetal* y la *placenta uterina*. El feto y la placenta fetal juntas se conocen como el *conceptus*. El proceso de formación y fijación de la placenta se denomina *placentación* (Dellmann, 1994).

La implantación en rumiantes se considera como no invasiva, es decir, hay una fuerte unión entre las membranas embrionarias y el endometrio formado por carúnculas. La placenta se establece a las 5 semanas en bovinos y a las 3 semanas en ovinos (Hafez, 2002).

PLACENTA

La placenta es un órgano multifacético que es directamente responsable de mediar y (o) modular el ambiente materno necesario para el desarrollo normal del feto (Anthony, et al. 1995).

La placenta realiza varias funciones importantes durante la gestación: fija físicamente el feto al útero; transporta nutrientes de la circulación materna al feto; interviene en el proceso de respiración; excreta metabolitos fetales en el compartimiento materno; tiene un papel inmunomodulador en la aceptación materna del feto; y produce hormonas que regulan órganos maternos y fetales (Strauss, et al. 1996).

Una característica peculiar del desarrollo temprano de los mamíferos es el aporte de nutrimentos del organismo materno a través de la placenta. La placenta es una aposición o fusión de las membranas fetales al endometrio que permiten el intercambio fisiológico entre el feto y la madre; difiere de otros órganos en muchos aspectos. Se origina como resultado de diversos grados de interacción materno-fetal y se comunica con el embrión por medio de un cordón de vasos sanguíneos. Sus funciones y tamaño cambian continuamente durante la preñez hasta que finalmente es expulsada. Para el feto, la placenta combina en un solo órgano muchas actividades funcionales que son independientes en el adulto (Hafez, 2002).

PLACENTACION EN RUMIANTES

Los rumiantes comprenden un gran grupo de herbívoros que incluyen a especies domésticas como son bovinos, ovejas, cabras, entre otros. Todos estos animales, tienen placenta cotiledonaria. Ciertamente otros animales como el camello pueden ser considerados rumiantes, pero este animal tiene placenta difusa similar a lo que se ha visto en caballos (Hafez, 2002).

CLASIFICACION DE LA PLACENTA

La placenta tiene una gran diversidad estructural en las diferentes especies. Estas variaciones dan lugar a muchos sistemas distintos de clasificación; sin embargo, se pueden utilizar tres principios generales para describir estas peculiaridades: (1) origen vascular, (2) relación feto-materna y (3) clasificación morfológica (Dellmann, 1994).

Origen vascular.

Los rumiantes tienen un tipo de placenta corioalantoidea. En ésta, puede producirse una vascularización más amplia mediante los vasos alantoideos. Cuando el alantoides se fusiona con el corion se forma el *alantocorion*, resultando la placenta corioalantoidea. Este órgano es más eficaz para llevar a cabo los intercambios fisiológicos entre la madre y el feto (Dellmann, 1994).

Relación feto-materna

El grado en que las membranas fetales se unen al endometrio determina la cantidad de tejido uterino que se pierde durante el parto. En atención a esto se reconocen dos tipos diferentes de placentación alantoidea, la adecidua y la decidua. En el primer tipo, los componentes fetales se entrelazan con el tejido uterino relativamente intacto, del cual se pueden separar sin mucho quebranto (ungulados). En la placenta decidua, parte del estroma endometrial se expulsa con las membranas fetales después del parto. Las células deciduales son grandes, redondeadas y poliédricas, derivan de los fibroblastos del endometrio (carnívoros) (Dellmann, 1994).

Clasificación morfológica

Estructura microscópica

Una manera de clasificar a las placentas está dada por el número de capas que separan el suministro de sangre fetal y materna (Figura 1). Así los principales tipos de placentas se pueden caracterizar como epiteliocorial (tres capas maternas y tres capas fetales), endoteliocorial (una capa materna y tres capas fetales), hemocorial (sin capas maternas y tres capas fetales) (Steven, 1975; Carter and Enders, 2004).

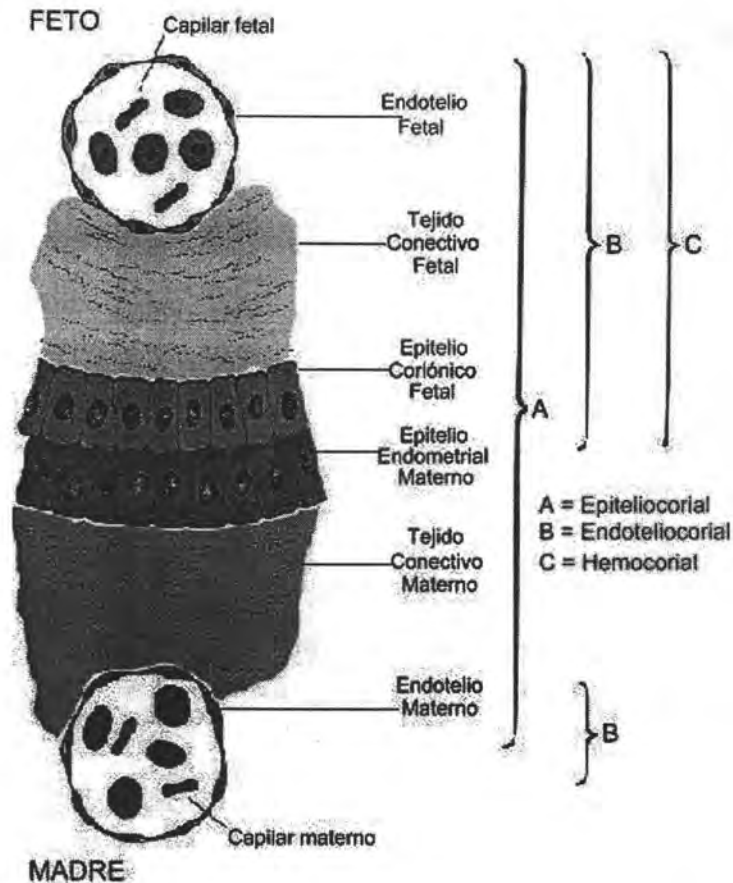


Figura 1. Existen seis capas de células fetales y células maternas que pueden estar en contacto con la sangre. *Epiteliocorial* (6-capas), estas placentas son comunes en cerdos, bovinos, caballos, oveja y cabra. *Endoteliocorial* (4 capas), este tipo de placentas se encuentran con frecuencia en perros, gatos y hurones. La placenta *Hemocorial* (donde la sangre está en contacto directo con el corion fetal) se presenta en humanos, ratas y ratones (Renfree, 1982).

Estructura macroscópica

Un esquema de clasificación se basa en la estructura macroscópica de los sitios donde ocurre la fijación entre el embrión y el endometrio del útero. La forma definitiva de la placenta está determinada por la distribución de las vellosidades en la superficie coriónica (Hafez, 2002). Estas ahora se denominan placentas difusas, cotiledonarias, zonarias y discoidales (Figura 2).

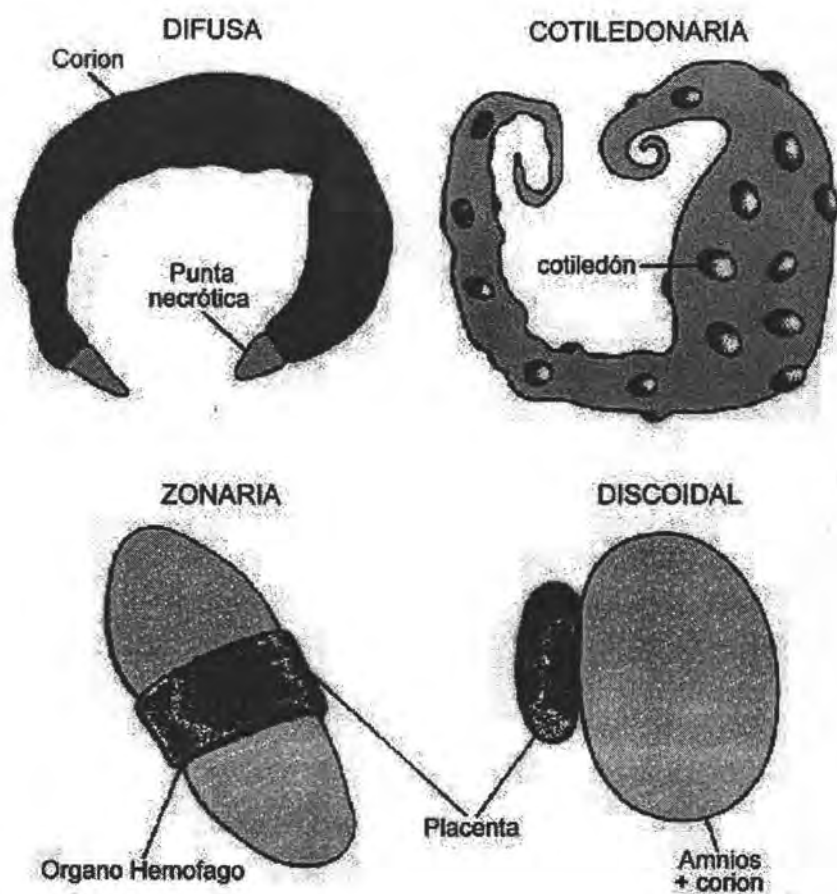


Figura 2. Estructura Macroscópica de las placentas (Renfree, 1982).

Las placentas difusas, están presentes en caballos, cerdos, camellos, lémures, zarigüeyas, canguros, y ballenas. La mayor parte del saco coriónico forma el corion frondoso unido al epitelio endometrial.

Las placentas cotiledonarias, son comunes en los ungulados tales como vacas, venado, cabra, oveja, entre otras; las vellosidades están ubicadas en parches circulares llamados cotiledones. El cotiledón fetal se encuentra unido con regiones maternas llamadas carúnculas para formar el placentoma (cotiledón y carúncula juntos) donde suceden los intercambios materno-fetales (Figura 3).



Figura 3. Placentación de tipo cotiledonaria

En la placenta zonaria, que es característica de los carnívoros, las vellosidades coriónicas ocupan una banda en forma de cinturón que rodea el centro del corion. Tales zonas pueden ser círculos completos (perros y gatos) o incompletos (osos).

La placenta discoidea se ve en humanos, ratones, insectívoros, conejos, ratas y monos. En tales placentas, el corion frondoso forma un área de fusión en forma de disco.

BIOSÍNTESIS DE ESTRÓGENOS

La biosíntesis de estrógenos C18 (estrone (E1), estradiol (E2)) desde esteroides C19 (androstenediona, testosterona) se cataliza por un miembro microsomal de la superfamilia del P450, llamado P450 aromatasa (P450arom, producto del gen *CYP19*) y enzima terminal en la biosíntesis de estrógenos, que está exclusivamente presente en las células productoras de estrógenos (Toda, et al. 1994; Yamada, et al.1995; Jeffery, et al.1997; Kamat, et al. 1999; Graddy, et al. 2000; Simpson, et al 2002, Agarwal, et al. 2005). La superfamilia del gen P450 es muy grande, conteniendo (a partir de 1996) más de 480 miembros en 74 familias de la cual la P450arom es el único miembro de familia 19 (Simpson, et al. 2002).

La aromatasa, es una enzima compleja del retículo endoplásmico (Kamat, et al. 1998). Esta hemoproteína es responsable de ligar el sustrato C19 esteroide androgénico y catalizar una serie de reacciones que llevan a la fenolización del anillo A característico de los estrógenos (Simpson, et al 2002). La reacción emplea 3 moléculas de oxígeno y 3 moléculas de NADPH para cada molécula del sustrato esteroide metabolizado (Figura 4).

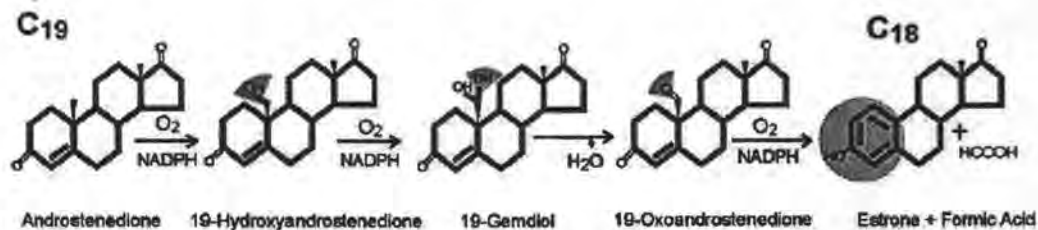


Figura 4. *CYP19* puede utilizar Androstenediona o testosterona como sustrato para la producción de Estrone o estradiol respectivamente. La reacción requiere tres moléculas de oxígeno y tres moléculas de NADPH (Payne and Hales, 2004)

Estas moléculas de oxígeno se utilizan para oxidar el grupo metilo C19 angular y transformarlo a ácido fórmico, lo cual ocurre simultáneamente con la aromatización del anillo A característico de los estrógenos. La reducción para esta reacción vía NADPH se proporciona por una flavoproteína microsomal ubicua conocida como NADPH- P450 reductasa (Figura 5) (Simpson, et al. 1994; Jeffery, et al.1997; Kamat, et al. 1999, Simpson, et al. 2002).

El *CYP19* humano es un gen de copia única que está compuesto de 10 exones; el exón II-X codifica la proteína aromatasa y la región 3' no traducida del mRNA de todos los tejidos productores de estrógenos. Por otro lado, alternativamente los exones primarios codifican regiones únicas 5' no traducidas de mRNA *CYP19* que se expresan en tejidos diferentes (Simpson, et al. 1994; Agarwal, et al. 1997).

Por consiguiente, las transcripciones del mRNA *CYP19* en el ovario, tejido adiposo y placenta contienen diferentes exones primarios que se unen alternativamente hacia un sitio común único río arriba del codón de inicio de traducción en el exón II (Figura 6). Se postula que la expresión del gen *CYP19* en estos tejidos se maneja por promotores tejido-específicos río arriba de estos exones. Por ejemplo, la región 5' no traducida de transcripciones de mRNA de *CYP19* en el tejido ovárico, es codificada por un exón primario ovario-específico inmediatamente río arriba del exón II (Toda, et al.1994; Kamat, et al. 1999; Furbass, et al. 2001).

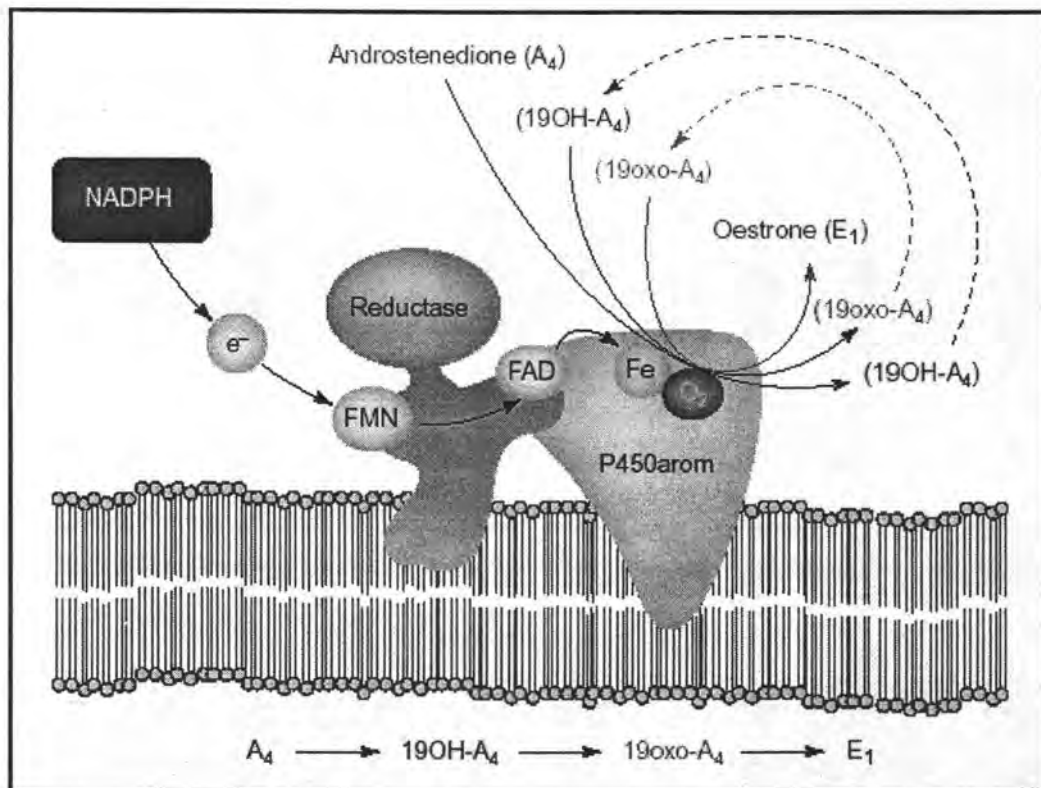


Figura 5. Diagrama esquemático de la membrana microsomal que ancla el complejo de la enzima aromatasa, que consiste en el citocromo P450 aromatasa (P450arom) y la reducción del NADPH citocromo P450 oxidoreductasa (reductasa). Se indican la flavina de los grupos protésicos de la reductasa, flavin adenin dinucleótido (FAD) y flavin mononucleótido (FMN). Se muestra también la reducción equivalente de electrones (e^-) desde nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH), junto con el hierro (Fe) del grupo hemo y oxígeno (O_2), en la unión - sustrato de P450arom. Nótese que se requieren tres ciclos oxidativos para convertir los sustratos C19, en este caso androstenediona (A_4), a sus intermediarios 19 OH- y 19oxo- ($19OH-A_4$ y $19oxo-A_4$) para la síntesis final de estrógenos. Aunque estos intermediarios se muestran en paréntesis, indican sólo la apariencia transitoria, en muchos casos éstos pueden escapar del metabolismo y llegar a ser productos de reacción adicionales (Conley and Hinshelwood. 2001).

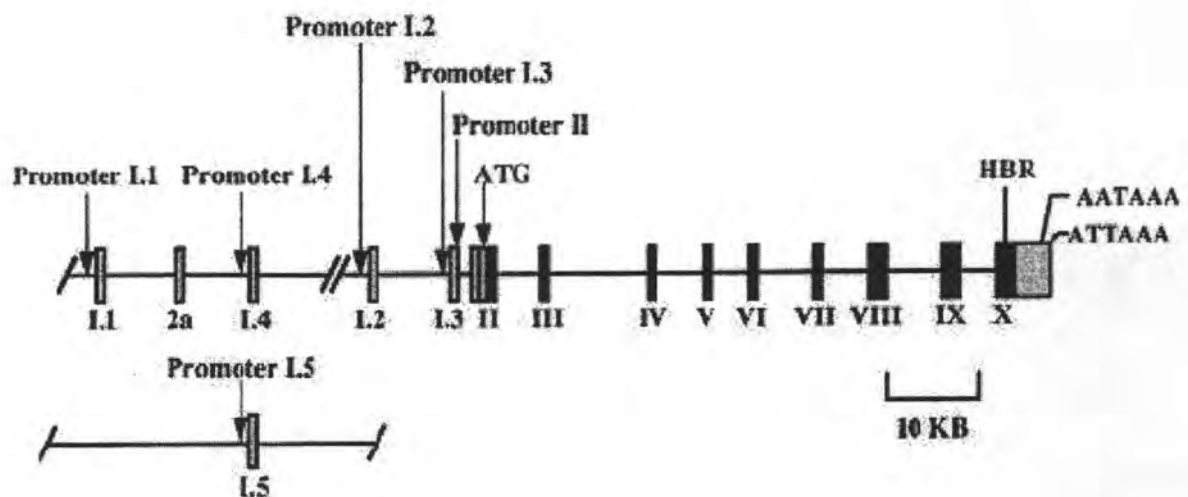


Figura 6. Representación esquemática del gen *CYP19* de humano. Las barras negras representan las secuencias que transcriben. Las barras en blanco representan los cinco exones que no se transcriben. HBR es en el exón 10 la región de unión del grupo hemo. Promotor I.1 se expresa en placenta. Promotor II se expresa en ovario y tejido adiposo. Promotor I.4 se expresa en tejido adiposo (Simpson, et al. 1997).

En estudios anteriores se ha demostrado en tejidos humanos adultos y en placenta humana, que la expresión del gen *CYP19* es regulada en parte, por medio de promotores tejido-específicos a través del uso de mecanismos alternativos (Fürbass, et al. 2001).

Aunque el gen que codifica la aromatasa en los humanos es un solo miembro de la familia *CYP19*, en otras especies de mamíferos se han identificado numerosos exones primarios unidos, sitios o locus múltiples de *CYP19* e isoformas, cada uno con un diferente promotor tejido-específico y un programa de desarrollo. Así la placenta bovina transcribe pero no traduce un pseudogen de aromatasa que consiste en sucesiones altamente homólogas para varios exones de aromatasa bovina funcional, pero se mantiene como un elemento repetitivo conservado (Brunner, et al. 1998; Vanselow, et al. 1999). Como el gen humano, el gen bovino también contiene un primer exón no traducido tejido específico. El genoma ovino también parece contener un gen *CYP19* funcional y un pseudogen (Brunner, et al. 1998; Vanselow, et al. 1999). Interesantemente, se ha presentado evidencia de que en el genoma porcino, las múltiples transcripciones de la aromatasa son productos de tres genes distintos (parálogos). Es decir, se presenta como tres isoformas distintas, así la isoforma tipo I se expresa predominantemente en el ovario, la tipo II se expresa en el endometrio y en la placenta en gestación mediana y tardía. Adicionalmente en el periodo de peri-implantación porcina se sintetizan niveles altos de estrógeno que son

consecuencia de los altos niveles de expresión de otra forma de aromatasa dentro del tejido denominada isoforma tipo III, con presuntas diferencias en la especificidad del sustrato, niveles de expresión, actividad y modo de regulación.

Se ha demostrado que esta última isoforma cataliza la formación de norandrógenos 19 (Graddy, et al. 2000). La vía de evolución molecular que ha dado lugar a esta complejidad de isoformas y uniones alternativas está lejos de aclararse, pero es evidente que las distintas especies han escogido diferentes rutas para lograr la regulación tejido-específica en la biosíntesis de estrógenos (Yamada, et al. 1995; Graddy, et al. 2000; Simpson, et al. 2002).

P450 PLACENTARIA

Durante el desarrollo fetal, la glándula adrenal fetal produce grandes cantidades de dehidroepiandrosterona (DHEA) y dehidroepiandrosterona sulfatada (DHEAS), las cuales sirven como precursores estrogénicos placentarios durante la gestación (Figura 5) (Simpson, et al. 1994; Yamada, et al. 1995; Dharia, et al. 2004). En el humano la DHEAS de origen materno y fetal contribuyen a la formación de estrona y estradiol mientras que el sulfato de 16α -hidroxidehidroepiandrosterona (16α -OH-DHEAS) proporcionado por el feto contribuye con más del 90% de la síntesis de estriol placentario (Ugele, et al. 2002).

La placenta es el sitio primario de síntesis de estrógenos durante la preñez (Yamada, et al. 1995). Tiene una notable capacidad de aromatizar los C19 esteroides secretados por las adrenales fetales, y después de la novena semana de gestación en el humano, la placenta proporciona la fuente primaria de estrógenos circulantes (Figura 7) (Kamat, et al. 1998; Kao, et al., 2000; Ugele, et al. 2002).

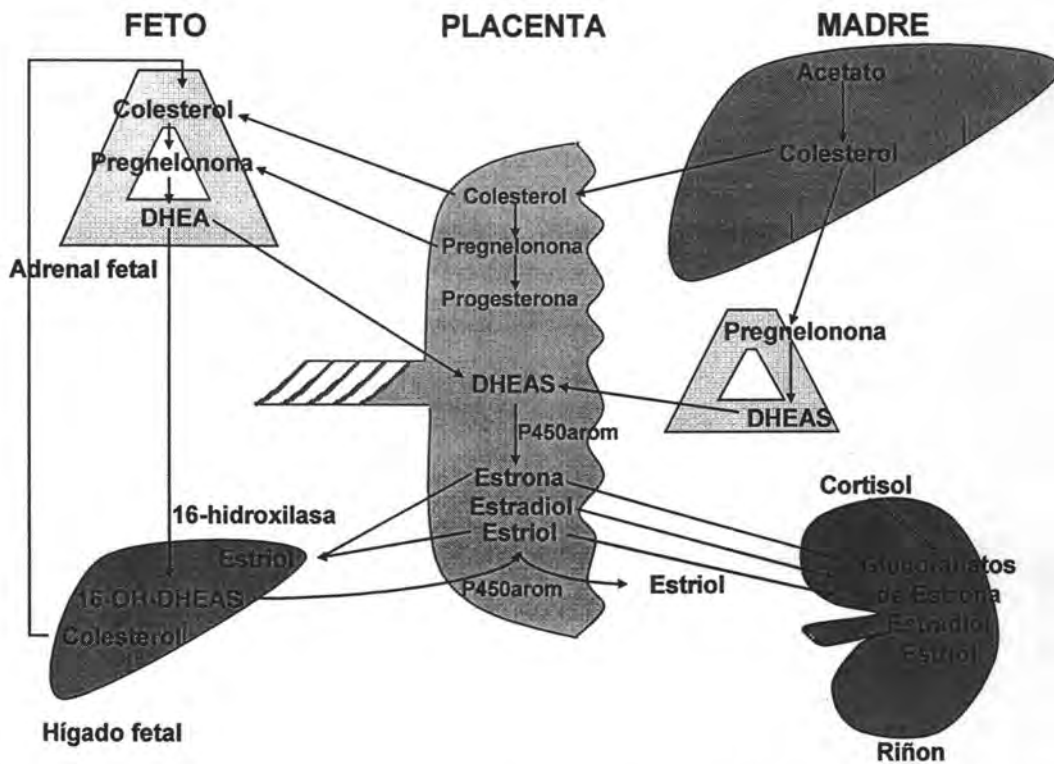


Figura 7. La esteroidogénesis placentaria se debe a la cooperación entre la placenta, el hígado fetal y la suprarrenal fetal (Botella, 2003)

El mRNA de la aromatasa humana expresado en la placenta tiene un solo exón I no traducido, el cual se designa como exón 1a o I-1 (Mahendroo et al. 1991). Este tipo de mRNA de aromatasa sólo se detecta en la placenta y en células en cultivo de origen trofoblástico. Aunque los cDNA contienen otros tipos de regiones 5' no traducidas, el extremo 5' del exón 1a es el sitio de iniciación mayor en la placenta. Un coriocarcinoma de la línea celular JEG-3 expresa mRNA del tipo aromatasa placentaria. Esta línea celular expresa aromatasa en condiciones de no estimulación así como en respuesta a ésteres de forbol y varios reactivos que aumentan los niveles intracelulares de cAMP. La actividad de la aromatasa en las células se relaciona estrechamente con el contenido de mRNA de aromatasa que es muy lábil, mientras que el control transcripcional es el principal punto regulador para la actividad de la enzima. Así, esta línea celular parece proporcionar un buen sistema para investigar la regulación transcripcional de la aromatasa de tipo placentario (Yamada, et al. 1995).

El rápido crecimiento de la placenta durante el primer trimestre de gestación se debe a la multiplicación de células citotrofoblásticas mononucleares que se asientan sobre una membrana basal (Kamat, et al. 1998; Jiang, et al. 2000). Cuando estas células maduran, se dejan de dividir, se fusionan y se dispersan para formar la capa del sincitiotrofoblasto el cual tiene numerosas funciones secretoras y de transporte. La diferenciación del sincitiotrofoblasto trae consigo la generación de una cascada de signos reguladores que producen la expresión de genes que codifican hormonas polipeptídicas diferentes y enzimas que

metabolizan esteroides. Sin embargo, no se conocen todos los eventos moleculares que promueven y mantienen la diferenciación del sincitiotrofoblasto y culminan en la expresión de varios genes, incluyendo a la P450aromatasa (Kamat, et al. 1998).

La expresión placentaria de aromatasa se maneja por un poderoso promotor placentario Pl.1 río arriba del exón I.1 no traducido, el cual se localiza a una distancia de 89 Kb del sitio de inicio de traducción. Empleando varias delecciones mutacionales de la región flanqueadora río arriba del exón I.1, varios grupos han examinado secuencias reguladoras putativas dentro de esta región, así como las proteínas que actúan recíprocamente con estas secuencias para regular la expresión de la aromatasa en las células del coriocarcinoma. Toda y colaboradores (1992) identificaron un factor C/EPB- β (CCAAT/Enhancer Binding Protein- β) localizado entre -2141 y -2115 pb relacionado con el comienzo de la transcripción en el exón I.1.

Sun y colaboradores (citado por Simpson et al 2002) identificaron una secuencia palindrómica imperfecta, 5'- AGGTCATGCCCC-3', localizada entre -183 y -172 pb que es la responsable del estímulo de expresión de la aromatasa por los ácidos retinoicos. Esta secuencia parece ligar un heterodímero compuesto de RXR (Retinoid X Receptor) y VDR (Vitamin D Receptor). A su vez, se reportó que los niveles de expresión de receptores RXR y RAR (Retinoic Acid Receptors) aumentan durante el proceso de diferenciación citotrofoblástica en los sincitiotrofoblastos de la placenta. Esto coincide con el aumento en la expresión de

la aromatasa. Estos resultados sugieren que los retinoides juegan un papel importante en la regulación del desarrollo de la expresión del gen aromatasa en la placenta. Recientemente, se mostró que la inactivación del gen PPAR γ (Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ) es letal para el embrión y esto se debe al fracaso del desarrollo del trofoblasto. Este factor funciona como un heterodímero con RXR, por lo que es posible que PPAR γ también pueda estar implicado en la expresión de aromatasa en la placenta (Simpson et al. 2002). El grupo de Mendelson identificó una secuencia de -42 a -125 pb del promotor I.1 río arriba del sitio de inicio transcripcional. Este sitio liga el factor Mash-2 (Mammalian Achaete-Scute Homologous Protein-2) el cual es un factor de transcripción inducido por hipoxia utilizado para inhibir la expresión de la aromatasa en cultivos de células sincitiotrofoblásticas humanas. Así, los sitios múltiples en la región genómica río arriba del exón I.1 parecen requerirse en la regulación de la expresión de la aromatasa placentaria en humanos, actuando en algunos casos como estimulantes y en otros como inhibidores (Simpson, et al 2002).

JUSTIFICACIÓN

Varias especies unguladas, como los bovinos, cerdos y ovejas expresan aromatasa. El gen de la aromatasa de estas especies utiliza una variedad de promotores que permiten una diferente expresión en distintos tejidos. Aunque la actividad enzimática correspondiente a aromatasa se ha encontrado en ovario y placenta de cabra, la biología molecular de esta enzima ha sido poco estudiada en esta especie. Romano y colaboradores (Bobes, et al, 2004) han clonado la aromatasa a partir del ovario de cabra. Sin embargo, no se ha reportado la expresión del mRNA del gen de la aromatasa (*CYP19*) en la placenta de la cabra durante la gestación. La identificación de la expresión del gen *CYP19* durante el desarrollo de la placenta en las cabras puede contribuir a una mejor comprensión del control de la gestación a nivel molecular, y eventualmente a mejorar el funcionamiento reproductivo en esta y otras especies domésticas como ovinos y bovinos.

HIPÓTESIS

1.- Dado que se ha demostrado que la placenta de la cabra transforma andrógenos a estrógenos en las fases finales de la gestación, es posible encontrar la expresión del mRNA de P450 aromatasa *in vitro* e *in situ* en las fases finales de la gestación, así como desde las fases iniciales de la formación de la placenta.

2.- La expresión *in situ* de la P-450 aromatasa en la placenta varía en los diferentes estadios de la gestación.

OBJETIVOS

Objetivo general

Estudiar la expresión y distribución tisular de la P450 aromatasa en la placenta de la cabra a lo largo de la gestación.

Objetivo particular

Detectar mediante RT-PCR *in vitro* la expresión de la P450 aromatasa en la placenta de la cabra, así como su distribución tisular por RT-PCR *in situ* a lo largo de la gestación.

MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención y clasificación de las placentas.

Para el estudio de la placenta en diferentes estadios de la gestación se obtuvieron úteros completos de cabras criollas adultas gestantes provenientes de los estados de Oaxaca, Guerrero y Puebla, y sacrificadas en el Rastro "La Hacienda" en Tehuacán Puebla, donde se disecaron los úteros para obtener las placentas y tejidos periplacentarios.

La edad del feto se calculó de acuerdo con el método descrito previamente por Ritcher y Götze en 1960 (Valencia, et al. 1986) (Tabla 1).

EDAD GESTACIONAL (Longitud de la nuca a la base de la cola)	
FINAL DEL PRIMER MES (30 días aprox.)	4-8 cm.
2 MESES (31 a 60 días)	12-16 cm.
3 MESES (61 a 90 días)	17-24 cm.
4 MESES (91 a 120 días)	25-30 cm.
5 MESES (a término) (121 a 150 días)	40-50 cm.

Tabla 1. Determinación de la edad gestacional de la cabra tomando en cuenta la longitud de la nuca a la base de la cola.

Se tomaron aleatoriamente cabras de cada mes de la gestación para su análisis por RT-PCR *in vitro* e *in situ* (Tabla 2).

Clasificación	Sexo Cría	Tamaño del producto (cm)	Edad Gestacional. (Aproximada)
5	M, H	5	Final del 1 mes (30 días)
+13	H	9	Final del 1 mes (30 días)
+31	M, M	4, 3.5	Final del 1 mes (30 días)
3	H	12	2 meses (31-60 días)
22	M	11	2 mes (31-60 días)
+2	M	10	2 meses (31-60 días)
+5	M, M	11	2 meses (31-60 días)
16	H	23	3 meses (61-90 días)
+30	M, M	23	3 meses (61-90 días)
20	H	29	4 meses (91-120 días)
+26	M	30	4 meses (91-120 días)
8	M	38	5 meses (120-150 días)
+15	M	43	5 meses (120-150 días)

Tabla 2. Cabras seleccionadas aleatoriamente para el estudio, indicando la clasificación, el tamaño del producto y edad gestacional aproximada. M: Macho, H: Hembra.

Las placentas a término, se obtuvieron durante el proceso del parto de las cabras en el Centro de Enseñanza Práctica e Investigación en Producción y Salud Animal de la UNAM, dentro de los primeros minutos posteriores a la expulsión del último producto (posparto inmediato). Las cabras utilizadas en el estudio fueron la 039, 058 y 068. Cabe señalar que todas las muestras utilizadas dentro de este estudio fueron tratadas por duplicado.

Las placentas se obtuvieron en condiciones de asepsia. Los cotiledones (porción fetal) de los animales sacrificados en el rastro fueron desprendidos de las carúnculas (porción materna) y se colocaron en tubos para centrifuga de 15ml, congelándolos inmediatamente en nitrógeno líquido. Las placentas de las cabras en posparto inmediato, fueron obtenidas en los primeros minutos después de la expulsión del producto y al igual que las muestras anteriormente descritas, fueron colocadas en tubos para centrifuga y congeladas en nitrógeno líquido para posteriormente trasladarlas al laboratorio para proceder luego con la extracción de RNA total y realizar el análisis de la expresión *in vitro* del gen de aromatasa. Muestras similares de estas mismas placentas (no mayores de 1 cm³ por 1 cm³) fueron fijadas en paraformaldehído al 4% y transportadas en hielo para someterlas luego a un proceso de deshidratación en alcoholes a diferentes diluciones y finalizando con la inclusión en parafina para el tratamiento y análisis por RT-PCR *in situ*.

RT-PCR *in vitro*

Extracción de RNA total

La obtención del RNA total de las placentas se realizó por el método de Trizol, de acuerdo a las instrucciones del fabricante (Invitrogen, USA), como se describe a continuación:

Se homogenizó el tejido en un homogenizador tisular (Politrón) a una relación de 1 ml de Trizol por cada 100 mg de tejido a temperatura de -4° , y se colocó en tubos para microcentrifuga. A cada uno de los tubos se le agregaron 200 μ l de cloroformo (almacenado a -20°C) por cada ml de Trizol, se agitó vigorosamente de forma manual y después con un agitador automático (Vortex) hasta obtener un color rosa uniforme y se incubó a 4°C . Posteriormente se centrifugó a 13,000 rpm a 4°C . La fase inferior (orgánica) contiene proteínas, la interfase contiene el DNA y la superior es la fase acuosa (60% del volumen de Trizol, la cual contiene el RNA total). Se tomó la fase acuosa y se colocó en un tubo nuevo, se agregó un volumen de isopropanol por cada ml de Trizol, se mezcló suavemente; se incubó a temperatura ambiente, posteriormente se centrifugó a 13,000 rpm a 4°C . La pastilla (RNA total) se lavó con 1 ml de etanol al 80% preparado con agua tratada con dietilpirocarbonato (DEPC) y se almacenó a -20°C , se agitó con Vortex para resuspender la pastilla, se centrifugó a no más de 9,000 rpm a 4°C , se repitió el lavado, se decantó en un solo paso y se dejó secar, finalmente se resuspendió en 100 μ l de agua DEPC calentando a 60°C

y se almacenó a -20°C . Posteriormente se cuantificó el RNA obtenido a una lectura de 260/280 a una dilución 1 en 200 en un espectrofotómetro (BECKMAN, USA)

Para visualizar el RNA obtenido se realizó una electroforesis en gel de agarosa (BIO-RAD Laboratories, USA) al 1.8% en buffer tris-acetato (TAE) y ácido etilen-diamino-tetra-acético (EDTA), teñido con bromuro de etidio, y visualizándose en un transiluminador de luz UV. La imagen fue obtenida con una cámara GeneCam (SynGene, USA).

Síntesis del cDNA: Reacción de la transcriptasa reversa (RT)

Partiendo del RNA total extraído de las placentas se tomó un volumen de muestra equivalente a 5 μg de RNA, al cual se le agregó 1 μl de oligonucleótido de timina (oligodT, 0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) y agua tratada con DEPC al 0.1% para tener un volumen final de 12 μl , se incubó a 70°C e inmediatamente se incubó en hielo. Se agregaron 4 μl de buffer 5X (Tris-HCl 250 mM, KCl 375 mM y MgCl_2 15mM), 2 μl de ditioneitol (DTT, 0.1mM), 1 μl de deoxinucleótidos tri-fosfatados: dATP, dGTP, dCTP y dTTP (dNTP's, 0.2 mM); 1 μl de Inhibidor de ribonucleasas (RNase Inhibitor Cloned, 10 U/ μl) y se incubó a 42°C . Finalmente se agregó 1 μl de la enzima transcriptasa reversa, "SuperScript™ II Rnase H" (200 U/ μl) y se dejó actuar a 42°C , posteriormente se incubó a 70°C y se almacenó el cDNA a -20°C .

Cabe señalar que los reactivos utilizados fueron obtenidos de la casa comercial Invitrogen, USA. La metodología es la recomendada por el fabricante.

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Se prepararon tubos con un volumen final de reacción de 50 μ l, los cuales contenían: 39 μ l de agua ultrapura, 2.5 μ l de Cloruro de Magnesio ($MgCl_2$, 2mM). La secuencia de oligonucleótidos específicos para P450 aromatasa se obtuvieron a partir de la secuencia de aromatasa de cabra descrita por Bobes y colaboradores (2004), 1 μ l del oligo sentido (5'GGC ATC ATA TTT AAC AAT AAT CCA GCA 3'), 1 μ l de oligo antisentido (3'CAG ACA TGG TGT CTG GCG CTG CGA TCA 5'). La expresión de actina se usó como control positivo de expresión con los siguientes oligonucleótidos obtenidos de la secuencia de actina humana: sentido (5'CCA AGG CCA ACC GCG AGA AGA TGA C 3'); antisentido (3'AGG GTA CAT GGT GGT GCC GCC AGA C 5'), 5 μ l de Buffer 10x (Tris-HCl 200 mM y KCl 500 mM), 1 μ l dNTP's (0.2 mM) y 0.2 μ l de la enzima Taq DNA polimerasa (5U/ μ l) (Sambrook, 1989).

Las condiciones de amplificación para cada par de oligonucleótidos se mencionan en la Tabla 3.

Gen	Predesnatura- lización	Desnatura- lización	Alineamiento (T _m)	Síntesis	Extensión	Ciclos	Cita
B-actina	94°C / 3min	94°C / 30 seg.	60°C / 30 seg.	72°C / 30 seg.	72°C / 10min	30	Ace y Okulicz, 1995
P450arom	94°C / 3min	94°C / 30 seg.	60°C / 30 seg.	72°C / 30 seg.	72°C / 10min	30	Bobes et al. 2004

Tabla 3. Condiciones de amplificación para cada par de oligonucleótidos

Para visualizar los productos del RT-PCR correspondientes a la expresión de dichos genes, se realizaron electroforesis en geles de agarosa (BIO-RAD, Laboratories, USA) al 3% en TAE, los geles fueron teñidos con bromuro de etidio y visualizados en un transiluminador de luz UV. En cada corrida se incluyó un marcador de peso molecular en escalera de 100 pares de bases (Invitrogen, USA). Los geles fueron analizados utilizando una cámara digital (GeneCam, Syngene, USA).

RT-PCR *in situ*

Obtención y tratamiento de las muestras

Se obtuvieron placentas de cabras en diferentes estadios de la gestación, así como placentas de cabras que se encontraban en el posparto inmediato, especialmente de la región carúncula-cotiledón (materno-fetal). Estas muestras se fijaron en paraformaldehído al 4%, se deshidrataron en alcoholes a diferentes diluciones y posteriormente se incluyeron en parafina. A partir de estos bloques se realizaron cortes de 5 micras y se fijaron en portaobjetos para su posterior tratamiento y análisis por RT-PCR *in situ*.

RT *in situ* (Síntesis del cDNA)

Se desparafinaron los tejidos en un horno (entre 65- 70°C) y se colocaron dentro de una cámara con Xilol, seguida de una cámara con etanol absoluto y se

PCR *in situ* (Amplificación)

Se utilizó el sistema GeneAmp *In situ* PCR 1000 (Perkin Elmer Applied Biosystems, USA). Se Agregó a cada tejido 50µl de la reacción PCR (H₂O, Buffer, oligo sentido y oligo antisentido de la secuencia de aromatasa clonada en el laboratorio, DIG (PCR DIG, Roche, USA), MgCl₂ y finalmente se agregó la enzima Taq DNA polimerasa (Taq DNA Polymerase Recombinant, Invitrogen USA). Se cubrió cada tejido con la mezcla de reacción para PCR, se sellaron con los AmpliCover discs (Applied Biosystems, USA) y se introdujeron las laminillas en el GenAmp *In situ* PCR System 1000 iniciándose el programa convenido para la amplificación del producto.

Detección de la señal

Posteriormente se realizó un lavado con PBS 1X, pH 7.4 después se bloquearon las muestras con una solución de Tris 1M, pH 7.4, NaCl 4M, BSA (Serum Bovine Albumina, Sigma, USA) y H₂O bidestilada y después se incubaron con el anticuerpo anti-digoxigenina (Anti- DIG, Roche, USA) acoplado a fosfatasa alcalina en presencia de H₂O bidestilada, Tris 1M pH 7.4, y NaCl 4M. Después, las muestras se lavaron con H₂O bidestilada, NaCl 4M, Tris 1M pH 7.4 y Tween 20 (Aldrión, USA) y, posteriormente se cubrieron con el Buffer de detección (H₂O bidestilada, Tris 1M, pH 9.5, MgCl₂ 250mM y NaCl 4M).

El desarrollo de color azul-morado se logró incubando las muestras con el substrato NBT/BCIP ("Nitro blue tetrazolium/5-bromo, 4-chloro, 3-indoly-

phosphate”). Se detuvo la reacción realizando 5 lavados con H₂O bidestilada y después se dejaron secar. Finalmente, se montaron con medio de montaje no acuoso para su posterior análisis por microscopía de luz.

RESULTADOS

Detección de aromatasa

Los resultados de expresión de aromatasa *in vitro* obtenidos indican que durante las fases tempranas de la gestación (2 meses) no es posible detectar la enzima con esta técnica (Figura 1).

En cambio, se encontró expresión de aromatasa en placentas de cabras de 4 meses (90-120 días) de gestación (Figura 1).

También se pudo identificar expresión de aromatasa en placentas de cabras próximas al parto, que se encontraban en el quinto mes (120-150 días) de la gestación (Figura 2).

Por último, se encontró una importante expresión de P450 aromatasa en placentas de cabras obtenidas en el posparto inmediato (Figura 2).

phosphate”). Se detuvo la reacción realizando 5 lavados con H₂O bidestilada y después se dejaron secar. Finalmente, se montaron con medio de montaje no acuoso para su posterior análisis por microscopía de luz.

RESULTADOS

Detección de aromatasa

Los resultados de expresión de aromatasa *in vitro* obtenidos indican que durante las fases tempranas de la gestación (2 meses) no es posible detectar la enzima con esta técnica (Figura 1).

En cambio, se encontró expresión de aromatasa en placentas de cabras de 4 meses (90-120 días) de gestación (Figura 1).

También se pudo identificar expresión de aromatasa en placentas de cabras próximas al parto, que se encontraban en el quinto mes (120-150 días) de la gestación (Figura 2).

Por último, se encontró una importante expresión de P450 aromatasa en placentas de cabras obtenidas en el posparto inmediato (Figura 2).

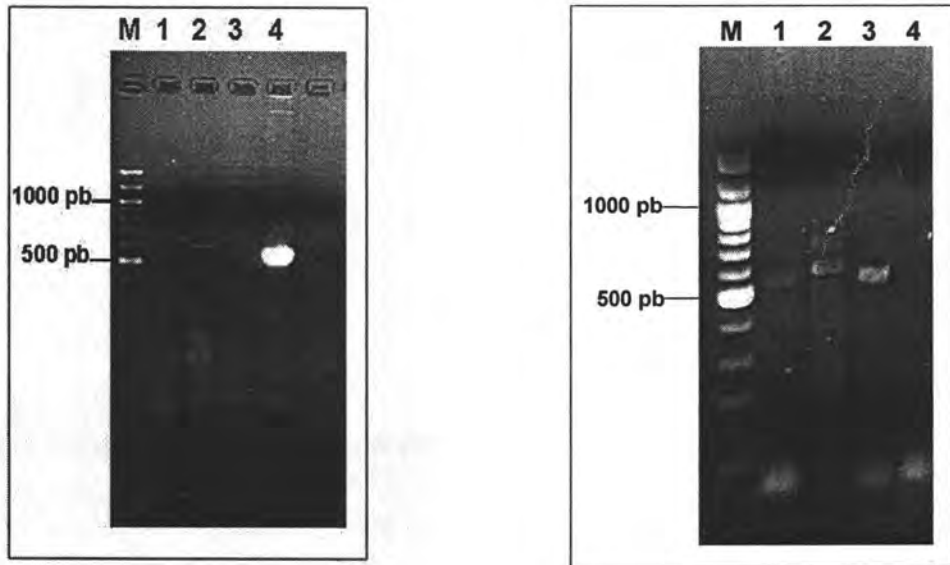


Figura 1. Productos de amplificación fraccionados mediante electroforesis en agarosa al 1%. Placenta de 2 meses de gestación (izquierda). Carril 1. Aromatasa; Carril 2. Actina; Carril 3. Control sin DNA molde; Carril 4. Control con gen aromatasa clonado; M. Marcador de peso molecular de 100 pb. Placenta de 4 meses de gestación (derecha). Carril 1. Aromatasa; Carril 2. Actina; Carril 3. Control con gen aromatasa clonado; Carril 4. Control sin DNA molde; M. Marcador de peso molecular de 100 pb.

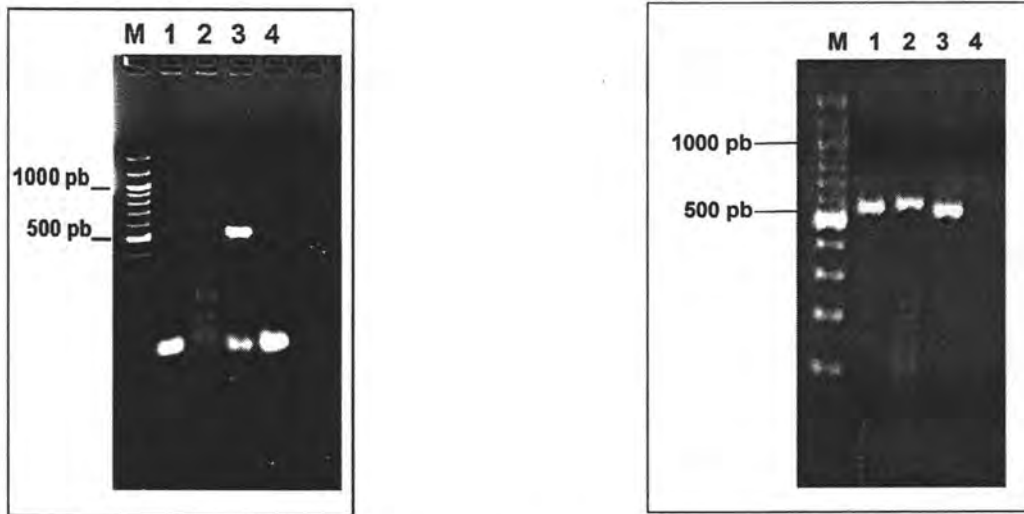


Figura 2. Productos de amplificación fraccionados mediante electroforesis en agarosa al 1%. Placenta de 5 meses de gestación (izquierda). Carril 1. Aromatasa; Carril 2. Actina; Carril 3. Control con gen aromatasa clonado; Carril 4. Control sin DNA molde; M. Marcador de peso molecular de 100 pb. Placenta posparto (derecha). Carril 1. Aromatasa; Carril 2. Actina; Carril 3. Control con gen aromatasa clonado; Carril 4. Control sin DNA molde; M. Marcador de peso molecular de 100 pb.

Expresión de P450 aromatasa *in situ*

Se detectó expresión del transcrito para aromatasa fundamentalmente en las células del sincitiotrofoblasto dentro del cotiledón así como en las microvellosidades de placentas correspondientes al final del 1^{er} mes (alrededor de 30 días) y a los 2 meses de gestación (Figuras 3 y 4 respectivamente). Como se ve en la Figura 3, se encontró una escasa expresión de aromatasa en el interior del cotiledón en esta etapa de la gestación de la cabra, ya que sólo en algunas pequeñas regiones es posible encontrar la señal que nos indica que la enzima está presente en dicha zona.

En las placentas de 2 meses (31-60 días aproximadamente) se observa en detalle la vellosidad placentaria en la cual se aprecia el sincitiotrofoblasto, lugar donde se encontró la expresión de aromatasa placentaria (Figura 4).

También se encontró expresión de este gen localizada fundamentalmente en las células del sincitiotrofoblasto de las microvellosidades placentarias correspondientes a cabras de 2 meses (30-60 días) de gestación (Figura 5, Región 1). Sin embargo la expresión de aromatasa en el interior del cotiledón en este periodo aún permanece escasa (Figura 5, Región 2).

Las células del sincitiotrofoblasto de las microvellosidades de las placentas correspondientes a 4 meses (90-120 días) de gestación mostraron una abundante expresión del gen de aromatasa (Figura 6 A) en el citoplasma. Sin embargo, no se encontró expresión de aromatasa en la carúncula (Figura 6 B). Nótese la

ausencia de la expresión de este gen en el control negativo (sin transcriptasa reversa) del cotiledón placentario (Figura 6 C).

En la Figura 7 se muestra la expresión de aromatasa en una placenta de 5 meses (120-150 días) de gestación. En el detalle de la figura de la derecha se puede observar una marcada expresión en el citoplasma de las células del sincitiotrofoblasto de las microvellosidades placentarias y ausencia de expresión en la porción caruncular.

Por último se observó abundante expresión de aromatasa en las células del sincitiotrofoblasto de los cotiledones de la placenta en el posparto inmediato (Figura 8). En esta imagen se observa un corte con abundante expresión de la enzima aromatasa en el interior del cotiledón placentario (A, D y E). Nótese la ausencia de expresión en el control negativo (B) en el que se omitió la enzima Transcriptasa Reversa. La distribución es similar a la observada en la placenta de 4 meses de gestación.

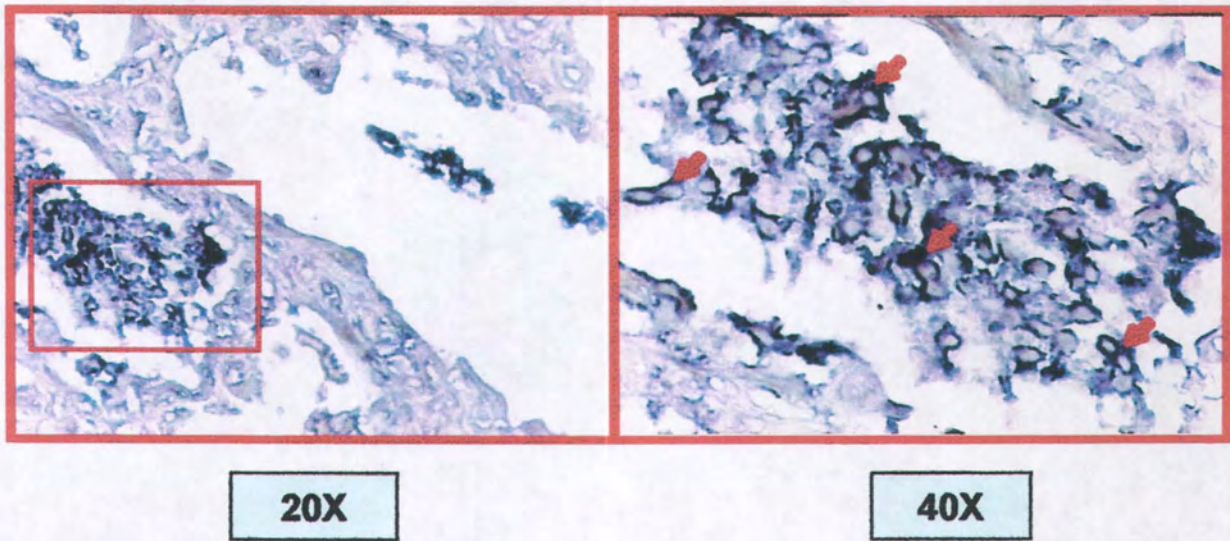


Figura 3. Cotiledón placentario de final del primer mes (día 30 aproximadamente) de gestación / RT-PCR *in situ*. Izquierda 20X, derecha 40X.

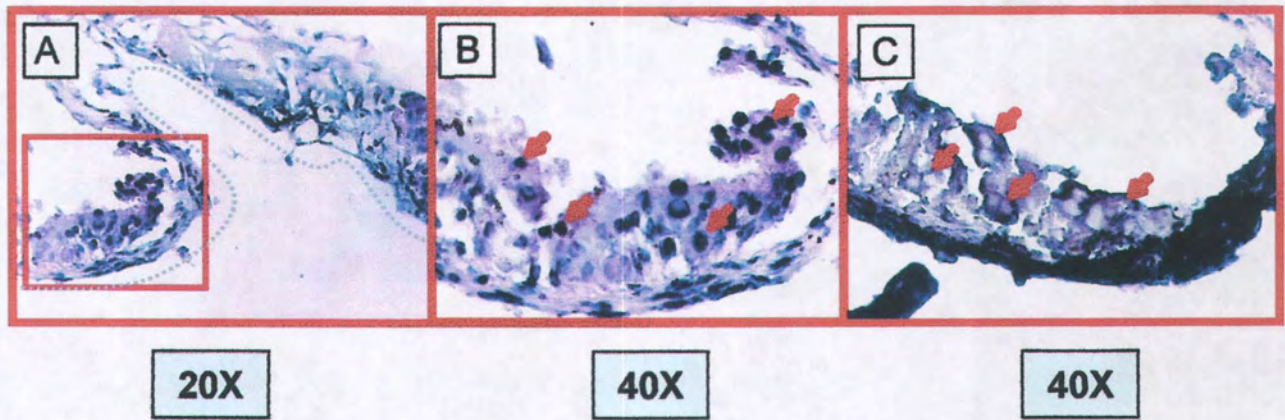


Figura 4. Cotiledón placentario de 2 meses de gestación (31-60 días aprox.). A y B: Hematoxilina + Eosina, 20X y 40X respectivamente., C: RT-PCR / P450arom. 40X.

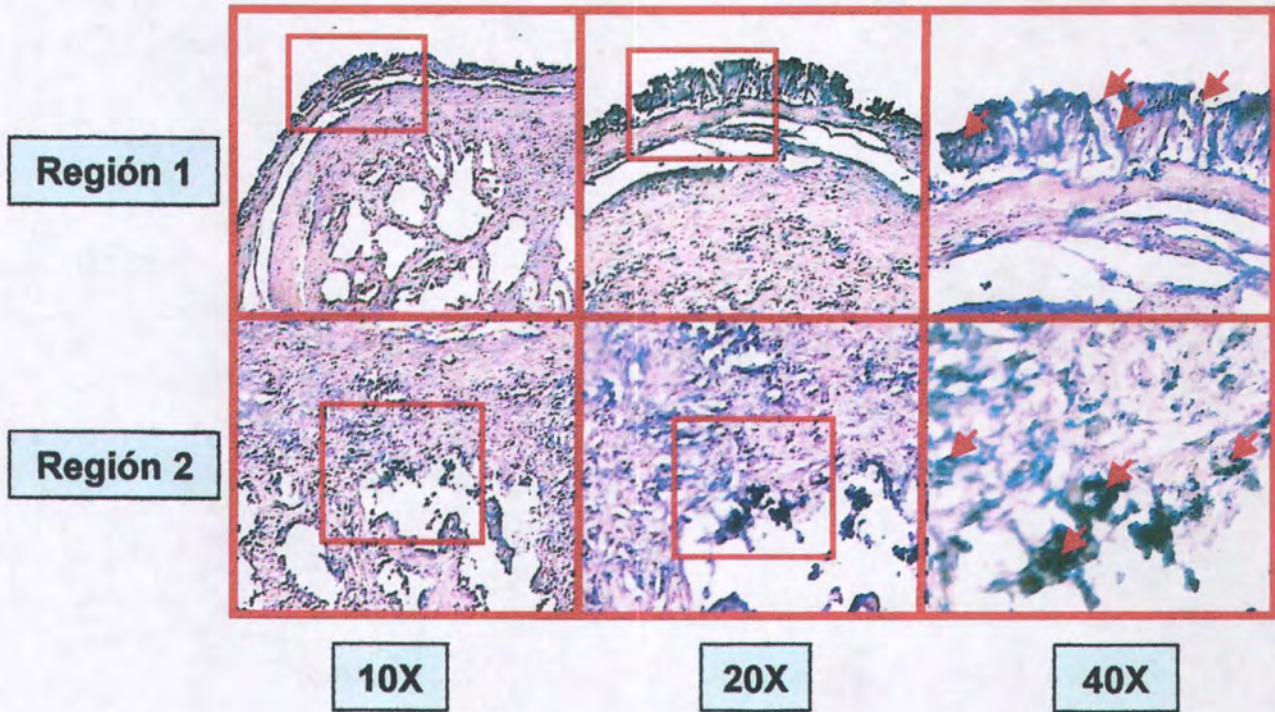


Figura 5. Expresión de aromatasa *in situ* en placenta de 2 meses de gestación. Región 1: Expresión de P450arom en microvellosidades cotiledonarias. Región 2: Expresión de P450arom en el interior del cotiledón.

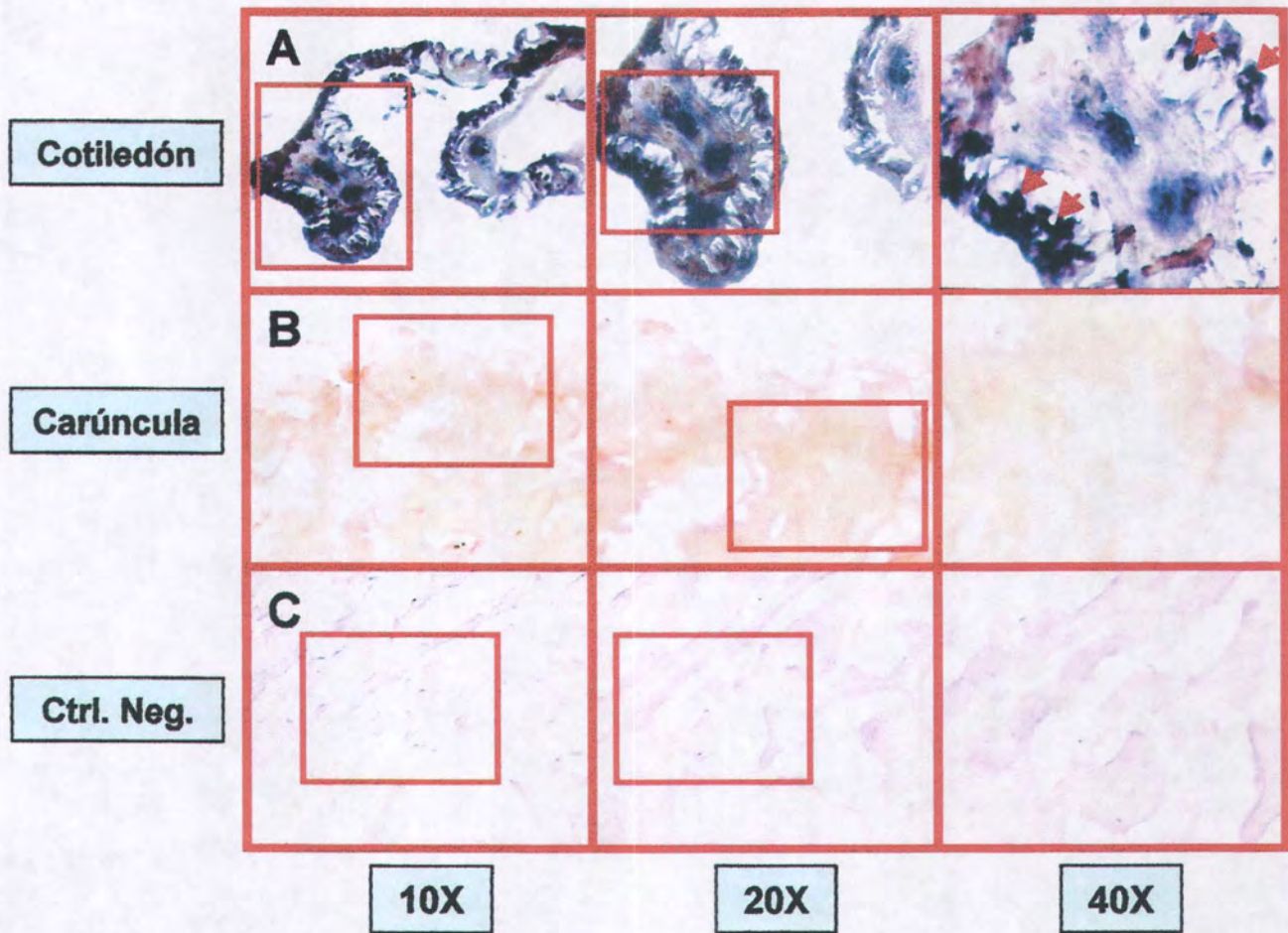


Figura 6. (A) Expresión de P450arom en microvellosidades cotiledonarias. Nótese la ausencia de expresión en la zona caruncular (B), y en el control negativo (C) donde se omitió la reversa transcriptasa. 10X, 20X y 40X.

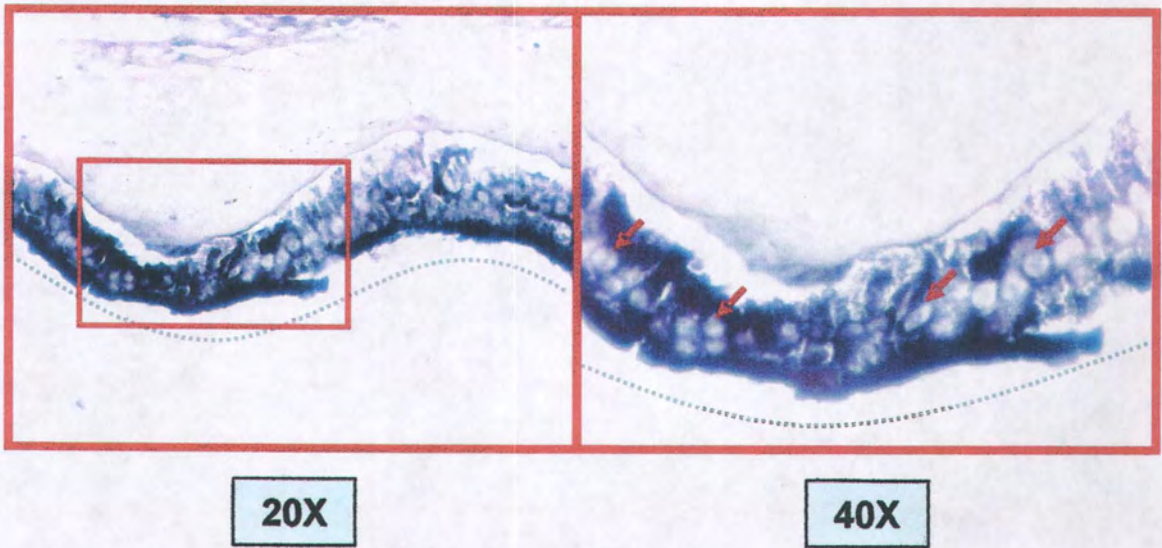


Figura 7. Detalle de cotiledón placentario de 5 meses de gestación. RT-PCR *in situ* / P450 aromatasa. Izquierda 20X, derecha 40X. Línea punteada: Zona cotiledonaria.

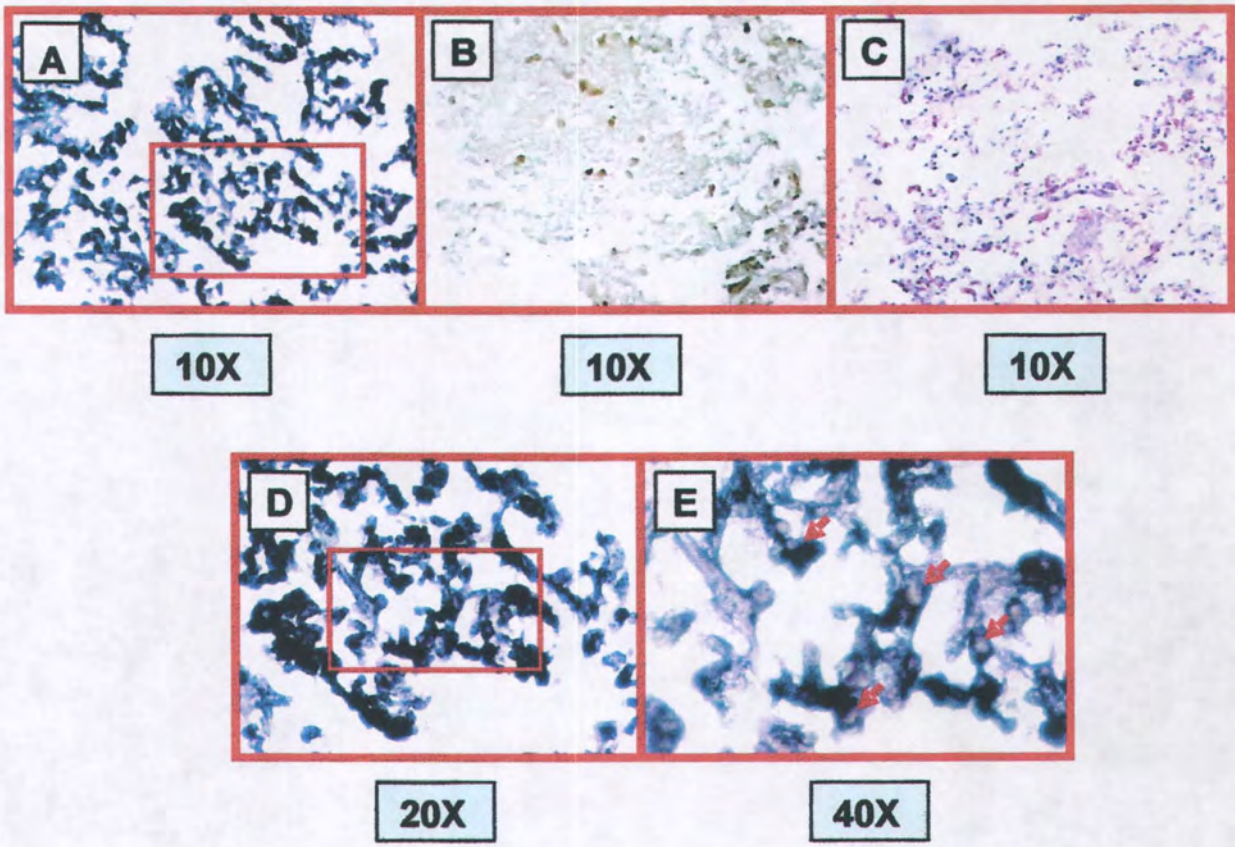


Figura 8. Cotiledón de placenta posparto. A: RT-PCR / P450arom., B: Control Negativo (sin RT), C: Hematoxilina + Eosina., D y E: RT-PCR / P450arom.

DISCUSION

La conversión de androstenediona a estrógenos *in vitro* fue demostrada en la placenta a término de la cabra por Ainsworth y Ryan (1970). A su vez Ryan en 1971 encontró que los estrógenos son sintetizados en la placenta de los mamíferos (humanos, monos, bovinos, caballos ovejas y cabras) que tienen un periodo largo de gestación. Este hecho sugería fuertemente que el tejido placentario de esta especie expresa la enzima que aromatiza los andrógenos para sintetizar estrógenos. Sin embargo no se encontraron datos en la bibliografía sobre la expresión de la enzima en placentas a término ni en etapas anteriores.

En el presente trabajo se demuestra por primera vez la expresión de P-450 aromatasa en la placenta de la cabra a lo largo de la gestación mediante RT-PCR *in vitro* y RT-PCR *in situ*. En un estudio preliminar nuestro grupo demostró que la P-450 aromatasa se expresa abundantemente en la placenta de la cabra obtenida inmediatamente después del parto (Bobes, et al 2004).

Los resultados de la RT-PCR *in situ* que se presentan en este estudio muestran que utilizando esta técnica es posible demostrar que la placenta de la cabra expresa el mRNA para aromatasa desde etapas tempranas de la gestación. En la placenta de otras especies como cerdos y caballos se ha encontrado expresión de aromatasa desde etapas muy tempranas de la gestación (Conley, 1994; Walters, et al, 2000).

Vanselow y colaboradores (2001) señalan que durante la gestación la placenta fetal llega a ser la principal fuente de estrógenos en humanos y varias

especies unguladas. A su vez mencionan que la producción de estrógenos placentarios muestra un patrón bifásico durante el embarazo basándose en la medición de la actividad de aromatasa en el bovino y en la expresión de *CYP19* en la placenta ovina, respectivamente. Mientras que la función biológica del primer pico durante la gestación media no se conoce aún, el papel del segundo pico, más pronunciado, que ocurre al final de la gestación, parece ser crucial para el momento del parto. Esto sugiere fuertemente que existe actividad de aromatasa por lo menos desde la mitad de la gestación y hasta el momento del parto. El cambio de progesterona a estrógeno como hormona dominante induce la maduración cervical, aumenta la actividad de miometrial y culmina en el trabajo de parto y la expulsión del producto.

Kamat y colaboradores (1998) observaron que las células citotrofoblásticas mononucleadas aisladas de la mitad del trimestre de la placenta humana, espontáneamente se fusiona en cultivo para formar el sincitiotrofoblasto multinuclear. Estos cambios morfológicos están asociados con una marcada inducción de la actividad de aromatasa y expresión del gen de la P450 aromatasa.

Esto coincide con lo observado por Jiang y colaboradores (2000) que muestran que la diferenciación de sincitiotrofoblasto está asociada con una rápida y dramática inducción de la expresión del gen *CYP19*, lo que sugiere que la diferenciación del citotrofoblasto a sincitiotrofoblasto está asociada con la generación de una cascada de eventos que acompañan a este proceso de diferenciación. Sin embargo, estos eventos aún no se conocen en detalle. Estos

datos sugieren asimismo, que la diferenciación bioquímica ocurrirá sólo después de la formación sincitial, ya que la formación sincitial es una consecuencia del proceso de diferenciación (Kao, et al., 1998).

La distribución tisular de la expresión de aromatasa en la placenta de la cabra muestra que ésta se encuentra abundantemente en el trofoblasto. Se sabe que cuando las células del citotrofoblasto se fusionan, se desencadena un proceso de diferenciación que involucra el prendimiento de diversos genes entre los que podrían encontrarse los de aromatasa; por esto es razonable que la expresión de la enzima aparezca muy marcadamente en el sincitiotrofoblasto. Los datos obtenidos sugieren que la expresión de mRNA para aromatasa comienza en el momento en el que las células se fusionan para formar el sincitiotrofoblasto. En el embrión equino, se ha encontrado expresión *in situ* de mRNA de aromatasa ya desde la etapa de blastocisto (Walters, et al, 2000), por lo que será necesario investigar tejidos más tempranos para dilucidar este punto.

Fürbass y colaboradores (2001) reportan que los cotiledones bovinos pero no las carúnculas muestran alta actividad de aromatasa durante la gestación y parto. A su vez Vanselow y colaboradores (2001) señalan que en los bovinos y ovejas la actividad de la aromatasa, la expresión del gen *CYP19*, así como la producción de estrógenos está restringida a los cotiledones placentarios.

En el presente trabajo no se encontró expresión *in situ* de aromatasa en la carúncula, zona que corresponde al tejido uterino lo cual también sugiere que la

expresión de aromatasa, así como la producción de estrógenos se lleva a cabo únicamente en los cotiledones.

En este estudio la P450 aromatasa estuvo presente en el sincitiotrofoblasto de la placenta, mostrando que la cabra tiene la habilidad de sintetizar andrógenos a estrógenos desde fases tempranas de la gestación.

Por lo tanto, es importante entonces tomar en cuenta desde que estadio de la gestación se está produciendo el sustrato necesario para que se lleve a cabo ésta síntesis. Mesiano y Jafee (1997) mencionan que durante los últimos dos tercios de la gestación en humanos y primates, las glándulas suprarrenales fetales aumentan desproporcionadamente y exhiben una actividad extraordinaria de crecimiento y de esteroidogénesis en un compartimiento cortical especializado conocido como la zona fetal (Mesiano and Jafee, 1997; Mastorakos and Ilias, 2003, Hammer, et al. 2005) que expresa la enzima 17α hidroxilasa (*CYP17*) (Hammer, et al. 2005). Durante la mitad de la gestación, la zona fetal ocupa del 80 al 90% del volumen cortical y produce de 100 a 200 mg/día de esteroides C19 androgénicos, es decir, sulfato de dehidroepiandrosterona (DHEAS), que es cuantitativamente el producto principal esteroide de la glándula suprarrenal fetal durante la gestación (Mesiano and Jafee, 1997) y se utiliza como precursor estrogénico en la placenta durante la gestación (Yamada, et al. 1995; Dharia, et al. 2004).

Ugele y colaboradores (2002) reportan que en el humano los DHEAS de origen materno y fetal contribuyen a la formación de estrona y estradiol mientras que el sulfato de 16α -hidroxidehidroepiandrosterona (16α -OH-DHEAS) sintetizado también por el feto es el precursor de alrededor del 90% de la síntesis de estriol placentario.

Por lo tanto, podría decirse, que son las adrenales fetales las que marcan la pauta en la síntesis de estrógenos placentarios, ya que la enzima P450 aromatasa puede estar presente desde las fases tempranas de la gestación pero no el sustrato. Sin embargo, en el caso de la cabra aun no se conoce como se lleva a cabo la producción de DHEA y DHEAS por las adrenales fetales.

En conclusión, en el presente trabajo se muestra por primera vez la expresión del mRNA de aromatasa en el tejido placentario de la cabra durante la gestación, habiéndose localizado dicha expresión en el sincitiotrofoblasto desde el primer mes de la gestación.

CONCLUSIONES

La expresión de la P450 aromatasa *in vitro* se detectó en los cotiledones de la placenta de cabra a los 4, 5 meses de gestación y posparto.

Con la metodología utilizada *in vitro* no se observó la expresión de la P450 aromatasa en las placentas de 2 meses de gestación o menos.

Ugele y colaboradores (2002) reportan que en el humano los DHEAS de origen materno y fetal contribuyen a la formación de estrona y estradiol mientras que el sulfato de 16α -hidroxidehidroepiandrosterona (16α -OH-DHEAS) sintetizado también por el feto es el precursor de alrededor del 90% de la síntesis de estriol placentario.

Por lo tanto, podría decirse, que son las adrenales fetales las que marcan la pauta en la síntesis de estrógenos placentarios, ya que la enzima P450 aromatasa puede estar presente desde las fases tempranas de la gestación pero no el sustrato. Sin embargo, en el caso de la cabra aun no se conoce como se lleva a cabo la producción de DHEA y DHEAS por las adrenales fetales.

En conclusión, en el presente trabajo se muestra por primera vez la expresión del mRNA de aromatasa en el tejido placentario de la cabra durante la gestación, habiéndose localizado dicha expresión en el sincitiotrofoblasto desde el primer mes de la gestación.

CONCLUSIONES

La expresión de la P450 aromatasa *in vitro* se detectó en los cotiledones de la placenta de cabra a los 4, 5 meses de gestación y posparto.

Con la metodología utilizada *in vitro* no se observó la expresión de la P450 aromatasa en las placentas de 2 meses de gestación o menos.

Utilizando la metodología de RT-PCR *in vitro* se encontró que la aromatasa se expresa claramente a partir del cuarto mes de gestación y hasta el momento del parto.

Asimismo se detectó una importante expresión *in situ* de la enzima en células de las placentas a partir de finales del primer y hasta el parto.

La distribución tisular de la expresión de aromatasa cambia notoriamente durante el desarrollo de la placenta de la cabra.

No se detectó expresión de aromatasa en la carúncula.

En resumen, las células del sincitiotrofoblasto de la placenta de cabra expresan el transcrito de P450-aromatasa desde finales del primer mes de gestación y hasta el momento del parto.

LITERATURA CITADA

- Ace C. I. and Okulicz, W. C. 1995. Differential gene regulation by estrogen and progesterone in the primate endometrium. *Mol Cell Endocrinol.* 115:95-103.
- Ainsworth L. and Ryan K. J. 1970. Steroid hormone transformation by endocrine organs from pregnant mammals VI. The conversion of delta 4-androstene-3,17-dione to estrogens by goat placental preparations *in vitro*. *Steroids.* 16: 553-559.
- Agarwal V.R., Ashanullah, C. I., Simpson, E. R. and Bulun, S. E. 2005. Alternative spliced transcripts of the aromatase cytochrome P450 (*CYP19*) gene in adipose tissue of women. *J Clin Endocr Met.* 82 (1): 70-74.

Utilizando la metodología de RT-PCR *in vitro* se encontró que la aromatasa se expresa claramente a partir del cuarto mes de gestación y hasta el momento del parto.

Asimismo se detectó una importante expresión *in situ* de la enzima en células de las placentas a partir de finales del primer y hasta el parto.

La distribución tisular de la expresión de aromatasa cambia notoriamente durante el desarrollo de la placenta de la cabra.

No se detectó expresión de aromatasa en la carúncula.

En resumen, las células del sincitiotrofoblasto de la placenta de cabra expresan el transcrito de P450-aromatasa desde finales del primer mes de gestación y hasta el momento del parto.

LITERATURA CITADA

- Ace C. I. and Okulicz, W. C. 1995. Differential gene regulation by estrogen and progesterone in the primate endometrium. *Mol Cell Endocrinol.* 115:95-103.
- Ainsworth L. and Ryan K. J. 1970. Steroid hormone transformation by endocrine organs from pregnant mammals VI. The conversion of delta 4-androstene-3,17-dione to estrogens by goat placental preparations *in vitro*. *Steroids.* 16: 553-559.
- Agarwal V.R., Ashanullah, C. I., Simpson, E. R. and Bulun, S. E. 2005. Alternative spliced transcripts of the aromatase cytochrome P450 (CYP19) gene in adipose tissue of women. *J Clin Endocr Met.* 82 (1): 70-74.

- Anthony R. V., Pratt, S. L., Liang, R., and Holland, M. D. 1995. Placental-fetal hormonal interactions: Impact on fetal growth. *J Anim Sci.* 73: 1861-1871.
- Bobes R. J., Pérez-Martínez, M., Gomez, Y. and Romano, M. C. 2003. Metabolism of progesterone to estrogens and androgens by individual follicles of the goat ovary. *Small Rumin Res.* 47: 233-342
- Bobes R.J., Miranda, C., Pérez-Martínez, M., Luu-The, V. and Romano, M.C. 2004. Isolation and characterization of goat ovarian aromatase cDNA: assessment of the activity using an intact cell system and placental expression. *Theriogenology.* 62:532-543.
- BonDurant R. H., Dairien, B. J., Munro, C. J., Stabenfieldt, G. H., Wang, P. 1981. Photoperiod induction of fertile oestrus and changes in LH and progesterone concentrations in yearling dairy goats (*Capra hircus*). *J Reprod Fertil.* 63: 1-9.
- Botella LI. J. El ciclo gravídico normal (Endocrinología de la gestación, parto y lactación). In: Tratado de endocrinología básica y clínica. Volumen I. Edited by Tresguerres, A. F. Editorial Síntesis. España.
- Bronson F.S. 1985. Mammalian reproduction: an ecological perspective *Biol Reprod.* 32:1-26.
- Carter A. M. and Enders, A.C. 2004. Comparative aspects of trophoblast development and placentation. *Reprod Biol Endocr.* 2:46-60.
- Chemineau P. 1983. Effect on oestrus and ovulation of exposing creole goats to the male at three times of the year. *J Reprod Fertil.* 67: 65 - 72.

- Chemineau P. 1986. Sexual behaviour and gonadal activity during the year in the tropical Creole meat goat. Female oestrous behaviour and ovarian activity. *Reprod Nutr Develop.* 26 (2A):441-452
- Chemineau P., Normant, E., Ravault, J. P. and Thimonier, J. 1986. Induction and persistence of pituitary and ovarian activity in the out-of-season lactating dairy goat after a treatment combining a skeleton photoperiod, melatonin and the male effect. *J Reprod Fertil.* 78:497-504.
- Chemineau P. 1993. Reproducción de las cabras originarias de las zonas tropicales. *Rev Latamer Peq Rumin.* 1 (1): 2-14.
- Chemineau P., Morillo, H., Delgadillo, J.A., Malpaux, B. 2003. Estacionalidad reproductiva en pequeños rumiantes: mecanismos fisiológicos y técnicas para la inducción de una actividad sexual a contra-estación. 3er Congreso ALEPRYCS. Facultad de Veterinaria. Universidad de Chile. Viña del Mar, Chile.
- Conley A.J., Christenson, L.K., Ford, S.P. and Christenson, R.K. 1994. Immunocytochemical localization of cytochromes P450 17 α -hydroxylase and aromatase in embryonic cell layers of elongating porcine blastocytes. *Endocrinol.* 135: 2248-2254.
- Conley A. and Hinshelwood, M. 2001. Mammalian aromatases. *Reproduction.* 121: 685–695

- Dharia S., Slane, A., Jian, m., Conner, M, Conley, A. and Parker, Jr. C. 2004. Colocalization of P450c17 and cytochrome b5 in androgen-synthesizing tissues of the human. *Biol Reprod.* 71: 83–88
- Delgadillo J. A, Canedo, G. A., Chemineau, P., Guillaume, D. and Malpoux, B. 1999. Evidence for an annual reproductive rhythm independent of food availability in male creole goats in subtropical northern Mexico. *Theriogenology.* 52(4): 727-737.
- Delgadillo S. J., Flores, C. J., Véliz, D. F., Duarte, M. G., Vielma, S. J., Poindron, M. P., Malpoux, B. 2003. Control de la reproducción de los caprinos del subtrópico mexicano utilizando tratamientos fotoperiódicos y efecto macho. *Vet. Méx.* 34(1): 69-79
- Dellmann H. 1994. Histología Veterinaria. 2^{da} edición. Zaragoza (España). ed. Acribia S.A. pp. 291-306.
- Dhindsa, D. S., Metcalfe, J., Resco, J. A. 1981. Oestrogen concentrations in systemic plasma of pregnant pygmy goats. *J Reprod Fert.* 62:99-103.
- Ford M. M., Thorburn, G. D., Caddy, D.J., and Young, I.R. 1999. Pulsatile output of prostaglandin F_{2α} does not increase around the time of luteolysis in the pregnant goat. *Biol Reprod.* 61: 411-415.
- Fürbass R., Kalbe, C. and Vanselow, J. 1997. Tissue specific expression of the bovine aromatase encoding gene uses multiple transcriptional start sites and alternative first exóns. *Endocrinol.* 138: 2813-2819.

- Fürbass R., Harun, M., Schwerin, M. and Vanselow, J. 2001. Chromatin structure of the bovine *CYP19* promoter 1.1 DNase I hypersensitive sites and DNA hypomethylation correlate with placental expression. *Eur J Biochem.* 268:1222-1227.
- Gamboa V. J. 1986. El establecimiento de la actividad reproductiva en la cabra, un planteamiento teórico sobre la similitud entre pubertad y estacionalidad. III Congreso Nacional de La Asociación Mexicana de Zootecnistas y Técnicos en Caprinocultura, A.C. (AZTECA). Diciembre, Guanajuato Gto.
- Graddy L. G., Kowalski, A. A., Simmen, F. A., Davis, S. L., Baumgartner, W. W. and Simmen, R. C. M. 2000. Multiple isoforms of porcine aromatase are encoded by three distinct genes. *J Steroid Bioch Mol Biol.* 73(1-2):49-57
- Hammer G. D., Parker, K. L., and Schimmer, B. P. 2005 . Transcriptional regulation of adrenocortical development. *Endocrinol.* 146(3):1018–1024
- Jayasekara N. W., Yonezawa, T., Ishida, M., Yamanouchi, K. and Nishihara, M. 2004. Molecular cloning of goat 20 α -hydroxysteroid dehydrogenase cDNA. *J Reprod Dev.* 50 (3): 323-331
- Jiang B., Kamat, A. and Mendelson, C. 2000. Hypoxia prevents induction of aromatase expression in human trophoblast cells in culture: potential inhibitory role of the hypoxia-inducible transcription factor Mash-2 (Mammalian achaete-scute homologous protein-2). *Mol Endo.* 14 (10): 1661-1673.

- Jeffery S., Babischkin, Gerald J. Pepe and Eugene D. Albrecht. 1997. Estrogen regulation of placental p-450 cholesterol side-chain cleavage enzyme messenger ribonucleic acid levels and activity during baboon pregnancy. *Endocrinol.* 138 (1): 452-459
- Kamat A., Alcorn, J.L., Kunczt, C. and Mendelson, C.R. 1998. Characterization of the regulatory regions of the human aromatase (P450arom) gene involved in placenta-specific expression. *Mol Endocrinol.* 12 (11): 1764-1777.
- Kamat A., Graves, K.H., Smith, M.E., Richardson, J.A. and Mendelson, C.R.. 1999. A 500-bp region, 40 kb upstream of the human *CYP19* (aromatase) gene, mediates placenta-specific expression in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci.* 96 (8): 4575-4580.
- Kao L., Caltabiano, S., Wu, S., Strauss, J. F., Filman, H. J. 1998. The human villous trophoblast: interactions with extracellular matrix proteins, endocrine function, and cytoplasmic differentiation in the absence of syncytium formation. *Dev Biol.* 130:693-702.
- Kao Y.C., Higashiyama, T., Sun, X., Okubo, T., Yarborough, C., Choi, I., Osawa, Y., Simmen, F. A. and Chen, S. 2000. Catalytic differences between porcine blastocyst and placental aromatase isozymes. *Eur J Biochem.* 267: 6134-6139
- Lindsay D.R. 1991. Reproduction in the sheep and goat. In: Reproduction in the domestic animals. 4th edition. Edited by Cupps, P.T. Academic Press. U.S.A.

- Mahendroo, M. S., Means, G. D., Mendelson, C. R., and Simpson, E. R. 1991. Tissue-specific expression of human P450_{arom}. The promoter responsible for expression in adipose tissue is different from that utilized in placenta. *J Biol Chem.* 266 (17):11276-11281.
- Mastorakos G. and Ilias, I. 2003. Maternal and fetal hypothalamic–pituitary–adrenal axes during pregnancy and postpartum. *Ann N Y Acad Sci.* 997:136–149.
- Mesiano S. and Jaffe, R. B. 1997. Developmental and functional biology of the primate fetal adrenal cortex. *Endocr Rev.* 18 (3): 378-403.
- Mossman, H. W. 1987. Vertebrate fetal membranes. Rutgers University Press, New Brunswick, NJ.
- Nuovo G. 1996. The foundation of successful *in situ* PCR. *Frontiers in Bioscience.* 1: 4-15.
- Nowak R. Rodway, R.G. 1985. Effect of intravaginal implants of melatonin on the onset of ovarian activity in adult and prepubertal ewes. *J Reprod Fertil.* 74:287-293.
- Payne H.A. and Hales, B.H. 2004. Overview of steroidogenic enzymes in the pathway from cholesterol to active steroid hormones. *Endo Rev.* 25(6): 947-970.
- Pérez-Martínez M., Mendoza, M. E., and Romano, M. C. 1999. Exfoliative vaginal cytology and plasma levels of estrone and estradiol-17 β in young and adult goats. *Small Rumin Res.* 33: 153-158.

- Ramón V.J. 1997. Factores de mortalidad embrionaria en ovejas. *Agrociencias* 31: 113-120.
- Richter J. and Götze R. 1960. Tiergeburtschilfe. 2 Auflage. Paul Parey. Hamburg.
- Renfree, M. B. 1982. Implantation and placentation. In Austin, C. R. and Short, R. V. Reproduction in mammals 2. Embryonic and fetal development (Second edition). Cambridge University Press, Cambridge. pp. 26-69.
- Ryan KJ. 1971. Endocrine control of gestacional length. A time to be born. *Am J Obstet Gynecol.* 109: 299-306.
- Silva E., Galina, M., Palma, J. M., Valencia, J. 1998. Reproductive performance of Alpine dairy goats in a semi-arid enviroment of Mexico under a continuous breeding system. *Small Rum Res.* 27:79-84.
- Simpson E.R., Dodson M.M., Agarwal, V.R., Hinshelwood, M.M., Bulum, S.E. and Zhao, Y. 1997. Expression of the *CYP19* (aromatase) gene: an unusual case of alternative promoter usage. *FASEBJ.* 11: 29-36.
- Simpson E. R, M. S Mahendroo, G. D Means, M. W Kilgore, M. M Hinshelwood, S. Graham- Lorence, B. Amarneh, Y. Ito, C. R. Fisher, and M. D. Michael. 1994. Aromatase cytochrome P450, the enzyme responsible for estrogen biosynthesis. *Endocr Rev.* 15: 342-355.
- Simpson E. S., Clyne, C., Rubin, G., Chin Boon, W., Robertson, K., Britt, K., Speed, C. and Jones M. 2002. Aromatase—a brief overview. *Annu Rev Physiol.* 64: 93-127.

- Smith M. C. and Sherman, D.M. 1994. Goat medicine. Lea & Febiger. Philadelphia.
- Strauss J.F., Martinez, F. and Kiriakidou, M. 1996. Placental steroid hormone synthesis: unique features and unanswered questions. *Biol Reprod.* 54: 303-311.
- Thatcher W.W., Staples, C.R., Danet-Desnoyers, G., Oldick, B. And Schmitt, E.P. 1994. Embryo health and mortality in sheep and cattle. *J Anim Sci.* 72 (Suppl. 3):16-30.
- Toda K, Simpson, E.R, Mendelson, C.R, Shizuta, Y. and Kilgore, M.W. 1994. Expression of the gene encoding aromatase cytochrome P450 (*CYP19*) in fetal tissues. *Mol Endocr.* 8: 210-217.
- Ugele B., St-Pierre, M., Pihusch, M., Bahn, A. and Hantschmann, P. 2003. Characterization and identification of steroid sulfate transporters of human placenta. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 284: E390–E398.
- Valencia J., Gonzalez, J.L., Diaz, J. 1986. Actividad Reproductiva de la cabra criolla en México en el examen *postmortem* de aparato genital. *Vet Méx.* 17:177-180
- Valencia J., Zarco, L., Ducoing, A., Murcia, C. and Navarro, H. 1990. Breeding season of criollo and granadina goats under constant nutritional level in the Mexican highlands. *Livestock Reproduction in Latin America.* International Atomic Energy Agency. Viena. pp. 321-333.

- Vanselow J., Zsolnai, A., Fésüs, L., Fűrbass, R. and Schwerin, M. 1999. Placenta-specific transcripts of the aromatase encoding gene include different untranslated first exons in sheep and cattle. *Eur J Biochem.* 265: 318-324.
- Vanselow J., Fűrbass, R., Zsolnai, A., Kalbe, C., Said, H. M. and Schwerin, M. 2001. Expression of the aromatase cytochrome p450 encoding gene in cattle and sheep. *J Steroid Bioch Mol Biol.* 79: 279-288.
- Walters K.W., Corbin, C.J, Anderson, G.B., Roser, J.F. and Conley, A.J. 2000. Tissue- specific localization of cytochrome P450 aromatase in the equine embryo by *in situ* hybridization and immunocytochemistry. *Biol Reprod.* 62:1141-1145.
- Yamada K., Nobuhiro, Harada, Shin-ichiro, Honda, Yasuyuki, Takagi. 1995. Regulation of placenta-specific expression of the aromatase cytochrome P-450 Gene. Involvement of the trophoblast-specific element binding protein. *J Biol Chem.* 270 (42): 25064-25069.
- Yellon S.M. Foster, D.L. 1985. Alternate photoperiods time puberty in the female lamb. *Endocrinol.* 116: 2090 – 2097.