



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

EXPRESIÓN DE LA HORMONA INHIBIDORA
DE LOS CONDUCTOS DE MULLER (AMH) DURANTE
EL DESARROLLO FOLICULAR TEMPRANO DEL RATÓN

Mus musculus

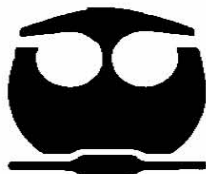
T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

P R E S E N T A

MIRIAM ANAYA PEDRERO



MÉXICO, D. F.

2007



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.

JURADO ASIGNADO

PRESIDENTE:	PROFR. ENRIQUE MORENO SAENZ
VOCAL:	PROFRA. RAQUEL ORTEGA MUÑOZ
SECRETARIO	PROFRA. MARIA IRMA VILLLPANDO FIERRO
1er. SUPLENTE	PROFRA. MARTHA LETICIA JIMENEZ PARDO
2do. SUPLENTE	PROFRA. MARTHA ALICIA MENJIVAR IRAHETA

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

LABORATORIO DE EMBRIOLOGÍA MOLECULAR EN EL DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA CELULAR Y FISIOLOGÍA DEL INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM.

ASESOR DEL TEMA

DRA. MARIA IRMA VILLALPANDO FIERRO

SUSTENTANTE

MIRIAM ANAYA PEDRERO

"Si por un instante Dios se olvidara de que soy una marioneta de trapo y me regalara un trozo de vida, aprovecharía ese tiempo lo más que pudiera.

Posiblemente no diría todo lo que pienso, pero en definitiva pensaría todo lo que digo.

Daría valor a las cosas, no por lo que valen, sino por lo que significan.

Dormiría poco, soñaría más, entiendo que por cada minuto que cerramos los ojos, perdemos sesenta segundos de luz. Andaría cuando los demás se detienen, despertaría cuando los demás duermen.

Si Dios me obsequiara un trozo de vida, vestiría sencillo, me tiraría de bruces al sol, dejando descubierto no solamente mi cuerpo, sino mi alma.

A los hombres les probaría cuán equivocados están al pensar que dejan de enamorarse cuando envejecen, sin saber que envejecen cuando dejan de enamorarse.

A un niño le daría alas, pero le dejaría que él solo aprendiese a volar.

A los viejos les enseñaría que la muerte no llega con la vejez, sino con el olvido.

Tantas cosas he aprendido de ustedes, los hombres... He aprendido que todo el mundo quiere vivir en la cima de la montaña, sin saber que la verdadera felicidad está en la forma de subir la escarpada.

He aprendido que cuando un recién nacido aprieta con su pequeño puño, por primera vez, el dedo de su padre, lo tiene atrapado por siempre.

He aprendido que un hombre sólo tiene derecho a mirar a otro hacia abajo, cuando ha de ayudarlo a levantarse.

Son tantas cosas las que he podido aprender de ustedes, pero realmente de mucho no habrán de servir, porque cuando me guarden dentro de esa maleta, infelizmente me estaré muriendo.

Siempre di lo que sientes y haz lo que piensas.

Si supiera que hoy fuera la última vez que te voy a ver dormir, te abrazaría fuertemente y rezaría al Señor para poder ser el guardián de tu alma.

Si supiera que estos son los últimos minutos que te veo te diría "te quiero" y no asumiría, tontamente, que ya lo sabes.

Siempre hay un mañana y la vida nos da otra oportunidad para hacer las cosas bien, pero por si me equivoco y hoy es todo lo que nos queda, me gustaría decirte cuanto te quiero, que nunca te olvidaré.

El mañana no le está asegurado a nadie, joven o viejo. Hoy puede ser la última vez que veas a los que amas. Por eso no esperes más, hazlo hoy, ya que si el mañana nunca llega, seguramente lamentarás el día que no tomaste tiempo para una sonrisa, un abrazo, un beso y que estuviste muy ocupado para concederles un último deseo.

Mantén a los que amas cerca de ti, diles al oído lo mucho que los necesitas, quíereles y trátalos bien, toma tiempo para decirles "lo siento", "perdóname", "por favor", "gracias" y todas las palabras de amor que conoces.

Nadie te recordará por tus pensamientos secretos. Pide al Señor la fuerza y sabiduría para expresarlos".

Gabriel García Márquez.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Irma Villalpando Fierro por darme la oportunidad de trabajar en su laboratorio, por sus horas de enseñanza y por compartir conmigo sus conocimientos

A la Biol. Esmeralda Lira por su asesoría y apoyo técnico para la realización de este trabajo pero sobretodo por brindarme su amistad.

A la Universidad Nacional Autónoma de México por abrirme las puertas al conocimiento.

A mis amigos y compañeros de la facultad con quienes compartí tantas cosas.

DEDICATORIAS

*A mis padres Manuel y Lourdes por darme
todo su apoyo y más de lo que a su alcance estaba
y por guiarme en la vida para seguir el camino adecuado.*

*A mis hermanos y sobrinos a quienes
les deseo de todo corazón que su vida sea la mejor
y que se forjen el mejor futuro para cada uno de ellos.*

*A mis abuelitos quienes han sido parte
fundamental en mi vida y siempre me han apoyado.*

*A ti Alejandro por tu apoyo,
tu comprensión y por todo tu amor, porque
contigo he aprendido que la vida puede ser aún más bella.*

CONTENIDO

	Página
I. RESUMEN.....	1
II. INTRODUCCIÓN.....	3
1. Desarrollo ovárico.....	4
1.1 Formación de la cresta genital.....	4
1.2 Etapa de gónada indiferenciada.....	6
1.3 Diferenciación gonadal.....	7
2. Expresión de genes relacionados con la diferenciación sexual gonadal...	8
2.1 En el primordio gonadal.....	9
2.2 En el testículo.....	9
2.3 En el ovario.....	10
3. Diferenciación fisiológica del ovario.....	12
3.1 Meiosis.....	12
3.2 Etapas de meiosis e inhibición.....	13
3.3 Foliculogénesis.....	16
3.3.1. Etapa embrionaria.....	16
3.3.2. Etapa postnatal.....	17
4. Hormona inhibidora de los conductos de Müller.....	20
4.1 Organización del gen.....	23
4.2 Organización de la proteína.....	23
4.3 Expresión en el ovario.....	24
5. Papel de la AMH.....	25
5.1 En la morfogénesis gonadal.....	25
5.2 En la secreción de estrógenos y andrógenos.....	26
III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	27
IV. HIPÓTESIS.....	28
V. OBJETIVOS.....	29
VI. MATERIAL Y MÉTODOS.....	30
1. Reactivos.....	30
2. Animales de experimentación.....	30

3.	Aislamiento de muestras biológicas.....	30
4.	Fijación de antígenos.....	31
5.	Inclusión.....	31
6.	Obtención de cortes.....	32
7.	Inmunodetección.....	32
8.	Inclusión directa en corcho.....	33
9.	Postfijación.....	34
10.	Fotografías.....	34
VII.	RESULTADOS.....	35
1.	Expresión en el ovario infantil.....	35
2.	Expresión en el ovario prepúber.....	37
3.	Expresión en el ovario púber.....	39
4.	Expresión al inicio del control hipofisiario.....	41
VIII.	DISCUSIÓN.....	43
IX.	CONCLUSIONES.....	47
X.	REFERENCIAS.....	48
XI.	APÉNDICE.....	51

ABREVIATURAS

aa	aminoácidos
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
AMH	Hormona inhibidora de los conductos de Müller
BMPs	Proteínas morfogenéticas del hueso
BSA	Albúmina Suero Bovino
CGPs	Células Germinales Primordiales
DAMB	Diamino bencidina
d.g.	días de gestación
dpp	días post parto
DSS	Dosage Sensitive Sex Reversal
FSH	Hormona Estimulante del Folículo
KDa	Kilo Dalton
Kpb	kilo pares de bases
LH	Hormona Luteinizante
MIS	Sustancia Inhibidora Mulleriana
µm	micrómetros
PB	Buffer de Fosfatos
RIA	Radioinmunoanálisis
RNAm	Ácido Ribonucleico mensajero
SF-1	Factor esteroideogénico-1
SRY	Factor determinante del testículo
TGF-β	Factor de crecimiento transformante β
17-β E ₂	17-β estradiol

I. RESUMEN

El desarrollo folicular en el ovario de los mamíferos es regulado posnatalmente por la hormona estimulante del folículo (FSH) y la hormona luteinizante (LH). En este proceso también participan factores de crecimiento como la hormona inhibidora de los conductos de Müller (AMH), entre otros. En los roedores, la foliculogénesis se inicia a los 16 días de gestación (d.g.) y continúa postnatalmente. Estudios realizados en la rata, revelan que la AMH inhibe el reclutamiento de los folículos primordiales a preantrales y reduce la respuesta de éstos a la FSH. Se ha observado que la exposición de ovarios fetales a la AMH, inhibe la producción de la aromatasa (enzima que transforma los andrógenos a estrógenos). Sin embargo, se sabe poco sobre el papel de la AMH durante el desarrollo folicular del ratón. En el presente trabajo se estudió la expresión de la AMH durante el desarrollo folicular del ratón antes y al momento de establecerse el control del eje hipotálamo-hipófisis-gónada. Se emplearon ovarios de ratón de la cepa CD-1 de diferentes etapas de desarrollo: de 2 y 5 días postparto (dpp), (ovario infantil); de 10 y 15 dpp. (prepúber); de 20, 25 y 30 dpp. (púber) y de 35 dpp. (juvenil). Se obtuvieron cortes de 10 μm , se realizó una técnica de inmunodetección de la expresión de la AMH con un anticuerpo anti-goat biotinilado y se reveló con peroxidasa. Esta hormona fue detectada en el ovario desde los 2 hasta los 35 dpp. en las células de la granulosa de folículos

primordiales, primarios (preantrales), secundarios (antrales) y terciarios (maduros o De Graaf). Sin embargo, no se detectó la presencia de la AMH en algunos folículos atrésicos después de los 25 dpp. observándose un aumento de la expresión en edades y etapas más avanzadas de desarrollo folicular en el ovario. Asimismo, se observa un patrón de expresión similar al momento en el que se establece el eje hipotálamo-hipófisis-gónada a los 35 dpp., además de observarse un aumento en el número de folículos en diferentes etapas de desarrollo que expresaron la AMH. Estos resultados sugieren que la AMH se expresa desde el inicio del desarrollo folicular temprano y es proporcional al grado de desarrollo folicular, en etapas que son independientes del control hormonal hipofisiario.

II. INTRODUCCIÓN

La diferenciación sexual en los mamíferos es un proceso secuencial y ordenado que se lleva a cabo en varias etapas consecutivas. Comienza con la diferenciación genética ó cromosómica, en la que se establece el sexo genético (XX ó XY) durante la fertilización. Dependiendo si el ovocito es fecundado por un espermatozoide portador de un cromosoma X o un cromosoma Y, se desarrollará un ovario o un testículo respectivamente, dando lugar a la diferenciación gonadal (Gilbert, 2005). La secreción de las hormonas elaboradas por las gónadas, determinará la diferenciación de los genitales internos y externos dando como resultado la diferenciación fenotípica (Revisado por Merchant y Moreno, 2003) (Fig. 1).

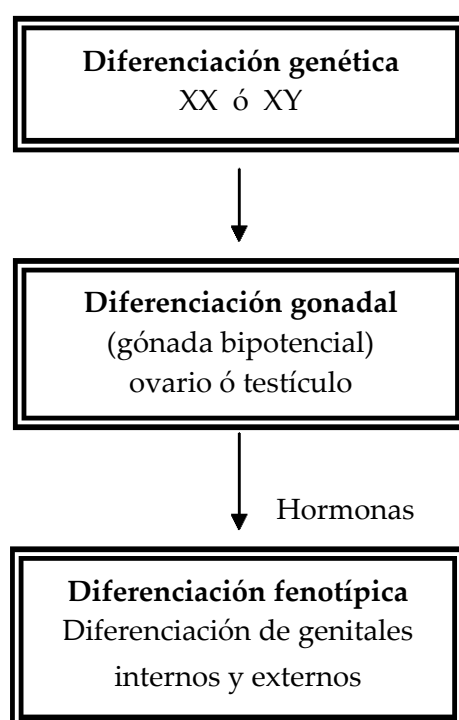


Fig. 1. Etapas de la diferenciación sexual en los mamíferos.

1. Desarrollo ovárico

El desarrollo y la diferenciación gonadal de los mamíferos ocurre durante el periodo embrionario y se lleva a cabo en tres etapas:

- a) Formación de la cresta genital.
- b) Etapa de gónada indiferenciada.
- c) Diferenciación gonadal.

Las dos primeras etapas son comunes tanto para hembras como para machos. En la tercera etapa se establece la diferenciación morfológica de la gónada: ovario en el caso de las hembras ó testículo en el caso de los machos (Revisado por Merchant, 1991).

1.1 Formación de la cresta genital

Al inicio del desarrollo gonadal, la cresta genital se aprecia como un par de engrosamientos longitudinales formados por la proliferación de células del epitelio celómico o mesotelio y células del mesénquima (Sadler y Langman, 2004). Las células somáticas del primordio gonadal se originan del mesodermo e inicialmente son de tres tipos: mesenquimáticas, mesoteliales y endoteliales (Revisado por Merchant, 1991). En la formación de esta zona participan también las células germinales primordiales (CGPs) que son las precursoras de los gametos. Estas células tienen un origen extraembrionario debido a que provienen del endodermo del saco vitelino, región desde donde migran hacia

las futuras crestas genitales (Larsen, 2003) (Fig. 2). Ahí estas células son rodeadas por células mesenquimáticas y epiteliales con las que se asocian estrechamente formando el primordio gonadal (Revisado por Merchant, 1991).

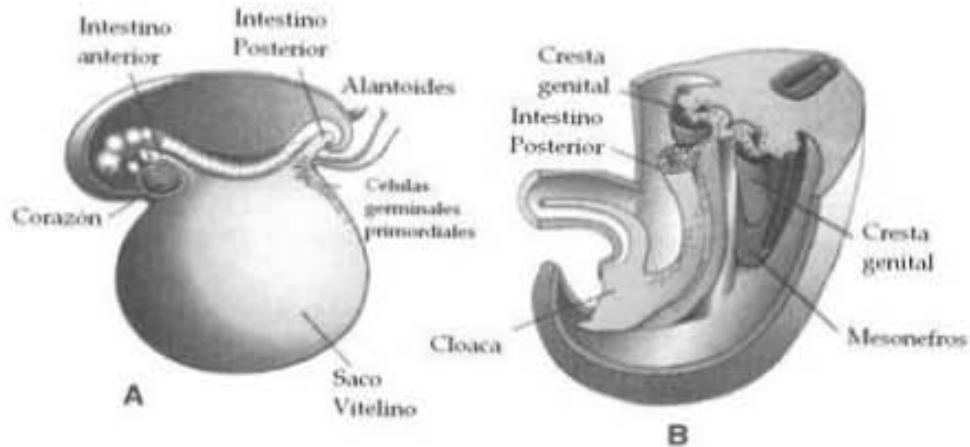


Fig. 2. A. Embrión de 8-12 d.g. B. Camino que siguen las células germinales primordiales desde el intestino posterior hacia la cresta genital (Tomado de Sadler y Langman, 2004).

Una vez que llegan las CGPs a la futura cresta, las células somáticas inician un proceso de proliferación, observándose una condensación de células epiteliales y mesenquimáticas que conducen gradualmente a la formación del blastema gonadal (Revisado por Merchant y Moreno, 2003) (Fig. 3). En el ratón el establecimiento de esta etapa comprende de los 9.5-10.5 d.g. (Revisado por Villalpando, 2000).

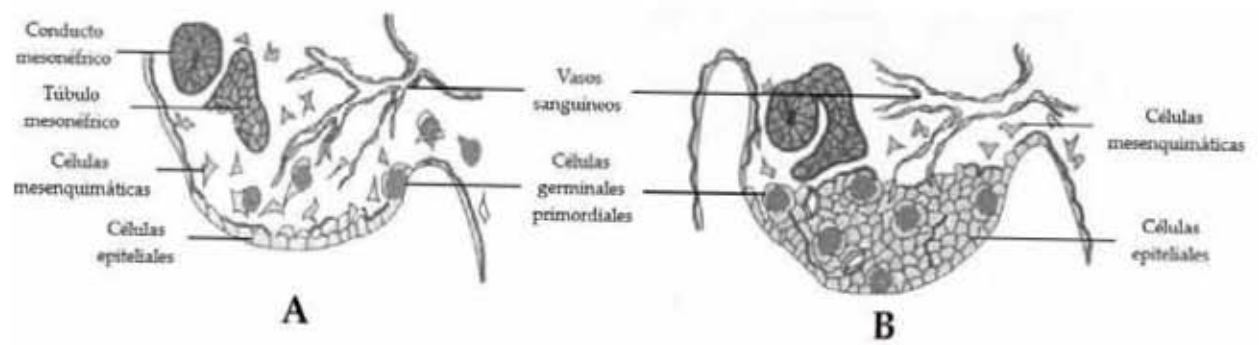


Fig. 3. Desarrollo temprano de la gónada. **A.** Organización de la cresta genital. **B.** Blastema gonadal (Tomado de Merchant, 1991).

1.2 Etapa de gónada indiferenciada

La gónada de los mamíferos se desarrolla a través de un estado morfológico bipotencial (indiferenciado), durante el cual no tiene características femeninas ni masculinas (Gilbert, 2005). Esta etapa es llamada etapa de gónada indiferenciada y se establece a partir de la formación del blastema gonadal. Este primordio da origen a dos importantes tejidos gonadales: los cordones sexuales primitivos y el estroma. Los primeros son arreglos epiteliales envueltos por una lámina basal formados por células íntimamente asociadas por uniones intercelulares. En estos cordones sexuales es donde se encuentran la mayoría de las CGPs. En el estroma se encuentran células de origen mesenquimático y vasos sanguíneos que irrigan a la gónada indiferenciada (Fig. 4). En el ratón esta etapa ocurre entre los 9.5 y 11.5 d.g. (Revisado por Merchant, 1991).

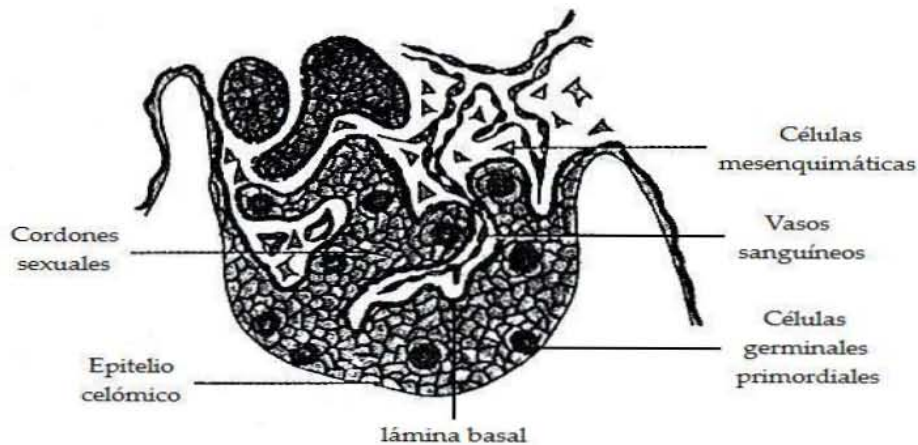


Fig. 4. Gónada indiferenciada. Se muestran los cordones sexuales y el estroma (Tomado de Merchant, 1991).

1.3 Diferenciación gonadal

En los mamíferos la primera manifestación estructural de la diferenciación gonadal se detecta en la gónada de los machos. En el caso del ratón, la diferenciación del testículo se presenta alrededor de los 12 d.g. Lo primero que se observa es una gradual separación de los cordones del epitelio celómico por una invasión activa de las células mesenquimáticas y vasos sanguíneos formando así los cordones seminíferos (Revisado por Merchant, 1991). Durante la diferenciación del ovario, éste no muestra cambios con respecto a la estructura de la gónada indiferenciada, sólo se puede observar un crecimiento debido a la proliferación de células somáticas y germinales a los 12.5 d.g. (Revisado por Merchant y Moreno, 2003). Cuando las CGPs han alcanzado la gónada genéticamente femenina proliferan por mitosis y posteriormente se diferencian en las células germinales precursoras de los gametos denominadas

ovogonias (Carlson, 2004). La fragmentación de los cordones sexuales da origen a los folículos ováricos (Revisado por Merchant, 1991) (Fig. 5).

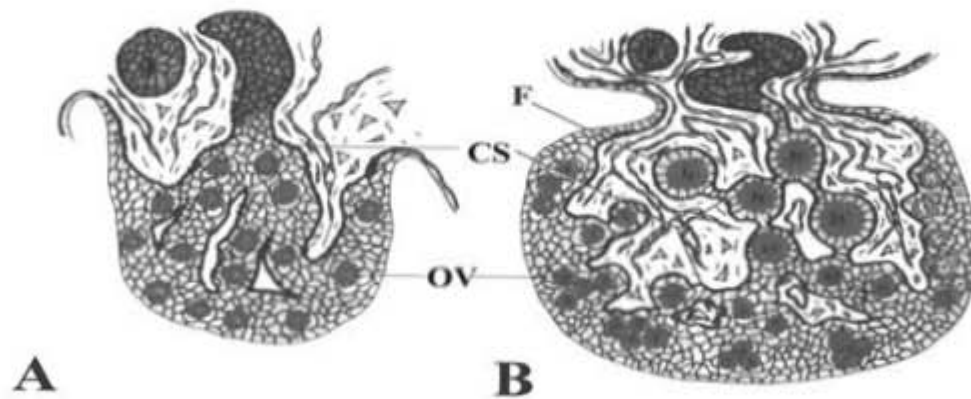


Fig. 5. Diferenciación del ovario. **A.** Los embriones con genotipo femenino no muestran cambios con respecto a la estructura de la gónada indiferenciada. **B.** Después de que los ovocitos (OV) han iniciado la profase de la primera división meiótica, comienza la formación de los folículos (F) por fragmentación de los cordones sexuales (CS) (Tomado de Merchant, 1991).

2. Expresión de genes relacionados con la diferenciación sexual gonadal

Los mecanismos que llevan a la diferenciación de un testículo o un ovario, están regulados por la presencia o ausencia de genes cromosómicos o autosómicos que se expresan desde etapas muy tempranas del desarrollo (Revisado por Merchant y Moreno, 2003).

2.1 En el primordio gonadal

La formación de la gónada indiferenciada requiere de la función de al menos dos genes: el *SF-1/Sf-1* (Factor esteroideogénico-1) y el *WT-1/Wt-1*, denotados por mayúsculas en el humano y minúsculas en otras especies (Carlson, 2004). *Sf1* se detecta en la cresta genital del ratón tanto de hembras como de machos entre los 9.5 y 10.5 d.g. Su expresión en la gónada bipotencial sugiere que puede desempeñar un papel importante durante las etapas tempranas del desarrollo gonadal. Otro gen que interviene en el establecimiento de la gónada indiferenciada es el denominado *Wt-1*. En estudios realizados en el ratón, usando hibridación *in situ*, se demostró que el sitio predominante de expresión de este gen en el embrión está confinado al riñón y a la gónada. Su expresión se detecta primero a los 9 d.g. y es más evidente a los 12 d.g. (Revisado por Merchant y Moreno, 2003).

2.2 En el testículo

El patrón general que controla la diferenciación gonadal está bajo la influencia del gen *SRY* (Sex-determining Region of the Y chromosome) que codifica el factor determinante testicular humano y que se localiza en el brazo corto del cromosoma Y en los mamíferos (Carlson, 2004). El gen del ratón *Sry* también se relaciona con la presencia de testículos y se expresa a partir de los 10.5 d.g. pero su máxima expresión ocurre a los 12.5 d.g. momento en el que se

inicia la diferenciación sexual morfológica del testículo en esta especie. *SRY/Sry* es necesario pero no suficiente para el desarrollo de los testículos en mamíferos y requiere interactuar con genes autosomales para inducir la diferenciación testicular completa. Un gen autosómico que participa en este proceso, es el denominado *SOX9/Sox9*, en el humano y ratón respectivamente. Su expresión se ubica desde los 10.5 d.g. en las crestas genitales de ratón tanto de hembras como de machos y posteriormente en estos últimos sólo se localiza en las células de Sertoli a los 13.5 d.g. Aunque se desconoce el mecanismo mediante el cual el gen *Sox9* interviene en la diferenciación testicular, se ha propuesto que tiene propiedades de trasactivación, es decir, éste podría activar otros genes involucrados en la diferenciación testicular (Revisado por Villalpando, 2000).

2.3 En el ovario

En estudios realizados se demostró que en el cromosoma Xp 21 existe una región implicada en procesos de reversión sexual denominada como DSS (*Dosage Sensitive Sex Reversal*) (Revisado por Merchant y Moreno, 2003). Se propuso que ésta región contiene un gen que codifica para un miembro de la familia de receptores nucleares de hormonas sexuales. Este gen, denominado *DAX1/Dax1* en humanos y otras especies de vertebrados, parece antagonizar la función de *Sry* y *Sox9* promoviendo la feminización de la gónada indiferenciada (Gilbert, 2005). La expresión de *Dax1* se detecta en las crestas genitales del ratón

hembra y macho a los 11.5 d.g. Los niveles de expresión decrecen conforme se forman los cordones testiculares en los machos (12.5 d.g.), y en el caso de las hembras, *Dax1* continúa expresándose en la gónada después de los 12.5 d.g., y a los 14.5 d.g. la señal es restringida a la región proximal del ovario con el mesonefros (Revisado por Merchant y Moreno, 2003). El gen *Dax1* parece ser activado por el producto de un gen determinante del ovario, el *Wnt-4* (Fig. 6). Este gen se expresa en la cresta genital del ratón mientras todavía se encuentra en el estado bipotencial aunque su función aún no está bien establecida (Revisado por Villalpando, 2000).

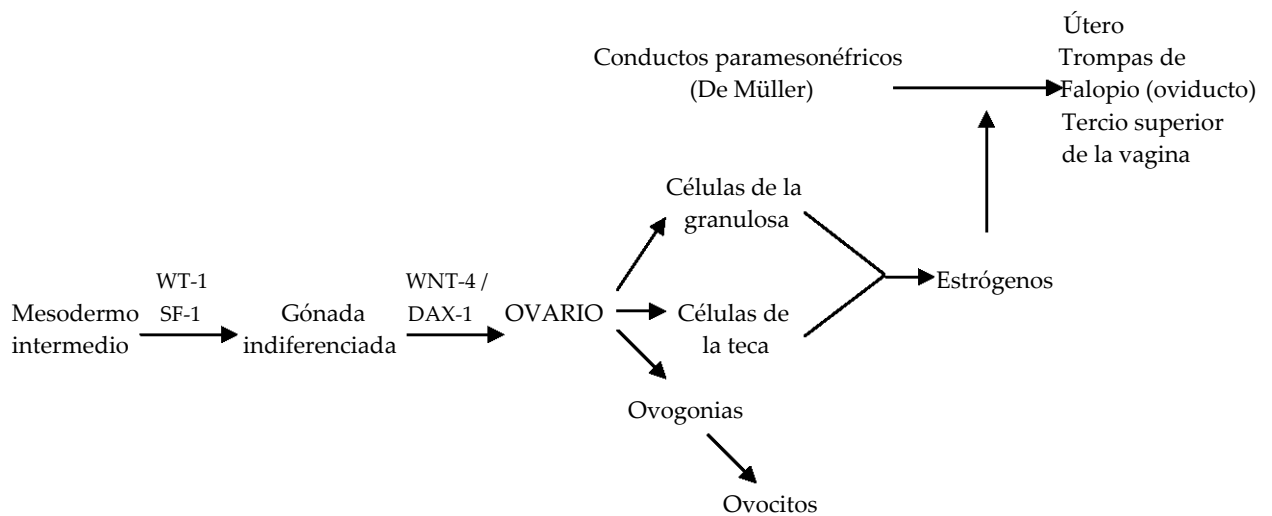


Fig. 6. Esquema que muestra la diferenciación de la gónada femenina (Modificado de Carlson, 2004).

3. Diferenciación fisiológica del ovario

El ovario o gónada femenina, es un órgano que desempeña dos funciones interrelacionadas: a) Producción de gametos femeninos, llamada ovogénesis y b) producción de esteroides (esteroidogénesis), en la cual se secretan dos grupos principales de hormonas esteroides: los progestágenos y los estrógenos (Ross y Romrell, 1997). Una vez que las CGPs alcanzan la gónada genéticamente femenina, se diferencian para dar origen a las ovogonias (Sadler y Langman 2004). Al igual que las células somáticas normales del organismo, las ovogonias son diploides, es decir contienen un conjunto de 23 pares de cromosomas en el humano (con un total de 46 cromosomas) y 20 pares en el ratón (40 cromosomas). Estas células producen gametos al experimentar la meiosis (Larsen, 2003).

3.1 Meiosis

La meiosis es un proceso especializado de división celular que sólo tiene lugar en la línea germinal para generar los gametos femeninos y masculinos, ovocitos y espermatozoides respectivamente (Larsen, 2003). Consiste en una sucesión de 2 divisiones celulares y nucleares cualitativamente distintas: la meiosis I y la meiosis II, que reducen el número de cromosomas del número cromosómico diploide ($2n$) al haploide ($1n$); de manera que pueda mantenerse el número de cromosomas propio de la especie de generación en generación (Carlson, 2004).

3.2 Etapas de meiosis e inhibición

Después de la última división mitótica de la célula germinal, se produce un periodo de síntesis de ADN, de modo tal que la célula que inicia la meiosis duplica la cantidad de ADN en su núcleo. La meiosis I suele llamarse división de reducción y en ésta se lleva a cabo el apareamiento de los cromosomas homólogos y los entrecruzamientos frecuentes. Esta primera división meiótica comienza con una prolongada profase llamada profase I, que se subdivide en cinco etapas: *leptoteno*, *cigoteno*, *paquiteno*, *diploteno* y *diacinesis* y continúa con la metafase I, anafase I y telofase I (Gilbert, 2005).

Cada célula hija de la primera división meiótica contiene el número haploide ($1n$) de cromosomas y cada cromosoma consta de 2 cromátidas conectadas por el centrómero ya que la profase I se inició con el contenido cromosómico ya duplicado. La segunda división meiótica, denominada división ecuatorial, es similar a una mitosis ordinaria, excepto que antes de la división, la célula es haploide ($1n$) (Carlson, 2004).

En la ovogénesis, a medida que las ovogonias entran en la primera división meiótica durante el periodo fetal, se denominan ovocitos primarios. Al nacimiento los ovocitos primarios continúan en meiosis hasta la etapa de diploteno de la primera división meiótica, etapa en la cual se detienen y no terminan su primera división meiótica hasta que han alcanzado la pubertad. En la fase de reposo del diploteno se presenta el primero de los dos bloqueos del

proceso meiótico. Durante este periodo el ovocito primario se prepara para cuando ocurra la fertilización y el desarrollo embrionario (Carlson, 2004).

En el ovario el número de células germinales queda limitado en la vida fetal, ya que una vez iniciada la meiosis, los ovocitos no pueden proliferar después del nacimiento. Los ovocitos fetales alcanzan su número máximo alrededor del quinto mes de la gestación (cerca de 70 millones en los 2 ovarios) a partir del cual se inicia un proceso de degeneración masiva denominado atresia (Revisado por Merchant, 1991).

En la pubertad reinicia la primera división meiótica durante la ovulación y resultan 2 progenies celulares desiguales. Una es una célula grande llamada ovocito secundario, y la otra es una célula pequeña que carece de función y se llama primer cuerpo polar. Los ovocitos secundarios comienzan la segunda división meiótica, pero de nuevo el proceso de la meiosis se detiene, esta vez en la metafase II. El estímulo para la liberación de este bloqueo de la meiosis es la fecundación por un espermatozoide (Fig. 7). Los ovocitos secundarios no fecundados no pueden terminar la segunda división meiótica y degeneran (Carlson, 2004).

El ratón presenta lo que se denomina meiosis inmediata, es decir, que se inicia un poco después de la diferenciación sexual de la gónada. Entre los 13 y 14 d.g. se observan ovocitos en las primeras etapas de la profase I. Entre los 15 y 16 d.g. la mayoría de los ovocitos se encuentran en etapas de cigoteno y paquiteno, esta última representada por la presencia de complejos

sinapteinémicos formados por el acoplamiento de los cromosomas homólogos. Es durante estas dos etapas cuando ocurre el proceso de degeneración de algunos ovocitos (Revisado por Merchant y Moreno, 2003).

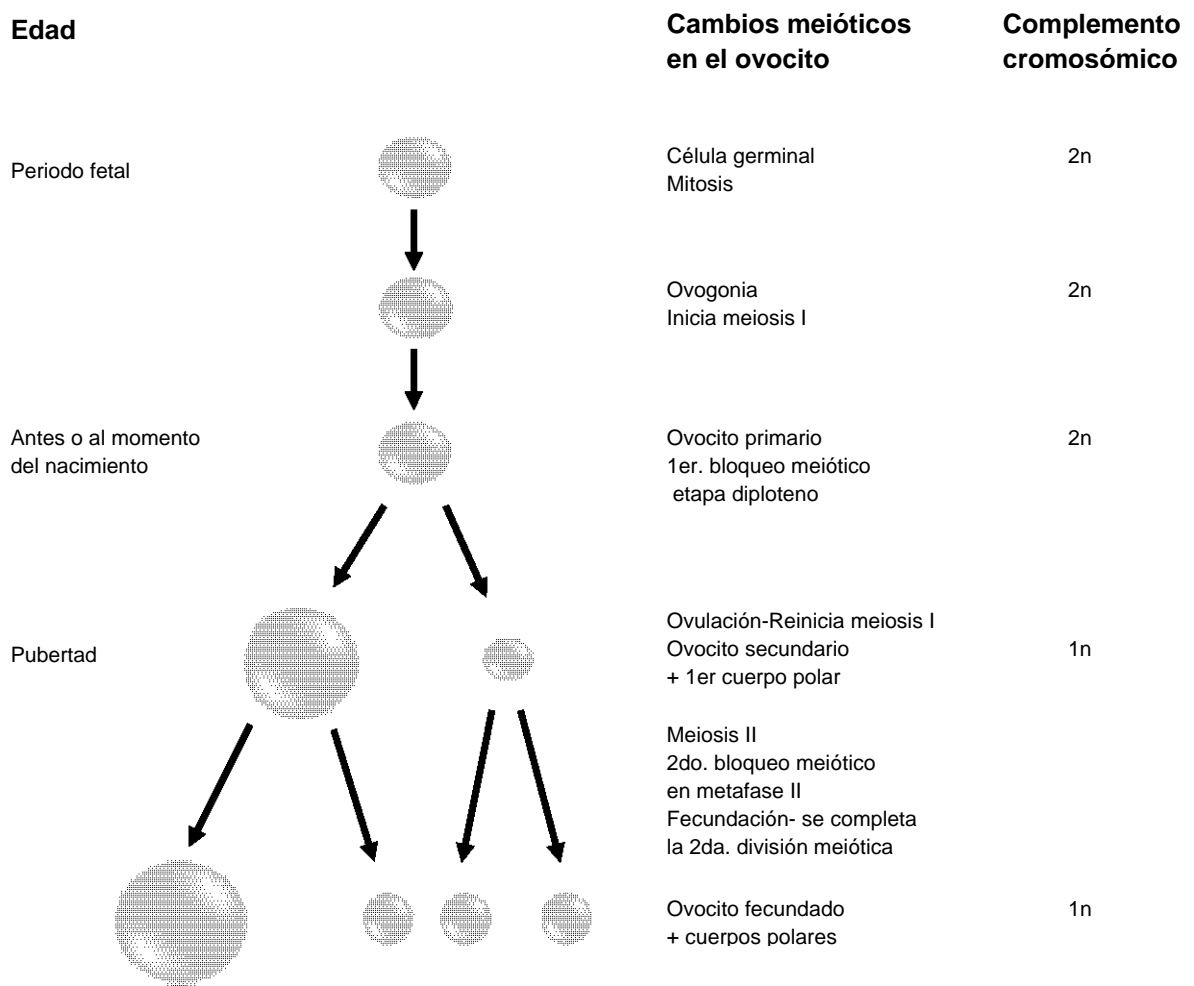


Fig. 7. Principales acontecimientos en la ovogénesis en el humano (Modificado de Carlson, 2004).

3.3 Foliculogénesis

Iniciada la meiosis I, principia a su vez el proceso de foliculogénesis que se define como la formación de los folículos primordiales en el ovario de los mamíferos. Este proceso inicia en la etapa embrionaria y continúa en la etapa postnatal. (Revisado por Merchant y Moreno, 2003).

3.3.1. Etapa embrionaria

En este periodo la foliculogénesis se divide en tres etapas:

- I. Los ovocitos están agrupados haciendo contacto directo entre sí en el interior de los cordones sexuales.
- II. Los ovocitos son separados por células epiteliales dentro de los cordones sexuales.
- III. Los ovocitos en conjunto con las células epiteliales y envueltos por una lámina basal, son individualizados por células del estroma (Merchant y Chimal, 1989) (Fig. 8).

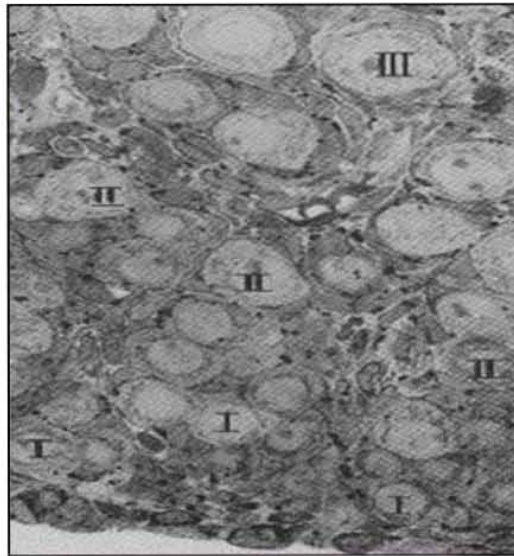


Fig. 8. Ovario de ratón recién nacido. Se muestran las tres etapas de la foliculogénesis (I, II, III) (Tomado de Merchant y Chimal, 1989).

3.3.2. Etapa postnatal

Al nacimiento, los folículos primordiales comienzan su transición a folículos en crecimiento, el ovocito aumenta su tamaño y las células foliculares planas que lo rodean proliferan y se tornan cúbicas formando entonces el folículo primario o preantral. En el ovario del ratón esto ocurre del 1 a los 6 dpp. A medida que se consolida el folículo primario se forma entre el ovocito primario y las células foliculares una membrana no celular translúcida llamada zona pelúcida. Enseguida, mediante una rápida proliferación mitótica la capa de células foliculares da origen a un epitelio estratificado: la membrana granulosa que rodea al ovocito. Las células foliculares se identifican entonces como células de la granulosa. Posteriormente, las células estromales derivadas del tejido conectivo ovárico comienzan a rodear al folículo formando una cubierta conocida como teca folicular que más adelante se diferencia en dos

capas: la teca interna, altamente vascularizada y glandular, formada por células mioideas, fibroblastos y células esteroideogénicas; y la teca externa que es una cápsula exterior formada por tejido conectivo fibroso (Carlson, 2004). La teca se diferencia en el ratón entre los 14 y los 19 dpp.

En la pubertad, continúa el desarrollo de los folículos, apareciendo cavidades llenas de líquido entre las células de la granulosa, llamado líquido folicular. Estas cavidades empiezan a coalescer hasta formar una única cavidad semilunar llamada antro folicular. Con la aparición de este antro el folículo se denomina ahora folículo secundario o antral. Conforme aumenta el tamaño del folículo secundario, aumenta también el antro y las células de la granulosa que rodean al ovocito permanecen intactas y forman el *cúmulo oóforo*. Las células del *cúmulo oóforo* que rodean al ovocito y permanecen unidas a él durante la ovulación, se denominan corona radiada (Sadler y Langman, 2004). Bajo múltiples influencias hormonales, el folículo aumenta de tamaño rápidamente y empieza a hacer una protusión en la superficie del ovario. En este punto se denomina folículo maduro o De Graff (Carlson, 2004) (Fig. 9).

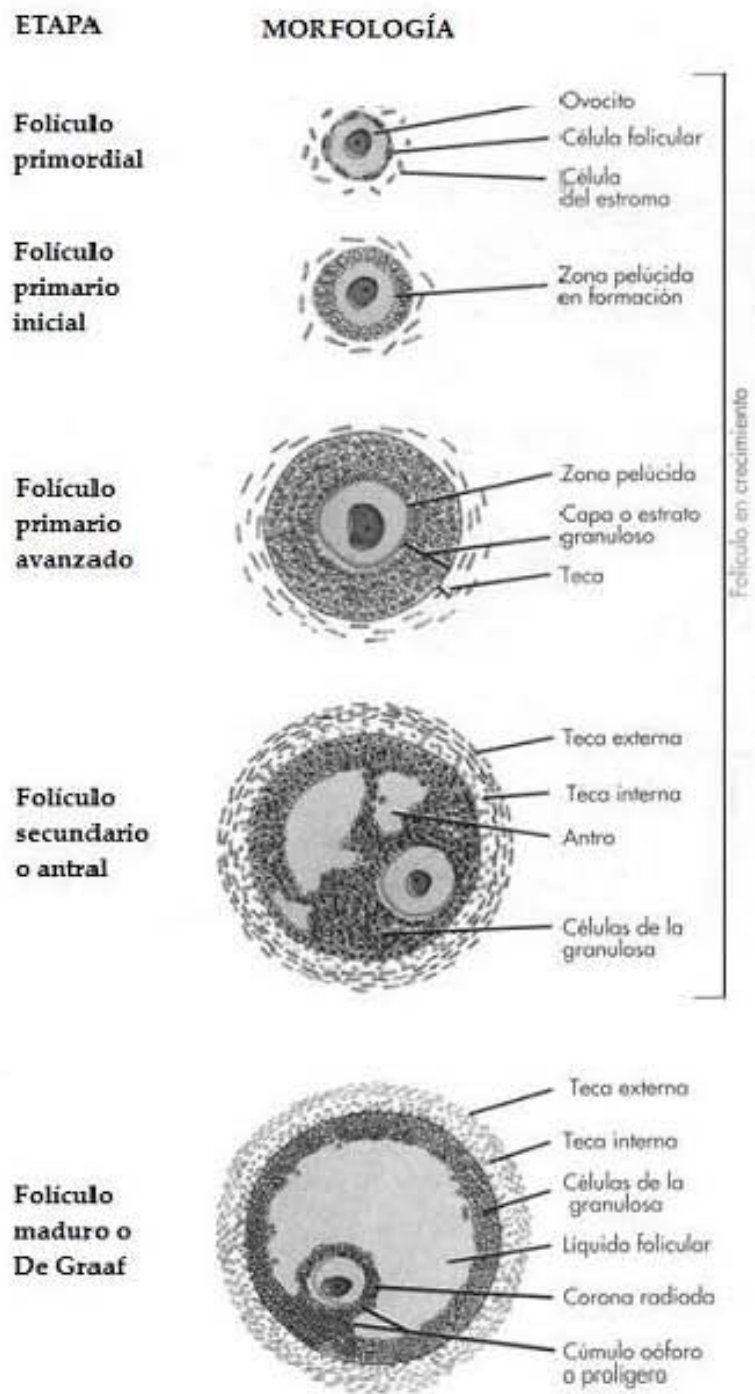


Fig. 9. Representación de las etapas del desarrollo de los folículos ováricos (Tomado de Ross y Rombell, 1997)

4. Hormona inhibidora de los conductos de Müller

En etapas tempranas del desarrollo fetal en mamíferos, la gónada es bipotencial y en ella están presentes un par de conductos: el conducto de Müller y el conducto de Wolff. Los primeros forman el oviducto, también conocido como trompas de Falopio; el útero y el tercio superior de la vagina. Los segundos, inducen la diferenciación del epidídimo, el conducto deferente y las vesículas seminales (Jamin y cols., 2003). La regresión de uno u otro conducto ocurre como consecuencia de la diferenciación gonadal (Fig. 10). En hembras la regresión del conducto de Wolf ocurre pasivamente en ausencia de testosterona, mientras que en machos, la regresión de los conductos de Müller es un proceso activo controlado por un factor testicular llamado Müllerian Inhibiting Substance (MIS) (Cate y cols., 1990) también conocido como Anti-müllerian hormone u hormona inhibidora de los conductos de Müller (AMH).

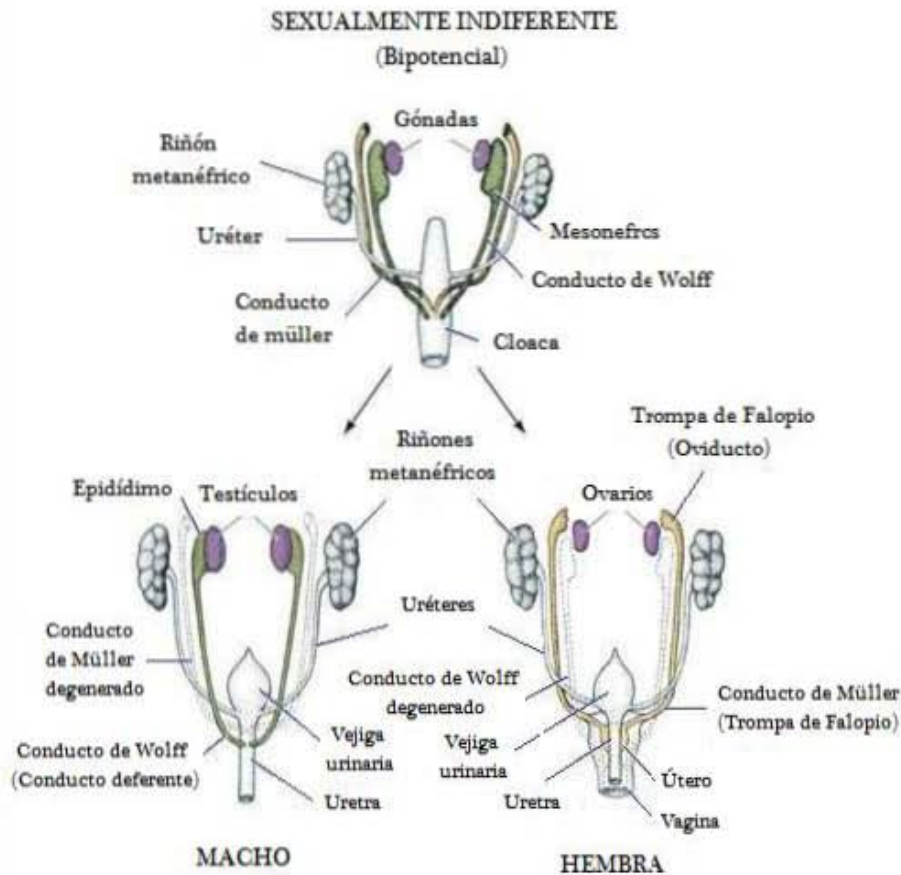


Fig. 10. Desarrollo de las gónadas y de sus conductos en los mamíferos (Modificado de Gilbert, 2005).

En 1940, fue sugerida por primera vez por Alfred Jost, la existencia de una hormona inhibidora de los conductos de Müller. Este investigador propuso que había un producto diferente a la testosterona que inducía la regresión de estos conductos al que nombró “inhibidor Mulleriano”. En 1978 se supó que se trataba de una proteína dimérica y fue en 1982 cuando Bernard Vigier y Patricia Donahoe localizan la actividad de MIS en las células de Sertoli y en las células de la granulosa del ovario postnatal. En 1986 los genes de MIS de bovino y humano fueron aislados y secuenciados por Richard Cate. En 1994 la ruta de

señalización de MIS comenzó a ser entendida al clonarse sus receptores (Rey y cols., 2003). Durante la embriogénesis masculina la AMH es secretada por las células de Sertoli en los testículos fetales e induce la regresión de los genitales internos femeninos. Su expresión es más alta durante el período que ocurre la regresión de los conductos de Müller y persiste después del nacimiento por corto tiempo en altos niveles y es aún producida en el testículo adulto pero en niveles bajos. La expresión de la AMH en el testículo después de que la regresión de los conductos de Müller se ha completado, sugiere que esta proteína puede tener un papel biológico adicional (Cate y cols., 1990).

La AMH pertenece a una familia de glicoproteínas involucradas en la regulación del crecimiento y diferenciación (Rey y cols., 2003). Es miembro de la familia del factor de crecimiento transformante β (TGF- β) que también incluye activinas, inhibinas, proteínas morfogenéticas del hueso (BMPs), complejo Decapentaplégico en *Drosophila melanogaster* y *Xenopus-1* (Behringer y cols., 1994). Además un número de funciones extra tales como el control de la maduración de células germinales y morfogénesis gonadal; inducción del descenso testicular; maduración pulmonar; inhibición de crecimiento de células transformadas (Lee y Donahoe, 1993) y regulación de la meiosis han sido propuestas para esta hormona (Cate y cols., 1990).

4.1. Organización del gen

El gen de la AMH en el humano se localiza en el cromosoma 19 p13.3 (Rey y cols., 2003), mientras que en el ratón es localizado en el cromosoma 10 (Lee y Donahoe, 1993). Está constituido por 5 exones y tiene una longitud de 2,75 Kpb. (Fig. 11-A). Este gen se ha clonado en ratón, rata, cerdo y pollo (Revisado por Rey y cols., 2003).

4.2. Estructura de la proteína

El péptido codificado por la AMH, es una molécula altamente conservada. Es una glicoproteína dimérica con un peso molecular de 140 KDa (Rey y cols., 2003) compuesta de dos subunidades idénticas de 70 KDa cada una, característica que comparte con otros factores de crecimiento como la inhibina y la activina (Revisado por Villalpando, 2001). Estudios previos demuestran que AMH es sintetizada como un precursor de 560 aminoácidos (aa) en humanos y 575 en bovino (Fig. 11-B). La expresión de MIS es potenciada por SOX9 en las células de Sertoli al inicio de la diferenciación testicular y es regulada por factores como SF-1, GATA, así como por WT-1, DAX1 Y FSH (Revisado por Anttonen y cols., 2003).

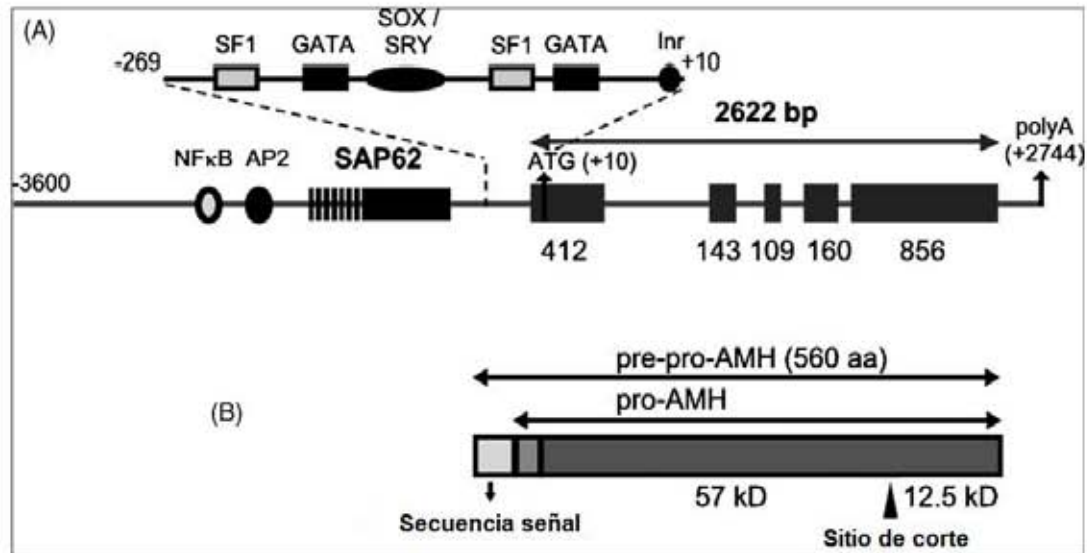


Fig. 11. A. Gen y promotor de la AMH en el humano.
B. Monómero de la proteína (Tomado de Rey y cols., 2003).

4.3. Expresión en el ovario

En contraste con la expresión de la AMH en ratas y ratones machos, la AMH no se expresa en roedores hembra antes del nacimiento y esta falta de expresión garantiza una diferenciación normal de las estructuras internas del tracto reproductor femenino (Durlinger y cols., 2002). La AMH, fue detectada por primera vez por RIA en fluido folicular de bovino y después fue detectada por inmunohistoquímica en células de la granulosa de ovarios de bovino (Ueno y cols., 1989). La ontogenia de la expresión de la AMH durante el desarrollo folicular se ha estudiado en vaca, oveja y rata. En el ovario de rata, la AMH fue detectada en células de la granulosa de folículos preantrales y antrales, pero no en folículos primordiales, atrésicos, células de la teca o en cuerpo lúteo (Cate y cols., 1990). Los niveles más altos de la AMH en esta misma especie se detectan

en las capas más internas de las células de la granulosa que están en contacto con el ovocito y cercanas a la cavidad antral (Ueno y cols., 1989). Los mecanismos que regulan la expresión ovárica de la AMH aún son desconocidos, pero la expresión del receptor de esta hormona en las células de la granulosa sugiere que puede desempeñar un papel en la fisiología del ovario (Rey y cols., 2003).

5. Papel de la AMH

Estudios previos plantean que la AMH participa en funciones que son fundamentales en la diferenciación sexual gonadal morfológica y endocrina del macho y de la hembra (Vigier, 1989).

5.1 En la morfogénesis gonadal

En experimentos realizados por Vigier y colaboradores (1987), se demostró que la AMH inducía una masculinización morfológica gonadal a través de la formación de estructuras parecidas a cordones testiculares en un cultivo de gónadas femeninas de ratas fetales en presencia de AMH, provocando una reversión sexual gonadal, lo cual sugiere que la AMH desempeña un papel importante en la morfogénesis gonadal (Vigier y cols., 1987).

5.2 En la secreción de estrógenos y andrógenos

La diferenciación sexual endocrina de los mamíferos está caracterizada por la producción de testosterona en los testículos y de 17- β estradiol (17- β E₂) en los ovarios. Para determinar si la AMH también afectaba el patrón de secreción hormonal de las gónadas fetales, Vigier y colaboradores (1989), realizaron experimentos cultivando ovarios fetales de ovino en presencia de AMH. Estos autores encontraron que esta hormona inducía la síntesis de testosterona aumentando los niveles de este andrógeno, provocando una disminución de la biosíntesis de 17- β E₂ debido a la inhibición de la actividad de la aromatasa (enzima que transforma los andrógenos a estrógenos). Estos resultados sugieren que la AMH induce una reversión sexual endócrina por la inhibición de la actividad de la aromatasa en el ovario, efecto que también fue observado en ovarios fetales de conejo y de rata (Vigier y cols., 1989).

III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El sexo del embrión queda determinado en el momento de la fecundación; dependiendo si el espermatozoide porta un cromosoma X o un cromosoma Y. En el primer caso, la hembra (XX) iniciará la foliculogénesis. En los roedores este proceso inicia en la etapa fetal entre los 16 y 18 d.g., en este periodo el ovario está formado primordialmente por cordones ovígeros que contienen ovogonias o células reproductoras. A los 18 d.g.; estas células empiezan a ser individualizadas por invasión de células pregranulosas. Al nacimiento el ovario está formado por folículos primordiales, los cuales inician una comunicación cruzada con el ovocito a través de la secreción de varias proteínas, entre la que se encuentra la AMH. Estudios previos realizados en rata demostraron que esta hormona inhibe el desarrollo de folículos primordiales a preantrales y disminuye la respuesta a FSH. La AMH aparentemente también está involucrada en la regulación de estrógenos y proliferación de las células de la granulosa. A pesar, de la información que se tiene actualmente en los mamíferos, en el ratón *Mus musculus* no se ha establecido cuando se inicia la expresión de la AMH y si ésta aumenta de acuerdo a la edad del ratón. Este enfoque inmunocitoquímico servirá para establecer el patrón protéico de la expresión de la AMH en el ratón para estudiar su regulación por hormonas sexuales y factores de transcripción.

Con base en los antecedentes descritos, se plantea la siguiente hipótesis.

IV. HIPÓTESIS

Sí la AMH se expresa desde el inicio del desarrollo en el ovario del ratón *Mus musculus*, entonces su expresión aumentaría de acuerdo al desarrollo de este órgano, en etapas en las cuales el crecimiento es independiente del control hormonal de la hipófisis entre los 2 y 30 dpp. Asimismo, en el momento que se inicia el establecimiento funcional del eje hipotálamo-hipófisis-gónada, a los 35 dpp., aumentaría el número de folículos que expresen la AMH.

V. OBJETIVOS

Objetivo general

Establecer el patrón de expresión de la hormona inhibidora de los conductos de Müller durante el desarrollo folicular temprano del ratón *Mus musculus*.

Objetivos particulares

1. Establecer la técnica de preservación morfológica y de conservación antigénica de la AMH.
2. Determinar en qué momento se inicia la expresión de la AMH durante el desarrollo del ovario del ratón *Mus musculus*.
3. Establecer si la expresión de esta proteína aumenta en el ovario prepúber de 10 y 15 dpp. y en el púber de 20 a 30 dpp.
4. Determinar su expresión a los 35 dpp. al momento de establecerse el eje hipotálamo-hipófisis-gónada.

VI. MATERIAL Y MÉTODOS

1. Reactivos

Los reactivos utilizados en esta tesis fueron de grado analítico.

2. Animales de experimentación

Se emplearon ratones hembras de 2, 5, 10, 15, 20, 25, 30 y 35 dpp. de la cepa CD1, ampliamente utilizada en experimentación debido a su fácil manejo, bajo costo, periodo corto de gestación y fácil reproducción. Se formaron grupos control y grupos experimentales de cada edad los cuales fueron mantenidos en el Bioterio del Instituto de Investigaciones Biomédicas a 18 °C con ciclos de luz y oscuridad de 12/12 h. y humedad relativa del 80%. Los animales fueron alimentados con alimento esterilizable Harlan Tekland México LM-485 y con agua estéril acidificada pH 2.5 para mantenerlos libres de bacterias y parásitos.

3. Aislamiento de muestras biológicas

Los grupos de cada edad fueron sacrificados por dislocación cervical, se les realizó una incisión en forma de "V" en la región abdominal y se extrajeron los ovarios, se colocaron sobre una gota de Tissue Tek (medio de inclusión para cortes en congelación) en una caja Petri y se retiró el tejido adyacente al ovario.

Una vez aislados los ovarios, a estos se les aplicaron diferentes técnicas de fijación y de inclusión para determinar en qué condiciones se observaba una mejor morfología. Con base a las observaciones obtenidas en los cortes de los diferentes grupos, se establecieron dos técnicas idóneas para preservar la morfología en las diferentes edades del ovario.

La primera técnica se utilizó en los grupos de ovario de 5, 10 y 15 dpp. y consistió en: fijación de antígenos; inclusión de órganos; obtención de cortes e inmunodetección.

4. Fijación de antígenos

Los ovarios de los grupos de 5, 10 y 15 dpp., se colocaron en un frasco con solución fijadora de glutaraldehído al 1.25 % en Buffer de Fosfatos (PB) 0.1 M durante 1 h. a 4 °C. Se retiró la solución fijadora y se realizaron 3 lavados colocando PB en el frasco y retirando cada 10 min.

5. Inclusión de órganos

Se colocó Tissue Tek en un contenedor de pastilla y se dejó sobre hielo. En una caja Petri estéril también colocada sobre hielo y conteniendo Tissue Tek, se transfirió el ovario con una pipeta Pasteur y con una aguja de punta roma se incluyó la muestra, enseguida se transfirió al contenedor de pastilla colocándola

de manera transversal o longitudinal para obtener cortes en diferentes posiciones. Los contenedores fueron almacenados a -20 °C para posteriormente obtener los cortes.

6. Obtención de cortes

Se colocó Tissue-Tek en el portamuestra y se montó la muestra en el criostato (Leyca CM1850), se obtuvieron cortes de 10 µm a -20 °C, se montaron en laminillas tratadas con Tespa (mezcla que cambia las propiedades del vidrio y permite la adhesión de cortes biológicos), y se mantuvieron en vacío a 4 °C hasta realizar la inmunodetección.

7. Inmunodetección

En las laminillas se formó un anillo utilizando un pegamento (cemento iris) alrededor de los cortes para formar un pozo. Se hicieron 2 lavados de 10 min. cada uno con PB 0.1 M y se incubó por 30 min. con reactivo para bloquear la acción de la peroxidasa (DACO Cytomation). De nuevo se hicieron 3 lavados de 10 min. con PB 0.1 M. Enseguida se incubó con una solución de bloqueo (ver Apéndice 1) durante 2 h. Se retiró la solución de bloqueo y se adicionó el anticuerpo primario resuspendido en solución de bloqueo dilución 1:10 (a los grupo control de cada edad no se les adicionó el anticuerpo) y se incubó durante toda la noche en cámara húmeda. Se realizaron 3 lavados de 10 min.

cada uno con PBS + Tritón al 0.1 %. Posteriormente se adicionó el anticuerpo secundario dilución 1:100 en PBS + Tritón al 0.1 % y 2 % de Albúmina Suero Bovino (BSA) y se incubó por 2 h. Nuevamente se hicieron 3 lavados con PBS + Tritón al 0.1 %, después se agregó la solución ABC (ver Apéndice 2) y se incubó por 1 h. Se hicieron 4 lavados de 10 min. cada uno con PB 0.1 M y se adicionó la diaminobenzidina (DAMB) (ver Apéndice 3) en oscuridad durante 5 min. Finalmente, se retiró el anillo de las laminillas y se lavó con agua bidestilada filtrada para eliminar impurezas y evitar la adherencia de otras partículas.

En los ovarios de los grupos de 2, 20, 25, 30 y 35 dpp. se utilizó la segunda técnica. Inmediatamente después del aislamiento de las muestras, se hizo una inclusión en corcho, enseguida se obtuvieron cortes, posteriormente se realizó una fijación (postfijación) y finalmente la inmunodetección.

8. Inclusión en corcho

Se colocó una gota de Tissue-Tek sobre un corcho y se incluyó en ella el ovario en forma transversal o longitudinal. Enseguida se transfirió a un recipiente conteniendo 2-metilbutano colocado dentro de nitrógeno líquido a -20 °C. Se retiraron y se almacenaron a la misma temperatura para posteriormente obtener los cortes como se indica en el punto 6.

9. Postfijación

Las laminillas se colocaron dentro de un vaso de Kopplin conteniendo solución fijadora de p-formaldehído al 4 % en PB 0.1 M, durante 30 min. a 4 °C y se secaron perfectamente para llevar a cabo la inmunodetección.

10. Fotografías

Los cortes se observaron en un microscopio Nikon (Eclipse E600 FN) con los objetivos de 40X (ovario de 2 dpp.), de 20X (ovario de 5 dpp.) y de 10X (ovario de 10 a 35 dpp.) y se capturaron fotografías con un sistema de análisis de imagen con el programa Axiovision.

VII. RESULTADOS

Expresión de la AMH durante el desarrollo folicular temprano del ratón *Mus musculus* de la cepa CD-1.

1. Expresión en el ovario infantil

La inmunodetección de la AMH en el ovario del grupo control de ovario infantil de 2 dpp. fue negativa para este órgano en donde sólo se observaron folículos primordiales formados por ovocitos rodeados por una capa de células de la granulosa (Fig. 12-A). Asimismo, tampoco se encontró la presencia de esta proteína en el grupo control del ovario de 5 dpp., en el cual se pueden identificar también folículos preantrales pequeños (Fig. 12-C). En el ovario de 2 dpp., la presencia de la AMH se detectó en las células pregranulosas de los folículos primordiales que se encuentran distribuidos en todo el ovario y están formados por una capa de células foliculares (Fig. 12-B). En el ovario de 5 dpp. la AMH se observó en los folículos primordiales y en los primeros folículos en desarrollo (primarios o preantrales) ubicados en la parte central del ovario, los cuales están formados por 2 ó 3 capas de células foliculares (Fig. 12-D).

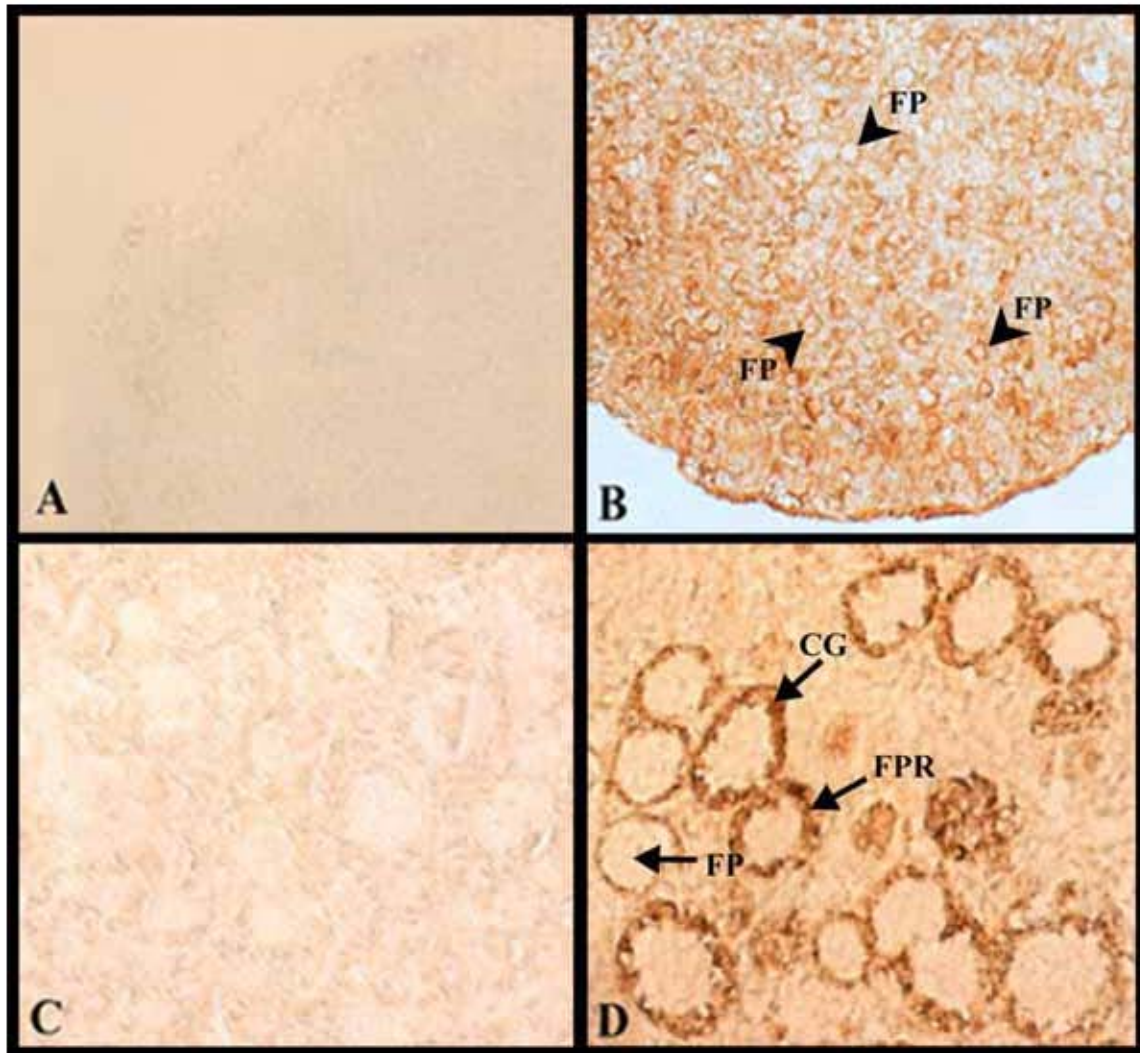


Fig. 12. Expresión de la AMH en el ovario del ratón infantil de 2 y 5 dpp.
A. Corte del grupo control de un ovario de 2 dpp. Nótese la ausencia de la expresión de la AMH en donde sólo se observan folículos primordiales. **B.** Corte del grupo experimental de ovario de 2 dpp. La AMH se expresa en la capa de células pregranulosas que rodean a los ovocitos de los folículos primordiales (FP) que se encuentran formando el ovario a esta edad. 400 X. **C.** Corte control de ovario de 5 dpp., no se detectó la presencia de la proteína. **D.** Corte experimental de ovario de 5 dpp. Se muestra expresión de la AMH en las células de la granulosa (CG) de los folículos primordiales (FP) y una mayor expresión en las células de la granulosa de los folículos primarios o preantrales (FPR). 200X.

2. Expresión en el ovario prepúber

En los grupos control del ovario prepúber de 10 y 15 dpp., no se detectó la presencia de la hormona en ninguno de los tipos celulares presentes que forman el ovario en estas edades (Fig. 13-A y 13-C). En el ovario de 10 dpp. se encontraron algunos folículos primordiales y una gran cantidad de folículos en desarrollo formados por 2 a 5 capas de células foliculares positivos a la reacción de la AMH (Fig. 13-B). En el ovario de 15 dpp., la presencia de la AMH se detectó en la células de la granulosa de folículos primarios o preantrales y de secundarios o antrales que constituyen en gran parte al ovario de esta edad y que se caracterizan por presentar el antro folicular y estar formados por más de 5 capas de células de la granulosa (Fig. 13-D).

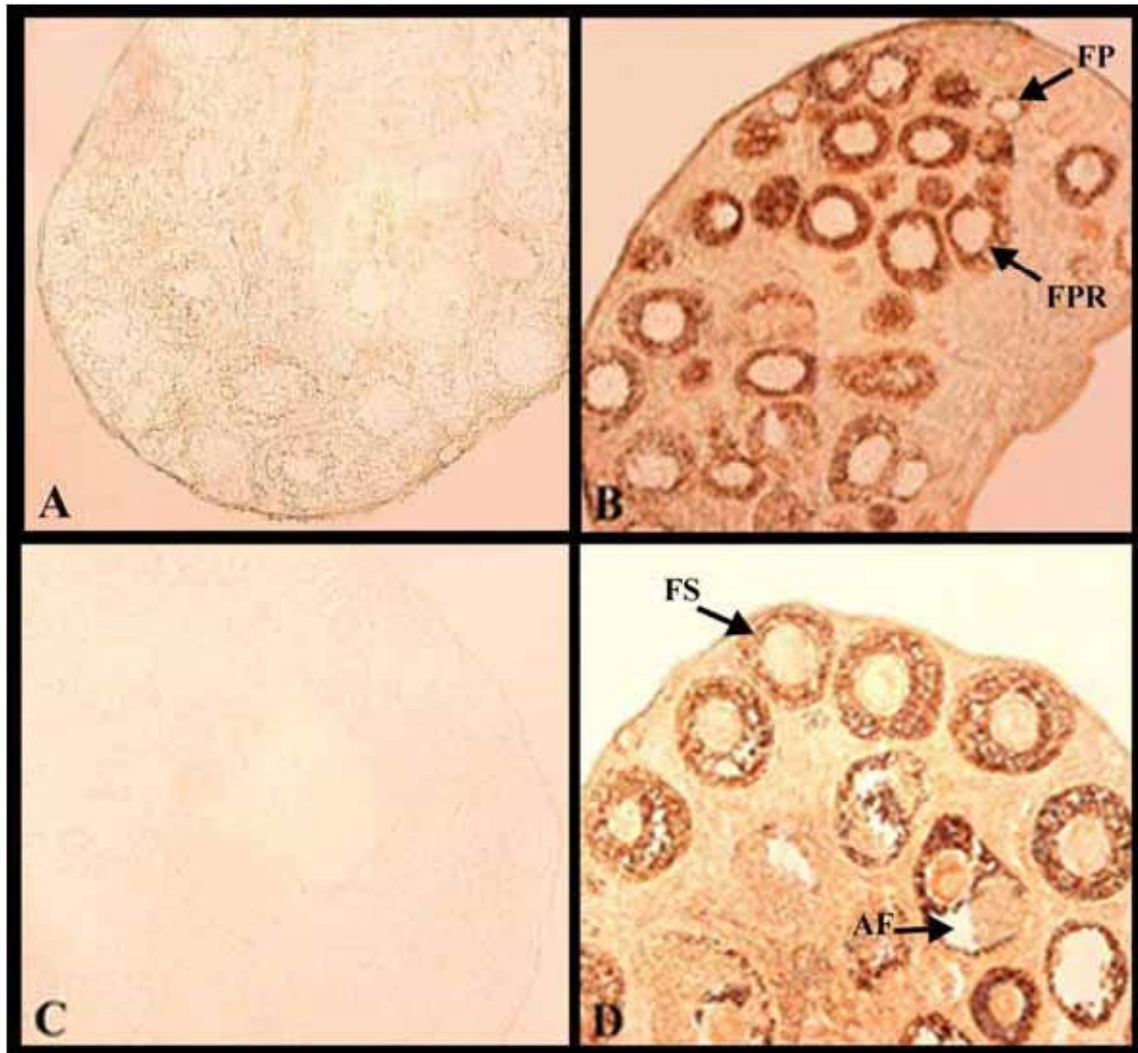


Fig. 13. Expresión de la AMH en el ovario del ratón prepúber de 10 y 15 dpp. A. Corte del grupo control de un ovario de 10 dpp. La expresión de la AMH no se presenta en ninguno de los folículos observados. B. Corte transversal del grupo experimental de un ovario de 10 dpp. La expresión de la AMH se observa en las células de la granulosa de los folículos primordiales (FP) y de los folículos primarios (FPR) que predominan a esta edad. C. Grupo control de ovario de 15 dpp. Los folículos muestran reacción negativa a la AMH. D. Corte experimental de ovario de 15 dpp. La expresión de la AMH se detecta en las células de la granulosa de los folículos primarios y de los abundantes folículos secundarios (FS) en los cuales se observa la formación del antro folicular (AF). 100X.

3. Expresión en el ovario púber

En los cortes de los grupos control no se detectó la expresión de la AMH en ninguno de los tipos de folículos que están formando el ovario púber a los 20, 25 y 30 dpp. (Figs. 14-A, 14-C y 15-A respectivamente). En el ovario de 20 dpp. la AMH se expresó en los folículos primordiales, primarios y secundarios formados por 6 o más capas de células de la granulosa. Así como en folículos maduros o De Graaf en los cuales se observó a las células foliculares que se encuentran alrededor del ovocito formando la corona radiada (Fig. 14-B). En el ovario de 25 dpp. se encontró una gran cantidad de folículos secundarios y de folículos terciarios o De Graaf, detectándose en estos últimos una expresión más alta a excepción de algunos folículos en los cuales la expresión fue nula debido a la presencia de células atrésicas (Fig. 14-D). En el ovario de 30 dpp. la expresión de la proteína se detectó en los folículos de diferentes etapas de desarrollo pero no se observó en los folículos atrésicos ni en las células de la teca (Fig. 15-B).

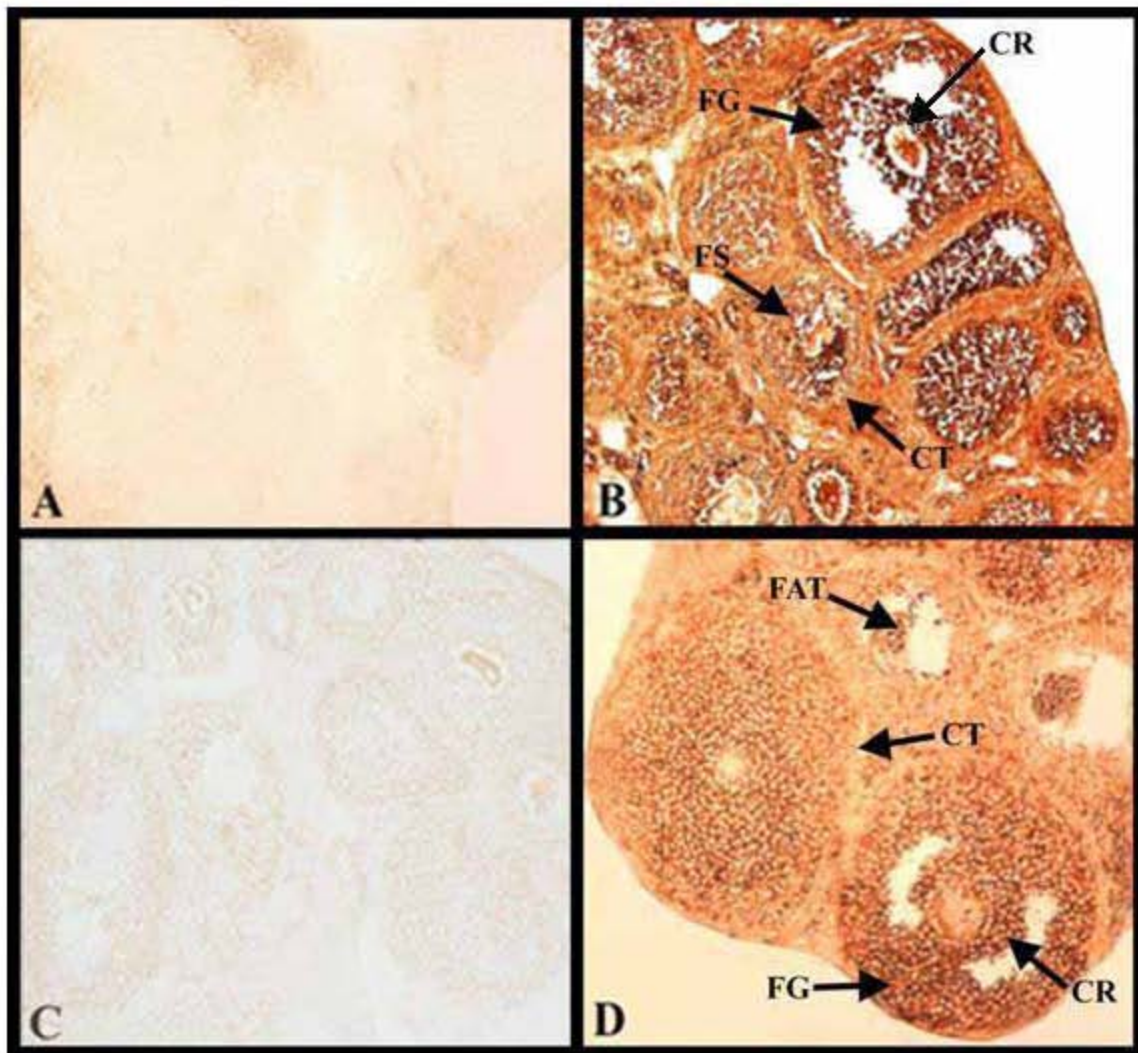


Fig. 14. Expresión de la AMH en el ovario del ratón púber de 20 y 25 dpp. A. Corte de un control de ovario de 20 dpp. No se detecta expresión de la AMH en ninguna extirpe celular presente. B. Corte experimental de ovario de 20 dpp., la expresión de la AMH se observó en las células de la granulosa de los folículos primarios, de los folículos secundarios (FS) y en las células de la granulosa que forman la corona radiada (CR) de los folículos maduros o De Graaf (FG). C. Corte control de ovario de 25 dpp. Se nota la ausencia de expresión de la AMH. D. Corte del grupo experimental de ovario de 25 dpp. Se presenta mayor expresión de la AMH en los folículos De Graaf ubicados en la periferia del ovario. No se detectó expresión de la AMH en las células de la teca (CT) ni en las células de los folículos atrécicos (FAT). 100X.

4. Expresión al inicio del control hipofisiario

En el grupo control del ovario de 35 dpp., la expresión de la proteína no se presentó en ninguna de las estirpes celulares ubicadas en la corteza (Fig. 15-C). En los cortes del ovario de 35 dpp. se observó un aumento en el número de folículos en las diferentes etapas del desarrollo en los cuales se detectó la presencia de la AMH (Fig. 15-D).

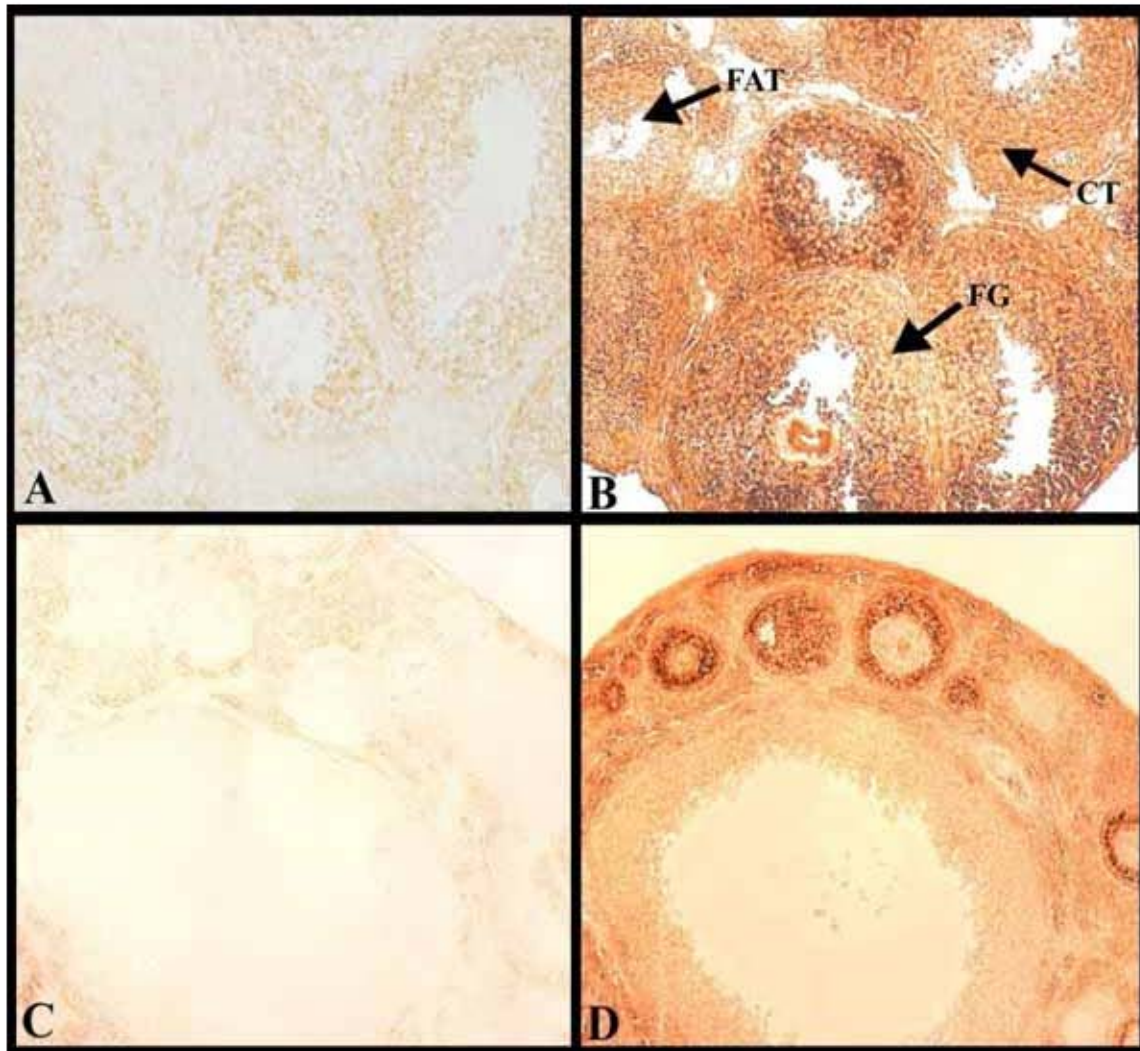


Fig. 15. Expresión de la AMH en el ovario del ratón de 30 y 35 dpp. A. Grupo control de ovario de 30 dpp. No se observa expresión de la AMH en las células foliculares. B. Corte de grupo experimental de ovario de 30 dpp. Se detecta expresión de la AMH en las células de la granulosa de los folículos De Graaf (FG) y la expresión o es nula en las células de la teca (CT) y en los folículos atrésicos (FAT). C. Control de un ovario de 35 dpp. Se observa reacción negativa para la AMH en todos presentes. D. Corte experimental de ovario de 35 dpp. La expresión de la AMH se detecta en las células de la granulosa de los folículos que se encuentran en diferentes etapas de desarrollo. 100X.

VIII.DISCUSIÓN

En la presente tesis se describe la expresión de la AMH en etapas del desarrollo folicular del ratón antes de que se establezca el control ejercido por el eje hipotálamo-hipófisis-gónada y al momento en que se inicia éste. Se sabe que la principal función de la AMH es inducir la regresión de los conductos de Müller durante la diferenciación sexual en el macho (Durlinger y cols., 2002). Estudios previos describen que en el caso de las hembras en la etapa embrionaria, la AMH aparentemente no se expresa. Su actividad ha sido detectada en ovario postnatal y la inmunohistoquímica sugiere que es producida por las células foliculares. La falta de expresión de esta proteína en el ovario del embrión, es crucial ya que su presencia podría ejercer un efecto masculinizante en el tracto reproductor femenino (Münsterberg y Novell-Badge, 1991). Tal como lo demostraron Vigier y colaboradores (1987), quienes observaron que la exposición de ovarios fetales de rata a la AMH, provocaba una reversión sexual morfológica en esta especie induciendo la formación de cordones testiculares (Vigier y cols., 1987).

La acción biológica de esta hormona es mediada por su receptor tipo II en el ovario postnatal. Esta proteína desempeña un papel importante en la foliculogénesis. Se observó que en la rata, esta hormona inhibe el reclutamiento de folículos primordiales a folículos en crecimiento y disminuye la respuesta de éstos a la FSH (Durlinger y cols., 2002).

Los resultados de esta investigación muestran que la AMH comienza a expresarse en el ovario infantil de 2 dpp. en la única capa de células de la granulosa que rodea a los folículos primordiales. La expresión continuó detectándose en los folículos en crecimiento (primarios y secundarios) y en los folículos maduros terciarios o De Graaf) de los ovarios de 5 a 35 dpp., observándose un aumento de expresión en las células de la granulosa de la mayoría de los folículos de acuerdo a la etapa de desarrollo folicular ovárico. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por hibridación *in situ*, realizada por Münsterberg y Lovell-Badge (1991). Este grupo de investigadores detectó la expresión del RNAm en el ovario de 6 dpp. cuya expresión está restringida a células de la granulosa y mencionan también que la expresión de ésta proteína fue dependiente del grado de desarrollo folicular, pero no de la edad del ovario (Münsterberg y Badge, 1991).

Estudios previos muestran que una función importante de la AMH, es inhibir la meiosis en el ovocito, quizá previniendo una maduración máxima previa a la selección para la ovulación y la subsecuente fertilización. Estos estudios sugieren que la AMH quizá contribuye a mantener un número constante de folículos en proceso de maduración (Donahoe, 1992).

Por otra parte, no se observó la expresión de la hormona en algunos folículos de los ovarios a partir de los 25 dpp. Esto hace suponer que aquellos folículos pudieran encontrarse en un proceso de atresia folicular, ya que diversos estudios revelan que la AMH no se expresa en folículos atrésicos

(McGee y cols., 2001). Estas observaciones, sugieren que la AMH podría desempeñar un papel protector en las células germinales.

Investigaciones hechas por Anttonen y colaboradores (2003) plantean que la expresión de la AMH en el ovario, es regulada por el cofactor Fog-2, el factor de transcripción Gata-4 y el gen SOX9 (Anttonen y cols., 2003), aunque el mecanismo que regula esta expresión aún es desconocido.

Los datos obtenidos en el ovario del ratón a los 35 dpp., momento en el que se establece el eje hipotálamo-hipófisis-gónada, demuestran que el desarrollo folicular ovárico del ratón en esta etapa, es dependiente de la FSH y de la LH, ya que se observó un aumento considerable en el número de folículos en diferentes etapas de desarrollo. Estas observaciones apoyan los estudios realizados por Cate y colaboradores (1990) quienes plantean que el desarrollo de los folículos en el ovario de los mamíferos es un proceso complejo en el cual células accesorias (de la granulosa y de la teca) responden a las gonadotropinas para el control de la maduración y liberación (ovulación) del ovocito (Cate y cols., 1990).

Nuestros datos también concuerdan con los experimentos realizados por Durlinger y colaboradores (2002) en ratones Knock-out para la AMH, en los cuales se describe la acción inhibitoria de la AMH sobre el efecto estimulador de la FSH en folículos en crecimiento. Estos investigadores observaron que altas concentraciones de FSH estimulan el crecimiento folicular tanto en número como en etapas de desarrollo, comparado con los ratones normales (Durlinger y

cols., 2002). Asimismo, se ha encontrado que la AMH también inhibe la producción de la aromatasa, induciendo una reversión sexual endócrina, lo cual sugiere que la AMH regula negativamente a esta enzima (Vigier y cols., 1989).

Debido a que la expresión de la AMH esta restringida a células ováricas de la granulosa, esta hormona puede ser útil como marcador tumoral de células de la granulosa así como un agente quimioterapéutico en tumores del epitelio ovárico (Durlinger y cols., 2002).

Hay evidencias de que la AMH de bovino puede inhibir tumores del tracto reproductor femenino. Trabajos realizados con MIS humano altamente purificado muestran que éste puede también suprimir tumores originados en los conductos de Müller y podría tener además, utilidad clínica dirigida a neoplasias ginecológicas (Donahoe, 1992).

En resumen, observamos que la AMH se expresa en el ovario del ratón desde el inicio del desarrollo de este órgano en las células de la granulosa; que su expresión aumenta de acuerdo al grado de desarrollo folicular y que no se expresa en folículos atrésicos.

IX. CONCLUSIONES

- ✚ La AMH se expresa desde el inicio del desarrollo en el ovario del ratón a partir de los 2 dpp.
- ✚ La expresión de la AMH aumenta de acuerdo a la edad del ovario y al grado de desarrollo folicular.
- ✚ Al momento de establecerse el eje hipotálamo-hipófisis-gónada hay mayor número de folículos que expresan la AMH.
- ✚ En conjunto, estos datos nos conducen a pensar que la AMH podría desempeñar un papel protector en las células germinales y formar parte del mecanismo que controla la proliferación de las células de la granulosa.

X. REFERENCIAS

1. Anttonen, M., Ketola, I., Parviainen, H., Pusa, A. y Heikinheimo, M., 2003. FOG-2 and GATA-4 Are Coexpressed in the Mouse Ovary and Can Modulate Müllerian- Inhibiting Substance Expression. **Biol. Reprod.** 68:1333-1340.
2. Behringer, R.R., Finegold, M.J. y Cate, R.L., 1994. Müllerian-inhibiting Substance function during mammalian sexual development. **Cell.** 79:415-425.
3. Carlson, B. M., 2004. **Embriología humana y biología del desarrollo.** 2da. ed. Ediciones Harcourt, S.A., Madrid, España. Pág. 2-12, 368-388.
4. Cate R.L., Donahoe, P.K. y MacLaughling, 1990. Müllerian inhibiting Substance **Handbook Experimental Pharmacology.** 95:179-210.
5. Donahoe, P.K., 1992. Müllerian Inhibiting Substance in Reproduction and Cancer. **Mol. Rep. Dev.** 32:168-172.
6. Durlinger, A., Visser, J. y Themmen, A., 2002. Regulation of ovarian fuction: the role of anti- Müllerian hormone. **Reproduction.** 124:601-609.
7. Gilbert, S., 2005. **Biología del desarrollo.** 7ª ed. Editorial Médica Panamericana, Buenos Aires. Pág. 585-614, 655-685.
8. Jamin, S.P., Arango, N.A., Mishina, Y., Hanks, M.C. y Behringer, R.R., 2003. Genetic studies of the AMH/MIS signaling pathway for Müllerian duct regression. **Mol. Cell. Endocrinol.** 221:15-19.

9. Larsen, W. J., 2003. **Embriología humana**. 3ª ed. Editorial Elsevier España, S. A. Pág. 1-25.
10. Lee, M. M. y Donahoe, P.K., 1993. Müllerian Inhibiting Substance: A gonadal Hormone with Multiple Functions. **Endocrinology**. 14:152-164.
11. McGee, E., Smith, R., Spears, N., Nachtigal, M., Ingraham, H. y Hsueh, A., 2001. Müllerian Inhibitory Substance Induces Growth of Rat Preantral Ovarian Follicles. **Biol. Reprod**. 84:293-298.
12. Merchant, H., 1991. **El sexo gonadal**. Memorias del Congreso Conmemorativo del Jubileo del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM. México. Tomo I. Pág. 451-460.
13. Merchant, H. y Chimal, J., 1989. The ontogeny of primordial follicles in the mouse ovary. **Dev. Ultrastr. Reprod**. Pág. 55-63.
14. Merchant H. y Moreno N., 2003. **Biología celular y molecular**. 1ra. ed. Prentice Hall. Pág. 718-815.
15. Münsterberg, A. y Lovell-Badge, R., 1991. Expression of the mouse anti-Müllerian hormone gene suggest a role in both male and female sexual differentiation. **Development**. 113:613-624.
16. Rey R., Lukas C., Lasala C. y Bedecarrás P., 2003. AMH/MIS: What we know already about the gene, the protein and its regulation. **Mol. Cell. Endocrinol**. 211:21-31.
17. Ross M.H, y Romrell L.J., 1997. **Histología, Texto y Atlas Color**. 3ra. ed. Editorial Médica Panamericana. Pág. 674-681.

18. Sadler T. y Langman, 2004. **Embriología médica**. 9ª ed. Editorial Panamericana S. A. Pág. 3-25.
19. Ueno, S., Takahashi, M., Manganaro, T., Ragin, R. y Donahoe, P., 1989. Cellular localization of Müllerian Inhibiting Substance in the Developing Rat ovary. **Endocrinology**. 124:1000-1006.
20. Vigier, B., Forest, M., Eychenne, B., Bezard, J., Garrigou, O. y Robel, R., 1989. Anti-Müllerian hormone produces endocrine sex reversal of fetal ovaries. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**. 86:3684-3688.
21. Vigier, B., Watrin, F., Magre, S., Tran D. y Josso, N., 1987. Purified bovine AMH induces a characteristic freemartin effect in fetal rat prospective ovaries exposed to it in vitro. **Development**. 100:43-55.
22. Villalpando I., 2000. **Sinfonía de genes gonadales**. Ciencia y Desarrollo. Sep-Oct . Pág. 32-41.
23. Villalpando I., 2001. Péptidos en la biología de la reproducción de los mamíferos. **Biología de la reproducción II**. Ed. Javier Velazquez Moctezuma. UAM-PUIS. Pág. 121-132.

XI. APÉNDICE

Apéndice 1

Solución de bloqueo

Para 5 ml

PB 4935 μ L

BSA 0.25 g

Tritón 15 μ L

Gelatina 50 μ L

Apéndice 2

Solución ABC¹

Para 1 mL

PB 1 mL

Reactivo A² 10 μ L

Reactivo B² 10 μ L

Apéndice 3

Diaminobenzidina

Sustrato³ 1 mL

Cromógeno⁴ 1 gota

1. Se prepara de 15 a 20 min. antes de usarse.
2. Vectastain ABC kit peroxidasa standard PK-400.
3. DAB Substrate buffer.
4. Chromogen DAB.