



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Facultad de Medicina

EFFECTO DE LOS ANDRÓGENOS SOBRE LA
PROLIFERACIÓN DE LAS CÉLULAS DEL
EPITELIO SUPERFICIAL DEL OVARIO DEL
EMBRIÓN DE POLLO

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

**MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
(BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)**

P R E S E N T A

LETICIA SEBASTIÁN MEDINA

DIRECTORA DE TESIS: DRA. MARÍA DEL CARMEN MÉNDEZ HERRERA

MEXICO, D.F.

MARZO, 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.

AGRADECIMIENTOS

- Para la realización de este trabajo se contó con el apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, el cuál otorgó una beca completa para llevar a cabo mis estudios de posgrado.
- Se agradece a la Dra. María del Carmen Méndez Herrera de la Facultad de Medicina de la UNAM, por la dirección de este proyecto de maestría, su apoyo académico y humano.
- A los miembros del comité tutorial por su asesoría y valiosos comentarios proporcionados durante el transcurso de este proyecto.
Dr. Felipe de Jesús Vilchis Úrbe del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán.
Dra. Marta Alicia Menjivar Iraheta de la Facultad de Química de la UNAM.
- Este proyecto fue realizado dentro del programa de Desarrollo gonadal del departamento de Embriología de la Facultad de Medicina de la UNAM y cuenta con apoyo del CONACYT Número: 45030-Q y del PAPIIT IN214403 e IN216807

- A mí familia por apoyarme en todo momento mi más grande y extenso agradecimiento. Sofía, Emigdio, Hugo, Fabi, Carlos, Octavio, Monse, Huguito, Jonathan y John.
- A la Universidad Nacional Autónoma de México por todo lo que he aprendido dentro de ella.
- Al Dr. Enrique Antonio Pedernera Astegiano, Jefe del Departamento de Embriología de la UNAM por todo su apoyo académico y técnico recibido durante la estancia en su laboratorio.
- Al personal Académico y Administrativo de la UNAM y del Posgrado en ciencias Biológicas y de la Facultad de Medicina que apoyaron directa o indirectamente durante el proceso de titulación. QFB Verónica Rodríguez por su apoyo técnico, Sras. Susana Cano y Celia Villeda por su apoyo en el laboratorio.
- A mis compañeros de laboratorio:
Carmelita Mondragón, Lupita Sánchez, René Escalona, Rodrigo Núñez, Nayeli Dupuy, María José Villaseñor, Esteban, Fremiet y Michael; por las experiencias compartidas en el laboratorio y su apoyo.
- A quienes considero también mi familia. Silver, Edgar, Tere, Yolanda, Félix, Blanca, Oswaldo, Lenin.
- A Carlos Zaragoza a quien agradezco de manera especial su ayuda en diferentes situaciones, además de Juan y Luisa.
- También a Anaid, Maru, Gaby, Idalia, Yola Aguilar, Estela; por su valiosa amistad.

ÍNDICE

I. RESUMEN.....	3
II SUMMARY	4
III LISTA DE ABREVIATURAS Y SIGLAS	5
1. INTRODUCCIÓN.....	8
1.1 <i>Desarrollo del ovario</i>	9
1.2 <i>Folículo ovárico</i>	9
1.3 <i>Desarrollo folicular</i>	11
1.4 <i>Epitelio superficial del ovario</i>	13
1.5 <i>Hormonas Esteroides y OSE</i>	15
1.6 <i>El embrión de pollo como modelo de estudio</i>	16
1.7 <i>Desarrollo del ovario embrionario de pollo</i>	17
1.8 <i>Biosíntesis de andrógenos</i>	18
1.9 <i>Actividad biológica de los esteroides sexuales</i>	19
1.10 <i>Mecanismo de acción de hormonas esteroides</i>	20
Receptor de andrógenos	20
1.11 <i>Papel del receptor de andrógenos durante el desarrollo del ovario</i>	24
2. JUSTIFICACIÓN	26
3. HIPÓTESIS.....	27
4. OBJETIVOS.....	27
4.1 <i>Objetivo General</i>	27
4.2 <i>Objetivos particulares</i>	27
5. MATERIAL Y MÉTODOS	28
5.1 <i>Animales</i>	28
5.2 <i>Reactivos y equipo</i>	28
Reactivos.....	28
Equipo	28
5.3 <i>Cultivos primarios y tratamiento con andrógenos</i>	29
5.4 <i>Cuantificación del porcentaje de células cultivadas en fase de síntesis del ciclo celular</i>	30
5.5 <i>Conteo del número total de células</i>	31
5.6 <i>Expresión del RNA mensajero de los receptores de andrógenos, estrógenos α y P450 arom en OSE</i>	31
5.7 <i>Detección de la proteína para el receptor de andrógenos en el ovario por inmunohistoquímica</i>	33
6. RESULTADOS	36
6.1 <i>El embrión de pollo como modelo de estudio in vitro</i>	36
6.2 <i>Efecto del tratamiento con andrógenos en el epitelio superficial</i>	37
6.3 <i>Amplificación de RNA mensajeros para el receptor de andrógenos, P450 arom y receptor de estrógenos alfa</i>	41
6.4 <i>Detección del receptor de andrógenos en el ovario del embrión de pollo</i>	44
7. DISCUSIÓN.....	45
Efecto sobre la proliferación celular.....	46
Receptor de andrógenos	50
8. CONCLUSIONES.....	52
9. BIBLIOGRAFÍA	53
10. APÉNDICE	63
10.1 <i>Soluciones y Reactivos</i>	63
10.2 <i>Medios de Cultivo</i>	65
10.3 <i>Técnicas</i>	66
Obtención de células epiteliales	66
Cultivos primarios de OSE.....	66
Número total de células.....	67
Inmunocitoquímica para BrdU	67
Inmunocitoquímica para Citokeratinas.....	67
Obtención de RNA por extracción fenólica.....	68
Procesamiento de muestras histológicas para inmunohistoquímica	69
Inmunohistoquímica para Citoqueratinas	69
Inmunohistoquímica para el receptor de andrógenos.....	69
Contratinción de núcleos.....	70
Purificación de productos de PCR.....	70

I. Resumen

El ovario produce hormonas esteroideas sexuales y ovocitos fertilizables, su superficie está recubierta por un epitelio plano el cual recibe constantemente estímulos hormonales y de factores de crecimiento. Se propone que de este tejido se derivan al menos el 90% de las neoplasias del ovario las cuales generan la mayor tasa de mortalidad mundial por causa ginecológica con un riesgo de 1.8 %. Los factores asociados a esta patología son principalmente hormonales y se diagnóstica frecuentemente en el climaterio. En esta etapa cambia la relación andrógenos/estrógenos producidos por el ovario y se incrementan los niveles de gonadotropinas hipofisarias (LH y FSH).

El epitelio superficial es menos del 1% del tejido ovárico lo cual dificulta el estudio de tejido normal por lo que en este trabajo se propone un modelo in vitro para estudiar la participación de la testosterona y la dihidrotestosterona en la proliferación de las células del epitelio superficial del ovario obtenidas de embriones de pollo de 14 días de incubación. Se trabajó con cultivos primarios de células epiteliales con aproximadamente 50% de confluencia, previo a la administración de los tratamientos hormonales las células se mantuvieron 12 h con medio de cultivo bajo en suero, las hormonas ensayadas fueron testosterona, dihidrotestoterona y 17β -estradiol a las dosis de 10^{-8} - 10^{-11} M. La proliferación celular se evaluó utilizando la técnica de incorporación de BrdU y la cuantificación del número total de células por caja de cultivo; los tiempos probados fueron de 1-3 h., 12 y 48 h. Los resultados muestran que la testosterona (10^{-10} y 10^{-11} M) a las 12 h de tratamiento incrementa discretamente el porcentaje de células en fase de síntesis. En los cultivos tratados con DHT (10^{-10} M) por 48 h se observó un aumento en el número de células/caja. No se detectaron cambios con 17β -estradiol con ninguna de las dosis ensayadas en los distintos tiempos de tratamiento. El RNAm para el receptor de andrógenos así como su proteína se encuentran en las células del epitelio superficial del ovario del embrión de pollo de 14 d.i. El modelo de embrión de pollo es accesible para el estudio del epitelio superficial del ovario, expresa in vivo y mantiene en cultivos primarios la expresión del receptor de andrógenos. Con base en los resultados obtenidos se sugiere que los andrógenos pueden participar en la regulación de la proliferación celular de este tejido.

II Summary

The ovary produces sex steroid hormones and fertilizable oocytes, its surface is covered with a stratified epithelium which is constantly stimulated by hormones and growth factors. It has been proposed that at least 90% of the ovarian epithelial cancer originate from this tissue. Mortality rate of ovarian epithelial cancer world wide is the highest among gynecological causes with a risk of 1.8%. Associated factors are mainly hormonal and diagnosis is common during menopause. During menopause there is a change in the androgen/estrogen ratio produced by the ovary and an increase in the levels of pituitary gonadotropins (LH and FSH). Superficial epithelium in the ovary is less than 1% of the organ tissue which makes its study challenging. We propose an in vitro experimental model to study the effects of testosterone and dihydrotestosterone on the proliferation of ovarian superficial epithelial cells in chick embryos on day 14 of gestation. These cells were cultured in a low serum medium at a confluence of 50% for 12 hours. Hormones assayed were testosterone, dihydrotestosterone and 17β -estradiol at doses of 10^{-8} – 10^{-11} M. Cellular proliferation was evaluated using the BrdU technique and by cell quantification per culture plate at 1-3, 12 and 48 hours. The results show that after 12 hours of treatment with testosterone (10^{-10} and 10^{-11} M) there is a slight increase of the percentage of cells in synthesis phase. Cell cultures treated for 48 hours with DHT (10^{-10} M) had an increment in the number of cell per culture plate. No effects were observed with the 17β -estradiol treatment. Both androgen receptor mRNA and androgen receptor protein were found in ovarian superficial epithelial cells at day 14 of gestation. The chick embryo model is accessible for the study of superficial ovarian epithelium and expresses in vivo and in cell culture as well, the expression of androgen receptor. Based on these results we suggest that androgens could participate in the regulation of cellular proliferation of the ovarian superficial epithelium.

III Lista de abreviaturas y siglas

- A	Androstendiona
- AF*	Función de activación
- ALPES	Aves libres de patógenos.
- AR*	Receptor de andrógenos
- ARE*	Elementos de respuesta a andrógenos
- ASB	Albúmina sérica bovina
- BrdU	5 Bromo 2' deoxiuridina
- cAMP*	Adenosin Mono Fosfato cíclico
- DNA*	Ácido deoxi ribonucléico
- cDNA*	DNA complementario
- CG	Células de la Granulosa
- CGP	Células Germinales Primordiales
- CoA	Coactivador
- Col.	Colaborador
- DEPC	Di-etil-pirocarbonato
- DHEA	Dehidroepiandrosterona
- DHT	Dihidrotestosterona
- d.g.	Días de gestación
- d.i.	Días de incubación
- D.O.	Densidad óptica
- E ₂	17β Estradiol
- EDTA	Ácido etilen diamino tetra acético
- EGFr*	Receptor del factor de crecimiento epidérmico
- ER*	Receptor de andrógenos
- ERα*	Receptor de estrógenos alfa
- ESM	Error estándar sobre la media
- EtOH	Alcohol etílico
- Fig.	Figura
- FSH*	Hormona Folículo Estimulante
- g	gramos
- GDF*	Factor de crecimiento diferencial
- GnRH*	Hormona liberadora de gonadotropinas

- IGF*	Factor de crecimiento similar a insulina
- h	horas
- HDL*	Lipoproteínas de alta densidad
- HDLr*	Receptor de proteínas de alta densidad
- h.i.	Horas de incubación
- HSP*	Proteína de choque térmico
- 3 β HSD	3 Beta hidroxí esteroide reductasa
- 17 β HSD	17 Beta hidroxí esteroide reductasa
- hCG*	Gonadotropina coriónica humana
- IgG	Inmunoglobulina G
- kb	kilobase
- L	Litro
- LDL*	Lipoproteínas de baja densidad
- LDLr*	Receptor de lipoproteínas de baja densidad
- LH*	Hormona Luteinizante
- M	Molar
- μ g	microgramos
- mL	mililitros
- mM	milimolar
- μ L	microlitros
- mg	miligramos
- min	minutos
- μ mol	micromola
- MUC 1	Mucina 1
- RNA*	Ácido ribonucleico
- RNAm	RNA mensajero
- NADP	Nicotinamida adenina dinucleotido fosfato
- OSE*	Epitelio superficial del ovario
- Ov.	Ovario
- P ₄	Progesterona
- P ₅	Pregnenolona
- P450arom	Citocromo P450 aromatasa
- P450 c17	Citocromo P450 17 alfa hidroxilasa
- P450scc*	Citocromo P450 de corte de la cadena lateral
- PCR*	Reacción en cadena de la polimerasa

- pb	Pares de bases
- PBS*	Búfer de fosfatos salino
- PSA*	Antígeno prostático específico
- 5 α -reductasa	5 alfa-reductasa
- rpm	Revoluciones por minuto
- RT-PCR*	Transcripción reversa de la PCR
- SSB	Solución salina balanceada libre de calcio y magnesio
- SFB	Suero fetal bovino
-SFBL	Suero fetal bovino lavado
- SNC	Sistema Nervioso Central
- SRB1*	Receptor basura tipo I
- T	Testosterona
- TA	Temperatura ambiente
- TGF β *	Factor de crecimiento transformante beta
- TGF β r*	Receptor del factor de crecimiento transformante beta
- UI	Unidades Internacionales

Nota aclaratoria. Las siglas y abreviaturas con asterisco “*” se encuentran en inglés aunque se traducen de manera literal al español en este apartado, en el texto se expresa el significado tanto en inglés como español.

1. Introducción

El ovario es un órgano endocrino que produce hormonas esteroideas y óvulos fertilizables esenciales para la reproducción; su unidad funcional es el folículo ovárico. Es un órgano en constante transformación, con una estructura multicompartimental; cuya morfología y producción hormonal se modifica en relación a la edad de la mujer. (Auersperg, 2001).

Dentro del ovario se distinguen tres regiones, la corteza, la médula y el epitelio superficial, OSE, por sus siglas en inglés (Ovarian Surface Epithelium). El OSE es una capa de células cúbicas que recubre la superficie del ovario; durante toda la vida reproductiva de la mujer este tejido realiza procesos de apoptosis y proliferación para permitir la ovulación y reparar las lesiones que la misma produce en la superficie del ovario.

La función ovárica está regulada por el eje hipotálamo-hipófisis-ovario, el hipotálamo secreta la hormona liberadora de gonadotropinas que se abrevia en inglés (GnRH: Gonadotropin Releasing Hormone), la cual estimula la secreción de la hormona luteinizante y la hormona folículo estimulante (LH y FSH por sus siglas en inglés: Luteinizing hormone y Follicle stimulating hormone respectivamente); en la teca la LH estimula la expresión de complejos enzimáticos involucrados en la biosíntesis de andrógenos en tanto la FSH induce la expresión de enzimas necesarias para la aromatización de éstos a estrógenos, los cuales a su vez junto con la inhibina regulan la secreción de GnRH y gonadotropinas hipofisiarias (Revisado en Diaz y Ulloa, 2003).

Durante el climaterio, la eliminación de folículos ováricos lleva a la pérdida de la producción de estradiol, progesterona, la mayor parte de la androstendiona ovárica y en menor medida de la testosterona. Sin embargo, el estroma ovárico continua produciendo andrógenos lo que resulta en una elevación de la tasa de andrógenos/estrógenos producidos en el ovario (Diaz y Ulloa, 2003).

La mayor parte de las investigaciones realizadas hasta hace algunos años con respecto al ovario se centraron en sus funciones reproductoras y se le dio poca importancia al OSE; sin embargo ha cobrado importancia el estudio de este tejido ya que se propone que es el causante del 90% de neoplasias ováricas de origen epitelial y estadísticamente estas se encuentran dentro de las primeras causas de muerte en la mujer por factores ginecológicos (Banks, 2000).

1.1 Desarrollo del ovario

Las células germinales primordiales (CGP) se originan en el epiblasto, salen del disco embrionario y se ubican en el saco vitelino, cerca de la alantoides. Estas células migran y alcanzan mediante movimientos ameboides las crestas genitales (Dissen y col., 2004).

En el humano las CGP llegan a la cresta genital alrededor de la quinta semana de gestación (dg), luego entre las semanas 5 y 7 dg. se forma la gónada indiferenciada que está determinada por la proliferación del epitelio celómico, del mesénquima subyacente y por la multiplicación de las CGP. El número de ovogonias es de 10 000 entre la semana 6 y 7 dg. y las continuas divisiones mitóticas aumentan el número total de ovogonias a 600 000, alrededor de las semanas 6 y 7 dg. entran a la primera división meiótica y forman los ovocitos primarios que quedan detenidos en dictioteno de la profase de la meiosis I.

El número de ovogonias asciende de 6 a 7 millones alrededor de la semana 20 de gestación. En este momento dos tercios del total de las células germinales son ovocitos primarios; el resto todavía permanecen como ovogonias.

Desde la octava semana la población de ovogonias está sujeta a tres procesos simultáneos: mitosis, meiosis y atresia. La formación del ovario es clara en la semana 16 dg. cuando ya pueden observarse folículos primordiales (Yen y col., 2001; Dissen y col., 2004).

La atresia de ovogonias finaliza a los siete meses dg., e inicia la atresia folicular. Al momento del nacimiento hay de 1 a 2 millones de células germinales en el ovario. Al llegar a la pubertad la mujer tiene una reserva de alrededor de 500 000 folículos de los cuales sólo 400 ó 500 de estos se ovularán en el curso de la vida reproductiva. La depleción folicular se incrementa una década antes de la menopausia.

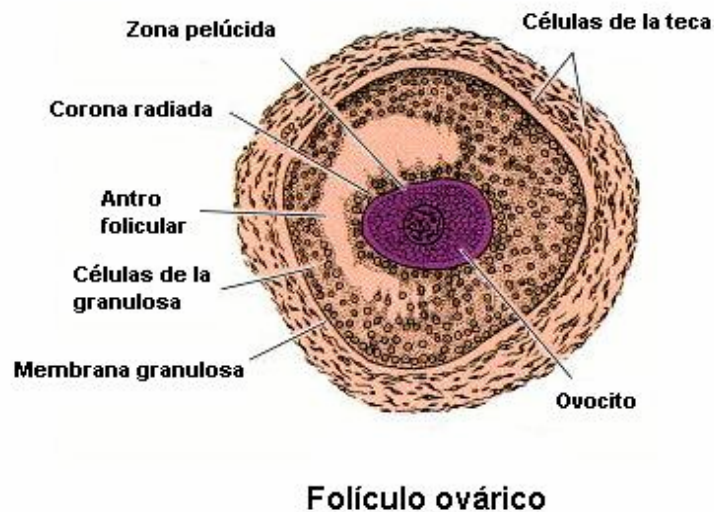
Finalmente alrededor de los cincuenta años de edad en la mujer se acaba la reserva folicular (Gougeon, 2004).

1.2 Folículo ovárico

La unidad estructural y funcional del ovario es el folículo ovárico. Un folículo maduro está formado por distintos tipos celulares: el ovocito, las células de la granulosa y las células de la teca. En los ovarios maduros se encuentran los folículos en diferentes estadios de desarrollo.

El ovocito está rodeado por las células de la granulosa (CG) que están interconectadas por uniones comunicantes (*gap junctions*), de las cuales se distinguen tres poblaciones: la granulosa mural, la antral y la del acúmulo ovigero (ver figura 1). Las células murales de la granulosa tienen la capacidad de sintetizar esteroides, con altos niveles intracelulares de 3 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa, y citocromo P-450 aromatasa. Además adquieren receptores a LH.

Las células que se localizan en el tejido conectivo laxo de la corteza y la médula del ovario; forman la teca interna y la teca externa en la capa exterior del folículo ovárico. Las células de la teca interna son la principal fuente de andrógenos y están relacionadas con el mantenimiento y la atresia folicular. Las células de la teca hipertrofiada remanente que sobrevive a la atresia folicular son fuente importante de andrógenos también (Yen y col., 2001).



El folículo ovárico está formado por el ovocito que está rodeado por células granulosa provenientes del epitelio superficial y células tecales originadas en el mesénquima gonadal. Tomada de Gilbert, 2003.

1.3 Desarrollo folicular

La transformación de un folículo ovárico a cuerpo lúteo fue descrita por primera vez en 1672 por Regnier de Graaf. Durante su maduración los folículos se clasifican de la siguiente manera:

1. Folículo primordial: Compuesto por un ovocito primario rodeado por una capa incompleta de células foliculares planas.
2. Folículo primario: Caracterizado por un ovocito primario rodeado por una capa de células de la granulosa cúbicas, se comienza a formar la zona pelúcida.
3. Folículo preantral: Mide de 80 a 100µm, presenta de una a dos arteriolas, el ovocito primario está rodeado por dos o más capas de células de la granulosa.
4. Folículo antral: Tiene múltiples capas de CG, comienza a formarse el antro que contiene el líquido folicular; se diferencia por acción de la LH la teca interna que se encuentra vascularizada a diferencia de la externa, la FSH incrementa la proliferación de CG y la aromatización de andrógenos a estrógenos.
5. Folículo preovulatorio: Se incrementa el número de CG el licor folicular es abundante, con altos niveles de estrógenos, las concentraciones de LH están elevadas y la FSH se ve inhibida por la acción de estrógenos e inhibina producidos por el folículo, se incrementa la vascularización de la teca y el folículo llega a medir hasta 20mm. La maduración de un folículo dominante requiere de tres ciclos previos a la ovulación.

Una vez que ocurre la ovulación el resto del folículo formará el cuerpo lúteo el cual produce progesterona y estrógenos, tiene una vida media de 14 ± 2 días y queda como cuerpo blanco (Zeleznik, 2004).

El ovocito primario permanece en la profase de la meiosis I, hasta poco antes de la ovulación, cuando se termina la meiosis I y se convierte en un ovocito secundario. Durante la ovulación, el ovocito secundario y las células del acúmulo ovífero son expulsados e ingresan a la tuba uterina. Si existe fecundación, el ovocito secundario termina la segunda división meiótica e inicia la segmentación (Yen y col., 2001). En la figura 2 se resumen los pasos de la maduración de las células germinales.

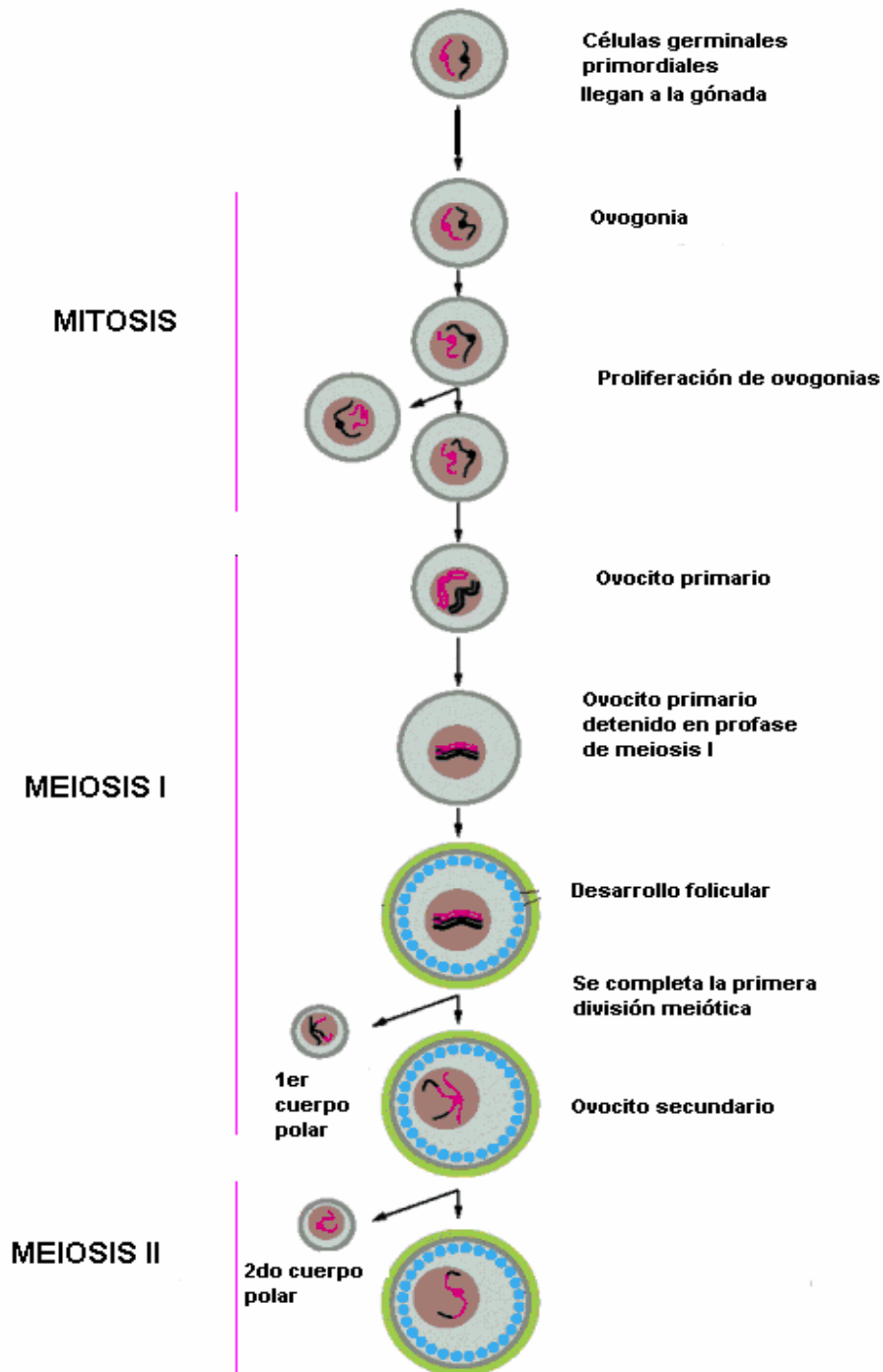


Fig. 2 Las células germinales femeninas llegan al futuro ovario donde proliferan por mitosis e inician la primera división meiótica durante el desarrollo intrauterino. En la pubertad los ovocitos primarios pasan a la segunda división meiótica la cual terminan sólo si son fecundados. Esquema modificado de Alberts, 2002.

1.4 Epitelio superficial del ovario

El epitelio superficial recubre la superficie del ovario, histológicamente es un epitelio cúbico simple originado a partir del epitelio celómico, el cual se deriva de la hoja esplácnica del mesodermo lateral. Durante la etapa reproductiva está sometido a procesos de apoptosis en la zona del estigma para permitir la ovulación y de proliferación celular para reparar las rupturas provocadas por la misma, además, se ha observado que transporta nutrientes desde el ovario hacia la cavidad peritoneal (Auersperg, 2001). Otros derivados del epitelio celómico son los conductos Müllerianos los cuales van a formar el epitelio del oviducto, la tuba, el útero y el endocervix.

Durante la embriogénesis, el epitelio celómico que cubre a la cresta genital (formada a partir del mesodermo esteroideogénico cerca del borde ventromedial del mesonefros) recibe influencias hormonales locales del futuro ovario y se modifica para formar el epitelio superficial. Este epitelio prolifera activamente y contribuye a la integración de la gónada con los cordones sexuales primarios y secundarios. Se encuentra separado del mesénquima subyacente por una membrana basal. Durante el desarrollo fetal el epitelio superficial se introduce en el mesénquima gonadal y forma estructuras papilares, luego esto se revierte y al nacimiento queda como una capa única de células cúbicas.

En la mujer adulta el OSE se encuentra separado del estroma del ovario por la membrana basal y la túnica albugínea, ésta última actúa como una barrera parcial ante la difusión de moléculas entre el estroma y el epitelio. Morfológicamente es un epitelio cúbico simple que en algunas regiones es plano; se mantiene unido por desmosomas, integrinas y cadherinas.

Las cadherinas regulan selectivamente la unión intercelular y están asociadas a mecanismos de señalización intracelular. La N-cadherina está presente en OSE al igual que en las células de la granulosa y el mesotelio extraovárico (Okamura y col, 2003). La E-cadherina se presenta en la mayoría de los epitelios pero escasamente en el OSE normal, su expresión se limita a invaginaciones columnares que se introducen al estroma del ovario y cuando este tejido entra en procesos metaplásicos y neoplásicos.

El OSE expresa queratinas tipo 7, 8, 18 y 19 características de los epitelios, también expresa vimentina que es propia de las células mesenquimáticas, mucina (MUC1), y

17 beta-hidroxiesteroide deshidrogenasa (17 β -HSD) Tipo I (Rae y col, 2005). A diferencia del mesotelio extraovárico y de los derivados Mülllerianos, no expresa el antígeno CA-125. Este hecho, aunado a su actividad proliferativa, su capacidad para transformarse en mesénquima y su naturaleza pluripotencial sugiere que no está finalmente diferenciado y en consecuencia puede adquirir características de células del epitelio del oviducto o del endometrio en condiciones neoplásicas (Vanderhyden y col., 2004).

En el ovario de la mujer de edad avanzada la depleción folicular hace que la superficie del ovario se vuelva irregular, se forman pliegues, invaginaciones y quistes de inclusión en el interior del ovario; los cuales son más propensos a progresar hacia neoplasias (Scully, 1995).

Después del climaterio el ovario queda como una estructura amarillenta y opaca con una superficie irregular que pesa menos de 10 g. La corteza es delgada y carente de folículos. En algunas ocasiones pueden encontrarse algunos folículos primordiales, otros en maduración o atrésicos hasta cinco años después de las últimas menstruaciones.

Se ha establecido por inmunohistoquímica que el estroma cortical del ovario posmenopáusico contiene enzimas esteroidogénicas y produce androstendiona in vitro (Dennefors y col., 1980). La médula del ovario posmenopáusico contiene células hiliares que tienen potencial esteroidogénico. El estroma ovárico es capaz de producir andrógenos. (Yen y col., 2001).

Durante el climaterio el ovario secreta predominantemente androstendiona y testosterona; la primera se encuentra en mayor cantidad, sin llegar a ser la misma producción que la de una mujer en edad reproductiva. Se estima que en esta etapa el ovario contribuye con menos del 20% a la producción diaria de andrógenos que podría ser dependiente de gonadotropinas y la causa del incremento de testosterona (Cano, 1998). La concentración de testosterona en la vena ovárica de las mujeres en periodo posmenopáusico es mayor que en sangre periférica, lo que evidencia que el ovario en este periodo es un órgano productor de andrógenos (Burger, 2002)

La producción estrogénica en mujeres posmenopáusicas depende de la aromatización extraglandular o periférica de androstendiona; y es la estrona el estrógeno que se encuentra en mayor cantidad (Cano, 1998).

1.5 Hormonas Esteroides y OSE

Las hormonas esteroides son fundamentales para la función ovárica, regulan la expresión de genes específicos y la proliferación celular en el folículo ovárico. El epitelio superficial está en estrecho contacto con el folículo preovulatorio y por lo tanto expuesto a altas concentraciones de hormonas y factores de crecimiento presentes en el licor folicular. Este tejido en humano presenta receptores a estrógenos alfa y beta (Hillier y col., 1998) a andrógenos (Edmondson y col.; 2002) receptores a progesterona (Hild-Petito y col., 1988; Lau y col., 1999) receptores para la hormona liberadora de gonadotropinas (Kang y col., 2000) y receptores a factores de crecimiento como TGF-beta, c-met y EGF entre otros (Rodríguez y col., 1991; Di-Renzo y col., 1994; Nilsson y Skinner, 2002).

La mayor parte de los estudios sobre el efectos de los esteroides en la regulación del crecimiento del OSE se han hecho en líneas celulares establecidas de neoplasias ováricas o bien en modelos de cultivos celulares. Los resultados hasta ahora obtenidos son poco consistentes (Wright y col., 2002) reportan que el 17 β -estradiol (E₂) no tiene efecto mitogénico in vivo sobre el epitelio superficial del mono rhesus. Otros estudios sugieren que el estradiol estimula la proliferación celular in vivo e in vitro en el OSE de rata (Stewart y col., 2004), de conejo (Bai y col., 2000).

La progesterona parece tener un efecto protector sobre la proliferación celular del epitelio superficial (Risch, 1998; Ho, 2003); el embarazo y los anticonceptivos hormonales que contienen progesterona disminuyen el riesgo de cáncer ovárico (Lukanova y Kaaks, 2005).

Edmondson y col., 2002 demostraron la expresión del receptor a andrógenos en el epitelio superficial de la mujer adulta y reportaron un aumento en la proliferación celular del OSE in vitro y disminución de la apoptosis por mibolerona. Sin embargo otros autores sugieren que los andrógenos disminuyen la proliferación celular (Thompson y Adelson, 1993). La 5 α -dihidrotestosterona regula a la baja la expresión del receptor para el factor de crecimiento transformante beta TGF β R I y TGF β R II, sugiriendo que estas hormonas están implicadas en el control del crecimiento normal y patológico del OSE (Evangelou y col., 2003).

Es ampliamente aceptado que las hormonas esteroides están implicadas en la biología del epitelio superficial ya que presenta receptores a gonadotropinas, hormonas esteroides y factores de crecimiento que podrían estar actuando de

manera autócrina o parácrina para la regulación de la apoptosis, la proliferación y la transición epitelio-mesénquima en este tejido. Sin embargo no están claros los mecanismos que intervienen en la fisiología del OSE.

Los factores de riesgo para las neoplasias ováricas están relacionados con eventos hormonales; por ejemplo la nuliparidad, la menopausia, los tratamientos hormonales para la inducción de la ovulación, y el sobrepeso entre otros (Lukanova y Kaaks, 2005).

El propósito de este trabajo es explorar el efecto de los andrógenos en la regulación del crecimiento del epitelio superficial del ovario del embrión de pollo.

1.6 El embrión de pollo como modelo de estudio

El epitelio superficial del ovario humano es difícil de estudiar por lo escaso que es este tejido (menos del 1%) en relación al ovario completo. Se han hecho estudios in vitro con líneas de células neoplásicas o en células obtenidas a partir de tumores ováricos y algunos en células normales, sin embargo la dificultad para obtener tejido sano ha sido un obstáculo para su estudio.

Por lo que es importante contar con modelos que permitan avanzar en el estudio de este tejido tanto en su biología como en el origen de los tumores ováricos que se desarrollan a partir de este.

La gallina es la única especie hasta ahora descrita además de la mujer que desarrolla tumores de manera espontánea. Los tumores que se desarrollan en la gallina son de origen ovárico y/o de oviducto y se descubren en etapas avanzadas al igual que en la mujer (Giles y col., 2004).

El embrión de pollo presenta varias ventajas con respecto a otros animales de laboratorio para el estudio de efectos hormonales, como es su fácil manejo, el control de su estadio de desarrollo, su manejo es individual. Al ser un sistema cerrado no hay intervención de hormonas esteroides placentarias.

1.7 Desarrollo del ovario embrionario de pollo.

En las aves, el sexo se determina genéticamente, siendo las hembras heterogaméticas ZW y los machos homogaméticos ZZ a diferencia de la especie humana donde las mujeres son homogaméticas XX y los hombres heterogaméticos XY (Revisado en Smith y Sinclair, 2004).

En la gallina el desarrollo del aparato reproductor es asimétrico, sólo son funcionales el ovario y el oviducto izquierdos, ya que la contraparte derecha involuciona.

La gónada en las aves se integra con células germinales, células del epitelio celómico y células mesenquimáticas de la cresta genital. Su desarrollo comienza a las 18 horas de incubación (hi.) (Romanoff, 1960), las células germinales primordiales comienzan a migrar desde las tres primeras h.i. (Gilbert, 2003). Las CGP migran a la creciente germinal (Gilbert, 2003). Al día 1.5 alcanzan los vasos sanguíneos y salen de ellos a la altura de la cresta genital. Las CGP migran por movimientos ameboides atraídas por un factor quimiotáctico cuya naturaleza no ha sido totalmente demostrada (Tajima y col., 1993). A los 2.5 d.i. llegan a la gónada atravesando el epitelio superficial, este tejido prolifera y rodea las CGP entre el 3^{er} y 4^o d.i. La gónada queda separada del tejido mesonéfrico por el mesénquima y los vasos sanguíneos. Las CGP se dividen por mitosis y formarán las ovogonias.

Entre el 3.5 y 4.5 d.i. se forma la gónada indiferenciada. El epitelio celómico que se encuentra en el área de la gónada forma los conductos mesonéfricos o de Wolff y los conductos paramesonéfricos o de Müller (Romanoff, 1960).

Al sexto día la gónada femenina derecha comienza a involucionar; al día 6.5 es histológicamente distinguible la diferenciación gonadal y en el 7^o día es más notoria la asimetría ovárica (Smith y Sinclair, 2004).

En el desarrollo gonadal de las aves se tiene un papel relevante de las hormonas esteroides. En las gónadas de hembras y machos el RNAm del receptor a estrógenos alfa (ER α , del inglés estrogen receptor alpha) se detecta desde el día 4.5 (Andrews y col; 1997) y el RNAm para la P450arom se detectó a partir del 6.5 d.i. (Smith y col., 1997) en el día 5.5 comienzan a sintetizarse estrógenos tanto en la hembra como en el macho, aclarando que en la primera se secretan cantidades mayores. Por inmunohistoquímica e hibridación *in situ* se encontró que el ER se expresa preferentemente en la gónada femenina izquierda a los 7.5 d.i. además el

ER se expresa en testículo y conductos müllerianos. Y en el ovario se expresa con mayor intensidad en la corteza a comparación de la médula donde se encuentra disminuido (Andrews y col., 1997).

Los estrógenos juegan un papel importante durante el desarrollo de la gónada embrionaria femenina e intervienen en el desarrollo de las características sexuales secundarias en las aves. La gónada tiene la capacidad de producir estrógenos antes y durante la diferenciación morfológica del ovario, así como de responder a estrógenos exógenos (Smith y col., 1997).

1.8 Biosíntesis de andrógenos

En el ovario las células de la granulosa producen los estrógenos a partir de los andrógenos sintetizados en las células de la teca usando el complejo enzimático P450 aromatasa (P450arom).

La regulación de la síntesis de esteroides es dependiente del eje hipotálamo-hipófisis-ovario y de proteínas secretadas por el folículo ovárico como la inhibina y la activina.

Los esteroides se obtienen a partir de colesterol, que es transportado por lipoproteínas de baja y/o alta densidad (LDL y HDL por sus siglas en inglés Low Density Lipoprotein y High Density Lipoprotein). Posteriormente estas son transportadas a las células esteroidogénicas del ovario por los receptores de estas proteínas LDLr y el SRB1 (Scavenger Receptor Type I) que funciona como receptor de las HDL (HDLr). Una vez que el colesterol es transportado a la membrana externa y luego translocado a la membrana interna de la mitocondria por acción de la proteína reguladora de fase aguda StAR (Steroidogenic Acute Regulatory Protein) (Ho y col., 2004), comienza la síntesis de esteroides. El primer paso es el rompimiento de la cadena lateral del colesterol por la enzima P450scc (Side Chain Cleavage), entonces el colesterol es convertido a pregnenolona (P5). Posteriormente se lleva a cabo la conversión de pregnenolona a Progesterona (P₄) por acción de la 3 β -HSD. Como ya se mencionó estas células sintetizan andrógenos en respuesta al estímulo de la LH usando las vías Δ 4 ó Δ 5. Cabe mencionar que en el ovario está favorecida la vía Δ 4 sin embargo estudios de (Lee y col., 1998) sugieren que en los folículos preovulatorios de gallina se usa con prioridad la vía Δ 5 en células de la

teca, sin descartar el uso de la $\Delta 4$; además observaron que las células de la granulosa emplean principalmente la vía $\Delta 4$ para la producción de estrógenos. La P_4 es sustrato de la enzima P450 17α -hidroxilasa/17,20 lyasa (P450 c17), para formar androstendiona (A) que posteriormente será metabolizada a testosterona usando la enzima 17 β -HSDI y funcionara como sustrato para la obtención de E_2 , reacción en la que interviene la P450arom presente en las células de la granulosa (Wood y Strauss, 2002). En la vía $\Delta 5$ la pregnenonolona es convertida a 17 α -hidroxipregnenolona por la P450 c17 y esta misma enzima cataliza la reacción de conversión a dehidroepiandrosterona (DHEA), que pasa a androstendiona por acción de la 3 β -HSD, a partir de esta se sintetiza nuevamente testosterona y que finalmente puede ser convertida a DHT usando la enzima 5 α -reductasa Fig. 3 (Gao y col., 2005).

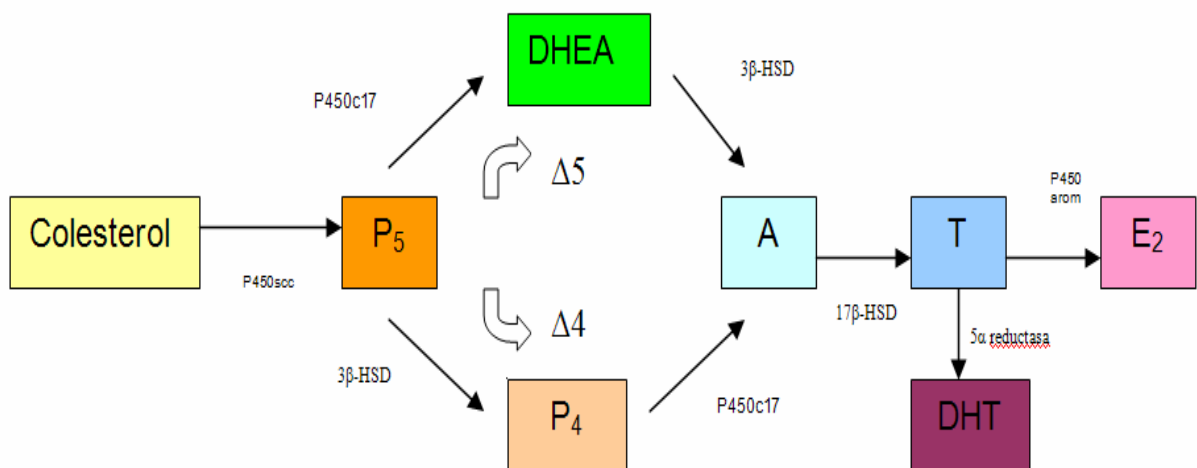


Fig. 3 Los esteroides sexuales en el ovario de gallina se sintetizan a partir del colesterol empleando la vía metabólica $\Delta 4$ o la $\Delta 5$. En la primera, la P_5 obtenida del colesterol se transforma a P_4 usando a la 3 β -HSD y luego a androstendiona por la P450c17. La vía $\Delta 5$ utiliza la enzima P450c17 y convierte la P_5 en DHEA que se transforma en androstendiona empleando a la 3 β -HSD. Ambas vías convergen en la formación de testosterona a partir de androstendiona usando como catalizador a la 17 β -HSD. La T podría aromatizarse a E_2 ó convertirse a DHT. Esquema modificado de Lee y col., 1998.

1.9 Actividad biológica de los esteroides sexuales

Estas hormonas sexuales regulan procesos biológicos como, la homeostasis, el dimorfismo sexual y la función reproductiva; en el sistema nervioso central (SNC), estas hormonas juegan un papel importante con acciones anestésicas y ansiolíticas. Su disminución se ha asociado inclusive con crisis depresivas (Simoncini y Genazzani, 2003).

El E₂ y la progesterona (P₄), participan en el establecimiento y manutención del embarazo. Intervienen en la maduración folicular, y en la regresión del cuerpo lúteo (Wood y Strauss, 2002).

Se propone que los estrógenos pueden contribuir al desarrollo de los genitales internos y externos de la mujer (diferenciación de conductos mullerianos: útero, oviductos y cervix). Intervienen en la presentación de las características sexuales secundarias y de algunas características conductuales (Gilbert, 2003).

En el sistema cardiovascular se ha reportado que los estrógenos intervienen en la vasodilatación, previniendo la aterosclerosis (Simoncini y Genazzani, 2003).

Los andrógenos incluyen a la testosterona y la dihidrotestosterona; intervienen en el establecimiento del fenotipo masculino, las características sexuales secundarias del varón y la espermatogénesis.

La acción fundamental de la testosterona en el embrión es el mantenimiento y diferenciación de los conductos de Wolff, para el desarrollo del epidídimo, vesículas seminales y conductos deferentes. La DHT viriliza los genitales externos del embrión masculino, el desarrollo del escroto y del pene y la formación de la porción membranosa de la uretra. Los andrógenos también contribuyen en el descenso testicular (Revisado en Gilbert, 2003).

En el ovario los andrógenos son la fuente para la producción de estrógenos, intervienen en los procesos de maduración y atresia folicular, su receptor se encuentra en las células del estroma del ovario y en las células de la teca, de la granulosa durante todos los estadios del desarrollo folicular. Intervienen además en la diferenciación de las células de la teca (Ahonen y col., 2000; Drummond, 2006).

1.10 Mecanismo de acción de hormonas esteroides

Receptor de andrógenos

Como ya se mencionó la acción de los andrógenos es mediada a través de su receptor, esta proteína intracelular se encuentra libre en el citosol y reconoce las diferencias estereoquímicas que existen entre las diferentes hormonas. Actúa como un factor de transcripción nuclear. Para regular sus genes blanco con un alto grado de especificidad. Ejemplos de estos son: el gen del antígeno prostático (PSA que se traduce del Prostatic Specific Antigen), el del factor de crecimiento para

queratinocitos y el factor antiapoptótico p21, involucrados en el ciclo celular, metabolismo y transducción de señales (McEwan, 2004).

El gen del receptor de andrógenos (AR=Androgen receptor) está localizado en el brazo largo del cromosoma X; en la región Xq11-12; que codifica para una proteína de 110 kDa (Brown y col., 1989); está orientado con el extremo 5' hacia el centrómero y abarca aproximadamente 90 kb de DNA. Este gen consiste de ocho exones codificantes y 7 intrones no codificantes y su organización estructural es idéntica a la de los genes que codifican para otros receptores de hormonas esteroides (Gelman, 2002).

Se ha identificado y clonado el receptor de andrógenos en humano y en este se encontraron dos ligandos diferentes. El concepto de dos hormonas y un receptor puede explicar las diferentes acciones de los andrógenos. Estas hormonas son la testosterona y la 5 α -dihidrotestosterona (Faber y col., 1991).

El receptor de andrógenos tiene cuatro dominios estructurales: el dominio de unión a DNA, el dominio de unión a ligando, la región bisagra, y el dominio amino terminal (McEwan, 2004).

1) El dominio de unión al DNA está codificado por los exones 2 y 3, se encuentra presente en todos los receptores de hormonas esteroides. Se compone de aproximadamente 70 aminoácidos. Este dominio interacciona con elementos de respuesta a andrógenos (ARE por su significado en inglés androgen response element) (Brinkmann y col., 1989). Es una estructura globular compacta la cual presenta dos subestructuras, que contienen en el centro un átomo de zinc, que interactúa vía enlaces coordinados con cuatro residuos de cisteína, es el mejor conservado entre los miembros de la familia de los receptores de esteroides, esta región es 100% idéntica en el humano y la rata, así mismo esta región es 79% idéntica a la estructura del dominio de unión a DNA del receptor de progesterona, 76% idéntica al receptor de glucocorticoides y 56% idéntica al receptor de estrógenos (Gelman, 2002). Los dedos de zinc son estructural y funcionalmente diferentes y son codificados por diferentes exones.

2) El dominio de unión al ligando, está codificado por los exones 4 al 8 en el humano, se compone de aproximadamente 250 aminoácidos, es el segundo mejor conservado; se localiza en el extremo carboxilo terminal de la proteína (Ver figura 4), ésta región se une a la hormona e interacciona con las proteínas de choque térmico

(HSP 90, 72 y 59). En esta región se llevan a cabo los procesos de dimerización y transactivación del AR (Luisi y col., 1991).

3) La región bisagra se encuentra entre el dominio de unión al DNA y el dominio de unión a ligando. Es una región no conservada y es variable en los diferentes receptores. Esta región es considerada como una unión flexible entre el dominio de unión a ligando y el resto de la molécula del receptor.

4) El dominio amino terminal es la región menos conservada y la que interviene en las funciones de activación de la transcripción. Tiene 537 aminoácidos, de los cuales los primeros 140 aminoácidos no son esenciales para la actividad transcripcional, presenta dos dominios de activación AF-1 y AF-5 (Activation Function). Los andrógenos dependen de la interacción con la región amino terminal en el dominio de unión al ligando del AR por que juegan un papel importante en la estabilización del AR en la formación del complejo homodimérico entre el receptor y el ligando (Orozco y col., 2000; McEwan, 2004). Véase figura 4.

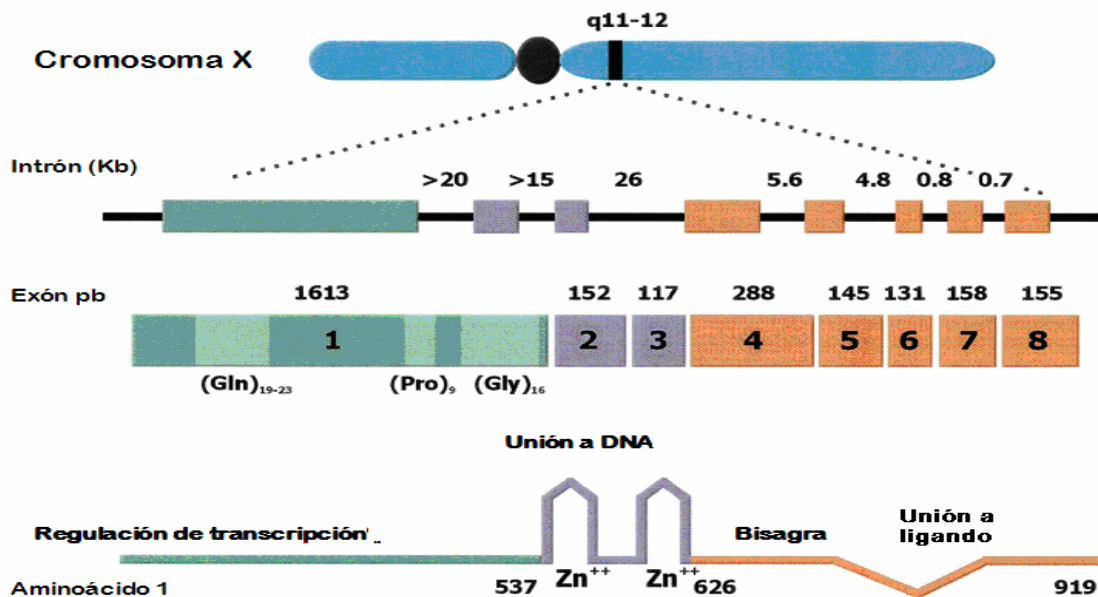


Fig. 4 Localización y estructura del receptor de andrógenos. El AR se encuentra localizado en el brazo largo del cromosoma X en la región q11-12. Está codificado por ocho exones, el exón 1 codifica para la región amino terminal, los exones 2 y 3 para la región de unión a DNA y de los exones 4 al 8 se codifica la región de unión a ligando. Modificada de Gelmann, 2002.

Los esteroides son moléculas hidrofóbicas de bajo peso molecular que pueden atravesar fácilmente la membrana plasmática.

Una vez que la hormona atraviesa la membrana se une a su receptor, que en ausencia de su ligando se encuentran unidos a proteínas de choque térmico, y una vez que se une el receptor a la hormona, se disocian estas proteínas. El complejo hormona-receptor se transloca al núcleo en los elementos de respuesta a andrógenos de las siglas en inglés: ARE (Androgen Response Elements), en este paso el complejo se une como un homodímero a la región promotora de los genes que se van a transcribir. Esta unión del AR con el DNA forma un complejo proteína-DNA que amplifica la señal iniciada por el AR. Esta acción está mediada por proteínas coactivadoras que amplifican la señal mediada por la proteína CREB (cAMP-response element binding protein) y así se inicia la actividad de la polimerasa II; así mismo la unión de coactivadores p160 a través de los motivos LXXLL resulta en la activación de la histona acetil transferasa que juega un papel importante en la remodelación de la cromatina (Gelmann, 2002) para abrir la doble hélice de DNA y permitir que sea transcrito un mensajero específico. La acción del AR también es atenuada por la unión de correpresores que son moléculas que inhiben la iniciación de la transcripción (Gelmann, 2002). La figura 5 ilustra el mecanismo de acción general de los andrógenos.

La acción del AR está regulada por modificaciones postraduccionales como la fosforilación que ocurre bajo diferentes condiciones. El AR es fosforilado al menos tres veces en los sitios S81, S94 y S650, las primeras dos fosforilaciones no se ha demostrado que sean importantes para la actividad del AR en sistemas experimentales, aunque no se ha determinado su papel fisiológico. Se ha demostrado que la fosforilación en S81 está regulado en respuesta a hormonas esteroides (Gelmann, 2002).

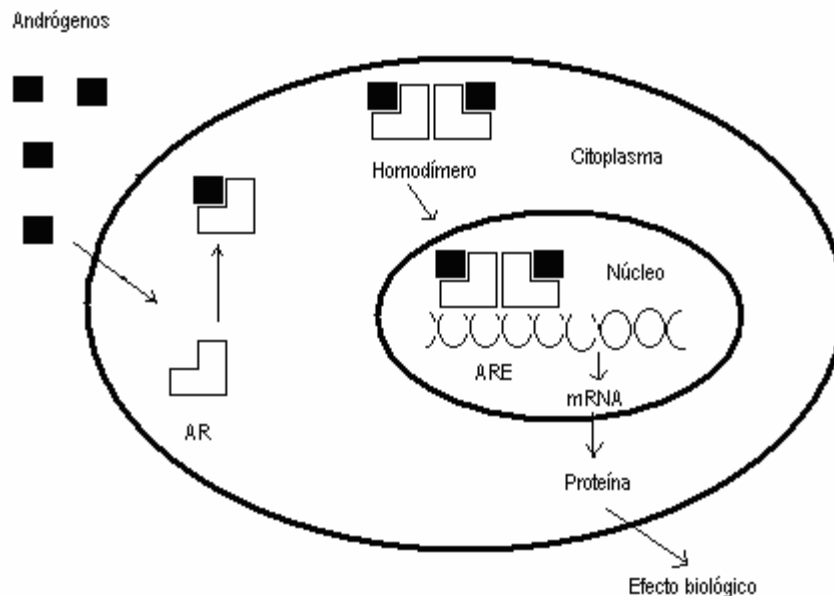


Fig.5 Mecanismo general de acción de las hormonas esteroides. Los andrógenos atraviesan la membrana plasmática y se unen a su receptor, el complejo hormona receptor en forma de homodímero se transloca al núcleo uniéndose a los ARE de los genes blanco.

1.11 Papel del receptor de andrógenos durante el desarrollo del ovario

Como se mencionó anteriormente el AR se encuentra involucrado clásicamente en el desarrollo del aparato reproductor masculino, sin embargo en trabajos recientes se ha reportado la presencia del AR durante el desarrollo de la gónada femenina en diferentes vertebrados incluyendo mamíferos y en el humano sugiriendo que son importantes para el desarrollo del ovario.

En fetos humanos femeninos de 9 semanas de gestación se detectó por inmunohistoquímica el AR, por consiguiente mencionan que esta proteína podría ser un factor importante en el crecimiento de la gónada durante el periodo de gestación (Sajjad y col., 2004).

En el embrión de pollo recientemente se publicó la secuencia completa del AR en pollo y del RNAm para este por RT-PCR, PCR en tiempo real y la proteína se evidenció por inmunohistoquímica en macho y hembra en diferentes periodos de incubación (7 a 21 d.i.), en los cuales se encontró incrementada la expresión del AR en el ovario en las distintas edades estudiadas; ya que en el macho se incrementa

poco antes del nacimiento. Con estos resultados sugieren que tanto los andrógenos como el AR pueden estar envueltos en el desarrollo del ovario (Kato y col., 2006).

2. Justificación

El epitelio superficial del ovario está sujeto a diferentes influencias hormonales en relación a la etapa de la vida de la mujer; estas regulan la proliferación y apoptosis celular del mismo para romper y luego reparar la superficie del ovario durante la ovulación. En la actualidad, se considera que este tejido es el origen del 90% de las neoplasias epiteliales ováricas cuyo riesgo aumenta durante el climaterio cuando la relación andrógenos/estrógenos producidos por el ovario es mayor. Por lo que en nuestro laboratorio decidimos estudiar el efecto de los andrógenos en el epitelio superficial del ovario utilizando un modelo de estudio in vitro con células del epitelio superficial obtenidas del ovario izquierdo del embrión de pollo. Además que hay pocos estudios hechos en tejido normal, debido a lo escaso que es este epitelio y la dificultad de obtenerlo.

3. Hipótesis

Los andrógenos participan en la proliferación celular del epitelio superficial del ovario, entonces el tratamiento con testosterona y dihidrotestosterona modificará el número de células en fase de síntesis y el número total de células en cultivos primarios.

4. Objetivos

4.1 Objetivo General

Estudiar la participación de los andrógenos en la proliferación de las células del epitelio superficial del ovario embrionario de pollo de 14 días de incubación.

4.2 Objetivos particulares

- ❖ Desarrollar un modelo in vitro que nos permita explorar el efecto de hormonas esteroideas sobre una población enriquecida de células epiteliales.
- ❖ Estudiar el efecto de testosterona y dihidrotestosterona a diferentes dosis sobre la proliferación del epitelio superficial del ovario embrionario de pollo en cultivos primarios.
- ❖ Detectar la presencia del RNAm del receptor a andrógenos por el método de RT-PCR.
- ❖ Evaluar la presencia y determinar la distribución del receptor a andrógenos en el ovario embrionario de pollo por inmunohistoquímica.
- ❖ Detectar el RNA mensajero del receptor a estrógenos alfa y de la enzima P450 aromatasa.

5. Material y métodos

5.1 Animales

Se emplearon embriones de pollo de 14 días de incubación, raza White Leghorn provenientes de la granja ALPES (Aves Libres de Patógenos) de Tehuacán Puebla. Se incubaron a 38° C con 80% de humedad relativa. Se sacrificaron por decapitación, y se disecó el ovario izquierdo.

5.2 Reactivos y equipo

Reactivos

Para este trabajo se ocuparon reactivos biológicos como: Anticuerpos: anti-AR (Santa Cruz AR-N20:sc-816), anti-BrdU y anti-ratón -fluoresceinado para detectar células en síntesis marcadas con BrdU (Roche 1296736), anticuerpo secundario biotinilado anti-conejo hecho en cabra IgG (ZYMED 81-6140), anticuerpo primario anti-ratón para citoqueratinas (Scy Tek A0029), (Roche Kit BrdU 1296736), anticuerpo secundario biotinilado (Scy Tek). Antibiótico (penicilina, estreptomicina y glutamina Gibco 0229). Tripsina (Gibco), Inhibidor de tripsina (Fluka). RNA extraído de ovario y de OSE de embrión de pollo de 14 d.i. a partir del cual se obtuvo DNA complementario. Medios de cultivo: Dulbecco's Modified Medium (Gibco 31600), albúmina sérica bovina, medio MCDB 105 y medio 199 (Sigma). Colorantes: Azul tripano (Gibco 0367), rojo de fenol (Sigma P0290). Otros reactivos empleados para la preparación de soluciones como Búfers, SSB, fijadores, etc. se adquirieron con los proveedores de distintas marcas comerciales como: Merk, Sigma, Fluka, JT-Baker y otros.

Equipo

El equipo que se utilizó para la realización de este proyecto se encuentra en el laboratorio de Embriología de la Facultad de Medicina y fue el siguiente: Autoclave (SANYO MAC-550EX), cámara horizontal para electroforesis (Gibco Horizon 58), campana de flujo laminar (NUAIRE NV425-400), centrífuga (Thermo Centra CL2), espectrofotómetro (Beckman DU650), Horno de hibridación con agitación (UVP Hybrilinker HL-2000), Incubadora para cultivos celulares de 37°C y 5% de CO₂ (NUAIRE Water Jacketed), Incubadora con agitación (Precision Scientific),

microcentrífuga (Eppendorf 5415D), microcentrífuga refrigerada (Eppendorf 5417R), microscopio óptico (Nikon Eclipse E400), microscopio de epifluorescencia (Nikon Eclipse E600), microscopio de campo invertido (Olympus CK40-F100), potenciómetro (Brinkman), termociclador de gradiente (Eppendorf Mastercycler gradient), termociclador (Gene Amp PCR System 2400), transluminador (UVP Epi Chemi II Darkroom).

5.3 Cultivos primarios y tratamiento con andrógenos

Para explorar el efecto proliferativo de los andrógenos in vitro sobre el OSE se desarrolló un modelo de cultivo primario. Se obtuvieron las células epiteliales por digestión parcial con tripsina al 0.01% disuelta en solución salina balanceada libre de calcio y magnesio (SSB)+EDTA 0.01mM; agregando 1 mL por ovario de esta solución se colocaron los ovarios en un matraz para separar las células epiteliales por agitación en baño maría a 37°C por 6 minutos. Posteriormente se recuperaron por centrifugación a 1200 rpm durante 10 min. De esta suspensión celular se obtuvo más del 80% de pureza de células epiteliales. Para verificar la viabilidad celular, se hizo una prueba con azul tripano al 0.4%; además se determinó la pureza de la suspensión celular al microscopio óptico contando en el hemocitómetro una alícuota de la suspensión celular mezclada con el colorante.

Por otra parte se controlaron histológicamente los ovarios antes y después de la digestión con tripsina, para corroborar que con este método se desprendiera el epitelio superficial se llevó a cabo la detección de citoqueratinas por inmunohistoquímica en cortes de ovario (Apéndice), y se verificó que las células obtenidas en la digestión fraccionada fueran células epiteliales positivas también a citoqueratinas con inmunocitoquímica (Apéndice).

De la suspensión celular obtenida se sembraron 140 000 células/caja de 35 mm para cultivarlas con medio MCDB105 y medio199 (105/199) en proporción 1:1 enriquecido con suero bovino fetal al 10% y suplementado con 1% de antibiótico; se incubaron estas células por 48 h, cuando presentaron una confluencia entre 40 y 50% se les cambio el medio de cultivo por uno con baja concentración de suero y libre de esteroides (ayuno) por 12 h previas a los tratamientos hormonales. Las condiciones de los tratamientos hormonales in vitro fueron las siguientes: testosterona (T), dihidrotestosterona (DHT) y 17 β -estradiol (E_2) en dosis de 10^{-8} a

10^{-11} M por 12 h; para T y E_2 en dosis de 10^{-10} M por tiempos cortos de 1, 2 y 3 h con estas condiciones se determinó la proliferación celular por conteo de células en fase de síntesis. Finalmente se usaron tratamientos de T y DHT en dosis de 10^{-8} y 10^{-10} M por 48h para medir proliferación celular contando el número de células por caja.

5.4 Cuantificación del porcentaje de células cultivadas en fase de síntesis del ciclo celular

50 minutos previos a agregar el tratamiento hormonal, se adicionó a los cultivos celulares primarios una solución de 5 Bromo 2 deoxi Uridina (BrdU) a una concentración de 10 μ M. Las células se recuperaron de las cajas de cultivo por tripsinización, se lavaron con PBS y se hicieron extendidos celulares en portaobjetos y se fijaron en alcohol ácido (pH de 2.0). Para detectar las células en fase de síntesis se empleó el método de inmunocitoquímica usando un anticuerpo anti-BrdU y un segundo anticuerpo marcado con fluoresceína (Ver apéndice) donde se observa reacción positiva en el núcleo de las células en proliferación como puede verse en la figura 6. Se evaluó el porcentaje de células en proliferación que incorporaron BrdU contando al menos 200 células por muestra en un microscopio de epifluorescencia (Nikon Eclipse E600).

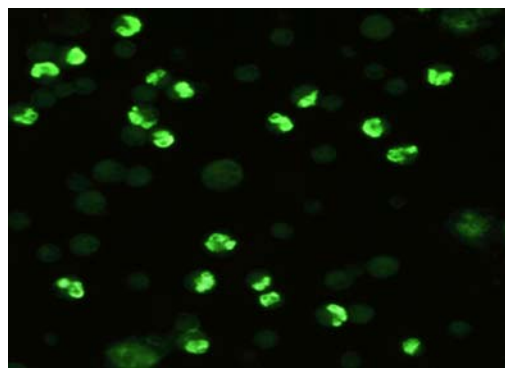


Fig. 6 Las células en fase de síntesis incorporan BrdU y pueden ser detectadas por inmunofluorescencia.

5.5 Conteo del número total de células

Para analizar si el tratamiento con andrógenos modificaría el número de células in vitro; se contó el número total de células/caja en los grupos testigo y tratados con testosterona ó dihidrotestosterona por 48 h a dosis de 10^{-8} y 10^{-10} M; una vez transcurrido el tiempo de tratamiento, se recuperaron las células de la caja con tripsina al 0.05% y SSB +EDTA 0.1mM y se contó en una alícuota en el hemocitómetro (Apéndice).

5.6 Expresión del RNA mensajero de los receptores de andrógenos, estrógenos α y P450 arom en OSE.

Uno de los objetivos de este trabajo fue determinar la presencia del RNAm del AR en el OSE embrionario de pollo por PCR, pero además no se descartó la posibilidad de que la testosterona pudiera ser metabolizada a estradiol por la P450 arom y que hubiese un efecto estrógeno en la proliferación por lo que se busco la expresión del RNAm de la P450 arom y ER α , mediante reverso transcripción y la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR).

Se obtuvo el RNA total de las células epiteliales cultivadas, sin cultivar y de ovario completo por extracción fenólica (Ver apéndice) y se sintetizó a partir de 2 μ g de este el DNA complementario (cDNA) por retro-transcripción según las instrucciones del proveedor (Roche 1st Strand Síntesis Kit for RT-PCR 1483188). Para amplificar los fragmentos de interés a partir del cDNA, se emplearon oligonucleótidos sintéticos, que delimitan un fragmento de 398 pb para el receptor de andrógenos. Se detectó un fragmento 548 pb de longitud para P450arom (Villalpando y col; 2000), de 697 pb para el receptor de estrógenos alfa (Méndez y col; 1999). Se amplificó simultáneamente un fragmento de 296 pb para β -actina de pollo, que es un gen constitutivo usado como un control de la PCR. Se empleó un termociclador de gradiente Eppendorf para la reacción de la PCR. Las secuencias de oligonucleótidos usadas para la detección de los RNA mensajeros en este trabajo se encuentran en la tabla I.

Tabla I. Secuencias de oligonucleótidos empleados para la amplificación génica

Gen	Oligonucleótidos 5'→3'	Referencia
Receptor de andrógenos	Sentido: CAG CCA GAC TCC TTC TCC AA Antisentido: TTC TGG TTC TTC AGG CCA TC	
Receptor de estrógenos alfa	Sentido: CGT GGA AAG CAA CAA GAC AG Antisentido: AAG CCT CCC CGT TCC TGG	Méndez y col., 1999
P450 arom	Sentido: CTC GAT TTG GGA GCA AGC TTG GAT Antisentido: GAC ATT CTC AGC AGT CAG ATC TTC	Villalpando y col., 2000.
β-actina	Sentido: CAA AGC CAA CAG AGA GAA GA Antisentido: TCA CGC ACA ATT TCT CTC TC	Kost y col., 1983

El fragmento del AR de pollo que se amplificó, se encuentra ubicado de la región 1792→2189 (Ver figura 7) de la secuencia del receptor a andrógenos de pollo con clave de acceso NM_001040090 en el GenBank.

```

1621 agtctgaaga cacaagatga agctgaggca gccagctcat ccagccccac ggaggagcaa
1681 gctcctaaga tggatgatgac acacgtcaat ggctttgagt gccagcccat ctttctcaat
1741 gtgctggaag ccatcgagcc cgctgtggtg tgtgctggcc atgacaacag cagccagac
1801 tccttctcca acctgctaag cagcctgaat gaacttgggg agagacagct ggtctacgtc
1861 gtcaagtggg caaaggcttt gccaggattt cgcaatttgc atgtggatga ccagatgtca
1921 ataatccagt attcttggat gggctcatg atttttgcca tgggttgag atctttcact
1981 aacgtcaatt ccaggatgct ttactttgcc ccagatttgg tcttcaacga gtaccgatg
2041 cacaaatcca gaatgtacag ccaatgcgtc aggatgcggc agctctcca ggagtttggg
2101 tggcttcaga tcacgccccca ggagtttctc tgcataaagg ctctgctctt cttcagtatt
2161 attccagtgg atggcctgaa gaaccagaag ctctttgatg aacttgcac gaactacatt
2221 aaggaactcg atcggatcat tgcttgcaag aggaagaacc ccacctctg ctctaggcgg
2281 ttttaccagc tcaccaaggt cctggactcc gtgcatccta ttgccaagga tctgcaccag
2341 tttacatttg atcttttaat taaggccac atggtgagcg tggactacc ggaaatgatg
2401 gccgagatca tctctgtgca ggttccaag atcctgtctg gaaaagtga acccatttac

```

Fig. 7 En este fragmento de la secuencia del AR de pollo se muestran el amplicón (398 pb) obtenido por PCR (sombreado) y las secuencias de oligonucleótidos empleadas.

Las condiciones de PCR usadas fueron optimizadas para cada uno de los fragmentos de interés y se muestran en la tabla II.

Tabla II. Condiciones usadas para la amplificación de fragmentos por RT-PCR.

Gen	Temperatura				
	Desnaturalización (°C)	Alineación (°C)	Extensión (°C)	Extensión final (°C)	Ciclos
AR	94	64.3	72	72	35
ER α	94	62	72	72	40
P450 arom	94	72	72	72	35
β -actina	94	59	72	72	30

En esta tabla se muestran las condiciones de PCR para la amplificación de los fragmentos de interés, el tiempo de desnaturalización fue en todos los casos de 2 min a excepción de la β -actina, que fue de 1 min. El tiempo de alineación fue de 1' para el ER α y de 45'' para los restantes, el tiempo de extensión usado para todos los fragmentos fue de 45'' y el de extensión final 5'.

Finalmente los productos de amplificación se visualizaron por electroforesis en geles de agarosa al 1% como se verá más adelante en las imágenes de los resultados. El tamaño del fragmento se identificó utilizando un marcador de peso molecular de 100 pb (1 μ g/ μ L). Como solución de corrimiento se empleó buffer Tris-Acetato EDTA (TAE) 1X.

5.7 Detección de la proteína para el receptor de andrógenos en el ovario por inmunohistoquímica

Se disecó el ovario embrionario izquierdo y se fijo en paraformaldehído al 4% disuelto en PBS por 2 h a 4°C, se lavaron los ovarios y se deshidrataron en alcoholes graduados y xilol para posteriormente llevar a cabo la inclusión en parafina. Se hicieron cortes de 5 μ m de grosor que fueron montados en laminillas recubiertas con poli L-lisina. Para llevar a cabo la inmunohistoquímica se desparafinizaron los cortes con calor y xilol; posteriormente se rehidrataron con alcoholes en concentraciones decrecientes y finalmente se lavaron con PBS y se procedió con la inmunodetección del AR usando un anticuerpo primario policlonal anti-receptor de

andrógenos humano hecho en conejo (Santa Cruz AR-N20:sc-816) diluido 1:50 en PBS y albúmina, posteriormente se agregó el anticuerpo secundario biotinilado (Goat anti-rabbit IgG ZYMED 81-61 40). Finalmente visualizaron las células positivas con el Kit de detección para reacciones inmunoenzimáticas (Scy Tek AEA080) que usa estreptavidina peroxidada, y con 3'3 diaminobenzidina (Ver apéndice).

En el siguiente esquema se resume metodología usada en este trabajo. Las técnicas y las soluciones empleadas se describen con detalle en el apéndice.

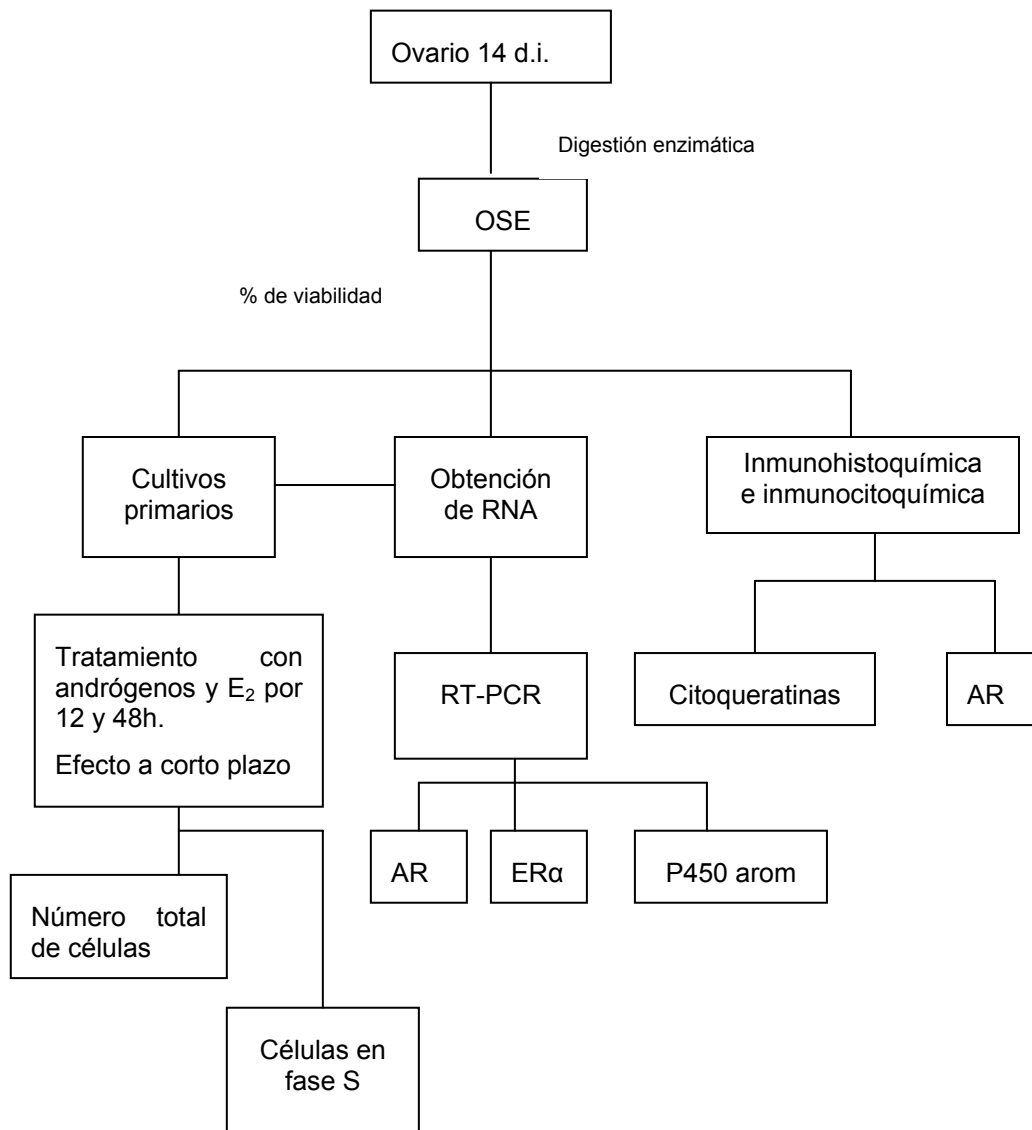


Fig.8 Diagrama de flujo con los procedimientos empleados en este trabajo experimental.

6. Resultados

6.1 El embrión de pollo como modelo de estudio in vitro

En este trabajo se estableció un modelo de cultivo primario de células epiteliales de ovario de embrión de pollo de 14 d.i. Esto nos permitió evaluar el efecto in vitro con testosterona y dihidrotestosterona a diferentes dosis.

Por digestión parcial se obtuvo una suspensión enriquecida de células epiteliales con al menos el 90% de viabilidad para ser cultivadas; entre el 80 y 85% de estas células fueron positivas a citoqueratinas como se observa en la figura 9.

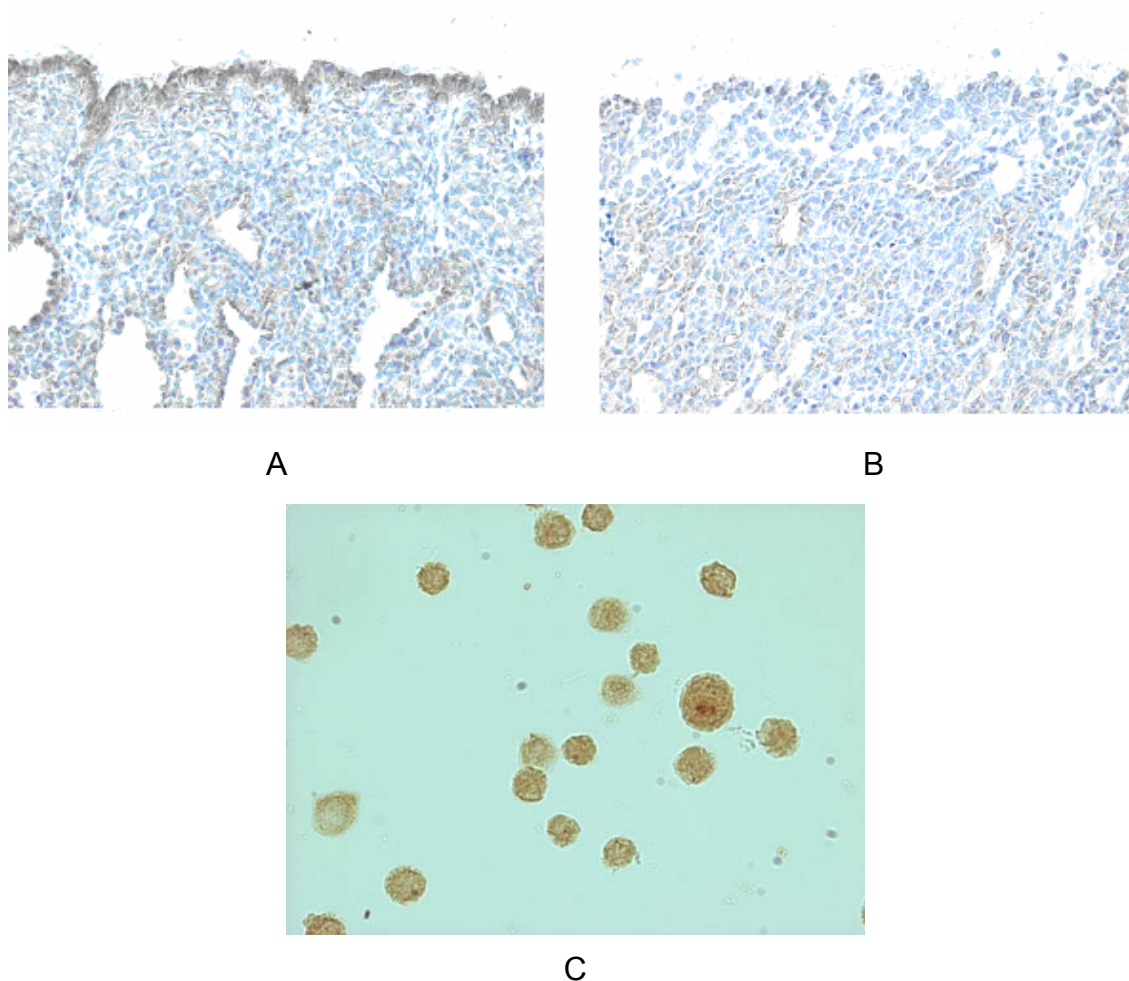


Fig 9 Detección de citoqueratinas en ovario de pollo de 14 d.i. por inmunohistoquímica antes de la disgregación con tripsina se observa teñido el citoplasma de las células del epitelio que recubre la superficie del ovario 20X (A). Después de la disgregación enzimática esta marca se pierde 20X (B). La suspensión celular obtenida por este método muestra que entre el 80 y 85% de estas células son positivas a citoqueratinas por inmunocitoquímica, 40X(C).

Las células epiteliales se cultivaron en cajas de petri de acuerdo a las condiciones previamente descritas, para obtener cultivos primarios como el que se muestra en la figura 10. Al adherirse a la superficie de la caja de cultivo las células epiteliales toman inicialmente una apariencia estrellada, luego tienden a ser poliédricas. Una vez establecido el cultivo, las células toleran el medio bajo en suero libre de esteroides, sin despegarse de la caja y en buenas condiciones para proseguir con los tratamientos hormonales.

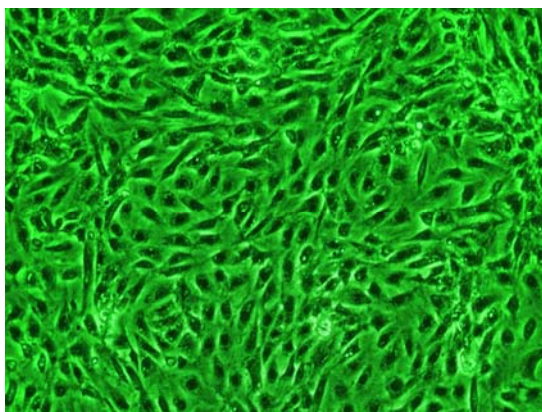


Fig. 10 Cultivo primario de células epiteliales que llegaron a confluencia. Se observa el aspecto de “adoquinado” descrito para el OSE humano. Aumento 10X.

6.2 Efecto del tratamiento con andrógenos en el epitelio superficial

La proliferación celular se evaluó comparando el porcentaje de incorporación de BrdU entre los grupos testigo y los tratados con hormonas esteroides. Los resultados con los tratamientos de T, DHT y su comparación con E_2 , se muestran en la tabla III. De los esteroides usados a las dosis estudiadas, el único tratamiento que modificó ligeramente el porcentaje de células en fase de síntesis fue T a dosis de 10^{-10} y 10^{-11} . Las células tratadas con DHT no incrementaron la incorporación de BrdU (Figura 11). Con estradiol tampoco se observaron cambios.

Para tiempos cortos los resultados obtenidos en las células del OSE tratadas con T y E_2 , tampoco fueron significativos y se encuentran en la tabla IV.

En cuanto a los resultados del número de células recuperadas por caja de cultivo tratadas con T y DHT por 48h a dosis de 10^{-8} y 10^{-10} M, se muestran en la tabla V. Sólo DHT en dosis de 10^{-10} M registró un ligero incremento (Ver figura 12).

Estos datos reportados en la tabla de resultados se expresan como la media \pm ESM (Error estándar sobre la media), de al menos tres experimentos por grupo hechos por triplicado y se analizaron estadísticamente por el método de Duncan $P < 0.05$.

Tabla III. Porcentaje de células positivas a BrdU en cultivos primarios de células del epitelio superficial del ovario de pollo de 14 d.i. tratadas por 12h con T, DHT y E₂.

Dosis (M) Tratamiento		10⁻⁸	10⁻⁹	10⁻¹⁰	10⁻¹¹
Testigo	11.2±0.44				
Testosterona		11.49±0.46	11.43±0.32	13.41±0.57	13.62±1.14
Dihidrotestosterona		11.29±0.78	10.92±1.52	11.86±0.50	10.97±0.26
Testigo	16.64±0.88				
17β- estradiol		17.30±1.52	18.03±1.78	18.73±1.06	17.57±1.20

Se reportan los promedios ± ESM de al menos tres experimentos por triplicado para cada uno de los grupos. Analizados con la prueba de Duncan los tratamientos de T 10⁻¹⁰ y T 10⁻¹¹ difieren del control.

Tabla IV. Porcentaje de células positivas a BrdU incubadas con 17β- estradiol y testosterona a la dosis de 10⁻¹⁰ M.

Tratamiento	Tiempo (h)		
	1	2	3
Testigo	26.90±0.00	26.40±1.32	24.80±1.15
Testosterona	26.30±1.97	26.90±1.67	25.41±0.43
17β- estradiol	25.60±3.90	26.80±1.44	22.50±0.90

Se reporta la media ± ESM de al menos cuatro experimentos hechos por triplicado. No se encontró diferencia significativa en los tratamientos ensayados usando la prueba de Duncan P < 0.05.

Tabla V. Número de células epiteliales por caja en cultivos primarios tratados in vitro con testosterona y dihidrotestosterona por 48h.

Dosis (M) Tratamiento		10⁻⁸	10⁻¹⁰
Testigo	26.88±0.97		
Testosterona		28.07±2.34	28.36±1.70
Dihidrotestosterona		28.17±1.16	33.06±1.81

Se reporta el promedio ± ESM del número de células de al menos cinco experimentos por triplicado en cultivos primarios de células epiteliales 48h después de adicionar tratamientos con andrógenos. Con la prueba de Duncan se encontró que el número de células de los cultivos tratados con DHT a la dosis de 10⁻¹⁰ M difiere del grupo testigo.

Proliferación celular en cultivos de OSE tratados con andrógenos

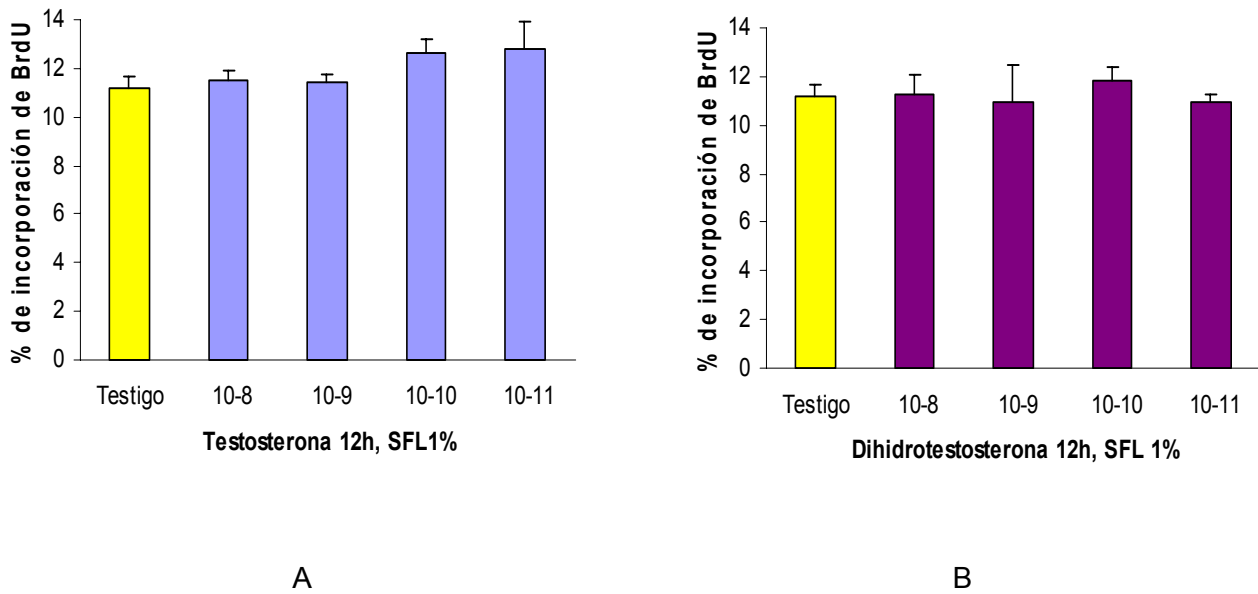


Fig. 11 A. Las células tratadas con testosterona a la dosis de 10^{-10} y 10^{-11} M sugieren un ligero incremento en la proliferación. En la figura 11 B, no se observan cambios en la incorporación de BrdU en las células tratadas con DHT. Los resultados se expresan como la media \pm ESM, de al menos 3 experimentos por grupo, $P < 0.05$.

Número total de células del OSE tratadas in vitro con andrógenos

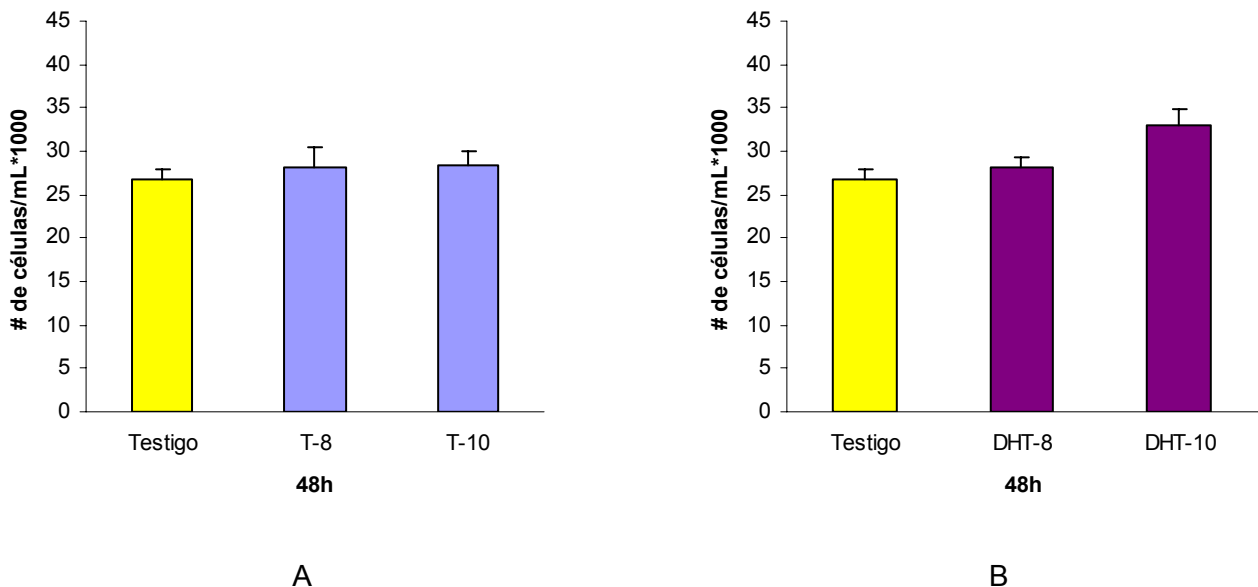


Fig. 12. No se observa incremento en el número de células tratadas con testosterona (A), sin embargo en los cultivos tratados con DHT en dosis de 10^{-10} M, se observa un incremento en el número de células por caja (B). Datos analizados con la prueba de Duncan \pm ESM, $n = 5$.

6.3 Amplificación de RNA mensajeros para el receptor de andrógenos, P450 arom y receptor de estrógenos alfa.

Se detectaron los RNA mensajeros de los receptores de andrógenos y estrógenos alfa, así como para la enzima P450 arom por RT-PCR; en el ovario completo del embrión de pollo de 14 d.i., en las células epiteliales sin cultivar y cultivadas, así mismo se usó como control positivo cDNA de ovario completo. Como puede observarse las bandas de expresión del RNAm de la P450arom lucen más tenues en OSE y no se aprecian con las muestras del OSE cultivado. Se corrieron muestras paralelas para el gen de la β -actina ya que es un gen constitutivo y así confirmar que las muestras de cDNA obtenido fueran de buena calidad. Los resultados se muestran en la figura 13.

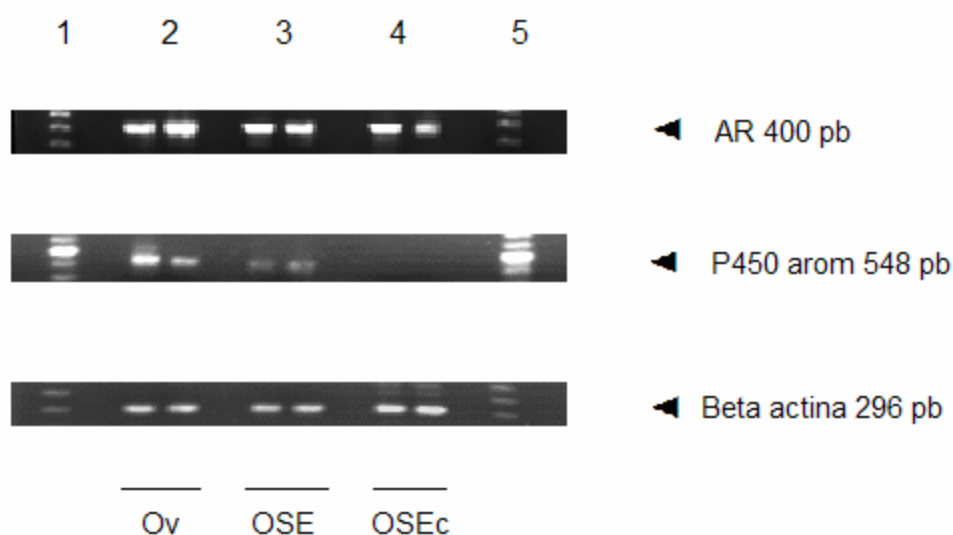


Fig. 13. Expresión del RNAm del AR, P450 arom, y β -actina en el OSE y OSE cultivado (OSEc) de 14 d.i. El carril 2 corresponde a la muestra de ovario (Ov), en el carril 3 y 4 OSE y OSE cultivado. Los carriles 1 y 5 contienen el marcador de 100 pb.

En la figura 14 se muestra la fotografía del gel de agarosa en el que se corrieron los productos de amplificación para el RNAm del receptor de estrógenos alfa en ovario completo OSE y OSE cultivado de embrión de pollo. Este RNAm del ER α se amplificó para saber si se encontraba presente en el OSE y así tener una idea si este tejido podía responder a también a E₂.

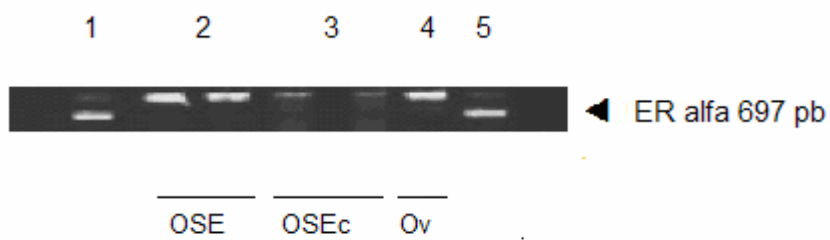


Fig. 14 Expresión del ER α en OSE (2), OSEc (3), Ov (4) de 14 d.i. Ladder de 123 pb (1 y 5).

El fragmento del receptor de andrógenos detectado en células del OSE que se observa en la figura 13 fue purificado con un kit de extracción de productos de PCR y posteriormente fue secuenciado. El electroferograma del amplicón coincide con la secuencia de de AR de pollo reportado en el GenBank (NM_001040090), figura 15.

6.4 Detección del receptor de andrógenos en el ovario del embrión de pollo

La proteína del receptor de andrógenos se encuentra presente en el ovario del embrión de pollo de 14 d.i. En el epitelio superficial se encuentran células con núcleo positivo para el AR. En la corteza, dan reacción positiva las células germinales aunque esta se observa también en el citoplasma más que en el núcleo. En la médula, las células somáticas que corresponden a las células esteroidogénicas también muestran reacción positiva para el receptor de andrógenos.

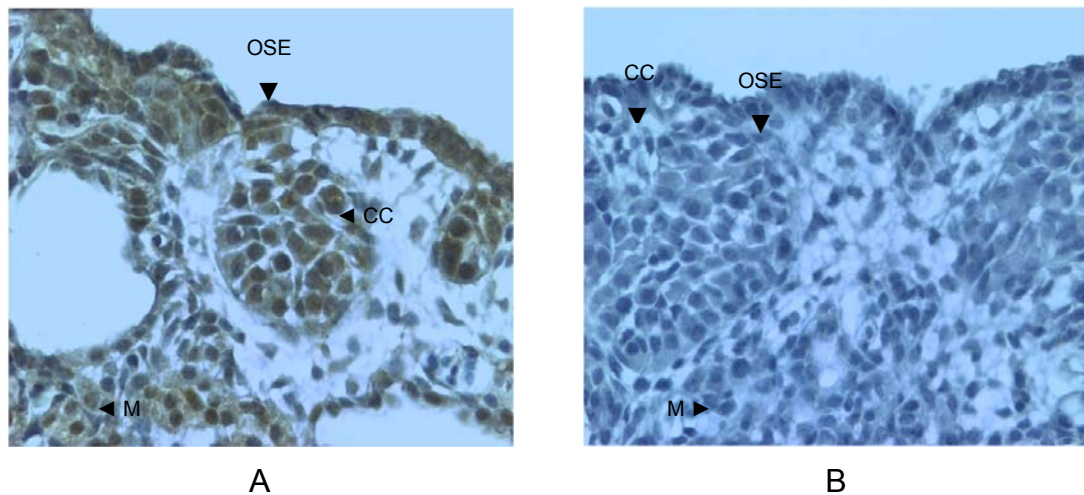


Fig. 16 Reacción de inmunohistoquímica positiva para el receptor de andrógenos en el ovario de pollo de 14 d.i.(a) Se observa una marca café característica en el núcleo de las células del OSE, de los cordones corticales (CC) y de la médula (M). Las muestras se contratiñeron con hematoxilina de Harris. Control negativo (B). Ambas imágenes fueron tomadas con un aumento de 40X.

7. Discusión

En este trabajo, se describe un modelo para el estudio de las células del epitelio superficial del ovario utilizando el embrión de pollo. Se demostró la presencia del RNAm del receptor de andrógenos así como la proteína para el mismo. Se describe un posible efecto de la testosterona y la dihidrotestosterona sobre la proliferación celular en cultivos primarios del epitelio superficial del ovario.

El desarrollo de modelos experimentales es fundamental para avanzar en el conocimiento de la biología del OSE, el embrión de pollo tiene la ventaja de ser un modelo aislado, de fácil acceso que nos permite obtener una cantidad suficiente de tejido normal. Los cultivos primarios se hicieron con células epiteliales obtenidas de embriones de 14 días; a esta edad se recuperan células en cantidad suficiente, con una pureza de aproximadamente 85% y se mantienen en buenas condiciones durante en el cultivo. Las imágenes histológicas del ovario, después de la disgregación enzimática fraccionada, nos muestran que en estas condiciones se desprende el epitelio superficial dejando prácticamente intacta la corteza ovárica. Al microscopio óptico se observa una población homogénea de células pequeñas con digitaciones en la membrana plasmática. Como prueba de su naturaleza epitelial se practicó inmunocitoquímica para citoqueratinas antes y después de cultivarlas lo que nos permite suponer que al menos en parte las células mantienen las características del OSE in vivo. La imagen de los cultivos celulares muestra una población homogénea con la morfología característica descrita para las células epiteliales como se observa en la figura 10 en la parte de resultados de este trabajo.

La principal contaminación de las células epiteliales, que se obtienen para realizar los cultivos primarios, son las células germinales las cuales no se adhieren a las cajas de cultivo, por lo que se pierden durante los reemplazos de medio de cultivo. Otras células somáticas de la corteza del ovario es poco probable que alcancen a propagarse, ya que este medio de cultivo es favorable para las células epiteliales por su alto contenido en calcio. Este mismo medio de cultivo fue descrito para el cultivo de células del epitelio superficial del ovario humano (Auersperg, 2001).

A diferencia de las células obtenidas de 14 d.i. las de embriones de edades menores aún cuando se recuperan bien es más difícil cultivarlas. Esto podría deberse a que en el día 13 d.i. se lleva a cabo una secreción importante de FSH que podría estar mejorando la viabilidad de las células epiteliales in vitro (Rombauts y col., 1993). En estas condiciones de cultivo, las células crecen formando una monocapa que da una apariencia de “empedrado”; aunque cuando no han llegado a confluencia sobre la superficie de la caja, pueden tener un aspecto alargado parecido a fibroblastos, fenómeno que ha sido descrito en otros modelos de cultivo (Dunfield y col., 2002).

Existen varios modelos para estudiar el epitelio superficial del ovario y aún cuando se ha trabajado con muestras de tejido humano, su obtención es difícil. El avance en esta área ha sido limitado en parte por la mínima disponibilidad de tejido, menos del 1% del total del tejido ovárico. La mayoría de los trabajos se han realizado con líneas celulares provenientes de tumores de ovario humano de tipo epitelial lo que hace difícil explicar lo que sucede en el tejido normal, ya que las células tumorales pueden presentar mutaciones. En modelos murinos, se ha inducido la formación de tumores introduciendo o mutando genes, ya que estos animales no desarrollan tumores de manera espontánea (Vanderhyden y col., 2003). El modelo experimental de las aves es interesante porque en la gallina se generan tumores ováricos manera espontánea, con la salvedad de que no se ha establecido fehacientemente que estas neoplasias sean generadas por el epitelio superficial (Fredrickson, 1987); por otra parte, no hay estudios en el OSE normal de pollo.

Efecto sobre la proliferación celular

Para evidenciar el efecto mitogénico de las hormonas administradas se utilizó un periodo de ayuno, en un medio de cultivo con bajo contenido de suero bovino fetal libre de esteroides, para tratar de sincronizar a las células en el ciclo celular.

Cuando utilizamos la incorporación de BrdU para evaluar la síntesis de DNA en el ciclo celular, observamos que la testosterona a la dosis de 10^{-10} y 10^{-11} M produce un leve aumento en la incorporación de BrdU a las 12 h de tratamiento en las células cultivadas del OSE. Con DHT no se observaron cambios en la síntesis de DNA pero si se observó un ligero incremento en la cuenta del número total de células cultivadas recuperadas de las cajas de cultivo las cuales recibieron un tratamiento de 48 h a la dosis de 10^{-10} M. La

proliferación evaluada por estos dos métodos fue consistente en todos los ensayos realizados y difiere levemente al compararlo con los cultivos testigo. La información obtenida de estos resultados sugiere un discreto efecto estimulador de los andrógenos sobre la proliferación in vitro del OSE del embrión de pollo aunque hay que señalar que no se encontró un alto significado estadístico. Es interesante destacar que en ninguna de las condiciones y dosis experimentales se observaron efectos inhibitorios por parte de testosterona y DHT sobre la síntesis de DNA o sobre el número de células.

Una de las hipótesis planteadas en la literatura para el estudio del efecto de los andrógenos sobre el OSE, se basa en que el ovario de mujeres en periodo climatérico produce más andrógenos; por lo que durante la formación de los quistes de inclusión, los mismos están expuestos a estas hormonas y predisponen la aparición de neoplasias (Risch, 1998).

Resultados obtenidos de cultivos de OSE humano normal y en líneas celulares de cáncer de ovario, muestran un incremento en el número de células con el tratamiento de DHT y éste es más efectivo que la testosterona en OSE normal, aunque en las líneas de cáncer el efecto proliferativo es similar con ambos esteroides (Syed y col., 2001). En el citado experimento usaron dosis de (10^{-6} a 10^{-11} M) y el efecto que ellos obtienen difiere de nuestros datos ya que la proliferación la observan a dosis altas, además de que sus tratamientos los prolongan durante 5 días. En otro estudio usaron cultivos primarios de células del OSE normal humano de mujeres pre y posmenopausicas los cuales recibieron un tratamiento con mibolerona con el que se observó incremento en la proliferación celular por incorporación de timidina tritiada (Edmonson y col., 2002). Sin embargo en este último no se usó DHT; además no todos los cultivos de las pacientes respondieron de la misma manera.

Por otra parte, células cultivadas provenientes de tumores ováricos incrementaron su crecimiento celular al ser tratadas con dihidrotestosterona, así mismo incrementaron la expresión de la proteína del receptor de andrógenos, otra de sus observaciones fue que al adicionar vitamina D₃ en conjunto con DHT se revierte el efecto proliferativo de esta última (Ahonen y col., 2000). En cultivos primarios de células del epitelio superficial del ovario humano normales y malignas, la DHT favorece la proliferación celular a

través de la regulación a la baja de la expresión del receptor I y II del factor de crecimiento transformante beta, (Evangelou y col., 2003).

Algunos de estos resultados sugieren que testosterona y DHT tienen un efecto positivo sobre la proliferación del epitelio superficial del ovario, sin embargo para poder confirmar en nuestro modelo es necesario realizar más experimentos y realizar más variaciones en estos. Es necesario considerar que entre los distintos modelos experimentales hay diferencias en las condiciones de cultivo, así como en los tipos de células ováricas cultivadas, los periodos de cultivo, las especies usadas y la edad de los individuos, entre otros factores.

En otro trabajo, se emplearon cobayos a los cuales se les administraron tratamientos de testosterona in vivo, con dicho tratamiento observaron la aparición de tumores quísticos benignos en el epitelio superficial (Silva y col., 1997). Además, se ha visto que en células granulosas de cerdas la testosterona y DHT tienen un efecto positivo en la síntesis de DNA en conjunto con ovocitos y los factores de crecimiento GDF9 e IGF-I y en células granulosas de rata se observó un efecto similar con tratamientos de FSH asociados con 17β -estradiol y dihidrotestosterona (Hickey y col., 2005., Bley y col; 1997). En células germinales de pollo también se ha observado un incremento en la proliferación celular al recibir tratamientos de testosterona (Liu y col., 2005). Por resultados como estos, se ha planteado la hipótesis de que las células del folículo ovárico, necesitan de los factores de crecimiento secretados por el ovocito para continuar con su maduración y crecimiento (Hickey y col., 2005). Una de las características del modelo realizado en nuestro trabajo, es que las células epiteliales crecen aisladas de otros tipos celulares y quizá como sucede con las células de la granulosa se requieran de otras células del ovario como sería el caso del ovocito (Hickey y col., 2005). Por lo que sería interesante combinar factores de crecimiento derivados del ovocito en conjunto con los andrógenos para tratar a los cultivos celulares primarios del OSE embrionario.

Otro de los mecanismos por los cuales los andrógenos regulan a las células foliculares del ovario es la apoptosis. La inhibición de este proceso por estas hormonas fue evidenciada por Ojala y col., 2004 quienes hicieron estudios in vitro y concluyeron que estos esteroides son capaces de favorecer la sobrevivencia de las células granulosas humanas inhibiendo la apoptosis. No podemos descartar un efecto de este tipo en nuestros resultados con DHT aumentando el número de células del OSE luego de 48h de cultivo.

Los esteroides sexuales actúan a través de su receptor nuclear y tienen efectos genómicos en diferentes células, aunque también se ha planteado que tenga efectos no genómicos a través de un receptor de la membrana plasmática e interactuar con factores de crecimiento y vías de señalización dependientes de cinasas para regular la proliferación celular (Ojala y col., 2004), hecho que no ha sido explorado en modelos experimentales de OSE.

En nuestros experimentos, los cultivos tratados con 17β -estradiol durante 12 h no se apreció incremento en la incorporación de BrdU. Lo mismo sucedió con los tratamientos por periodos cortos (1 h, 2 h y 3 h) con estradiol y testosterona.

En cuanto al papel de los estrógenos sobre la proliferación del OSE, se han reportado trabajos en los que se menciona que no tiene un papel en la proliferación in vitro del OSE, como en el caso de mono rhesus (Wright y col., 2002). Sin embargo Stewart y col., 2004, observaron proliferación del OSE al hacer tratamientos in vivo con estrógenos y gonadotropinas. En el trabajo publicado por Taube y col., 2002 se encontró producción de 17β -estradiol en cultivos primarios de tumores de origen epitelial de ovario, sin detectar producción de progesterona ni testosterona, por lo que los autores proponen que las células tumorales de ovario tienen un papel activo en la producción de E_2 creando su propio ambiente hormonal y promoviendo así la progresión tumoral. En el OSE humano se ha encontrado la presencia del RNAm de la mayoría de las enzimas involucradas en la esteroidogénesis, sugiriendo que este tejido tiene la maquinaria para llevar a cabo este proceso. Sin embargo no se tienen datos consistentes sobre la actividad enzimática en este tejido. Sólo se ha reportado actividad de las enzimas 17β -HSD y P450arom en tumores epiteliales (Rae y col; 2005). También

se describió que las células del OSE humano inmortalizadas, cultivadas con células del estroma endometrial en un ambiente rico en estrógenos, fueron capaces de metabolizar estrona a estradiol y expresaban genes para la P450 arom y 17 β -HSD (Okamura y col., 2003). Se requieren más estudios para dilucidar si el OSE embrionario tiene la capacidad de transformar andrógenos a estrógenos. Sin embargo, se podría proponer que los andrógenos actúan como tales sobre el OSE del embrión de pollo, sobre todo porque observamos un ligero efecto de DHT (andrógeno no aromatizable) sobre el número de células del OSE en cultivo, esto se refuerza por la presencia del RNAm y la proteína del receptor de andrógenos en el OSE del embrión de pollo; cabe recalcar que no se observa la expresión del RNAm de la aromatasa en los cultivos de OSE embrionario de pollo así como tampoco hubo un efecto en la proliferación celular al agregar tratamientos de 17 β - estradiol.

Receptor de andrógenos

En este trabajo, se identificó el RNAm del AR por RT-PCR y la proteína por inmunohistoquímica en el ovario embrionario de pollo de 14 días de incubación. En otros estudios hemos encontrado que el RNAm para el AR está presente desde los 8 días de incubación (resultados no mostrados). Por inmunohistoquímica, a los 14 d.i., la proteína del AR se presenta primordialmente en el núcleo de las células productoras de esteroides localizadas en la región medular del ovario y en los núcleos de las células del epitelio superficial del ovario.

Recientemente se publicó la secuencia completa del receptor de andrógenos en pollo, donde se encuentra una homología de éste con otras especies. Por ejemplo con el humano tienen una similitud del 31% en la región amino terminal, en el dominio de unión a DNA se presenta una homología del 98% y del 92% en el dominio de unión al ligando, valores similares se observan entre el ratón y el pollo (Kato y col., 2006). En el mismo trabajo, se detectó el RNAm del receptor de andrógenos por RT-PCR en gónadas embrionarias de pollo hembra y macho desde 7 a 21 días de incubación, observándose una mayor expresión en la gónada femenina durante el desarrollo. Por inmunohistoquímica se detectó el AR en gónadas embrionarias de pollo de 15 días de incubación y mencionan que a esta edad ya hay producción de testosterona por el

ovario. En este artículo sólo mencionan que se encuentra presente el AR en el núcleo de las células del ovario sin especificar la población.

En fetos humanos también se ha buscado la presencia de la proteína del AR en el aparato reproductor para esto se usaron fetos a de 8 a 11 semanas de gestación, en el ovario no se observó reacción positiva por inmunohistoquímica en la octava semana, pero sí en la semana 9 de gestación, fundamentalmente en la región medular, a las 10 semanas la reacción positiva se pierde en el ovario fetal. En los conductos paramesonéfricos se observó reacción positiva en el epitelio del mismo, a partir de la novena a la onceava semana (Sajjad y col., 2004).

En ovinos también ha sido detectada la presencia del RNAm del AR en el tejido conectivo de la médula ovárica a partir del día 55 de gestación, en el día 75 se observa en la médula del ovario y en el epitelio superficial. La proteína para el AR se detectó a partir de las mismas edades en el estroma del ovario y en el epitelio superficial. También fue detectada en los ovocitos de los folículos ováricos en las diferentes etapas del desarrollo folicular (Juengel y col., 2006).

Por otra parte, en los ovocitos de ratón se ha detectado la presencia del receptor a andrógenos, y se plantea que éstos intervengan en la maduración de los ovocitos detenidos en profase I de la meiosis (Gill y col., 2004).

Como se mencionó anteriormente, la mayoría de los tumores ovario presentan el receptor de andrógenos (Chadha y col., 1993; Vanderhyden y col., 2004), pero no se sabe que participación tienen en el proceso tumoral de este tejido. Durante el desarrollo del ovario el OSE es muy activo en división celular y también se encuentra presente el AR. Quizás una de las posibilidades por las que se encuentra este receptor en el OSE en condiciones de neoplasia, es que este tejido adopta las características de un tejido embrionario el cual no esta completamente diferenciado (Auersperg y Woo, 2004).

8. Conclusiones

- El tratamiento con testosterona in vitro a las dosis de 10^{-10} y 10^{-11} M sugiere un ligero incremento en la proliferación celular de las células del epitelio superficial del ovario del embrión de pollo.
- La dihidrotestosterona a las dosis estudiadas no incrementa la proliferación celular en cultivos primarios de células del epitelio superficial del ovario del embrión de pollo cuantificando la incorporación de BrdU, sin embargo al contar el número de células se observa mayor cantidad con la dosis de 10^{-10} M.
- El 17β -estradiol in vitro no incrementa la proliferación celular del OSE a las dosis estudiadas.
- El RNA mensajero del receptor de andrógenos se encuentra presente en las células epiteliales sin cultivar y se mantiene durante el cultivo.
- El RNA mensajero para la P450arom se expresa en el epitelio superficial del ovario del embrión de pollo de 14 d.i. sin cultivar, pero desaparece su expresión en los cultivos primarios de células epiteliales.
- La proteína del receptor de andrógenos se expresa en el núcleo de las células del epitelio superficial, en las células germinales y en las células somáticas precursoras de las células esteroideogénicas de la médula del ovario del embrión de pollo de 14 d.i.
- El modelo de embrión de pollo es accesible para el estudio del epitelio superficial del ovario.

9. Bibliografía

- Ahonen MH, Zhuang YH, Aine R, Ylikomi T and Tuohima P. 2000. Androgen receptor and Vitamin D receptor in Human Ovarian Cancer: Growth Stimulation and Inhibition by Ligands. *International Journal of Cancer* 86: 40-46.
- Alberts B, et. al. 2002. *Molecular Biology of the cell*. 4th edition. Garland Sciences U.S.A. Pp.1463.
- Andrews JE, Smith CA, and Sinclair AH. 1997. Sites of estrogen receptor and aromatase expression in the chicken embryo. *General and Comparative Endocrinology* 108: 182-190.
- Auersperg N. 2001. Ovarian Surface Epithelium: Biology, Endocrinology, and Pathology. *Endocrine Reviews* 22: 255-288.
- Auersperg N and Woo MM. 2004. Developmental and Differentiation of Ovarian Surface Epithelium: Cues the Basis of its Malignant potential. Chapter 35. *The Ovary*. Second Edition. Elsevier Academic Press. USA. Pp. 25-43.
- Bai W, Oliveros-Saunders B, Wang Q, Acevedo-Duncan ME, Nicosia S. 2000. Estrogen stimulation of ovarian surface epithelial cell proliferation. *In vitro Cellular & Developmental Biology*. *Animal* 36: 657-66.
- Banks E. 2000. The epidemiology of ovarian cancer. *Ovarian Cancer. Methods and Protocols*. Human Press Inc. USA. Pp. 3-11.
- Bley MA, Saragueta PE and Barañao JL. 1997. Concerted Stimulation of Rat Granulosa Cell Deoxiribonucleic Acid Synthesis by Sex Steroids and Follicle-

Stimulating Hormone. The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology 62: 11-19.

- Brinkmann AO, Faber PW, Vaan Rooig HC, Kuiper GG, Ris C, Klaassen, P Van der Karput J, Voorhost M, Van Laar J, Mulder E, et al.1989. The human androgen receptor, domain structure, genome, organization and regulation of expression. Journal of Steroid Biochemistry 34: 307-310.

- Brown CJ, Goss SJ, Lubahn DB, Joseph DR, Wilson EM, French FS and Willard HF. 1989. Androgen receptor locus on the human X chromosome: regional localization to Xq-11-12 and description of a DNA polymorphism. American Journal of Human Genetics 44: 264-269.

- Burger HG. 2002. Androgen production in women. Fertility and Sterility. Supplement 4, 77: 3-5.

- Cano A. 1998. Aspectos endócrinos del proceso climatérico. Cuadernos de Medicina reproductiva. Pellicer A y Simon C. Climaterio y Menopausia. España Panamericana. Pp. 28-60.

- Chadha S, Rao BR, Slotman BJ, van Vroonhven CC and van der Kwast TH. 1993. An immunohistochemical evaluation of androgen and progesterone receptors in ovarian tumors. Human Pathology 24: 90-95.

- Dennefors BL, Janson PO, Kutson F and Hamberger L. 1980. Steroid production and responsiveness to gonadotropin in insolated stromal tissue of human postmenopausal ovaries. American Journal of Obstetrics and Gynecology 136: 997-1002.

- Diaz L. y Ulloa A. 2003. Regulación neuroendócrina de la función reproductiva. 1:47-60. Pellicer A y Simon C. Cuadernos de medicina reproductiva. Panamericana. España.

- Di Renzo MF, Olivero M, Katsaros D, Crepaldi T, Gaglia P, Zola P, Sismondi PM, Comoglio P. 1994. Overexpression of the Met/HGF receptor in ovarian cancer. *International Journal of Cancer* 58: 658-62.

- Dissen G, Paredes a, Romero C, Dess L and Ojeda S, 2004. Neural and Neurotrophic Control of ovarian development. Chapter 1. The Ovary. Second Edition. Elsevier Academic Press. USA. Pp. 25-43.

- Drummond AE. 2006. The role of steroids in follicular growth. Review. *Reproductive Biology and Endocrinology*.16: 1-11.

- Dunfield LD, Shepherd TG and Nachtigal MW. 2002. Primary culture and mRNA analysis of human ovarian cells. *Biological Procedures Online* 28: 55-61.

- Edmonson RJ, Monaghan JM and Davies BR. 2002. The human ovarian surface epithelium is an androgen responsive tissue. *British Journal of Cancer* 86: 879-885.

- Evangelou A, Letarte M, Jurisica I, Sultan M, Murphy KJ, Rosen B and Brown TJ. 2003. Loss of Coordinated Androgen Regulation in Nonmalignant Ovarian Epithelial Cells with BRCA1/2 Mutations and Ovarian Cancer Cells. *Cancer and Research* 63: 2416-2424.

- Faber P W, van Rooij H C, van der Korput H A, Baarends W M, Brinkmann A O, Grootegoed JA, and Trapman J. 1991. Characterization of the human

androgen receptor transcription unit. *The Journal of Biological Chemistry* 266: 10743-10749.

-Fredickson TN. 1987. Ovarian tumours of the hen. *Environmental Health Perspectives*. 73: 35-51.

- Gao W, Bohl CE and Dalton JT. 2005. Chemistry and structural Biology of Androgen Receptor. *Chemical Reviews* 105: 3352-3370.

- Gilbert S. 2003. *Developmental Biology*. Seventh edition. Sinauer Associates, Inc. USA. Pp. 838.

- Giles JR, Shivaprasad HL and Johnson PA. 2004. Ovarian tumour of an oviductal protein in the hen: a model for human serous ovarian adenocarcinoma. *Gynecologic Oncology*. 95: 530-533.

- Gill A, Jamnongjit M and Hammes SR. 2004. Androgens Promote Maturation and Signalling in Mouse Oocytes Independent of Transcription: A Release of Inhibition Model for Mammalian Oocyte Meiosis. *Molecular Endocrinology* 18: 97-104.

- Gelmann EP. 2002. Biology of Neoplasia. *Molecular Biology of the Androgen Receptor*. *Journal of Clinical Oncology* 20: 3001-3015.

- Gougeon A. 2004. Dynamics of Human Follicular Growth: Morphologic, Dynamic and Functional Aspects. Chapter 2. *The Ovary*. Second Edition. Elsevier Academic Press. USA. Pp. 25-43.

- Hickey TE, Marroco DL, Amato F, Ritter LJ, Norman RJ, Gilchrist RB and Armstrong DT. 2005. Androgens Augment the Mitogenic Effects of Oocyte-Secreted Factors and Growth Differentiation Factor 9 on Porcine Granulosa Cells. *Biology of Reproduction* 73: 825-832.

- Hild-Petito S, Stouffer RL and Brenner RM. 1988. Immunocytochemical localization of estradiol and progesterone receptors in the monkey ovary throughout the menstrual cycle. *Endocrinology* 123: 2896-2905.

- Hillier SG, Anderson RA, Williams AR, Tetsuka M. 1998. Expression of oestrogen receptor alpha and beta in cultured human ovarian surface epithelial cells. *Molecular Human Reproduction* 4: 811-815.

- Ho C, Christenson L, and Strauss J. 2004. Intracellular Cholesterol Dynamics in Steroidogenic Cells. Chapter 6. *The Ovary*. Second Edition. Elsevier Academic Press. USA. Pp. 25-43.

- Ho SM. 2003. Estrogen, progesterone and epithelial ovarian cancer. *Reproductive Biology and Endocrinology* 1: 73.

- Juengel JL, Heath DA, Quirke LD and McNatty KP. 2006. Oestrogen receptor α and β , androgen receptor and progesterone receptor mRNA and protein localization within the developing ovary and in small growing follicles of sheep. *Reproduction* 131: 81-92.

- Kang SK, Choi KC, Cheng KW, Nathwani PS, Auersperg N, Leung PC. 2000. Role of gonadotropin-releasing hormone as an autocrine growth factor in human ovarian surface epithelium. *Endocrinology* 141: 72-80.

- Katoh H, Ogino Y and Yamada G. 2006. Cloning and expression analysis of androgen receptor gene in chicken embryogenesis. *FEBS Letters* 580: 1607-1615.

- Kost TA, Theodorakis N, Huges SH. 1983. The nucleotide sequence of the chick cytoplasmic beta-actin gene. *Nucleic Acids Research* 11: 8287-8301.

- Lau KM, Mok SC, Ho SM. 1999; Expression of human estrogen receptor-alpha and beta, progesterone receptor, and androgen receptor mRNA in normal and malignant ovarian epithelial cells. *Proceedings of the Natural Academy of Science of the United States of America* 96: 5722–5727.

- Lee KA, Volentine KK and Bahr JM. 1998. Two steroidogenic pathways present in the chicken ovary: Theca layer prefers Δ^5 pathway and granulosa layer prefers Δ^4 pathway. *Domestic Animal Endocrinology* 15: 1-8.

- Liu H, Zhang C, Tang X, Zeng W and Mi Y. 2005. Stimulating effects of androgen on proliferation of cultured ovarian germ cells through androgenic and estrogenic actions in embryonic chickens. *Domestic Animal Endocrinology* 28: 451-462.

- Luisi B F, Xu W X, Otwinowski Z, Freedman L P, Yamamoto K R, and Sigler P B. 1991. Crystallographic analysis of the interaction of the glucocorticoid receptor with DNA. *Nature* 352: 497-505.

- Lukanova A, and Kaaks R. 2005. Endogenous hormones and ovarian cancer: epidemiology and current hypotheses. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention* 14: 98-110.

- McEwan IJ 2004. Molecular mechanism of androgen receptor-mediated gene regulation: structure-function analysis of the AF-1 domain. Review. *Endocrine-Related Cancer* 11: 281-293.

- Méndez MC, Chávez B, Echeverría O, Vilchis F, Vazquez GH, and Pedernera E. 1999. Evidence for estrogen receptor expression in germ cell and somatic cell subpopulations in the ovary of the newly hatched chickens. *Cell and Tissue Research* 298: 145-152.

- Nilsson EE, Skinner MK. 2002. Role of transforming growth factor beta in ovarian surface epithelium biology and ovarian cancer. *Reproductive Biomedicine Online*.5: 254-258.

- Okamura H, Katabuchi H and Ohba Takashi. 2003. What we have learning from isolated cells from human ovary? *Molecular and Cellular Endocrinology* 202: 37-45.

- Ojala M, Mäkinen S, Tuuri T, Sjöberg J, Pentikäinen, Matikainen T and Dunkel L. 2004. Effects of testosterone, dihydrotestosterone and 17 β -estradiol on human ovarian tissue survival in culture. *Fertility and Sterility*. 82, Supplement 3: 1077-1085.

- Orozco E, Gariglio P. Vidal P. 2000. *Genética y Biomedicina Molecular* Limusa, México, pag 348. Cap. 17.

- Rae MT and Hillier SG. 2005. Steroid signalling in the ovarian surface epithelium. *Trends in Endocrinology and Metabolism* 16: 327-333.

- Risch HA. 1998. Hormonal etiology of epithelial ovarian cancer, with a hypothesis concerning the role of androgens and progesterone. *Journal of The National Cancer Institute* 90: 1774-1786.

- Romanoff AL. 1960. *The avian embryo*. Mc Milan , New York.

- Rombauts L, Berghman L, Vanmontfort D, Decuypere E and Verhoeven G. 1993. Changes in immunoreactive FSH and inhibin in developing chicken embryos and the effects of estradiol and the aromatase inhibitor R76713. *Biology of Reproduction* 49: 549-554.

- Rodriguez GC, Berchuck A, Whitaker RS, Schlossman D, Clarke-Pearson D and Bast R. 1991. Epidermal growth factor receptor expression in normal ovarian epithelium and ovarian cancer. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 164: 745-750.

- Sajjad Y, Quemby S, Nickson P, Lewis-Jones DI, and Vince G. 2004. Expression of androgen receptor in upper human fetal reproductive tract. *Human Reproduction* 19: 1659-1665.

- Scully RE. 1995. Pathology of ovarian cancer precursors. *Journal of Cellular Biochemistry. Supplement* 23: 208-218.

- Silva EG, Tornos C, Fritsche HA, el-Naggar A, Gray K, Ordoñez NG, Luna M and Genderson D. 1997. The induction of benign epithelial neoplasm of the ovaries of guinea pigs by testosterone stimulation: a potencial animal model. *Modern Pathology* 9: 879-883.

- Simoncini T and Genazzani A. 2003. Non genomic actions of sex steroids hormones. *European Journal of Endocrinology* 148: 281-292.

- Smith CA, Andrews JE and Sinclair AH. 1997. Gonadal sex differentiation in chicken embryos: expression of estrogen receptor and aromatase genes. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 60: 295-302.

- Smith CA and Sinclair AH. 2004. Sex determination: insights from the chicken. *Review. Bioassays* 26: 120-132.

- Stewart SL, Querec TD, Gruver BN, O'Hare B, Babb JS, Patriotis C. 2004. Gonadotropin and steroid hormones stimulate proliferation of the rat ovarian surface epithelium. *Journal of Cellular Physiology* 198: 119-24.

- Syed V, Ulinski G, Mock SC, Yiu GK and Ho SM. 2001. expression of gonadotropin receptor and Growth responses to Key reproductive Hormones in Normal and Malignant Human Ovarian Surface Epithelial Cells. *Cancer Research* 61: 6768-6776.

- Tajima, A, Naito M, Yasuda Y, Kuwana T. 1993. Production of germ line chimera by transfer of primordial germ cells in the domestic chicken (*Gallus domesticus*). *Theriogenology* 40: 509-519.

- Taube M, Hockenstrom T, Isaksson M, Lindaren PR and Backstrom T. 2002. Low sex steroid environment affects survival and steroid secretion of ovarian tumour cells in primary cultures. *International Journal of Oncology* 3: 598-594.

- Thompson MAD, Adelson M.1993. Aging and development of ovarian epithelial carcinoma: The relevance of changes in ovarian stromal androgen production. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 330: 155-65.

- Vanderhyden BC, Shaw TJ and Ethier JF. 2003. Animal models in ovarian cancer. Review. *Reproductive Biology and Endocrinology* 1: 1-11.

- Vanderhyden BC, Shaw TJ, Garson K and Tonary AM. 2004. Ovarian carcinogenesis Chapter 36. *The Ovary. Second Edition. Elsevier Academic Press. USA. Pp. 25-43.*

- Villalpando I, Sánchez G, Sánchez I, Pedernera E and Villalfan MH. 2000. The P450 aromatase (P450 arom) gene is Assymmetrically Expressed in a Critical Period for Gonadal Sexual Differentiation in the Chick. *General and Comparative Endocrinology* 117: 325-324.

- Kost TA, Theodorakis N, Hughes SH. 1983. The nucleotide sequence of the chick cytoplasmic beta-actin gene. *Nucleic Acids Research* 11: 8287-8301.

- Wood JR and Strauss FJ 3rd. 2002. Multiple signal Transduction Pathways Regulate Ovarian Steroidogenesis. *Reviews in Endocrine & Metabolic Disorders* 3: 33-46.

- Wright J, Toth-Fejel S, Stouffer R, Rodland K. 2002. Proliferation of rhesus ovarian surface epithelial cells in culture: lack of mitogenic response to steroid or gonadotropic hormones. *Endocrinology* 143: 2198-2207.

- Yen S, Jaffe R y Barbieri R. 2001. *Endocrinología de la reproducción. Fisiología, Patología y manejo clínico. 4ª ed. Panamericana, México. 912 pág.*

- Zelenik A. 2004. Dynamics of Primate Follicular Growth: A physiological perspective. Chapter three. *The Ovary. Second Edition. Elsevier Academic Press. USA. pp 45-53.*

10. Apéndice

10.1 Soluciones y Reactivos

- Solución libre de calcio y magnesio

-NaCl.....	8.09g
-KH ₂ PO ₄	0.20g
-KCl.....	0.20g
-Na ₂ HPO ₄	1.15g
-H ₂ O.....	1L

agregar de 2 a 5 gotas de rojo de fenol

- Solución libre de calcio y magnesio con EDTA 0.1mM (Versene)

-solución libre de calcio y magnesio	1L
-EDTA.....	0.037g

- Búfer de fosfatos salino (PBS)

-NaCl.....	8.00g
-KCl.....	0.20g
-Na ₂ HPO ₄	1.44g
-KH ₂ PO ₄	0.24g
-H ₂ O.....	1L

- PBS albúmina 1% (PBA)

-ASB.....	1.00g
-PBS.....	100mL

- Buffer 20x TBE

-Tris base.....	121g
-Ac. Bórico.....	61.7g

-EDTA..... 7.44g
-H₂O..... 1L

- Buffer de Glicina

-Solución A: 0.2M Glicina

-Solución B: 0.2M HCl

-A..... 50mL

-B..... 44mL

-aforar a 200ml con H₂O

-ajustar pH 2.0

- Buffer de Citratos 0.1M

-Ac.cítrico deshidratado.....2.94g

-H₂O dest..... 100mL

-ajustar pH 6.0

- Paraformaldehído 4%

-Paraformaldehído..... 4.00g

-PBS..... 80mL

-ajustar pH a 7.4

-aforar a 100ml con PBS

- Tripsina 0.01%

-Tripsina..... 0.005g

-Versene..... 50ml

- Tripsina 0.05%

-Tripsina..... 0.025g

-Versene..... 50ml

- Inhibidor de tripsina

-Inhibidor de tripsina..... 0.15g
-DMEM..... 30ml

- Inhibidor de tripsina 0.02%

-Inhibidor de tripsina..... 0.01g
-DMEM..... 50ml

- Inhibidor de tripsina 0.5%

-Inhibidor de tripsina..... 0.15g
-DMEM..... 30ml

10.2 Medios de Cultivo

- Dulbecco's Modified Eagle Medium baja glucosa y 0.1% de ASB (DMEM)

-DMEM..... 0.998g
-ASB..... 0.10g
-H₂O dest..... 100ml
-ajustar pH 7.2 con Bicarbonato de Sodio al 4%

- Medio MCDB 105

-Medio 105..... 14.9g
-H₂O..... 1L

- Medio 105:199 completo

-Medio 105..... 45ml
-Medio 199..... 45ml
-SFB..... 10ml
-Antibiótico..... 1ml

10.3 Técnicas

Obtención de células epiteliales

Se disecaron ovarios embrionarios izquierdos de pollo y se lavaron de tres a cuatro veces SSB y tres veces más con SSB EDTA al 0.1mM, posteriormente se separaron las células del epitelio por digestión enzimática fraccionada incubando a 37°C por 6 minutos a 70 ciclos/min en baño maría con tripsina al 0.01% disuelta en versene (1 mL por ovario). Las células epiteliales que se desprendieron de los ovarios quedaron en la solución fueron contadas tomando una alícuota de 20µL de la suspensión celular y se mezclaron con 20 µL de colorante azul de tripan para checar la viabilidad. La solución que contenía las células epiteliales se transfirió a un tubo cónico con inhibidor de tripsina disuelto en medio Dulbecco's Modified Medium (DMEM) (Gibco 31600) con albúmina sérica bovina al 0.1%, se centrifugó a 1000 rpm por 10 minutos y se retiró el sobrenadante. Las células se resuspendieron en 400µL de medio de cultivo completo (105/199 1:1 con 10µg/mL de antibiótico penicilina-estreptomina y glutamina en solución de 10,000 UI/mL y suero bovino fetal al 10%).

Se contaron los porcentajes de células epiteliales, células muertas y células germinales en cámara de Neubauer por el método de exclusión del colorante con azul tripano.

Cultivos primarios de OSE

Se ajustaron a 140 000 células por caja de poliestireno de 35 mm (NUNC) en 2.5 mL de medio de cultivo completo. Las células epiteliales se incubaron por 48 horas en atmósfera de 5% de CO₂ a 37°C, al cabo de este tiempo se eligieron las cajas que presentaron una confluencia de 40 a 50% y se prosiguió con el tratamiento.

Una vez que llegaron que los cultivos celulares llegaron a la confluencia deseada se mantuvieron con privación de SFB por 12 horas (medio 105:199 con 1% de suero fetal bovino lavado (SFL) libre de esteroides) antes del tratamiento hormonal.

Se usó medio 105:199 con 1% de SFL para agregar el tratamiento de hormonas esteroides de 12 horas, de la siguiente manera: al grupo testigo sólo se le hizo cambio de medio, cajas tratadas con testosterona, DHT y 17 β -estradiol a concentraciones de 10⁻⁸, 10⁻⁹, 10⁻¹⁰, 10⁻¹¹ M disueltos en etanol.

Al cabo de doce horas de tratamiento se agregó una solución [10µmol/L] de 5 Bromo 2 deoxi Uridina (BrdU) (Roche Kit BrdU 1296736), por 50 minutos, para marcar las células en síntesis.

Se procedió a disgregar las células empleando tripsina al 0.05% disuelta en SSB, con pipeta pasteur se recuperaron las células de las cajas, posteriormente se centrifugaron a 1800 rpm por 10 min en 500µL de inhibidor de tripsina al 0.1% disuelto en DMEM. Se decantó el sobrenadante y se lavó dos veces el paquete celular con solución amortiguadora (PBS 1X).

Por consiguiente se elaboraron extendidos celulares en portaobjetos recubiertos con Poli-L-lisina (Sigma P8920) y finalmente se contaron las células en síntesis marcadas con BrdU por inmunocitoquímica.

Número total de células

Para realizar este proceso se realizaron los mismos pasos del cultivo primario, sólo se agregó un tratamiento prolongado de 48h de T y DHT. Transcurrido este tiempo se retiró el medio de cultivo a las células y se les dieron dos lavados con SSB. Posteriormente se disgregaron las células adheridas a la caja con tripsina al 0.05% disuelta en Versene e incubando 6 min a 37°C en agitación. Se separaron mecánicamente para transferirlas a tubos de 1.5 ml los cuales contenían inhibidor de tripsina al 0.1% disuelto en DMEM baja glucosa y 0.1% de ASB. Finalmente se mezclaron las células por pipeteo y se contaron en hemocitómetro.

Inmunocitoquímica para BrdU

Se fijaron las células en alcohol ácido que es una mezcla de etanol al 70% y búfer de glicina pH 2.0, por 20 minutos a -20°C.

Se retiraron las preparaciones del fijador y se dejaron secar al aire. Posteriormente se lavaron con PBS caliente (90°C) tres veces por 10 minutos.

Se agregó a cada preparación 30 µL de un anticuerpo primario contra BrdU diluído 1:10 en búfer de incubación a 37° C. Se dejó incubando por una hora en cámara húmeda en baño maría.

Se lavaron las preparaciones con PBS en agitación a temperatura ambiente, tres veces por 10 min.

Se incubó por 1 hora 30 µL del anticuerpo secundario marcado con fluoresceína diluído 1:10 en PBS y se dejó incubando a las mismas condiciones que el anticuerpo primario.

Se lavaron una vez las preparaciones con PBS Tween 20 al 0.01% por 10 min en agitación, y dos veces mas por de 10 min con PBS. Se observaron las preparaciones en el microscopio de fluorescencia para calcular el porcentaje de células positivas para BrdU.

Inmunocitoquímica para Citokeratinas

Se hicieron extendidos de células epiteliales cultivadas y/o sin cultivar en portaobjetos tratados con poli-L-lisina y se fijaron en paraformaldehído al 4% a 4°C por 20 min.

Se lavaron las preparaciones con PBS tres veces por 5 min, para posteriormente incubar con peróxido de hidrógeno (H₂O₂) al 3% en metanol por 8 min a temperatura ambiente.

Se lavaron las preparaciones tres veces con PBS y se incubaron con proteinasa K (5µg/mL en PBS) por 3 min. Se lavaron nuevamente las preparaciones con PBS y se incubaron con el primer anticuerpo anti-ratón contra citokeratinas (Scy Tek A00029).

El anticuerpo primario se agregó directamente a la preparación y se incubó por 1 h a 37°C ó toda la noche a 4°C en cámara húmeda.

Pasando este tiempo se lavaron las preparaciones con PBS y se les agregó el anticuerpo secundario biotinilado (Scy Tek AEA080). Se dejaron incubando en cámara húmeda por 20 min a temperatura ambiente.

Posteriormente se lavaron las preparaciones con PBS tres veces por 5 min y se incubaron con estreptavidina peroxidada por 20 min del mismo kit usado para la inmunodetección enzimática (Scy Tek), a temperatura ambiente, se lavaron las preparaciones con PBS y se revelaron con diaminobenzidina (DAB), de acuerdo a las instrucciones del proveedor, se observó al microscopio óptico la reacción hasta que se tiñeron las células de café.

Para tener un control negativo se incubó una preparación sin anticuerpo primario.

Obtención de RNA por extracción fenólica

1. Se agregaron 500 μ L de Trizol (Gibco 1559-015) por ovario; se agitó con vortex por 5' a Temperatura ambiente (TA). Las células del OSE y OSEc se resuspendieron con 200 μ L de trizol y se resuspenden con pipeteo.
2. Se agregaron 200 μ L de Cloroformo.
3. Se agitó vigorosamente (15 segundos) y se incubó a TA 2-3 min.
4. Se centrifugaron a 11,500 rpm/min a 4° C por 15 min.
5. La fase acuosa se transfirió a un tubo limpio evitando contaminación con la interfase.
6. Fueron agregados 500 μ L de alcohol isopropílico y se incubó a TA 10 min.
7. Se centrifugó a 11,500 rpm/min a 4° C por 10 min.
8. Se observó el RNA en el pellet como un botón ligeramente blanco.
9. Se lavó el pellet con 1 mL de etanol al 75% y se agitó con vortex.
10. Se centrifugó a 8500 rpm a 4 °C por 5 min.
11. Se dejó secar al aire.
12. Se disolvió el RNA en 20-50 μ L de agua DEPC.
13. Se tomaron 10 μ L de RNA y se agregaron 990 μ L de agua, para checar pureza y cuantificar el RNA en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 260 nanómetros en luz ultravioleta.
14. Se calculó el contenido de RNA con la siguiente relación:
$$1 \text{ DO de RNA} \text{ ----- } 40 \mu\text{L/mL}$$
15. Se tomó el volumen suficiente para tener una concentración de 2 μ g de RNA y sintetizar cDNA usando el Kit 1st Strand cDNA Synthesis Kit for RT-PCR (AMV) (Roche 11483188001) de acuerdo a los procedimientos indicados por el proveedor.
16. Las muestras de cDNA fueron conservadas a -20°C y posteriormente empleadas para llevar a cabo la detección de los RNAm de interés por PCR usando Amplitaq DNA polimerasa (Applied Biosystems 615319).

Procesamiento de muestras histológicas para inmunohistoquímica

Para llevar a cabo este procedimiento se necesitó procesar las muestras histológicas de la siguiente manera:

Se disecaron ovarios de pollo de 14 d.i. y se fijaron en paraformaldehído al 4%. Se dejaron a 4°C toda la noche, se lavaron dos veces con PBS, posteriormente se realizó la deshidratación de la muestra en series crecientes de alcohol desde 30 a 100% en hielo con lavados de 10 min cada uno. Posteriormente se dieron dos lavados en Xilenos de 10 min a T.A. Se pasaron las muestras a parafina precalentada a 56°C por 2 h y se cambió por parafina nueva.

Se colocaron las muestras histológicas en parafina a 56° en moldes de inclusión, se dejaron enfriar para desmoldar y conservar en refrigeración hasta el momento de cortarlos en micrótopo.

Inmunohistoquímica para Citoqueratinas

Se disecó el ovario embrionario izquierdo y se fijo en paraformaldehído al 4% y se procesó histológicamente y para inclusión en parafina. Se hicieron cortes histológicos de 5 micras, que se colocaron en laminillas recubiertas con poli-L-lisina. Posteriormente fueron desparafinizados en estufa a 56°C y se rehidrataron en vasos kopplin con etanol en series decrecientes de 100 a 50% por 5' cada uno, finalmente dos lavados con agua. Se llevo a cabo la recuperación antigénica con búfer de citratos pH 6.0 en olla de presión (Decloaking Chamber). Las peroxidasas endógenas fueron inhibidas con peróxido de hidrógeno al 3% de acuerdo a las instrucciones del proveedor (Kit de inmunodetección Scy Tek AEA080).

Se lavaron las preparaciones con PBS tres veces por 5 min.

Se agregó la solución de bloqueo del kit y se lavaron nuevamente las laminillas con PBS.

Se incubaron las preparaciones con el primer anticuerpo de la misma manera que la inmunocitoquímica para citoqueratinas, se siguen los mismos pasos para la inmunodetección, (descrito anteriormente).

Se llevo acabo la contratinción de núcleos con hematoxilina de Harris.

Inmunohistoquímica para el receptor de andrógenos

La inmunohistoquímica para el receptor de andrógenos se hizo de la siguiente manera:

Se procesaron las preparaciones de la misma forma de la inmunohistoquímica para citoqueratinas, solo hubo cambios con la solución bloqueadora y los anticuerpos, que a continuación se describen.

Se desparafinaron cortes de 5 micras de ovario de pollo de 14 d.i. en estufa a 56 °C por 1 h.

Se agregó péptido bloqueador*(sc-816 Santa Cruz) diluído 1:5 en PBA (ASB 1% en PBS) 2h.

Se lavaron con PBS 3 veces.

Se incubaron las laminillas con anticuerpo primario anti- AR (Santa Cruz AR N-20:sc-816) diluído 1:50 en PBA, de 2 h. a 37° o toda la noche a 4°C en cámara húmeda.

Se lavaron los cortes 3 veces con PBS.

Se agregó el anticuerpo biotinilado (81-61 40 ZYMED) diluido 1:200 en PBA, por 20' en cámara húmeda a temperatura ambiente.

Se enjuagaron las preparaciones 4 veces con PBS.

Se procedió con lo descrito anteriormente para la inmunodetección enzimática.

Se contratiñeron los núcleos.

Contratinción de núcleos.

Se sumergieron las preparaciones histológicas usadas en la inmunohistoquímica en agua destilada por 5 minutos.

Posteriormente se sumergieron en hematoxilina de Harris tres veces por un segundo.

Se enjuagaron con agua corriente por 1 segundo y en agua amoniacal 5 segundos y nuevamente se enjuagaron con agua corriente.

Se deshidrataron en concentraciones crecientes de etanol de 50%, 70%, 80%, 96% y 100% tres veces por 1 segundo. Finalmente se pasaron por Xilol, se montaron con resina sintética y se cubrieron con un cubreobjetos.

Purificación de productos de PCR.

Para llevar a cabo este procedimiento se utilizó un Kit de extracción de productos de PCR a partir de geles de agarosa (QIAquick Spin Handbook QIAquick Gel extraction Kit) Catalogo No.28604.

1.- Se corrió el producto de PCR deseado en un gel de agarosa al 1%, y se cortó el fragmento con una navaja limpia.

2.- Se pesó el trozo de gel en un tubo eppendorf transparente de 1.5 mL y se agregaron 3 volúmenes de búfer QG (Kit) por 1 volumen del gel (100mg≈100µl).

3.- Se incubó a 50°C por 10 min hasta que se disolvió completamente el gel.

4.- Se agregó un volumen de isopropanol por 1 volumen de gel (100µl de isopropanol por cada 100 mg de gel).

5.- Se colocó el líquido en una columna de extracción.

6.- Fue centrifugado por 1 min, a máxima velocidad aprox. 13000 rpm.

7.- Se desechó el eluído.

8.-Se lavó la columna con 0.75 ml de Buffer PE se centrifugó por 1min.

9.- Se descartó eluído y se centrigió por 1 min a 13000rpm.

10.-Fue tomada la columna y colocada en un nuevo tubo eppendorf.

11.- Se agregaron 30 µl de agua ultrapura en el centro de la columna y fue centrifugada por 1 minuto. El eluído final se uso para ser secuenciado.

