

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO



FACULTAD DE QUÍMICA

FUNCIÓN DE LA HORMONA INHIBIDORA DE LOS CONDUCTOS
DE MÜLLER (AMH) EN LA PROLIFERACIÓN DE CÉLULAS DE LA
GRANULOSA EN LA ETAPA INFANTIL Y PREPUBER
DEL RATÓN *Mus musculus*

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

P R E S E N T A

ANGÉLICA SOFÍA MARTÍNEZ RAMÍREZ

México D.F.

2008





Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Jurado asignado:

Presidente	Carmen Giral Barnés
Vocal	Enrique Moreno Saenz
Secretario	María Irma Villalpando Fierro
1er Suplente	Martha Alicia Menjivar Iraheta
2do Suplente	Martha Patricia Juárez Morales

Sitio donde se desarrollo el tema:

Instituto de Investigaciones Biomédicas, Departamento de Fisiología y Biología Celular, UNAM.

Asesor:

Dra. María Irma Villalpando Fierro

Sustentante:

Martínez Ramírez Angélica Sofía

“Si yo hablara todas las lenguas de los hombres y de los ángeles, y me faltara el amor, no sería más que bronce que resuena y campana que toca. Si yo tuviera el don de profecías, conociendo las cosas secretas con toda clase de conocimiento, y tuviera tanta fe como para trasladar los montes, pero me faltara el amor, nada soy. Si reparto todo lo que poseo a los pobres y si entrego hasta mi propio cuerpo para ser quemado, pero sin tener amor, de nada me sirve.”

“El amor es paciente, servicial y sin envidia. No quiere aparentar ni se hace el importante. No actúa con bajeza, ni busca su propio interés. El amor no se deja llevar por la ira, sino que olvida ofensas y perdona. Nunca se alegra de algo injusto y siempre le agrada la verdad. El amor disculpa todo; todo lo cree, todo lo espera y todo lo soporta.”

“El amor nunca pasará.”

1-Cor 13, 1-8.

Agradecimientos

A la Dra. Irma Villalpando Fierro por permitirme la realización de éste trabajo en su laboratorio, porque finalmente aprendí que el respeto a los demás y a mi misma, la responsabilidad y la humildad son las herramientas que me harán salir adelante como persona y profesionista.

A la M. en C. Esmeralda Lira, por el apoyo en las técnicas de purificación de células, cultivo celular, cortes en criostato, toma de fotografías y uso de microscopio; porque ha sido una muy buena amiga, porque más que compañeros, logró convertirnos a todos en una familia dentro del laboratorio, por ser un ejemplo de entereza, valor y sencillez, gracias por todo el apoyo.

A mis compañeros del laboratorio Miriam, Uriel, Salo, Aby, Bety, Pablo, Luis, gracias por su ayuda y por los buenos momentos que hemos pasado juntos.

A la Dra. Laura Escobar y a Bety porque me apoyaron en la toma de fotos.

A la Universidad Nacional Autónoma de México, que me recibió como su hija y me ha formado profesional, personal y culturalmente. Porque madurar y conocer la vida y todas las áreas del conocimiento humano solo pueden conseguirse en una Universidad como ésta.

A la Facultad de Química, porque en sus instalaciones he aprendido más que química, aprendí a vivir.

Dedicatorias

A Dios, por permitirme el maravilloso don de la vida, y por las bendiciones que he recibido, porque me ha permitido convertirme en una buena persona gracias a los ángeles que envió para cuidarme. Porque en la vida se requieren tropiezos para crecer, pero Él encuentra el punto exacto en el cual cada uno de nosotros aprende de las tragedias y dosifica las alegrías.

A mis padres, Jesús y Ángeles, porque cada uno de mis logros son también de ellos, porque han apoyado todas las grandes decisiones de mi vida, han sabido darme los mejores consejos, y me han brindado su ayuda para lograr mis metas. Porque mi vida es en si misma un logro suyo, y porque ahora cuando culmino con esta importante etapa de mi vida es un logro también suyo. ¡Gracias infinitamente!

A mi tía Estela que más que eso es confidente y amiga, a Monse y mi tío Alex que siempre han sido mi apoyo y mi segunda familia, qué más puedo pedir si tengo una hermana y otros padres .

A Juanito porque me ha enseñado con su entereza a ser cada día mas fuerte. Y a mi Abue hasta el cielo, porque siento que me cuida desde allá.

A mi familia, todos personas muy valiosas en mi vida.

A Toño, mil gracias mi niño por todo tu apoyo, y más aún por el amor tan grande que me permites brindarte y que siento de ti. Agradezco al cielo que te enviara para mí, es hermoso saber que mientras camino, tú caminas a mi lado, apoyándonos.

A mis niñas, Sonia, Bety, Sandra Luz, Sandra, Silvia y Claudia, porque no fue necesario pedir al cielo que me envíe hermanas, ya las tengo a ustedes.

A mis grandes amigos, Alex, Salo, Aby, Juan Carlos, Adrián, Chava, José Carlos, Lorenzo, Jonathan, porque atesoro los momentos que pasé con cada uno de ustedes.

A mis amigos de la gran prepa 5, Jonás, Xiomara, Michel, Janet, Mauricio, Sarahi, Paola, Angeles, Marilú, Reyna, Talina, Nashely, Ana, Alejandro, porque juntos crecimos, nos convertimos en seres grandes de corazón.

A las excelentes personas del Laboratorio de Biología Molecular del INER, Víctor, Marco, Ery, Rafa, Nacho, Diana, Iliana, Caro, grandes profesionales y maravillosos seres humanos, que me ayudaron tanto en la etapa formativa de mi carrera.

A los Doctores Roberto Arreguín y Alejandro García y a los alumnos del laboratorio de Bioquímica II del Instituto de Química, por el apoyo que me brindaron.

Abreviaturas

CGPs	Células germinales primordiales
dg	Días de gestación
CGs	Células germinales
<i>SRY</i>	Gen determinante de la diferenciación testicular
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
cAMP	AMP cíclico
<i>WT-1</i>	Factor Tumoral Wilms-1
<i>SF-1</i>	Factor esteroideogénico-1
Kda	Kilodaltons
P450c17	Citocromo P450 17
PKA	Proteína cinasa A
LH	Hormona Luteinizante
FSH	Hormona Folículo Estimulante
dpp	Días post-parto
NAD	β -Nicotinamida Adenina Dinucleótido
NBT	Nitrobluetetrazolium
DHEA	Dehidroepiandrosterona
3 β -HSD	$\Delta^{4,5}$ -3 β -Hidroxiesteroide deshidrogenasa
μ m	Micrómetros
EDTA	Ácido Etilendiaminotetraacético
TGF β	Factor de Crecimiento Transformante β
AMH	Hormona Inhibidora de los Conductos de Müller
D'MEM	Medio Esencial Dubelco Modificado

NADP+	Nicotinamida Adenina Dinucleotido Fosfato
rpm	Revoluciones por minuto
PBS	Solución amortiguadora de fosfato
BMP	Proteínas Morfogenéticas de Hueso
R1	Receptor tipo I
R2	Receptor tipo II
SMAD	Proteínas moduladoras de la actividad de los ligandos de los factores de crecimiento transformantes beta
<i>XVent</i>	Secuencia de genes mesodermo ventral de <i>Xenopus</i>
<i>TLX2</i>	Secuencia 2 de célula T de leucemia
ActR1	Receptor activina tipo 1
ALK(2,3,6)	Activina tipo cinasa (2, 3 y 6)
BMPR1-(A,B)	Receptor tipo 1 (A, B) de Proteínas Morfogenéticas de Hueso
NF- $\kappa\beta$	Factor nuclear $\kappa\beta$
FOG	Proteínas cooperadoras de los factores de transcripción GATA
BrdU	Bromodeoxiuridina
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
F	Folículo
FP	Folículo primordial
FPR	Folículo primario
FS	Folículo secundario
FM	Folículo maduro
M	Médula
CT	Células de la Teca
C	Corteza del ovario
GI	Glándula Intersticial

Lys

Lisina

Thr

Treonina

Ser

Serina

Contenido	Pág.
I.- Resumen.....	11
II.-Introducción.....	12
1.- Desarrollo gonadal de los mamíferos.....	13
a) Etapa de Cresta Genital.....	13
b) Etapa de Gónada Indiferenciada.....	14
c) Diferenciación Morfológica del Ovario.....	16
d) Foliculogénesis.....	18
2.- Hormona Inhibidora de los Conductos de Müller.....	21
a) Organización del gen.....	23
b) Estructura de la proteína.....	24
3.- Regulación postnatal.....	25
a) Genes.....	26
b) Hormonas hipofisarias.....	28
c) Hormonas sexuales.....	29
d) Otras proteínas.....	30
4.- Función de la AMH.....	30
a) Papel en la producción de hormonas sexuales.....	30
b) Participación en la proliferación de tejidos.....	31
5.- Metabolismo de hormonas sexuales.....	32
a) Clasificación química.....	32
b) Clasificación biológica.....	34
i) Estrógenos.....	34
ii) Andrógenos.....	35
iii) Progestinas.....	36
c) Síntesis de andrógenos y estrógenos.....	37
III.- Planteamiento del problema e hipótesis.....	42
IV.- Objetivos.....	43
V.- Material y métodos.....	44
i) Primera parte.....	44
a) Animales.....	44
b) Determinación de la edad de gestación.....	44
ii) Segunda parte.....	44
c) Aislamiento del ovario.....	44
d) Inclusión de tejido.....	45
e) Obtención de cortes por congelación.....	45
f) Detección de la enzima 3 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa.....	45
iii) Tercera parte.....	46
g) Purificación de las células de la granulosa.....	46
h) Determinación del número de células.....	47
i) Cultivo celular.....	47

j) Fijación de las células.....	48
k) Inmunodetección.....	48
l) Fotografías.....	48
m) Análisis estadístico.....	48
VI.- Resultados.....	49
1.- Ensayos de proliferación de células de la granulosa.....	49
a) Etapa Infantil.....	49
b) Etapa Prepuber.....	50
2.- Detección de la enzima 3 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa.....	53
VII.- Discusión.....	56
VIII.- Conclusiones.....	61
IX.- Bibliografía.....	62
X.- Apéndice.....	65

I.- Resumen

La hormona inhibidora de los conductos de Müller (AMH), es miembro de la superfamilia de factores de crecimiento transformante beta. Estudios realizados en rata mostraron que la proteína y el ARNm de la AMH se expresan en las células de la granulosa de folículos en crecimiento, y su expresión disminuye en los folículos antrales y atrésicos (McGee et. al., 2001). Estos hallazgos sugieren que la AMH tiene una función importante en el ovario infantil en el desarrollo folicular, se ha descrito que con el tratamiento de AMH a folículos preantrales de la rata, aumenta el crecimiento de éstos. Sin embargo, no se ha descrito cual es la función de la AMH en el ratón. El objetivo de la presente investigación fue determinar el efecto de la AMH en la proliferación de células de la granulosa de ovarios de 10, 15, 20, y 25 dpp, que corresponden a la etapa infantil y prepuber en el ratón. Así como establecer la etapa en la cual empieza a diferenciarse el tejido esteroideogénico detectando la actividad de la enzima $\Delta^{4,5}$ -3 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa. Se emplearon ratones *Mus musculus* hembras de la cepa CD1 de las edades antes mencionadas, se extrajeron los ovarios y se realizaron grupos de 30 gónadas para las primeras edades y 10 para la de 25 dpp. Se purificaron las células de la granulosa por métodos enzimáticos. Se sembraron 2×10^4 células en medio D'MEM con BrdU, en presencia y ausencia de 50 ng/mL de AMH, 24 h con 5% de CO₂. Se observó que la AMH indujo la proliferación celular, aumentando 11% la proliferación a los 10 dpp, 17% a los 15 dpp, 41% a los 20 dpp, y 15% a los 25 dpp. Además, se observó que el tejido esteroideogénico se detecta desde antes de los 10 dpp, etapa que corresponde a la etapa infantil. Por lo que se propone que la AMH induce la proliferación de las células de la granulosa a lo largo de todas las etapas estudiadas y es capaz de inducir la producción de hormonas esteroides sexuales en el ratón *Mus musculus*.

II.- Introducción

La fecundación es el principio del desarrollo de un nuevo individuo, en este proceso se lleva a cabo la unión de dos células: el espermatozoide y el ovocito, estas células deben sufrir el proceso de meiosis para reducir el número de cromosomas a la mitad, por medio de dos divisiones meióticas (Langman, 2004). Durante esta etapa ocurre la determinación del sexo del individuo la cual se lleva a cabo en tres etapas. En la primera ocurre la determinación del sexo cromosómico, que se lleva a cabo en el momento de la fecundación, ésta se establece debido a que en los mamíferos dos de los cromosomas que posee cada especie son cromosomas sexuales. Los humanos tienen 46 cromosomas de los cuales 44 son autosómicos y dos son sexuales. El ovocito posee dos cromosomas X, mientras que el espermatozoide puede tener un cromosoma Y o uno X. En el caso de que el espermatozoide aporte un cromosoma X; el sexo del producto será femenino, y si el ovocito es fecundado por un cromosoma Y el sexo será masculino (Langman, 2004).

La segunda etapa corresponde al desarrollo del sexo gonadal. En el ovario la diferenciación morfológica y fisiológica de éste órgano ocurre posteriormente, en comparación con el testículo, en donde la diferenciación ocurre a los 12 dg en el ratón, la diferenciación del ovario ocurre por la expresión de genes y proteínas que se mencionarán más adelante. En la tercera etapa se lleva a cabo la diferenciación fenotípica en la que se forman los órganos sexuales internos y externos (Merchant, 1991). El modelo empleado en esta tesis es el ovario por lo que se describirá como se lleva a cabo la diferenciación de este órgano.

1.- Desarrollo gonadal de los mamíferos

Las gónadas de los mamíferos de ambos sexos están formadas por células germinales primordiales (CGPs) y somáticas (Merchant, 1991; Langman, 2004). Las gónadas femeninas y masculinas siguen la misma vía de desarrollo en las fases iniciales del desarrollo. Este proceso se lleva a cabo en tres etapas: la de cresta genital, la de gónada indiferenciada y la diferenciación sexual del testículo o del ovario.

a) Etapa de cresta genital

A partir de los 9 a los 10.5 días de gestación (d. g.) en el embrión de ratón, aparecen dos engrosamientos a cada uno de los lados de la línea entre el mesonefros y el mesenterio dorsal ubicado hacia la cavidad corporal o celoma. La cresta genital se forma por la proliferación del epitelio celómico, por la condensación del mesénquima y por la participación de las CGPs (Langman, 2004). Estas últimas tienen un origen extraembrionario, y se encuentran en las etapas iniciales de la gestación en el endodermo del saco vitelino cerca de la alantoides. De esta región migran hacia las crestas genitales en donde se encuentran a partir de los 9 días del desarrollo embrionario en el ratón (Merchant, 1995; Gilbert, 2005). Las células somáticas que se encuentran también en la cresta genital tienen un origen mesodérmico, entre éstas están las células mesoteliales, mesenquimáticas, mesonéfricas y endoteliales (Merchant, 1995).

Las CGPs migran hacia la cresta genital por dos tipos de movimientos: pasivo y activo, en el primero estas células se desplazan junto con los tejidos que tienen a su alrededor a medida que éstos van proliferando y creciendo. En el segundo las células se mueven formando pseudópodos, filopodios y lamelipodios que les permiten dirigirse hacia la cresta genital. Las CGPs durante la migración necesitan atravesar la lámina basal del intestino posterior. Además se ha planteado que pueden secretar enzimas proteolíticas y

proteínas, entre las que se encuentran mucopolisacárido, colágenas y glicoproteínas (Gilbert, 2005).

Se ha sugerido que las CGPs pueden dirigirse específicamente hacia la cresta genital por tres mecanismos; el primero es por medio de gradientes de concentración por factores secretados por las células del epitelio celómico que dirigen el movimiento de las CGPs por quimiotaxis. El segundo es por medio de receptores, las CGPs se acoplan a moléculas presentes en la superficie de las células mesenquimáticas y en la matriz extracelular, de esta forma las CGPs pueden dirigirse hacia la cresta genital a lo largo de las células mesenquimáticas que las rodean. El último mecanismo propone que la organización de las células somáticas les abre un camino a las CGPs por el cual avanzarán hasta la región de la futura gónada (Merchant, 1991).

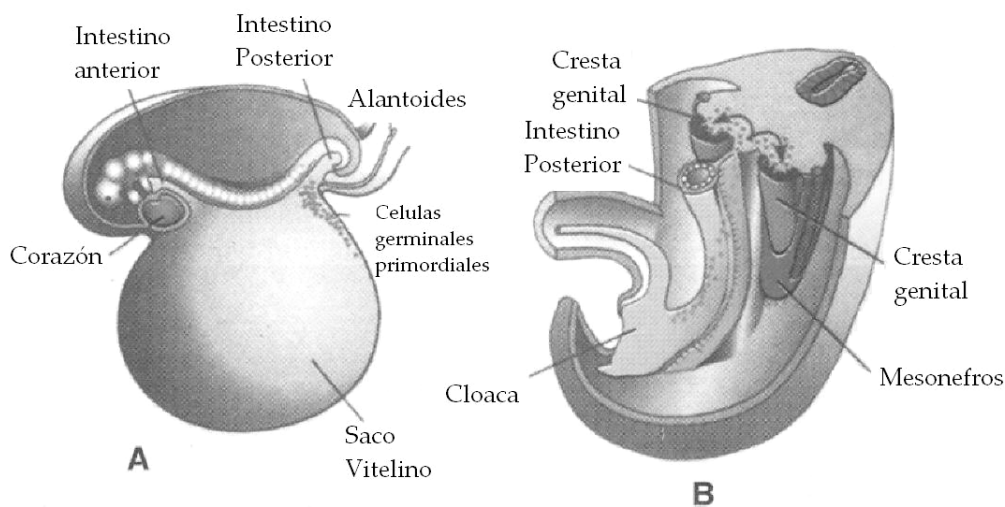


Fig.1 A. Embrión de 9-12 dg. B. Camino que siguen las células germinales primordiales desde el intestino posterior hacia la cresta genital (Tomada de Sadler, 2004).

b) Etapa de Gónada Indiferenciada

Mientras las CGPs están migrando hacia la cresta genital comienza a proliferar el epitelio celómico. En esta región hay una condensación de células mesenquimáticas y mesoteliales que formarán el blastema gonadal. Las células del epitelio penetran al mesénquima subyacente y se forman los cordones sexuales primitivos que van a rodear a

las CGPs a su llegada. Estos cordones sexuales se mantienen unidos al epitelio celómico o mesonéfrico. Los cordones sexuales son arreglos epiteliales que están formados por células unidas entre ellas, en el caso del testículo por células de Leydig y Sertoli y en el ovario por células de la granulosa. El estroma está conformado por células mesenquimáticas y vasos sanguíneos que se encuentran irrigando a la gónada indiferenciada, las células y los vasos se encuentran separados por una lámina basal. Ésta es un depósito de fibras de colágena y de fibronectina que separan compartimentos epiteliales diferentes (Merchant, 1991).

Entre los 11 a 11.5 d. g. en el ratón las gónadas, tanto masculinas como femeninas, tienen las mismas características morfológicas y es por esto que se le conoce como etapa de gónada indiferenciada (Merchant, 1991). Los embriones tanto femeninos como masculinos en esta etapa poseen dos tipos de conductos que están estrechamente relacionados con la gónada: el conducto mesonéfrico o de Wolf y el conducto paramesonéfrico o de Müller (Gilbert, 2005).

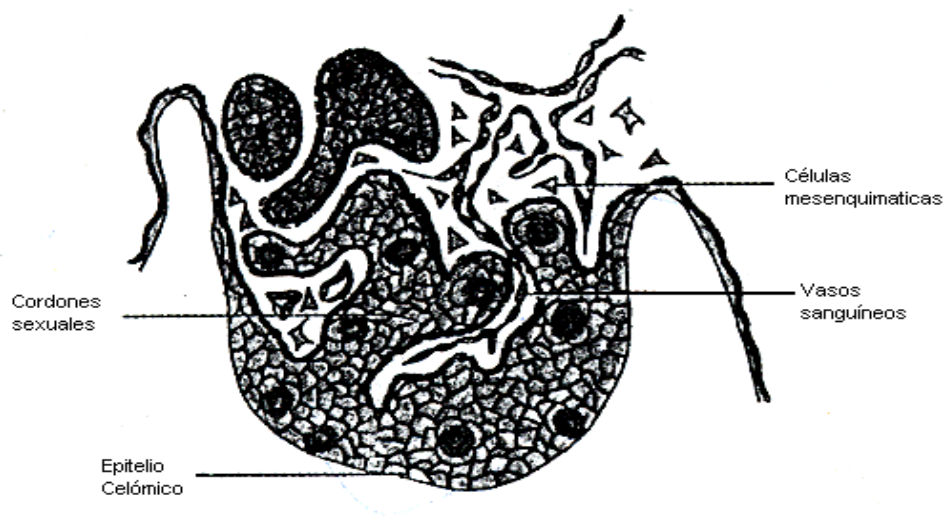


Fig. 2.- Gónada indiferenciada de ratón 11.5 d.g. (Tomada de Merchant, 1991).

c) Diferenciación Morfológica del Ovario

La diferenciación morfológica del ovario se caracteriza porque los cordones sexuales se fragmentan, y los grupos de células que quedan adentro son las precursoras de las células de la granulosa y estarán localizadas junto con las CGPs en la superficie de la gónada. Alrededor del día 15 a 18 en el ratón, comienza la profase de la primera división meiótica. Una vez que ésta se ha iniciado comienzan a formarse los folículos primordiales (Merchant, 1991).

Los conductos paramesonérficos o de Müller se desarrollan en los embriones femeninos por ausencia de la hormona inhibidora de los conductos de Müller y los conductos de Wolf desaparecen en ausencia de testosterona, esta hormona es necesaria para la formación de los órganos sexuales internos en los machos. Inicialmente se observan tres porciones en los conductos de Müller, la porción craneal vertical que desemboca en el abdomen, la región horizontal que se encuentra cruzada con el conducto mesonérfico y la zona caudal vertical. Cuando descienden los ovarios, las primeras dos porciones se convierten en la trompa de Falopio y las partes caudales forman el conducto uterino. Al fusionarse transversalmente los conductos se forma un ancho pliegue pelviano. Los conductos paramesonérficos al fusionarse dan lugar al cuerpo y al cuello uterino (Langman, 2004).

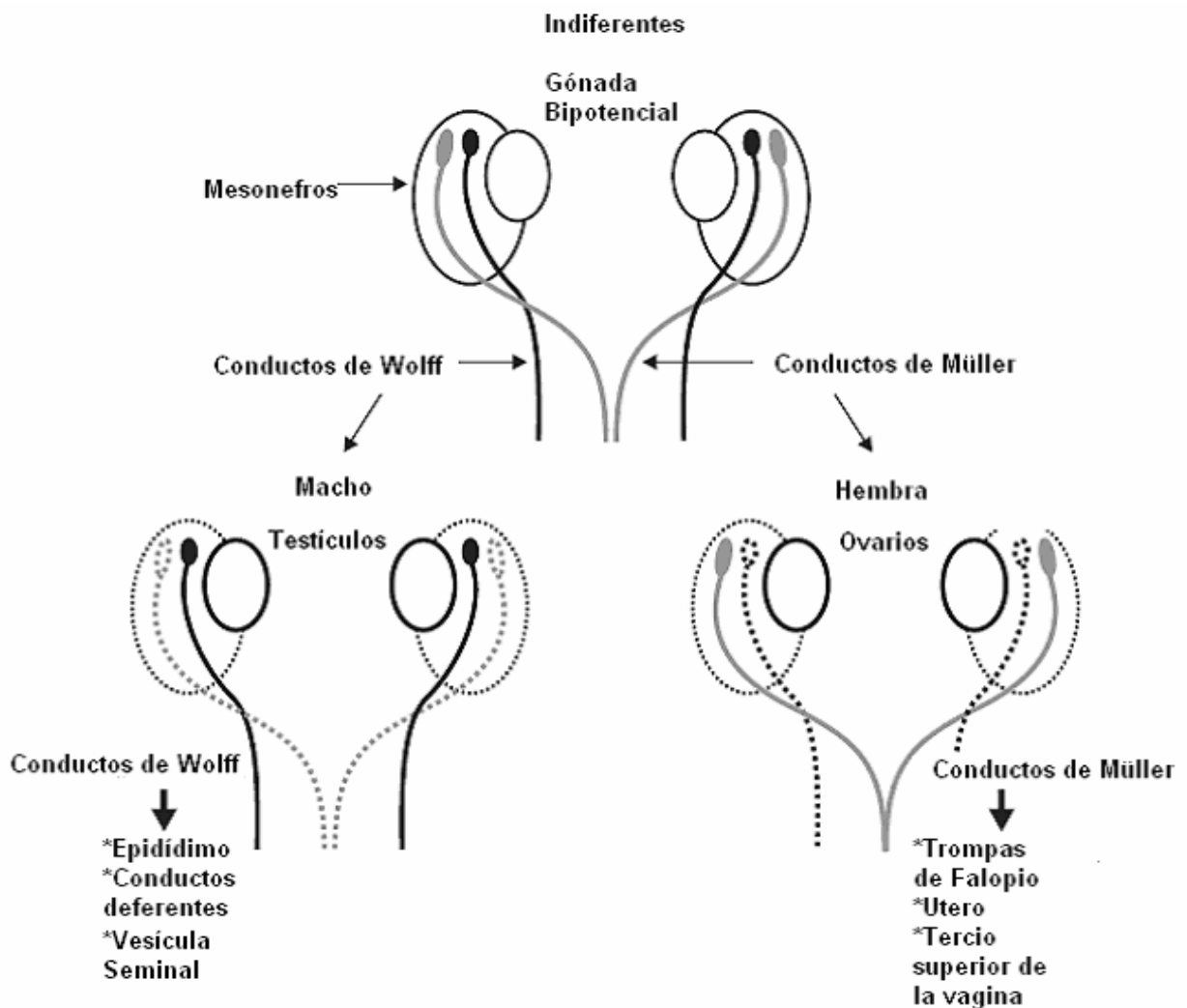


Fig. 3.- Desarrollo de los genitales internos de hembras y machos a partir de la gónada indiferenciada bipotencial. Los testículos producen testosterona y AMH, la primera es necesaria para el desarrollo de los genitales internos masculinos, mientras que la segunda produce la regresión de los conductos de Müller que se desarrollan en las hembras para la formación de los genitales internos (Modificada de Rey y Picard, 1998).

d) Foliculogénesis

El proceso de diferenciación del ovario se inicia cuando la actividad mitótica de las CGs cesa y comienza la profase de la primera división meiótica, la cual se subdivide en leptoteno, cigoteno, paquiteno y diploteno. Los ovocitos permanecerán en el diploteno, hasta que degeneren por atresia o maduren para la ovulación (Merchant, 1991). En la rata el crecimiento folicular comienza en el periodo perinatal alrededor de los 15 dpp (Richards, 1980).

Se ha sugerido que así como en el testículo se forma la *rete testii* formada por cordones sexuales interconectados y el epidídimo, en el ovario puede definirse la *rete ovarii* como la asociación entre los cordones sexuales gonadales y los túbulos mesonéfricos del riñón embrionario. Esta estructura se divide en tres regiones, extraovárica, conectiva e intraovárica (Merchant y Chimal, 1989). Los ovocitos localizados en la región central en el interior de los cordones sexuales están unidos entre sí formando lo que se denomina sacos ovígenos, de los 14 a los 16 dg comienzan a crecer y a separarse por la proliferación de las células epiteliales. En el ratón se ha propuesto que los folículos se forman por fragmentación de los cordones sexuales. Después éstos son rodeados por las células epiteliales y forman así los folículos primordiales (Merchant, 1991).

Durante la etapa infantil el ovocito aumenta de tamaño debido a que sintetiza ARNm de proteínas estructurales regulado por el ciclo celular. El crecimiento folicular comienza cuando el folículo primordial aumenta de tamaño debido a la proliferación de las células foliculares y por el depósito de líquido folicular producido por estas células que dará origen al *antrum* folicular. Posteriormente, alrededor de los 14 dpp, aparece la teca interna que está formada por células mioides, células mesenquimáticas indiferenciadas, células esteroideogénicas y fibroblastos. Finalmente, se diferencia la teca externa que está formada por tejido conectivo fibroso (Merchant, 1991). Ésta es la única región de la teca

que está irrigada y a partir de la cual le llegan todos los nutrientes a las células de la granulosa. Alrededor del día 12 dg se diferencia el tejido productor de hormonas sexuales en el ovario del ratón (Gilbert, 2005).

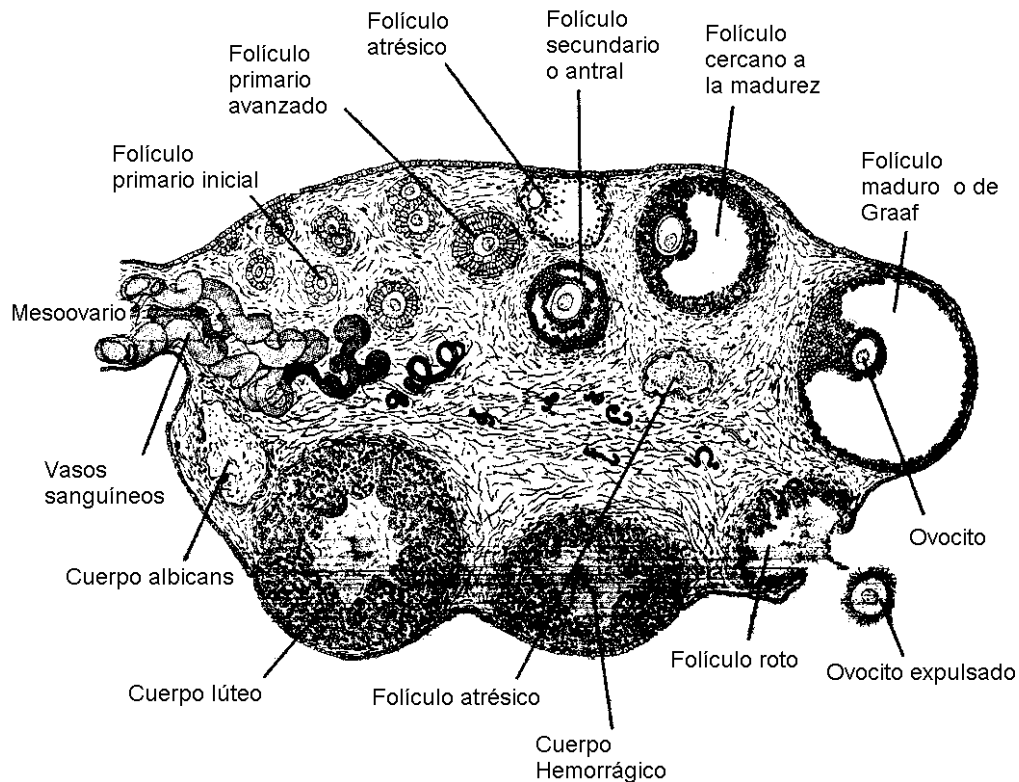


Fig. 4.- Esquema de un corte de ovario, se muestran las distintas etapas del desarrollo folicular (Tomada de Ross, 2005).

En el ratón en el momento del nacimiento los ovarios contienen alrededor de 11,000 ovocitos, de los cuales desaparecerán unos 5800 en los primeros 30 días de vida. La cantidad de folículos en una etapa particular del crecimiento depende de tres factores, la entrada de folículos en el grupo de folículos en crecimiento, el crecimiento de esos folículos, y la pérdida de folículos por atresia (Richards, 1980). Además el ovocito en la etapa prepuber inicia la formación de la zona pelúcida, la cual servirá de barrera mecánica y zona de reconocimiento del espermatozoide debido a la presencia de receptores para que ocurra la fecundación.

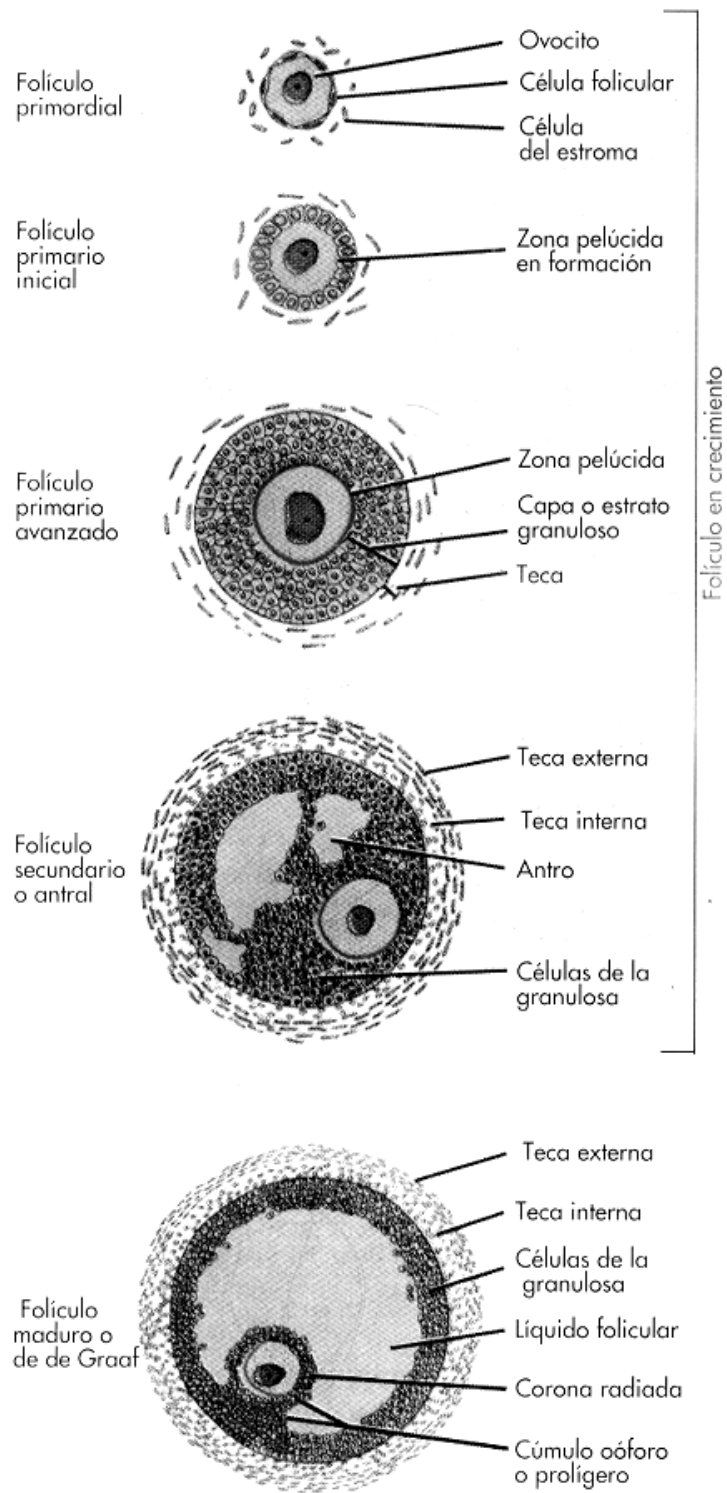


Fig. 5.- Desarrollo folicular de los mamíferos, se pueden identificar las distintas etapas del desarrollo de los folículos desde los primordiales hasta los maduros (Tomada de Ross, 2005).

Los factores hormonales dependientes de la edad y las hormonas secretadas son responsables de la cantidad de folículos maduros e inmaduros en cada especie (Balla et. al., 2003). Como ya se mencionó los folículos en el momento de su formación se encuentran unidos por puentes citoplásmicos, que posteriormente desaparecerán por el proceso de atresia, quedando únicamente aquellos que serán ovulados durante la vida fértil.

Las células que forman los folículos comenzarán a secretar hormonas, por acción de la hormona folículo-estimulante (FSH), hormona glicoproteica producida por la hipófisis anterior que actúa a través de receptores en las CGs. Se ha sugerido que tiene un papel importante en el inicio del crecimiento de folículos en la mayoría de las especies estudiadas. La hormona luteinizante (LH) incrementa la estimulación de la FSH sobre el crecimiento ovárico y actúa como estimulante para la producción de hormonas esteroides. Además promueve la síntesis de receptores a LH (Ross, 2005).

2.- Hormona Inhibidora de los Conductos de Müller

Se ha visto que además de las hormonas sexuales, la función ovárica es regulada por proteínas producidas localmente como la hormona inhibidora de los conductos de Müller, la cual es miembro de la superfamilia de factores de crecimiento TGF- β , entre los que se encuentran activinas, inhibinas, proteínas morfogenéticas del hueso y factores de crecimiento y diferenciación (Ganong, 2006). La AMH se expresa solamente en las gónadas y tiene efectos inhibitorios en el desarrollo y funciones reproductivas. En el hombre su presencia induce la regresión de los conductos de Müller. En las mujeres estos conductos se convierten en los órganos sexuales internos: el tercio superior de la vagina, el útero y las trompas de Falopio (Langman, 2004; Durlinger et.al., 1999; Durlinger et.al. 2002).

Los miembros de la familia TGF- β ejercen su efecto biológico a través de un complejo receptor heteromérico que consta de dos receptores con actividad de cinasa de serina/treonina acoplados, llamados receptores tipo I y tipo II. Cuando el ligando se une al receptor tipo II el receptor tipo I es reclutado dentro del complejo receptor y es fosforilado por el receptor tipo II. La activación del receptor tipo I resulta en la fosforilación de proteínas SMAD (Josso y di Clemente, 2003, Visser, 2003).

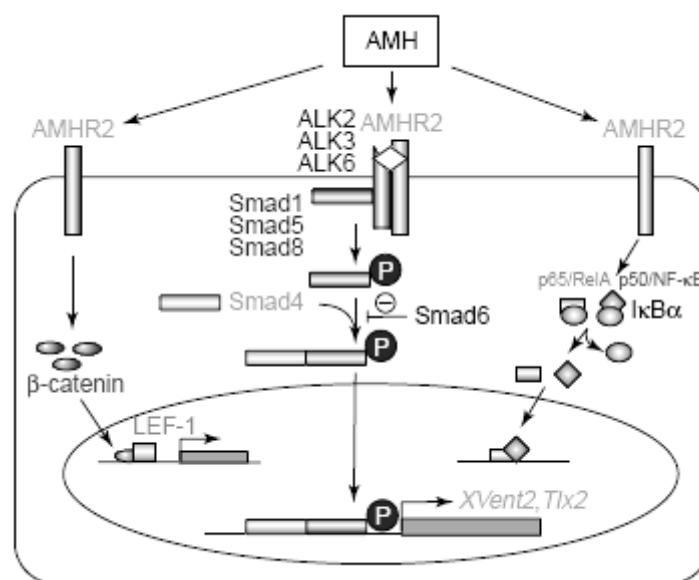


Fig. 6.- Vías de señalización de AMH, la vía principal se lleva a cabo

por medio de la unión del receptor tipo II (R2). (Tomada de Josso y di Clemente, 2003).

El dominio extracelular del receptor tipo II (R2), es una cinasa que enlaza al ligando, e induce la formación de un complejo tetramérico de dos moléculas R2 y dos R1. R2 actúa fosforilando dos residuos serina treonina localizados cerca de la región transmembranal de R1 en el dominio rico en glicina/serina. Cuando las proteínas SMAD son fosforiladas por la activación de R1, son traslocadas al núcleo, uniéndose a la vía a SMAD4, que actúa como un activador transcripcional. Este complejo activa genes BMP-específicos como el Xvent y el Tlx2, la proteína SMAD6 inhibe este paso. Por otro lado sin la participación de

R1 pueden activarse dos vías diferentes, la vía de la B-catenina y la vía NF-kB (Josso, 2003). El receptor tipo II se expresa en la membrana celular porque está encargado del enlace ligando-receptor para que se transmita la señal. Se conocen tres receptores tipo I que el ALK6, llamado BMPRI-B, el ALK2, llamado ActRI y el ALK3, llamado también BMPRI-A (Rey, 2003).

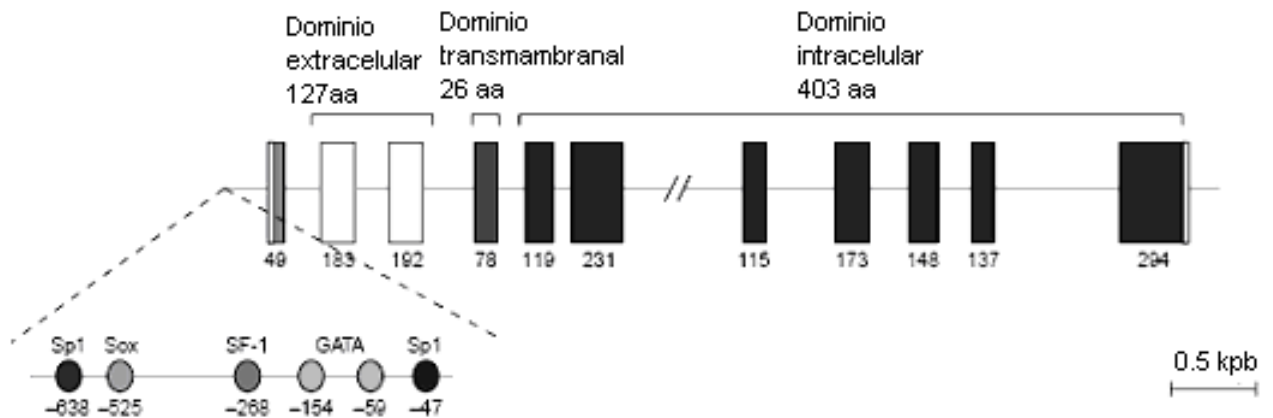


Fig. 7.-Gen que codifica para el receptor de AMH tipo II

(Modificada de Josso y di Clemente, 2003).

a) Organización del gen

La AMH está codificada en un gen de 2.75 kb con 5 exones y que tienen un alto contenido de bases GC, está localizado en el cromosoma 19 p13.3 en humanos, y en el ratón en el cromosoma 10 (Josso y di Clemente, 2003; Lee y Donahoe, 1993).

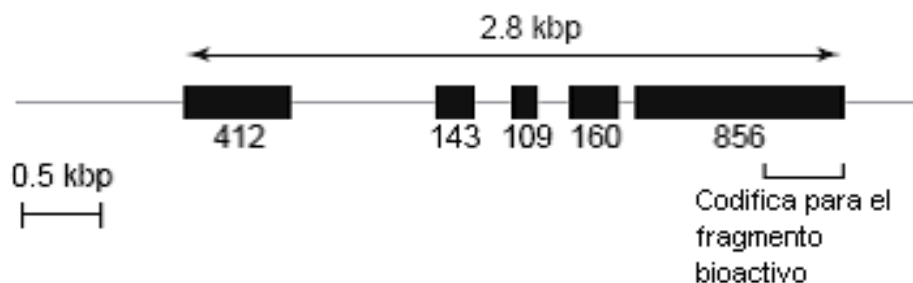


Fig. 8.- Gen que codifica para AMH, ubicado en el ratón en el cromosoma 10 con una longitud de 2.75 kpb con cinco exones. (Modificada de Josso y di Clemente, 2003)

En la rata se han encontrado dos especies de ARNm que son diferentes en su porción 3'. El promotor de ratón y rata contiene una caja TATA, mientras que el de humano contiene los elementos TATA y CCAAT (Rey et. al., 2003).

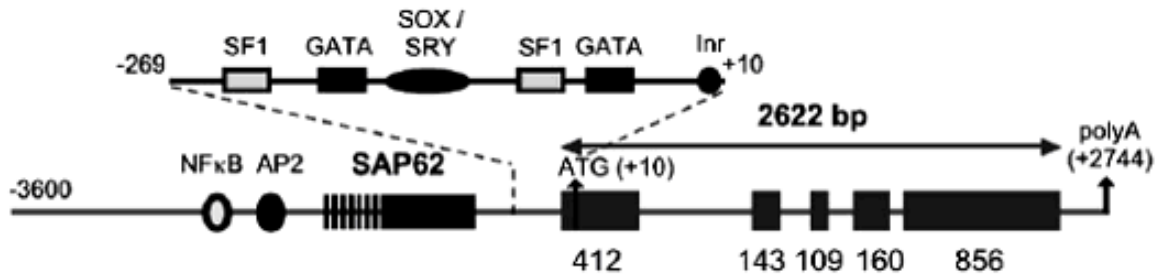


Fig. 9.- Gen que codifica para AMH en humanos y su promotor, en los mamíferos el gen para AMH se encuentra muy conservado evolutivamente (Tomada de Rey et. al., 2003).

b) Estructura de la proteína

La AMH es una glicoproteína dimérica simétrica de 536 aminoácidos y de 140 kDa. Las dos unidades que la conforman se encuentran unidas por puentes disulfuro, cada una es de 70 kDa (Rey et. al., 2003). La proteína posee dos dominios que son responsables de la actividad biológica, uno largo de 426 aminoácidos (110 kDa) que se ubica en la región N-terminal, y uno corto de 109 aminoácidos (25 kDa) que se encuentra en la región C-terminal. La estructura de la AMH es similar a los demás miembros del grupo TGF- β , el extremo carboxilo terminal está formado por siete residuos de cisteína altamente conservados. Muchas de las proteínas de esta familia se producen como precursores diméricos y después se realizan los procesos de control post-trascricional para su activación (Lee y Donahoe, 1993).

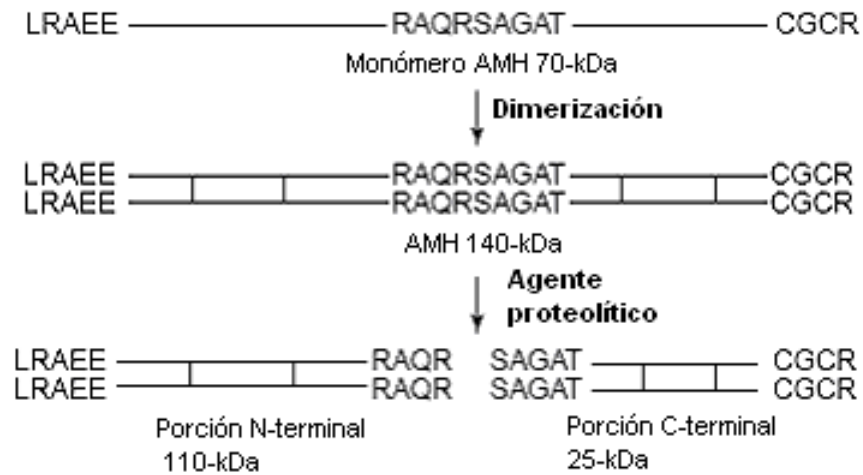


Fig. 10.- Procesos de control post-transcripcional para la activación de la AMH.

(Modificada de Josso y di Clemente, 2003).

3.- Regulación postnatal

La expresión de la AMH en el ovario comienza en la etapa perinatal, se mantiene en niveles bajos durante la vida reproductiva y se vuelve indetectable en la menopausia (Rey et. al., 2003). Los niveles en suero de AMH son altos en la etapa neonatal y en la pubertad de los machos, y es indetectable en hembras en estas etapas, lo que hace a la AMH un excelente marcador de la presencia de tejido testicular en pacientes con genitales ambíguos. Los niveles de AMH tienen un incremento alrededor de los 6 meses a los 2 años en los niños y después disminuye hasta la pubertad permaneciendo en el mismo nivel. Grandes aumentos en los niveles séricos de la AMH ocurren cuando se presentan tumores en las células de la granulosa y los cordones sexuales, la AMH sirve como diagnóstico de estos tumores (Texeira y Donahoe, 1996).

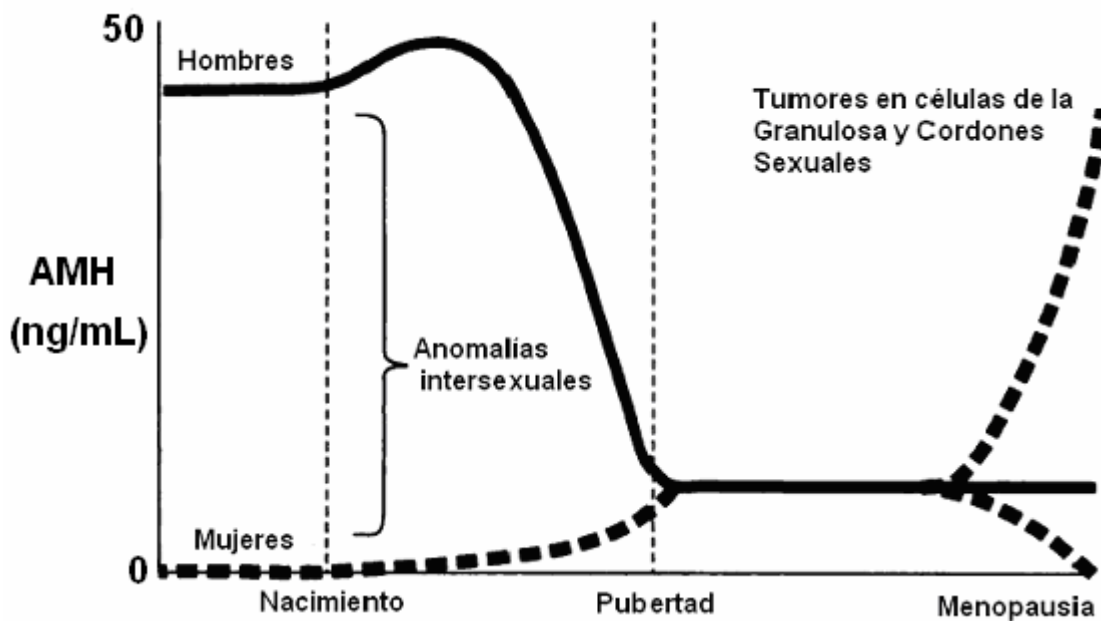


Fig. 11.- Regulación de la expresión génica de AMH en humanos, se observan las concentraciones séricas de AMH en hombres y mujeres en las distintas etapas del desarrollo (Modificada de Teixeira y Donahoe, 1996).

Los genes reguladores de la expresión de la AMH son *SRY*, *SOX9*, *SF-1* (Factor esteroideogénico-1), *WT-1* (Wilms Tumor Factor-1), *Dax-1* y *GATA-4*. Estos factores, con excepción de *Dax-1* y posiblemente *WT-1*, actúan enlazando a una región corriente arriba en 2180 pb del sitio de inicio del gen de AMH. Existen evidencias de que la regulación corriente arriba de AMH requiere de la acción coordinada entre *SF-1*, *SOX9*, *GATA-4* y *WT-1* y que la regulación corriente abajo de la transcripción de AMH requiere la interacción entre *Dax-1* y *SF-1*. La expresión de cada uno de estos factores precede a la expresión de AMH (Watanabe et. al., 2000).

a) Genes

DAX-1 tiene una interacción funcional con *SF-1* porque están localizados muy cerca uno del otro. Se ha mostrado que *DAX-1* reprime la transactivación mediada por *SF-1* de otros genes esteroideogénicos, incluyendo a los genes para las proteínas que participan en la

esteroidogénesis como la 3β -hidroxiesteroide deshidrogenasa, para la AMH y para P450c17. Por lo que tiene un efecto negativo sobre la producción de testosterona por las células de Leydig fetales que es indispensable para la diferenciación sexual en los machos (Gurates et. al., 2002).

Se ha sugerido a partir de estudios realizados en el ratón que *DAX-1* es un gen que antagoniza la función de *SRY* y que es requerido para la función ovárica. Sin embargo; una variante de estos resultados ha demostrado que se encuentra en niveles equivalentes en testículo y ovario de ratón y rata de los 12.5 a los 15.5 dg y es regulado en el ovario de edades posteriores. *DAX-1* es necesario para la morfología y funciones en el desarrollo gonadal de los machos pero el ovario deficiente o con nula expresión de éste es fértil (Lalli y Sassone-Corsi, 2003).

Se han sugerido dos mecanismos moleculares por medio de los cuales un macho puede presentar diferenciación sexual ambigua. En uno se propone que *DAX-1* reprime la producción de AMH por las células de Sertoli. Esto es debido a que *DAX-1* antagoniza el sinergismo que existe entre *SF-1* y *WT1* para activar el promotor del gen de AMH. Posteriormente la sobreexpresión de *DAX-1* incrementa la represión de la expresión de AMH en etapas críticas de la diferenciación sexual. El segundo mecanismo es la represión de la producción de testosterona por las células de Leydig, como ya se mencionó *DAX-1* tiene un efecto negativo sobre la producción de hormonas esteroides (Lalli y Sassone-Corsi, 2003).

El gen WT1 está también involucrado en la regulación de la producción de AMH, y está altamente conservado a lo largo de la evolución de las distintas especies de mamíferos. El producto de la transcripción de *WT1* está presente en las células de Sertoli, las células de la granulosa y en las células estromales del endometrio. Estudios realizados *in vivo* e *in vitro* sugieren que *WT1* puede actuar como un represor o como un activador

transcripcional. En el caso de AMH, se ha reportado que *WT1* regula su transcripción con una interacción proteína–proteína con *SF-1*. El corte alternativo del gen de *WT1* genera cuatro isoformas, un sitio de corte alternativo en el intrón 9 permite la adición de tres aminoácidos (lys-Thr-Ser o KTS), la isoforma *WT1(-KTS)* es reportada como más importante en la estimulación del promotor de AMH que las *+KTS* (Gurates et. al., 2002).

b) Hormonas hipofisarias

En la biosíntesis de la hormona luteinizante (LH) y de la hormona folículo estimulante (FSH) es una función crítica para el desarrollo reproductivo por medio del eje hipotálamo-hipófisis-gónada. La síntesis y la secreción de estas hormonas están reguladas por una serie de mecanismos inhibidores y estimuladores. Diversos miembros de la familia TGF β son responsables de modular la producción de gonadotropinas. Se ha encontrado que las inhibinas y activinas son responsables de la modulación de la FSH (Bédécarrats et. al., 2003).

Se ha observado en pacientes con deficiencia en la producción de andrógenos o con insensibilidad a éstos que los niveles de AMH son muy elevados en el primer mes de vida y después de la pubertad, lo que ha llevado a pensar que en ausencia de un efecto androgénico inhibitorio los altos niveles de FSH llevan a un incremento en la producción testicular de AMH (Rey et. al., 2003).

El mecanismo de señalización para FSH y LH en el adulto ocurre a través de una proteína G_s α que estimula a la enzima adenilato ciclasa a transformar el ATP, lo que finalmente lleva a un incremento en los niveles de AMP cíclico. El AMP cíclico en el tejido testicular humano induce un aumento en los niveles de ARNm de AMH que resulta en un incremento en los niveles de AMH en suero.

Se ha demostrado que se presenta un incremento en los niveles de AMH cuando se estimula con FSH por la vía de la proteína G_s α . La activación de la adenilato ciclasa y la proteína cinasa A (PKA), involucra secuencias que se encuentran a más de 400 pb

corriente arriba del sitio de inicio de transcripción de AMH. El promotor de AMH enlaza a un elemento responsable de AMP cíclico (Rey et. al., 2003).

Además la AMH tiene un efecto regulatorio muy importante a nivel de la hipófisis. En estudios en ratones que sobreexpresan AMH o deficientes en ésta o en su receptor tipo II, se encontró que los niveles de FSH en suero son más bajos en los ratones hembra adultos de 4 meses deficientes en AMH comparado con el control (Bédécarrats et.al., 2003).

En estudios realizados en mujeres voluntarias se observó que la administración de FSH tiene un efecto negativo sobre la secreción de AMH. Además, se ha demostrado que en ovarios en ratas adultas, la FSH tiene un efecto de regulación negativa de la expresión tanto de la AMH como de su receptor tipo II (La Marca et. al., 2004).

c) Hormonas sexuales

Después del nacimiento en los niños se observa una correlación entre los niveles en suero de AMH y de testosterona (Trbovich et.al., 2000). Se observa la disminución más notoria en los niveles de AMH en suero entre las etapas II y III del desarrollo de la pubertad y un poco después comienza a incrementarse la concentración de testosterona (Rey et. al., 2003, Trbovich et. al., 2000).

Observaciones clínicas en pacientes con pubertad precoz comparados con pacientes sanos, se describió que los andrógenos son responsables de la regulación negativa de AMH, y esto ha sido confirmado por los niveles muy elevados de AMH cuando se presenta insensibilidad a los andrógenos o bien deficiente producción de testosterona (Trbovich et. al., 2000).

c) Otras proteínas

Los factores de transcripción miembros de la familia GATA, son un grupo de proteínas reguladoras de la expresión de genes en varios tejidos, tienen secuencias muy conservadas evolutivamente y se han encontrado en muchos organismos, todos ellos tienen secuencias aproximadas de 50 kDa (Lowry y Atchley, 2000). La región C-terminal es importante para enlazarse al DNA y la región N-terminal es necesaria para la interacción con otros factores como las proteínas FOG con las que participan de forma acoplada (Martin y Orkin, 1990). En los vertebrados se encuentran 6 de estos factores de transcripción. GATA 4 es necesario para el desarrollo gonadal, en testículo se ha descrito que puede actuar activando a *SRY*. También activa varios genes que codifican para enzimas esteroideogénicas, como es el caso de StAR y la aromatasa, de hormonas como la AMH, la inhibina alfa y la inhibina/activina alfa y beta, y para el factor de transcripción *SF-1*. FOG-1 y FOG-2 modulan la actividad transcripcional de GATA-4 a través de varios mecanismos que dependen de las células en las que se presentan (Tremblay et. al., 2001).

4.- Función de la AMH

a) Papel en la producción de hormonas sexuales

Como se menciona más adelante, el colesterol es el compuesto precursor de las hormonas esteroideas, para iniciar con la cascada enzimática de la síntesis de hormonas esteroideas el colesterol debe entrar a la mitocondria. La membrana de la mitocondria no representa una barrera para la entrada del colesterol por ser lipofílica, pero la parte de afuera y dentro de ésta, por ser acuosa si representa una importante barrera para su entrada. La proteína StAR (proteína reguladora de la esteroideogénesis) ayuda al transporte del colesterol al interior de la membrana mitocondrial. Una vez que ocurre ésto se incrementa la expresión de enzimas esteroideogénicas incluyendo a StAR.

La inducción de la expresión de esta enzima se debe a distintos factores, como el ácido araquidónico, PKA y cinasas estimuladas por cAMP extracelular, estradiol y progesterona. Mientras que la regulación negativa se lleva a cabo por diversos factores, entre los cuales se encuentra AMH (Houk et. al., 2004).

Se ha encontrado en estudios previos que AMH no tiene un efecto inductorio en la expresión del ARNm de StAR directamente, pero parece aumentar la inducción mediada por cAMP de la expresión del ARNm de StAR, en células MA-10 y células de Leydig de ratón, es decir induce la expresión de StAR indirectamente, reduciendo los niveles de testosterona (Houk et. al., 2004).

Como ya se mencionó, la disminución en los niveles séricos de AMH durante la pubertad, coinciden con el incremento en los niveles de testosterona (Rey et. al., 2003, Trbovich et. al., 2000). Además, se ha encontrado en estudios en ovario de ratón que AMH suprime la expresión de la aromatasa, y en cultivos de células diferenciadas de la granulosa, suprime la producción de progesterona (McGee et. al., 2001).

d) Participación en la proliferación de tejidos

Estudios realizados en rata revelaron que la proteína y el ARNm de la AMH se expresan en las células de la granulosa de folículos en crecimiento en la rata, y su expresión declina en los folículos antrales y atrésicos. El receptor tipo II se expresa en células de la granulosa de folículos preantrales y pequeños folículos antrales, y también en las células de la teca de folículos pequeños en la rata. Lo anterior sugiere que la AMH tiene una función importante en el desarrollo folicular del ovario infantil (McGee et. al., 2001). En estudios realizados en folículos de rata, se observó que el tratamiento con AMH aumenta el crecimiento de los folículos preantrales incrementando tanto el tamaño de los folículos como el número de células (McGee et. al., 2001).

Sin embargo, en investigaciones llevadas a cabo en otras especies y en otras condiciones de cultivo, se ha encontrado que AMH inhibe el crecimiento folicular inducido por FSH, reduce la expresión del ARNm de Aromatasa y disminuye el número de receptores de LH en las células de la granulosa en cultivo (Durlinger et. al.; 1999, Durlinger et. al., 2002).

5.- Metabolismo de hormonas sexuales

Las hormonas sexuales se dividen en progestinas, andrógenos y estrógenos, entre las primeras se encuentran gestágenos y progestágenos (Stryer, 1990).

a) Clasificación química

En la clasificación química se relacionan a todas las hormonas esteroides con un compuesto precursor, formado por un anillo complejo totalmente saturado llamado núcleo ciclopentanoperhidrofenantreno. Este anillo tiene tres ciclohexanos unidos (los anillos A, B y C) y un ciclopentano (anillo D). Los esteroides en el ovario son derivados de uno de los cuatro compuestos precursores llamado colestano, este compuesto es el precursor del colesterol y otros esteroides (Stryer, 1990).

El colestano tiene grupos metilo en la unión entre los anillos A y B, en el carbono 10, y entre los anillos C y D, en el carbono 13; además, posee una cadena de 7 carbonos en el carbono 17. Eliminando la cadena entre C-20 y C-22, se originan los esteroides C₂₁ correspondiendo a la serie del pregnano a la que pertenecen las progestinas. Si se eliminan los carbonos entre C-17 y C-20, se producen los esteroides C₁₉ de la serie del androstano que agrupa a los androgenos. Y si se remueve el grupo metilo en C-10, se originan los esteroides C₁₈ de la serie del estrano, a la que pertenecen los estrógenos (Stryer, 1990).

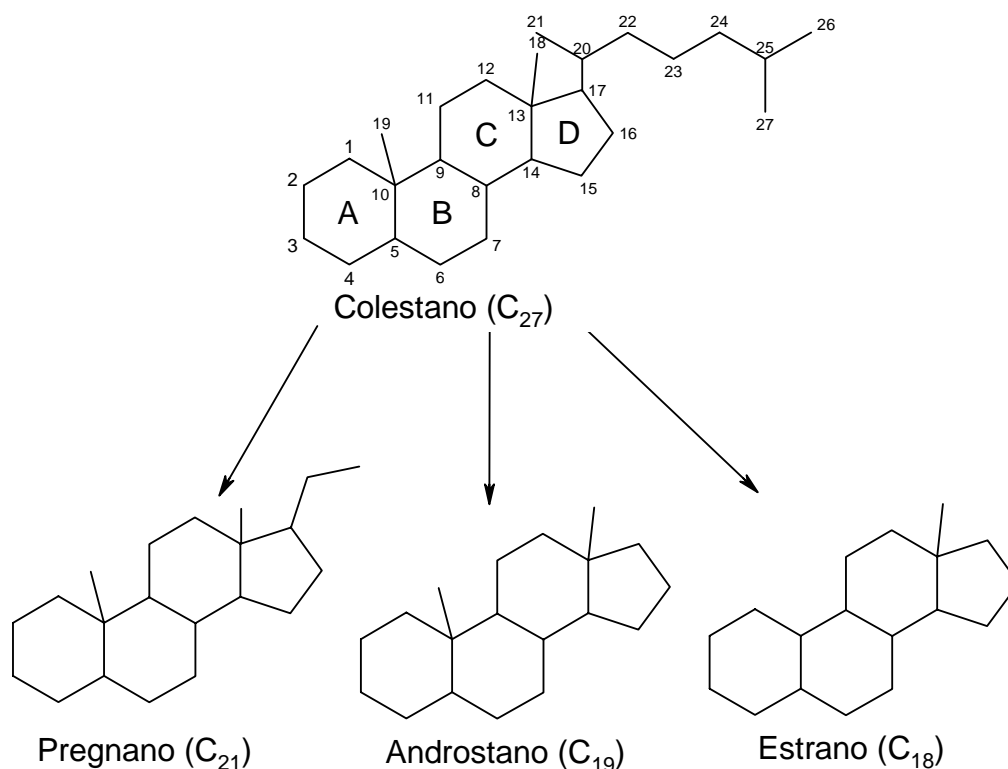


Fig. 12.- Se muestra el colesterol como compuesto precursor de las hormonas esteroideas y las modificaciones que se llevan a cabo para obtener cada uno de los grupos principales de hormonas sexuales. (Modificada de Ganong, 2006)

El sistema de nomenclatura sistemático se basa en las modificaciones que se realizan sobre el compuesto precursor, entre las que están:

- I. La introducción de dobles enlaces entre átomos de carbono adyacentes en una cadena o en el anillo.
- II. Grupos hidroxilo
- III. Grupos carbonilo, resultantes de la oxidación de los grupos hidroxilo.

Es necesario distinguir entre los estereoisómeros que pudieran resultar de la sustitución de carbonos asimétricos en el núcleo del compuesto precursor. Por convención los sustituyentes que se encuentren del mismo lado del plano que los grupos metilo angulares en el C-10 se considera que tienen configuración β , y los sustituyentes que

están del lado contrario del plano a éste grupo metilo en C-10 se encuentran en configuración α (Stryer, 1990).

Por otro lado, la orientación del átomo de hidrógeno en C-5 resulta en la isomería cis y trans con respecto a si se encuentra en el lado α o β de la molécula. Cuando el átomo de hidrógeno en C-5 se encuentra en el lado α tenemos el isómero trans, es decir que el átomo de hidrógeno se encuentra en posición trans con respecto al grupo metilo que está en C-10. El isómero trans resulta cuando el átomo de hidrógeno en C-5 se encuentra en el lado β de la molécula (Stryer, 1990).

b) Clasificación biológica

Las hormonas esteroides se clasifican también con base a sus principales funciones biológicas en tres grupos principales, estrógenos, andrógenos y progestinas, que como ya se mencionó pertenecen a los grupos del estrano, androstano y pregnano respectivamente (Metzler, 2003).

i) Estrógenos

La estrona y el estradiol son las hormonas producidas por las células foliculares más importantes fisiológicamente. En los roedores y en otros vertebrados inferiores participan en la inducción de la receptividad sexual en hembras de mamíferos (estro), aunque tienen otras funciones (Metzler, 2003).

Los estrógenos tienen una función importante en el desarrollo de los folículos ováricos y en la liberación de hormonas durante la ovulación. Los estrógenos endógenos incrementan la cantidad de lípidos en plasma, calcio y proteínas al mismo tiempo en que se presenta el desarrollo sexual (Metzler, 2003).

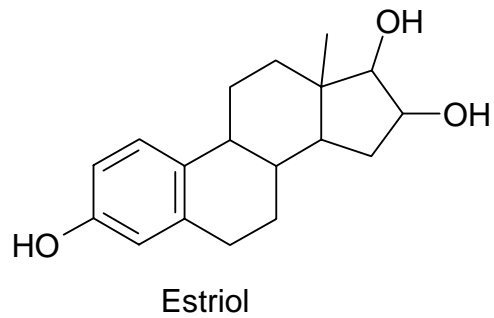
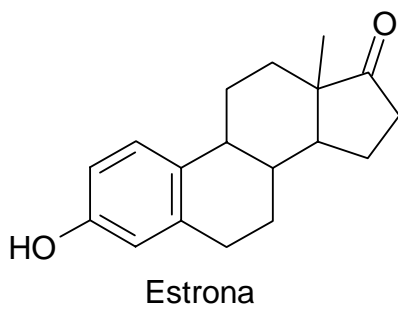
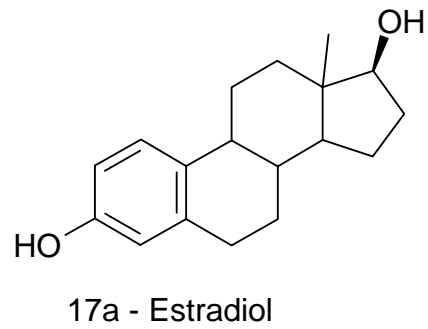
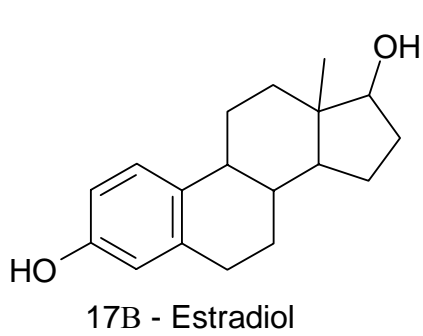


Fig. 13.- Estrógenos producidos por los ovarios de los mamíferos

(Modificada de Metzler, 2003).

ii) Andrógenos

El ovario produce androstendiona y testosterona, que son precursores biosintéticos inmediatos de los estrógenos ya que se lleva a cabo la aromatización del anillo A para producir estos últimos. Se producen estrona y estradiol-17 β a partir de androstendiona y testosterona respectivamente (Metzler, 2003).

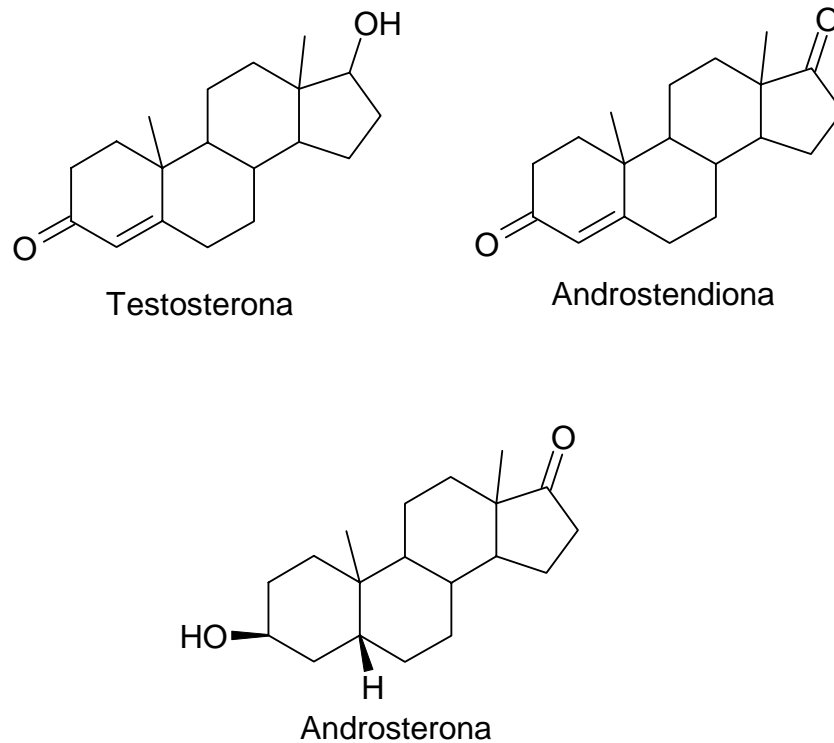


Fig. 14.- Andr6genos producidos por los ovarios de los mam6feros

(Modificada de Metzler, 2003).

III) Progestinas

Entre las progestinas la pregnenolona es la m1s importante producida en los fol6culos porque es un precursor importante para la s6ntesis de todas las dem1s hormonas esteroides. Sin embargo, la progesterona es producida m1s abundantemente en el fol6culo, como un intermediario biosint6tico por los fol6culos de todas las fases del crecimiento y secretado como producto final en la fase peri y post-ovulatoria (Metzler, 2003).

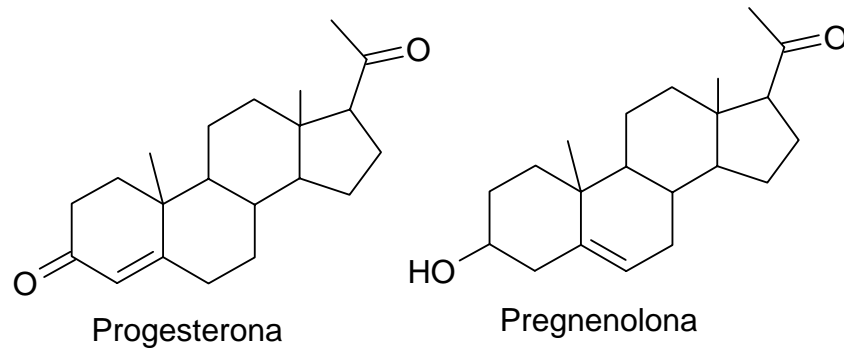


Fig. 15.- Progestinas producidas por los ovarios de los mamíferos
(Modificada de Metzler, 2003).

b) Síntesis de andrógenos y estrógenos

Como ya se mencionó, el colesterol es el compuesto precursor de las hormonas esteroides, puede ser derivado de tres fuentes principales. La primera y más importante es a partir de colesterol preformado tomado de la sangre en forma de lipoproteínas circulantes. La segunda es del colesterol preformado almacenado en las células ováricas, como colesterol libre, como constituyente de las membranas, o bien liberado de los ésteres de colesterol almacenado en lípidos citoplásmicos. La tercera es la síntesis de *novo* en las células ováricas, a partir de compuestos dicarbonílicos procedentes de la síntesis de carbohidratos, grasas y proteínas (Ganong, 2006).

El primer paso de la esteroidogénesis es el paso limitante de la cascada metabólica, y es la formación de un grupo carbonilo en el C-20 y la formación de un compuesto de 6 carbonos que es llamado aldehído isocaproico, estas reacciones ocurren en el lado externo de la membrana mitocondrial. Por medio de estas reacciones se forma la pregnenolona que es el intermediario de todas las hormonas esteroides que se producen en el ovario. La pregnenolona es convertida en progesterona por medio de un complejo enzimático llamado Δ^{4-5} - 3β - hidroxisteroide deshidrogenasa: Δ^{5-4} isomerasa.

Esta enzima utiliza el NAD⁺ como aceptor de electrones en una reacción irreversible en condiciones fisiológicas. Enzimas semejantes realizan la conversión de 17 α -pregnenolona a 17 α -hidroxiprogesterona y dehidroepi-androsterona (DHEA) a androstendiona.

El complejo 17 α -hidroxilasa: C-17, 20-liasa que está presente en la membrana microsomal cataliza una reacción que en presencia de NADHP y oxígeno convierte ya sea la pregnenolona a DHEA, o bien progesterona a androstendiona, estas vías alternas se conocen como 5-ene-3 β -hidroxi o Δ^5 y 4-en-3-oxo o Δ^4 respectivamente (Stryer, 1990).

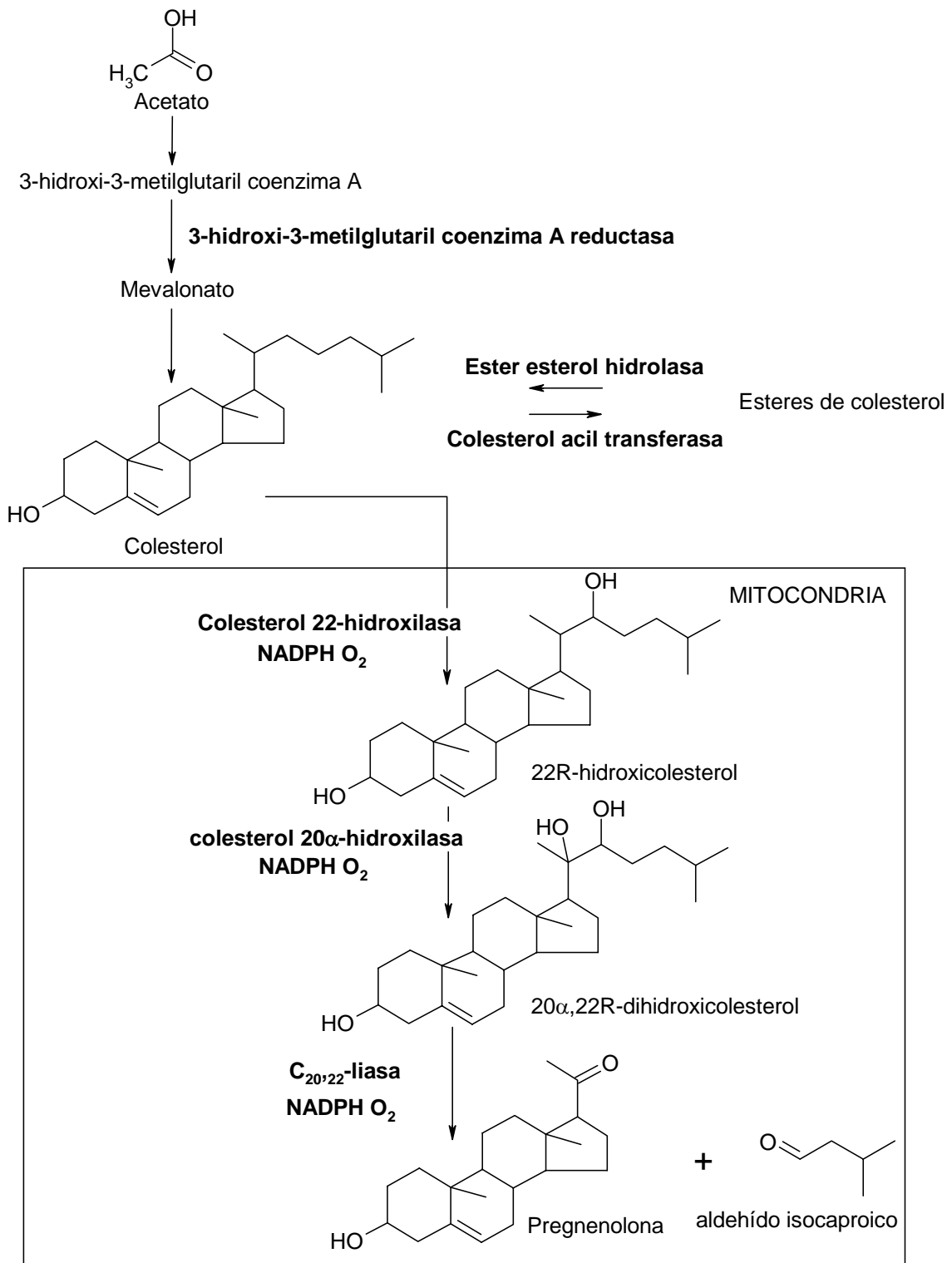


Fig. 16.- Síntesis de pregnenolona en las mitocondrias como intermediario para la síntesis de hormonas esteroides (Modificada de Metzler, 2003).

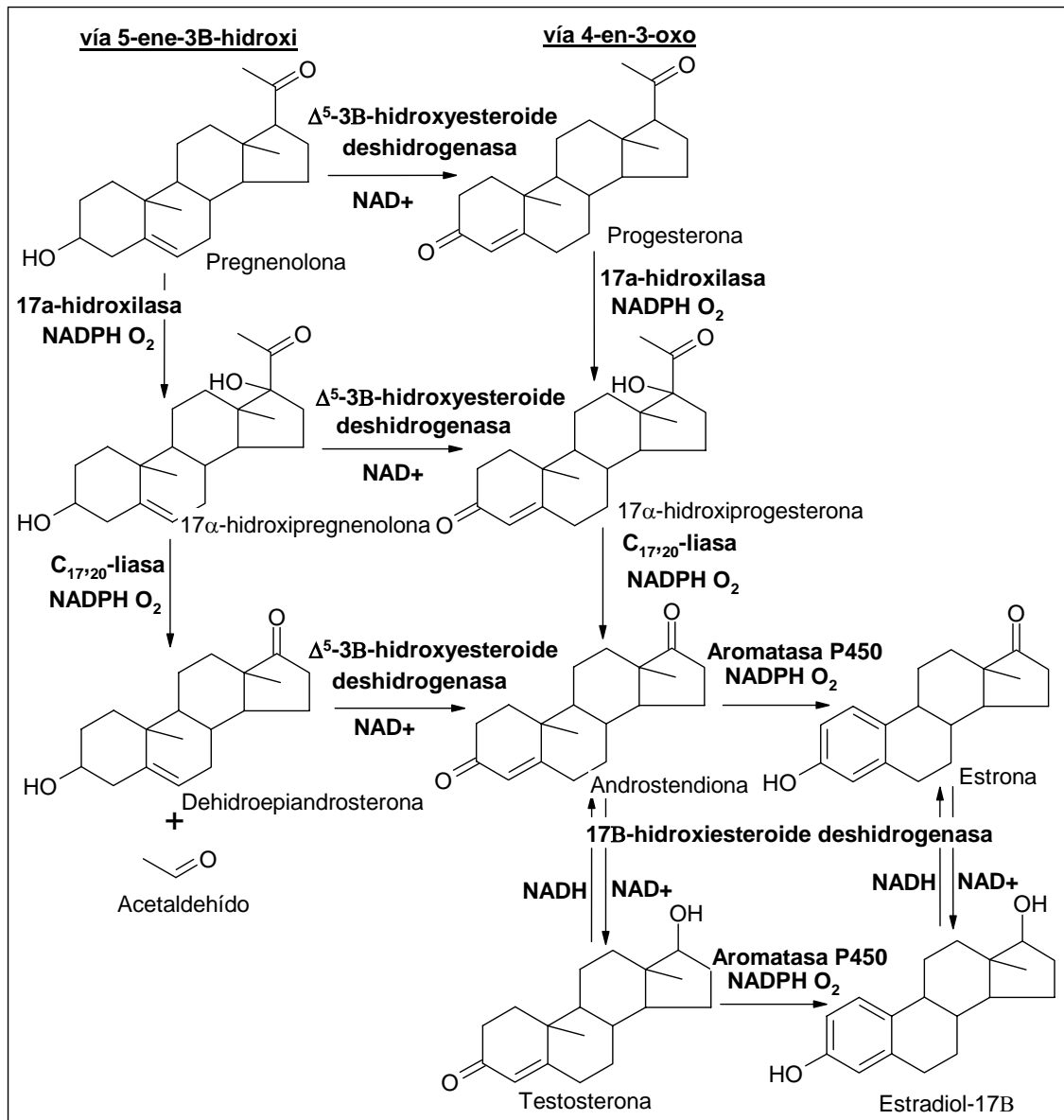


Fig. 17.- Síntesis de las hormonas esteroides a partir de su intermediario pregnenolona

(Modificada de Ganong, 2006 y Metzler, 2003).

La androsterona y la testosterona se convierten en estrona y 17β estradiol respectivamente por medio de un complejo enzimático conocido como aromatasas. Este complejo está localizado en la membrana del retículo endoplásmico liso de diversos tipos de células ováricas (Stryer, 1990).

La aromatasas cataliza la aromatización del anillo A de las moléculas de esteroides C_{19} . Es un complejo que contiene un citocromo P450 con una actividad de oxidasa. En la cascada de reacciones que se llevan a cabo se elimina el grupo metilo en C-10 como ácido fórmico y se reorganiza el anillo para obtener una estructura aromática. En las reacciones son necesarios 3 moles de O_2 y NADPH. Dos de éstos se consumen en dos hidroxilaciones consecutivas en C19. Se requiere una tercera hidroxilación para que se lleve a cabo la aromatización del anillo y para esto se proponen tres mecanismos. El primer mecanismo que se propone es una 2 β -hidroxilación, el segundo es una $C_{4,5}$ -epoxidación, y el tercero es la formación de un enlace peróxido en C-19 (Ganong, 2006).

III.- Planteamiento del problema e hipótesis

Planteamiento del problema

Cuando se establece el eje hipotálamo-hipófisis-gónada se inicia la secreción de las hormonas FSH y LH. La FSH tiene como función favorecer el crecimiento y maduración folicular, mientras que la LH participa estimulando a las células de la teca para la producción de hormonas esteroideas e incrementando la estimulación de la FSH sobre el crecimiento folicular (Ross, 2005). En el ratón este eje se establece alrededor de los 35 dpp, sin embargo, el crecimiento folicular comienza alrededor de los 15 dpp (Richards, 1980). Además se ha encontrado que la AMH se expresa en las células de la granulosa a partir del día 0 del nacimiento (Villalpando y col, comunicación personal). En estudios realizados en la rata se encontró que la proteína y el ARNm de AMH se expresan en las células de la granulosa de folículos en crecimiento, y su expresión declina en los folículos antrales y atrésicos. Así mismo, se observó que su receptor también se expresa en las células de la teca de folículos pequeños (Mc Gee et. al., 2001). Lo anterior sugiere que la AMH tiene una función importante en el ovario infantil en el desarrollo folicular. Se ha demostrado que el tratamiento con AMH de folículos preantrales, aumenta el crecimiento de éstos. Sin embargo, no se ha descrito cual es la función de la AMH directamente en la proliferación de las células foliculares.

Hipótesis

Si el crecimiento folicular comienza antes de que se establezca el control hipofisiario y la AMH es una hormona producida en las células foliculares desde etapas tempranas del desarrollo, entonces la administración de AMH exógena en un cultivo de células de la granulosa, induciría la proliferación estas células en la etapa infantil y prepuber.

III.- Objetivos

Objetivo General

Establecer el papel de la hormona inhibidora de los conductos de Müller en la proliferación de células de la granulosa en el ovario infantil y prepuber en el ratón *Mus musculus*.

Objetivos Particulares

- 1.- Evaluar el efecto de la hormona inhibidora de los conductos de Müller en la proliferación de células de la granulosa *in vitro*.
- 2.- Establecer la etapa en la que se inicia la expresión de la enzima 3 β -HSD en ovario infantil y prepuber del ratón a los 10, 15 y 25 días post-parto (dpp).

IV.- Material y métodos

i) Primera parte

a) Animales

Se utilizaron machos y hembras de 10 semanas de edad de la cepa CD-1 y se pusieron a cruzar un macho con 5 hembras. El día que se observó el tapón vaginal se denominó día cero de la gestación. Se emplearon hembras gestantes de la cepa CD-1, y se mantuvieron en el bioterio del Instituto de Investigaciones Biomédicas en cajas estériles con Sani-Chips de Harlan® con periodos de 12 horas de luz-oscuridad y temperatura de 22 a 23°C. Los ratones hembra se alimentaron con Diet Mouse Food de Harlan® y agua esterilizada *ad libitum* acidificada con HCl puro (pH 2.5), filtrada por ósmosis inversa y esterilizada en autoclave.

b) Determinación de la edad de gestación

El día en que las hembras parieron se estableció como día cero, y a partir de ese día se establecieron grupos de 10, 15, 20 y 25 dpp. Los ratones recién nacidos se sexaron por el tamaño del poro genital y la distancia entre éste y el orificio anal. En el caso de los machos el poro genital es de mayor tamaño y la distancia entre éste y el orificio anal es más corta que en las hembras. Los ratones machos se sacrificaron mediante decapitación y fueron desechados y las hembras se mantuvieron en el bioterio del Instituto de Investigaciones Biomédicas en las condiciones antes mencionadas.

ii) Segunda parte

c) Aislamiento del ovario

Las hembras de los grupos de 10, 15 y 25 dpp fueron sacrificadas por dislocación cervical, se realizó una incisión abdominal en forma de "V" y se extrajeron los ovarios que se colocaron en una gota de Tissue-Tek en una caja de Petri estéril. Se limpiaron los ovarios y se mantuvieron en hielo inmersos en Tissue-Tek®.

d) Inclusión de tejido

Se realizó la inclusión directa del ovario sobre un corcho, se colocó una gota de Tissue-Tek sobre un corcho y se incluyó el ovario dentro de la gota de forma transversal o longitudinal. El ovario incluido sobre un corcho se congeló en hexano frío sobre un baño de acetona y hielo seco.

e) Obtención de cortes por congelación

Se realizaron cortes de 10 μm a -20°C en un criostato Leica CM. Los cortes se montaron en laminillas tratadas con Tezpa al 2% en acetona que permite la adhesión de los cortes de tejido sobre la laminilla de vidrio. Las laminillas se mantuvieron a 4°C en condiciones de vacío.

f) Detección de la enzima 3β -HSD

Se evaluó la expresión de la enzima 3β -hidroxiesteroide deshidrogenasa por medio de la técnica modificada de Levi et.al., 1959. Los cortes de ovario de las edades antes mencionadas se incubaron a 37°C en un medio que contenía 4 mg/mL de β -nicotinamida adenina dinucleótido (NAD) y 2 mg/mL de nitrobluetetrazolium (NBT) diluidas en amortiguador Tris-HCl 0.2M pH = 7.6. Se realizaron dos grupos un grupo control que contenía los reactivos antes mencionados, y un grupo experimental que contenía además 2 mg de la hormona dehidroepiandrosterona (DHEA), disuelta en NN-dimetilformamida como sustrato de la reacción enzimática. Se incubaron a 37°C dentro de un vaso de Kopplin en un baño de agua por 1 hora para los cortes del grupo de 25 días y 2 horas para los cortes de los grupos de 15 y 10 días. Después de la incubación se detuvo la reacción con agua destilada filtrada por 5 minutos, se fijaron los cortes con formalina neutra por 10 minutos a temperatura ambiente y se lavaron con amortiguador Tris – HCl 0.2M por 5 minutos. Finalmente se montaron las laminillas con glicerol para evitar la deshidratación del tejido y se guardaron protegidas de la luz.

iii) Tercera parte

g) Purificación de las células de la granulosa

Se aislaron 30 gónadas de los grupos de las edades experimentales de 10, 15 y 20 dpp y 20 gónadas para la edad de 25 dpp, se realizó la disgregación manual del tejido de 25 dpp con agujas de insulina, en 1 mL de en Medio Esencial Dulbecco Modificado (D'MEM, Apéndice) sobre cajas de Petri estériles, mientras que los ovarios de las demás edades no se disgregaron manualmente. Se transfirió a un tubo Eppendorf y se lavó con PBS estéril (ver apéndice) a temperatura ambiente. Se incubó el tejido a 37°C por 3 minutos con DNAsa para la edad de 15 dpp, 5 minutos para las edades de 10 y 20 dpp y 2 minutos para la edad de 25 dpp. Se disgregó con una pipeta siliconizada por 5 minutos para las edades de 10, 15, y 20 dpp, y 2 minutos para la edad de 25 dpp, terminado el tiempo se inhibió con inhibidor de tripsina la actividad de la enzima. Se centrifugó a 4000 rpm por 10 minutos para separar el sobrenadante que contiene células de la teca.

Se preparó una mezcla de 791 μ L de PBS estéril, 189 μ L de EDTA, Tripsina al 2.5%, Colagenasa 0.02 mg/mL y Dispasa 0.01mg/mL para las edades de 10, 15 y 20 dpp, para la edad de 25 dpp se utilizó una mezcla de 791 μ L PBS estéril, 189 μ L de EDTA, 10 μ L de tripsina y 10 μ L de Colagenasa tipo III. Se agregó 1 mL de la mezcla al tejido y con una pipeta siliconizada se resuspendió fuertemente por 2 min para disgregar completamente el tejido, transcurrido el tiempo se agregaron 110 μ L del inhibidor de tripsina se mezcló para detener la reacción enzimática completamente. Se transfirió el sobrenadante a otro tubo Eppendorf estéril y se centrifugó a 5000 rpm durante 5 min para obtener el botón celular. Se decantó el sobrenadante y se resuspendió el botón celular en 100 μ L de medio de cultivo suplementado.

h) Determinación del número de células

El conteo de células de la granulosa viables se realizó empleando una cámara de Neubauer. Se preparó una solución 1:1 de la suspensión celular y el colorante azul de Evans al 0.2% (v/v) tomando 5 μ L del colorante y 5 μ L de la suspensión celular. Se tomaron los 10 μ L de la mezcla y se colocaron en la cámara. Se contaron las células viables en los cuatro cuadrantes externos de la cámara observándolas en un microscopio óptico modelo Galen Tm III. Se calculó el número de células viables presentes en un mililitro de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$\#cel/mL = (\#cel \text{ en } 4 \text{ cuadrantes}) (2500) (1)$$

Donde:

2500 es el factor asociado a la cámara de Neubauer

1 es el factor de dilución

i) Cultivo celular

Conociendo el número de células por mililitro se calculó el número de células en el volumen de suspensión celular que se tenía, en este caso 100 μ L. Con éste dato se calculó el volumen en el cual se tenían 20,000 células. Se sembraron 20,000 células en cajas de cultivo con 96 pozos (Nuclon) con vidrios estériles. El cultivo celular se dejó 24 h a 37 °C con 5% de CO₂ y suero bovino fetal al 10%. Se realizaron dos grupos, el control y el experimental. El grupo control correspondió a las células de la granulosa sembradas en Medio Esencial Dulbecco Modificado más el marcador (BrdU) Bromodeoxy uridina (Roche) en concentración de 1mg/mL dilución 1:1000 en este medio. El grupo experimental correspondió a las células de la Granulosa sembradas en medio D'MEM suplementado más BrdU (1mg/mL) y el péptido MIS Recombinante Humano (R&D systems) en concentración de 50 ng/ μ L. El cultivo celular se dejó 24 h a 37 °C con 5% de CO₂.

j) Fijación de las células

Las células se fijaron con glutaraldehído al 0.3% (ver apéndice) por 10 minutos a 4°C, posteriormente se lavaron 2 veces con PBS, se retiró el PBS de las cajas completamente y las células se mantuvieron a -20°C. Se lavaron dos veces con PBS por 5 minutos a temperatura ambiente con agitación. Se agregó la solución de bloqueo que contiene Albúmina Sérica Bovina y Gelatina disueltas en PBS (ver apéndice), se incubó una hora con la solución de bloqueo a temperatura ambiente con agitación constante.

k) Inmunodetección

Se lavaron las células con PBS a temperatura ambiente dos veces. Se realizaron dos lavados más con PBS a 70°C por 5 minutos. Se colocaron 15µL del anticuerpo Anti-BrdU diluido 1:100 en amortiguador de incubación sobre las células y se incubaron 2 horas a temperatura ambiente en una cámara húmeda. Se lavó con PBS 2 veces. En la oscuridad se agregaron 30 µL del anticuerpo secundario antimouse FITC (antimouse acoplado a isotiocianato de fluoresceína) diluido 1:100 en PBS y se incubó por 1 hora a temperatura ambiente cubierto de la luz. Se lavó dos veces con PBS, se secaron los pozos y se mantuvieron las cajas a 4°C.

l) Fotografías

Las células marcadas fueron observadas y fotografiadas en un microscopio invertido de epifluorescencia modelo Zeiss. El conteo de las células se realizó sobre las fotografías para los grupos control y experimental de cada edad estudiada.

m) Análisis estadístico

Los resultados experimentales fueron analizados estadísticamente utilizando la prueba t–student con un nivel de significancia del 95.0%, ($p < 0.05$) para los ensayos de proliferación celular, y se analizaron con una prueba ANOVA con un nivel de significancia del 95%, ($p < 0.05$) para descartar que los efectos entre las edades estudiadas fueran iguales.

VI.- Resultados

1.- Ensayos de proliferación de células de la granulosa

a) Etapa infantil

En la figura 18 se muestran los resultados obtenidos de los ensayos de proliferación de células de la granulosa a la edad de 10 dpp. En éste caso el porcentaje de proliferación de células de la granulosa en el grupo control fue de 20% y en el grupo experimental de 31%. Las diferencias observadas entre el grupo control y el experimental fueron estadísticamente significativas a $p < 0.05$.

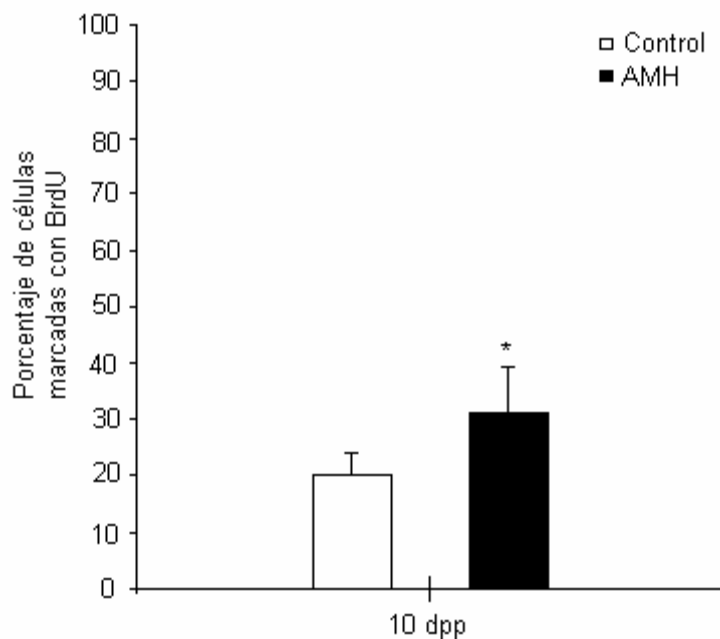


Fig. 18. - Efecto de la AMH sobre la proliferación de las células de la granulosa a la edad de 10 dpp. Las barras muestran la media y el error estándar.

* $p < 0.05$; experimental vs control 10 dpp.

Los ensayos de proliferación celular de la edad de 15 dpp se observan en la figura 19, se detectó también que el porcentaje de proliferación de células de la granulosa es menor en el grupo control comparado con el tratado con AMH (Fig. 19). Se observó además, que

el porcentaje fué mayor en el grupo experimental de ésta edad con relación a la edad de 10 dpp. El porcentaje de proliferación fue de 38% en el grupo control y 55% en el grupo experimental a los 15 dpp. Las diferencias encontradas entre los grupos control y experimental fueron estadísticamente significativas a $p < 0.05$.

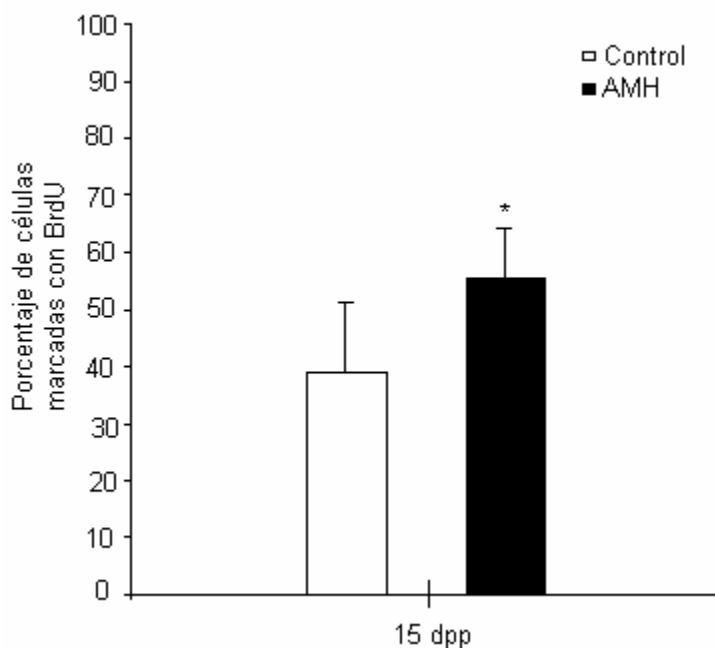


Fig. 19. - Efecto de la AMH sobre la proliferación de las células de la granulosa a la edad de 15 dpp. Las barras muestran la media y el error estándar.

* $p < 0.05$; experimental vs control 15 dpp.

b) Etapa prepuber

En la figura 20 se muestran los datos de los ensayos de proliferación celular de la edad de 20 dpp. El porcentaje de proliferación de células de la granulosa fue a ésta edad también mayor en el grupo tratado con AMH que para el grupo control. Además, se observó que el porcentaje de proliferación celular fué mayor para el grupo experimental de ésta edad con relación a las edades anteriores. A los 20 dpp el porcentaje de proliferación fue de 30% en el grupo control y 71% en el grupo experimental. Las

diferencias encontradas entre los grupos control y experimental fueron estadísticamente significativas a $p < 0.05$.

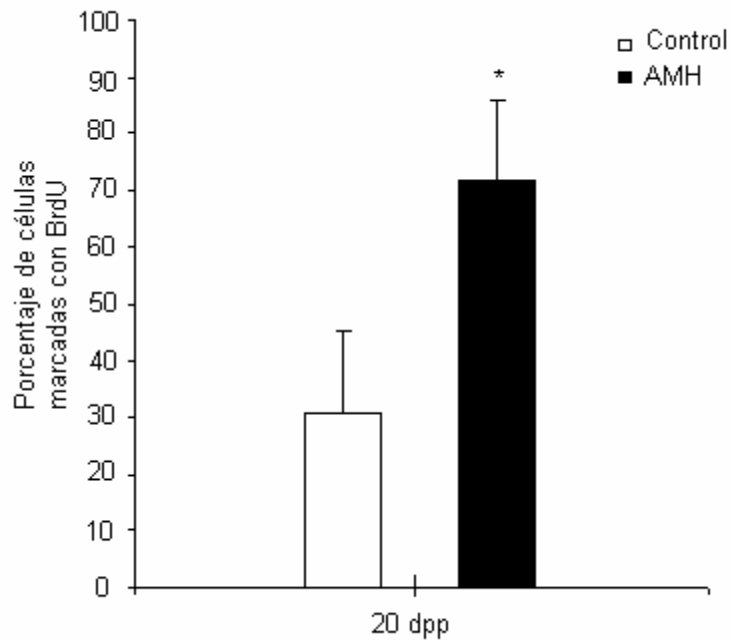


Fig. 20. - Efecto de la AMH sobre la proliferación de las células de la granulosa a la edad de 20 dpp. Las barras muestran la media y el error estándar.

* $p < 0.05$; experimental vs control 20 dpp.

Se muestran en la figura 21 los datos de los ensayos de proliferación celular de la edad de 25 dpp. El porcentaje de proliferación de células de la granulosa en ésta edad es mayor en el grupo tratado con AMH que en el grupo control. Se observó también que con respecto a la edad de 20 dpp el porcentaje de proliferación celular disminuyó. A ésta edad el porcentaje de proliferación fue de 33% en el grupo control y 48% en el grupo experimental. Las diferencias encontradas entre los grupos control y experimental fueron estadísticamente significativas a $p < 0.05$.

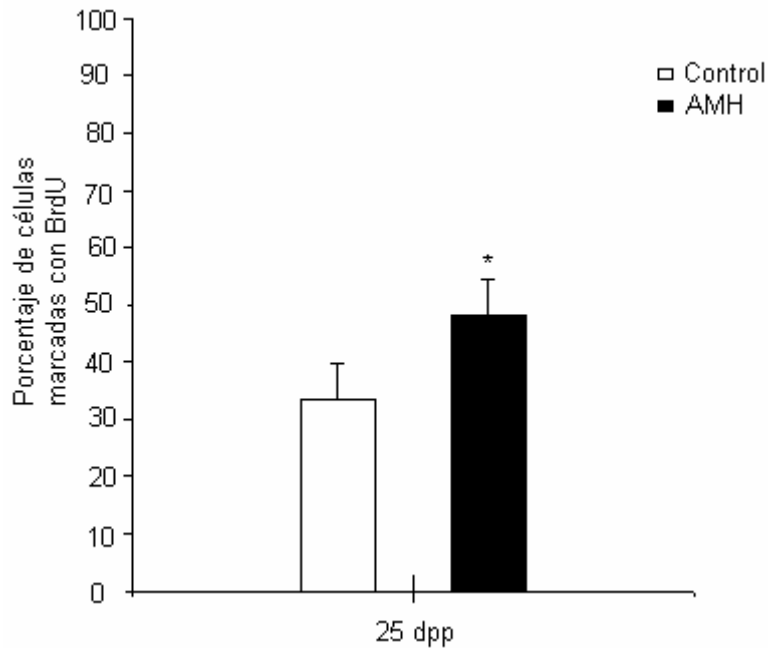


Fig. 21. - Efecto de la AMH sobre la proliferación de las células de la granulosa a la edad de 25 dpp. Las barras muestran la media y el error estándar.

* $p < 0.05$; experimental vs control 25 dpp.

En la figura 22 se muestra el efecto de AMH sobre la proliferación de las células de la granulosa en todas las edades estudiadas. Se puede observar un incremento a lo largo del desarrollo folicular hasta los 20 dpp en los que se detectó el porcentaje de proliferación mayor y después declinó a los 25 dpp. Se observó además, en todas las edades estudiadas, un efecto mayor en el grupo estimulado con AMH con respecto a su grupo control. Las diferencias encontradas entre los grupos control y experimental son significativas a $p < 0.05$. Se evaluaron los datos con una prueba ANOVA a $p < 0.05$, se rechaza la hipótesis nula en la que se plantea que el efecto de los grupos estudiados es igual y se acepta la hipótesis alterna en la que se propone que hay diferencias entre el grupo control con respecto al tratado con AMH.

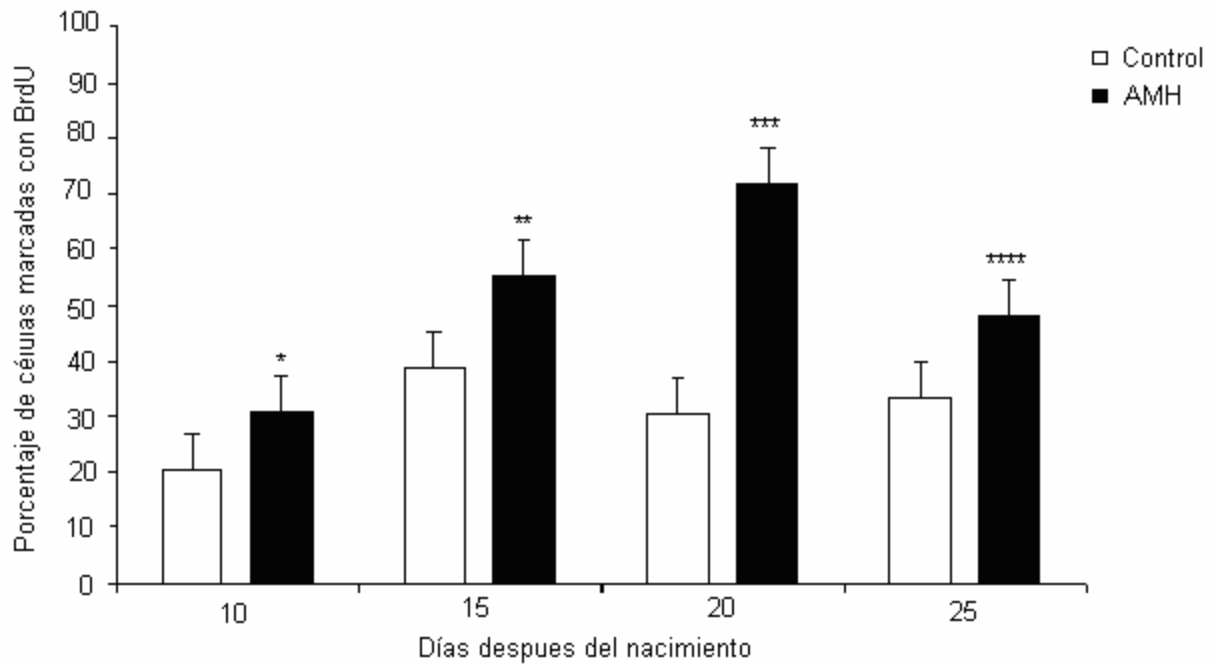


Fig. 18. - Efecto de la AMH sobre la proliferación de las células de la granulosa de ovario infantil y prepuber. Las barras muestran la media y el error estándar. * $p < 0.05$ experimental vs control 10 dpp. ** $p < 0.05$; experimental vs control 15 dpp. *** $p < 0.05$; experimental vs control 20 dpp. **** $p < 0.05$; experimental vs control 25 dpp.

2.- Detección de la enzima 3β -HSD

En las figuras 23 y 24 se muestran los resultados obtenidos en la detección de la enzima 3β -HSD en cada una de las etapas estudiadas de los 10 a los 25 dpp. La actividad de ésta enzima se detectó principalmente en las células de la teca en los folículos ováricos a lo largo del desarrollo folicular y en las células de la granulosa.

La actividad no se detectó en los folículos primarios, sino en los folículos secundarios y maduros formados por más de 3 capas de células (Fig. 23). En el grupo control de todas las edades no se detectó la actividad de la enzima 3β -HSD en las células de la teca ni en las células de la granulosa (Fig. 23 A-D y 24 A-B).

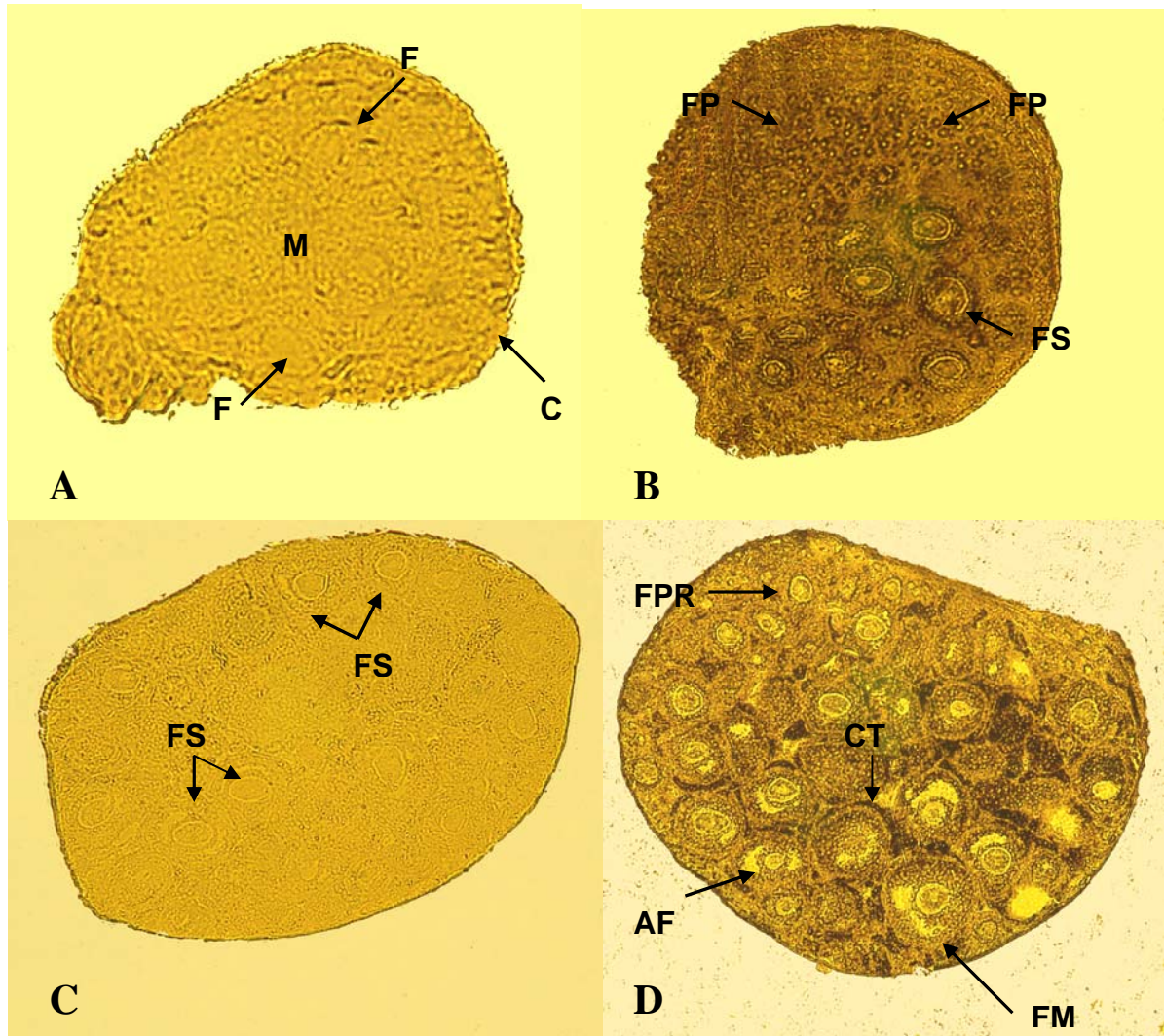


Fig. 23.- **A.** Corte transversal de ovario del grupo control de 10 dpp, note la ausencia de reacción de expresión de la enzima 3β -HSD en los folículos (F). Se observan folículos distribuidos en todo el ovario. Además se muestra la región central del ovario denominada médula (M) y la corteza de éste órgano (C). 10X. **B.** Corte transversal de ovario del grupo experimental de 10 dpp en donde se aprecia la actividad de la enzima en los folículos primarios (FPR) y secundarios (FS) en el ovario. 10X. **C.** Corte transversal del grupo control de 15 dpp, se muestran los folículos secundarios (FS) en la periferia y parte central del ovario. No se detectó la actividad de la enzima 3β -HSD. 10X. **D.** Corte transversal de un ovario del grupo experimental de 15 dpp, se observan los folículos maduros (FM) formados por varias capas de células de la granulosa.

En la mayoría de los folículos se observa el antro folicular (AF). También se aprecian los folículos primarios (FPR). La actividad más fuerte de 3β -HSD se detectó en las células de la teca (CT) de los folículos secundarios y los maduros. 10X.

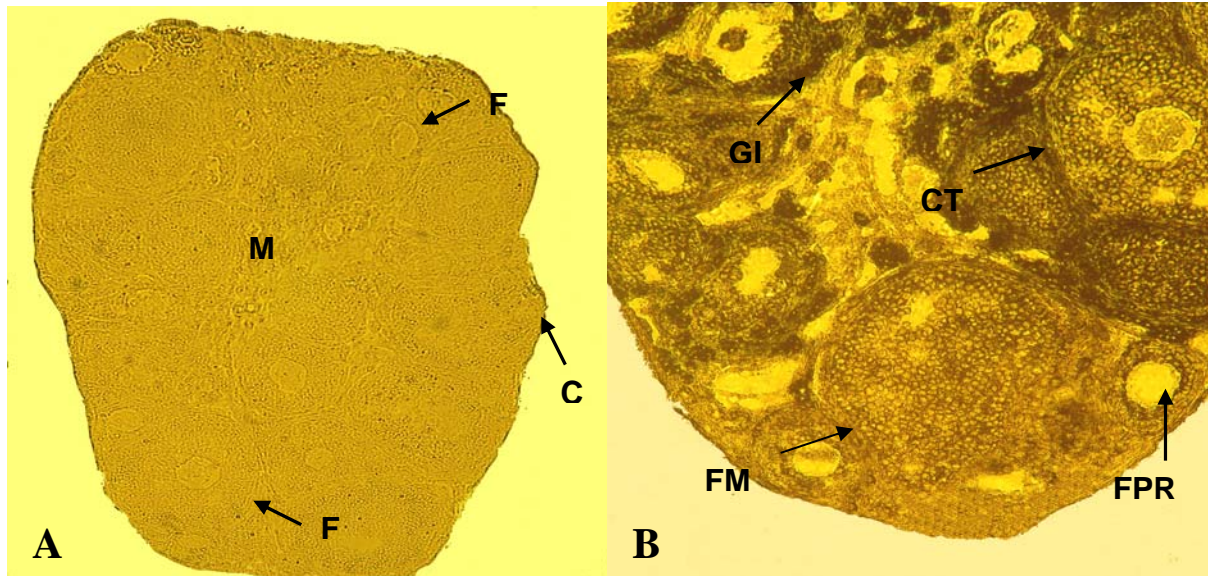


Fig. 24.- **A.** Corte transversal de ovario de 25 dpp del grupo control, no se observó la reacción de la 3β -HSD 10X. **F.** Corte de ovario del grupo experimental de 25 dpp, en donde se muestran folículos maduros (FM) y las células de la teca positivas a la 3β -HSD. Así mismo, se detectó la reacción en la glándula intersticial, la cual se forma por tejido de origen tecal, principalmente en los folículos atrésicos. Algunos folículos primarios también son positivos a la reacción en las células de la granulosa. 20X.

VII.- Discusión

En este trabajo se estudió el efecto de la AMH en la proliferación de las células de la granulosa en las etapas infantil y prepuber del ratón. Este es el primer estudio sobre el papel de la hormona Inhibidora de los conductos de Müller en cultivos de células de la granulosa.

Investigaciones realizadas en la rata mostraron que el mRNA y la proteína de la AMH se expresan en las células de la granulosa de folículos en crecimiento, y su expresión declina en los folículos antrales y atrésicos. Esto sugiere que la AMH tiene una función importante en el ovario infantil en el desarrollo folicular, se demostró que en la rata con el tratamiento de AMH a folículos preantrales, aumentó el crecimiento de éstos (McGee et. al., 2001); lo cual plantea que la AMH tiene un papel importante en el crecimiento folicular. En el ratón *Mus musculus* a lo largo del desarrollo folicular, se encontró que la AMH inicia su expresión en las células de la granulosa a partir de 1dpp (Villalpando y col, 2007, datos sin publicar). Estas investigaciones plantean que este péptido participa en la función ovárica del ratón, sin embargo el papel de la AMH es un tema de controversia en la actualidad. En la literatura el efecto de la AMH se ha realizado en distintas condiciones, en folículos de rata de 12 dpp en cultivo (Mc Gee et. al., 2001) y en cultivos de ovarios de rata de 2 dpp (Durlinger et.al., 2002). Los resultados obtenidos son opuestos, mientras que en el primero se encontró que favorece el crecimiento folicular, en el segundo se encontró que el crecimiento celular es inhibido por efecto de la AMH.

Después del nacimiento, en las hembras comienza a elevarse la concentración sérica de AMH hasta que alcanza una concentración máxima en la pubertad. Esta concentración se mantiene durante la vida fértil y declina en la menopausia (Teixeira y Donahoe, 1996). En la presente investigación se planteó la hipótesis de que la AMH podía en la etapa infantil y prepuber, estimular el crecimiento de las células de la granulosa. Los resultados

obtenidos en ésta investigación apoyan esta hipótesis; debido a que se encontró que la AMH incrementa la proliferación de las células de la granulosa en las edades estudiadas, correspondientes a la etapa infantil y prepuber. Estos resultados se obtuvieron por medio del cultivo de células en presencia del marcador BrdU. La incorporación de este marcador al núcleo celular, indica que las células se encontraban dividiéndose ya que la BrdU es un análogo a timidina que se incorpora al DNA cuando se está duplicando en la mitosis (Gollin et. al., 1985).

En los resultados se observó que el número de células marcadas con BrdU fue mayor en los grupos experimentales de todas las edades estudiadas. Estos datos indican que la AMH es un regulador importante de la proliferación de las células de la granulosa. El hecho de que estas células produzcan la AMH desde el primer día después del nacimiento y regulen la proliferación plantea que esta hormona participa entre otros factores en la regulación del crecimiento folicular en ausencia del control hipofisiario. Los resultados nos muestran que el efecto de AMH sobre la proliferación de las células de la granulosa aumenta conforme a la edad hasta los 20 dpp, lo que era esperado porque el desarrollo folicular requiere que conforme los folículos crezcan, el número de estas células sea mayor. En estudios realizados en el ovario de la rata se describió que la AMH tiene un papel inhibitorio en el inicio del crecimiento de los folículos primordiales (Durlinger et.al., 2002). Sin embargo nuestros resultados refutan este hallazgo, dado que observamos proliferación en folículos preantrales y antrales. Las diferencias observadas podrían explicarse por las diferencias específicas que hay entre la rata y el ratón. La función de la AMH parece ser diferente a lo largo del desarrollo folicular, ésta tiene un efecto importante en la maduración de grandes folículos preantrales y pequeños folículos antrales en la fase preovulatoria de la rata (Durlinger et.al., 2002). Los resultados obtenidos en este estudio apoyan esta investigación porque se observó que el máximo

porcentaje de proliferación celular se presenta en la edad de 20 dpp, edad que corresponde a la etapa prepuber, en la que se presenta más elevada la concentración sérica de AMH (Texeira y Donahoe, 1996). Además, es en esta etapa en la que el crecimiento folicular es mayor en el inicio del ciclo estral que en los ratones se presenta alrededor de los 4 meses (Durlinger et.al., 1999).

Detectamos que la proliferación de las células declina en los 25 dpp, edad que corresponde aún a la etapa prepuber y en la que debería presentarse un efecto similar al observado a los 20 dpp. La disminución de la proliferación podría ser explicada a través de la expresión de un inhibidor de la proliferación del ciclo celular, como el gen *Rb* u otros (Mancini et. al., 1994), o a la baja expresión de genes como el gen *Sox9*, que se ha postulado regula directa o indirectamente la expresión de AMH (Watanabe et. al., 2000). Sin embargo faltan aún muchas preguntas por contestar.

Los resultados de este estudio apoyan observaciones realizadas en la rata en los que se evaluó el efecto de la AMH y de la FSH sobre el crecimiento folicular, encontrándose que el tratamiento con AMH aumenta tanto el tamaño de los folículos como el número de células y que esta hormona no induce la apoptosis de las células de la granulosa (Mc Gee et. al., 2001).

En los ovarios de los mamíferos se secretan principalmente dos tipos de esteroides, progestágenos y estrógenos. Estos últimos participan en el crecimiento y diferenciación de los genitales tanto externos como internos, y son responsables de la aparición de los caracteres sexuales secundarios en la pubertad. En las células de la teca interna se encuentran una gran cantidad de receptores para LH, esta hormona es responsable de estimular a las células para la síntesis de andrógenos como precursores de los estrógenos (Ross, 2005). Por lo tanto las células de la teca son las principales productoras de esteroides en el folículo. Nuestros resultados demuestran que la expresión de la enzima 3β -HSD se encuentra en las células de la teca a partir de la formación de los

folículos secundarios o antrales, en las que aparece la teca interna a los 10 a 14 dpp.

Se estudió además la expresión de la enzima 3β -HSD, como un marcador de la etapa en la que comienza a diferenciarse el tejido esteroideogénico. Se encontró que la expresión de ésta enzima se presenta desde etapas iniciales, en la edad de 10 dpp, edad en la que se encontraron principalmente folículos primordiales y primarios, que están formados por células estromales rodeando al ovocito, y que continúa su expresión a lo largo de la etapa infantil y prepuber hasta la edad de 25 dpp. Estos resultados plantean que la diferenciación del tejido esteroideogénico a esta edad ocurre independientemente del control hipofisiario.

El papel de la AMH en la regulación de la esteroideogénesis no es claro hasta el presente. Se ha propuesto que la AMH tiene un efecto negativo en la regulación de la esteroideogénesis en la rata (Houk et. al., 2004), debido a lo cual se esperaría que las células de la granulosa cultivadas con AMH tuvieran una disminución en la producción de 17β estradiol en los grupos tratados con AMH. Sin embargo, en el presente estudio no se cuantificó la concentración de 17β estradiol de los cultivos, este estudio se realizará en trabajos posteriores. En los bovinos la AMH también parece tener un efecto inhibitorio a nivel endocrinológico y morfológico, debido a que los ovarios cultivados con AMH dejan de producir estrógenos lo cual provoca una reversión sexual morfológica caracterizada por la formación de cordones testiculares (Vigier et.al., 1989).

Además, la AMH participa en la regulación de la esteroideogénesis, debido a que regula negativamente la expresión de la enzima StAR transportadora de colesterol dentro de la mitocondria (Houk et. al., 2004). Se espera entonces que en el tratamiento de folículos con AMH se inhiba la esteroideogénesis, esto es debido a que una vez que se transporta el colesterol al interior de la membrana por medio de la enzima StAR, se comienza con la

expresión de las enzimas esteroideogénicas como la 3β -HSD. Como parte de las perspectivas a futuro se plantea determinar la cascada de señales que regulan la proliferación y la producción de estradiol y qué tipo de receptores median ésta función cuando empiezan a expresarse.

VIII.- Conclusiones

- La AMH participa en la regulación de la proliferación de las células de la granulosa *in vitro* a los 10, 15, 20 y 25 dpp, correspondientes a la etapa infantil y prepuber en el ratón *Mus musculus*.
- El efecto regulador de la AMH en la proliferación de las células de la granulosa se incrementa de acuerdo con la edad.
- El tejido productor de hormonas esteroides en el ratón se comienza a diferenciar a los 10 dpp y su expresión aumenta a lo largo de las etapas estudiadas.
- Se acepta la hipótesis de que la AMH tiene un papel importante en la inducción de la proliferación de las células de la granulosa en el ovario del ratón en ausencia del control hipofisiario.

IX.- Bibliografía

- Balla, A., Danilovich, N., Yang, Y., Sairam, M. R.** ,2003, Dynamics of ovarian development in the FORKO immature mouse: Structural and functional implications for ovarian reserve, *Biol. Reprod.*, 69, 1281-1293.
- Bédérracats, G., O'Neill, F. H., Norwitz, E. R., Kaiser, U. B., Teixeira, J.**, 2003, Regulation of gonadotropin gene expression by mülerian inhibiting substance, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 100 (16), 9348-9353.
- Durlinger, A. L. L., Kramer, P. Karels, B, De Jong, F. H., Uilenbroek, J. TH. J., Grootegoed J. A., Themmen A. P. N.** , 1999, Control of primordial follicle recruitment by anti-müllerian hormone in the mouse ovary, *Endocrinology.*, 140 (12), 5789-5796.
- Durlinger, A. L. L., Visser, J. A., Themmen, A. P.**, 2002, Regulation of the ovarian function : The role of anti-müllerian hormone, *Reproduction.*, 127, 601-609.
- Ganong, W.**, 2006, *Fisiología médica*, Editorial El Manual Moderno S.A. de C.V., México D.F., 20ª edición, pág. 339-363.
- Gilbert, S.**, 2005, *Biología del desarrollo*, 7ª Edición, Editorial Médica Panamericana, Buenos Aires, Capítulo 17, pág. 585-597.
- Gollin, S. M., Holmquist, G. P., Ledbetter, D.H.**, Fra(10)(q25): the BrdU effect is substitution-dependent, *Am. J. Hum. Genet.*, 37, 208-214.
- Gurates, B., Sebastián, S., Yang, S., Zhou, J., Tamura, M., Fang, Z., Suzuki, T., Sasano, H., Bulun, S. E.** .2002, WT1 and DAX-1 inhibit aromatase P450 expression in human endometrial and endometriotic stromal cells, *J. Clin. Endocrinol. Metabol.*, 87 (9), 4369-4377.
- Haqq, C., and Donahoe P.**, 1998, Regulation of sexual dimorphism in mammals, *Physiol. Rev.*, 78 (1), 1-33.
- Houk, C. P., Pearson, E. J., Martinelle, N., Donahoe, P. K., Teixeira, J.** , 2004, Feedback inhibition of steroidogenic acute regulatory protein expression in vitro and in vivo by androgens, *Endocrinology*, 145 (3), 1269-1275.
- Josso, N. and di Clemente N.**, 2003, Transduction pathway of anti-Müllerian hormone, a sex-specific member of the TGF- β family, *Trends Endocrinol. Metabol.*, 14, 91-97.
- Lalli, E. ans Sassone-Corsi, P.**, 2003, DAX-1, an unusual orphan receptor at the crossroads of steroidogenic function and sexual differentiation, *Mol. Endocrinol.*, 17 (8), 1445-1453.

- La Marca, A., Malmusi, S., Giulini, L., Fischer, L., Orvieto, R., Levratti, P., Volpe, A.,** 2004, Anti-müllerian hormone plasma levels in spontaneous menstrual cycle and during treatment with FSH to induce ovulation, *Hum. Reprod.*, 19 (12), 2738-2741.
- Langman, Jan,** 2004, *Embriología médica*, 9a Edición, Editorial Interamericana, México, Capítulo 14, pp. 355-383.
- Lee, M. M., and Donahoe, P. K.,** 1993, Mullerian inhibiting substance: A gonadal hormone with multiple functions, *Endocrinol. Rev.*, 14, 152-164.
- Levy, H., Deane, H. W., Rubin, B. L.,** 1959, Visualization of steroid-3 β -ol-dehydrogenase activity in tissues of intact and hypophysectomized rats, *Endocrinology*, 65, 932-943.
- Lowry, J.A. and W.R. Atchley,** 2000, Molecular evolution of the GATA family of transcription factors: Conservation within the DNA-binding domain, *J. Mol. Evol.*, 150 (2), 130-134
- Mancini, M.A., Shan, B., Nickerson, J. A., Penman, S., and Lee W. H.,** 1994, The retinoblastoma gene product is a cell cycle-dependent, nuclear matrix-associated protein, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 91, 418-422.
- Martin, D.I. and S.H. Orkin,** 1990, Transcriptional activation and DNA binding by the erythroid factor GF-1/NF-EI/Eryfl, *Gen. Dev.*, 4 (11), 1886-98.
- McGee, E. A., Smith, R., Spears, N., Nachtigal, M. W., Ingraham, H., Hsveh J. W. A.,** 2001, Müllerian inhibitory substance induces growth of rat preantral ovarian follicles, *Biol. Reprod.*, 64, 293-298.
- Mendenhall, William, and Sncich, Terry,** 1997, *Probabilidad y Estadística para Ingeniería y Ciencias*, 4^a edic., Edit. Prentice Hall, México, pág.. 323-328.
- Merchant,** 1991, El sexo gonadal, *Memorias del Congreso Conmemorativo del Jubileo del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM*, Tomo 1, pág. 451-460.
- Merchant, H. and Chimal, J. ,** 1989, The ontogeny of primordial follicles in the mouse ovary, *Dev. Ultraestruct. Reprod.*, 55-63.
- Metzler, David E.,** 2003, *Biochemistry the chemical reactions of living cells*, Vol 2, 2a edic., Edit. Academic Press, USA, pág.. 1252-1266.
- Rey, R., Lukas-Croisier, C., Lasala, C., Bedecarrás, P.,** 2003, AMH/MIS: what we know already about the gene, the protein and its regulation, *Mol. Cell. Endocrinol.*, 211, 21-31.
- Rey, R. and J.Y. Piccard ,** 1998, Embryology and endocrinology of genital development, *Clin. Endocrinol. Metabol.*, 12 (1), 17-33.
- Richards, J.,** 1980, Maturation of ovarian follicles: actions and interactions of pituitary and ovarian hormones on follicular cell differentiation, *Physiol. Rev.*, 60, 51-89.

Ross, Michael, 2005, Histología texto y atlas a color con biología celular y molecular, 4ª edic., Edit. Médica Panamericana, Buenos Aires, Argentina, pág. 729-744.

Sadler, 2004, Embriología con orientación médica, 9ª edición, Editorial Médica Panamericana, pág. 354-365.

Stryer, Lumbert, 1990, Bioquímica, Tomo 2, 3a edic., Edit. Reverté S.A., Barcelona España, pág. 571-577.

Teixeira, J., Fynn-Thompson, E., Payne, A. H., Donahoe, P. K., 1999, Müllerian inhibiting substance regulates androgen syntesis at the trascriptional level, Endocrinology, 140 (10), 4732-4738.

Teixeira, J., and Donahoe P. K., 1996, Molecular biology of MIS and its receptors, J. Androl., 17 (4), 336-341.

Trbovich, Alexander M., Sluss, P. M., Laurich, M. V., O'Neill, F. H., MacLughlin, D. T., 2000, Müllerian inhibiting substance lowers testosterone in luteinizing hormone-stimulated rodent, Proc. Natl. Acad. Sci., 98 (6), 3393-3397.

Tremblay, J. J., N. M. Robert and R. S. Vigier, 2001, Modulation of endogenous GATA-4 activity reveals its dual contribution to müllerian inhibiting substance gene transcription in Sertoli Cells, Mol. Endocrinol., 15 (9), 1636-50.

Vigier, B., Forest, M. G., Eychenne, B., Bezard, J., Garrigou, O., Robel, P. and Josso, N., 1989, Anti-müllerian hormone produces endocrine sex reversal of fetal ovaries, Proc. Natl. Acad. Sci., 86 (10), 3684-3688.

Visser, J. A. ,2003, AMH signaling: from receptor to target gene, Mol. Cell. Endocrinol., 211, 65-73.

Watanabe, Koji, Clarke, T. R., Lane, A. H., Wang, X., Donahoe, P. ,2000, Endogenous expresión of müllerian inhibiting substance in early postnatal rat sertoli cells requires multiple steroidogenic factor-1 and GATA-4 bindig sites, Proc. Natl. Acad. Sci., 97 (4), 1624-1629.

Yi Hong, Ch., Park, J. H., Seo, H. K., Jin-Man Kim, Young Im, S., Woon L., J., Heng-Sik Choi, Leei , K., 2003, Expresión of MIS in the testis in downregulated by tumor necrosis factor alpha through the negative regulation of SF-1 transactivation by NF-κB, Mol. Cell. Biol., 23 (17), 6000-6012.

X. APÉNDICE

1. Medio D'MEM suplementado

- Albúmina 0.1%
- Bicarbonato de sodio 7.5%
- L-glutamina 200 mM
- Penicilina G-sódica con sulfato de estreptomicina 5 000 U/ μ g/mL
- Piruvato de sodio 11mg/mL
- Amortiguador HEPES 250 mM

2. Solución PBS (1:10)

Para 100 mL

- 10 mL de PBS 10X (Gibco)
- 90 mL Agua bidestilada

3. Glutaraldehído al 0.3% (fijador)

Para 10 mL

- 125 μ L de glutaraldehído al 25% (Merck)
- cbp 10 mL de PBS .

4. Solución bloqueadora de albúmina al 5%

Para 10 mL

- 9870 μ L de PBS
- 0.5 g de Albúmina Sérica Bovina
- 100 μ L de Gelatina