



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**POSGRADO EN CIENCIAS
BIOLÓGICAS**

FACULTAD DE MEDICINA

“PARTICIPACIÓN DE HORMONAS EN LA
PROLIFERACIÓN EN LAS CÉLULAS DEL EPITELIO
SUPERFICIAL DEL OVARIO EMBRIONARIO DE
POLLO”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE
MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
(**BIOLOGÍA EXPERIMENTAL**)

P R E S E N T A

Biol. ALMA ROSA VARELA VEGA

DIRECTORA DE TESIS: DRA. MARÍA DEL CARMEN MÉNDEZ HERRERA.

MÉXICO, D.F.

Marzo, 2010.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

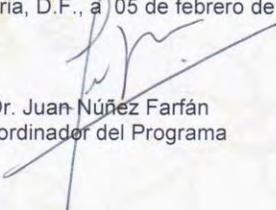
Dr. Isidro Ávila Martínez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 18 de enero de 2010, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)** de la alumna **VARELA VEGA ALMA ROSA** con número de cuenta **90401905** con la tesis titulada **"PARTICIPACIÓN DE HORMONAS EN LA PROLIFERACIÓN EN LAS CÉLULAS DEL EPITELIO SUPERFICIAL DEL OVARIO EMBIONARIO DE POLLO"**, realizada bajo la dirección del DRA. MARIA DEL CARMEN MÉNDEZ HERRERA:

Presidente:	DRA.	TERESA IMELDA FORTOUL VAN DER GOES
Vocal:	DR.	FELIPE DE JESÚS VILCHIS URIBE
Secretario:	DRA.	MARIA DEL CARMEN MÉNDEZ HERRERA
Suplente:	DRA.	NORMA ANGÉLICA MORENO MENDOZA
Suplente:	DR.	ENRIQUE PEDERNEA ASTEGIANO

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 05 de febrero de 2010.


Dr. Juan Núñez Farfán
Coordinador del Programa

AGRADECIMIENTOS

Al Posgrado de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Autónoma de México, por permitirme realizar mis estudios de maestría y obtener el grado de Maestra en Ciencias Biológicas.

El presente trabajo contó con el apoyo de DGAPA clave IN216807 y CONACYT clave 60346 X.

A CONACYT por la beca otorgada a la Biol. Alma Rosa Varela Vega con número de becario 172453 durante la realización de este trabajo de maestría.

A la Dra. María del Carmen Méndez Herrera, por la dirección, asesoría y apoyo para culminar este trabajo de tesis.

Al Dr. Felipe de Jesús Vilchis Uribe, por las valiosas aportaciones hechas durante la realización el trabajo de investigación y la revisión de este trabajo.

A la Dra. Norma Angélica Moreno Mendoza, por el apoyo durante realización de este proyecto y la finalización de esta tesis.

A la Dra. Teresa Imelda Fortoul van der Goes, por la revisión de esta tesis y sus valiosos comentarios.

Al Dr. Enrique Pedernera Astegiano por su apoyo, su asesoría y revisión de este trabajo de investigación.

Al personal del Departamento de Embriología a Susy, Betty, la señora Celia, el señor Alfredo, la señora Guille, gracias por todo su apoyo.

A G R A D E C I M I E N T O S

A mí mamá Emma por tu ejemplo, apoyo y amor.

A mí hermano Alejandro por compartir conmigo esta aventura, llamada vida.

A mis sobrinas Iliana y Fernanda por estar conmigo en los triunfos y fracasos, por su cariño.

A Juan Manuel por todas las PALABRAS, pero ante todo por tu amor.

A Nayelli, por estar en los momentos difíciles y ayudarme a encontrar las soluciones, por tu amistad incondicional.

A Marcela por compartir tus conocimientos, por las asesorías y el apoyo, pero sobretodo por tu amistad.

A Martha por todas tus oraciones, tu magia, tu apoyo y amistad.

A la maestra, Concepción Rugerío, por sus valiosos comentarios y su apoyo para mi formación profesional y personal.

A Patty Rivas por tu apoyo, comentarios valiosos y tu amistad.

*Esta tesis está dedicada a todas las personas,
que me ayudaron a ser posible lo imposible:*

A mi Familia:

Mi mamá, hermanos y sobrinos.

A mis amigas:

Nayelli Nájera, Marcela Ramírez y

Martha Martínez.

A mi par:

Juan Manuel Palacios

Y a tí por tu apoyo

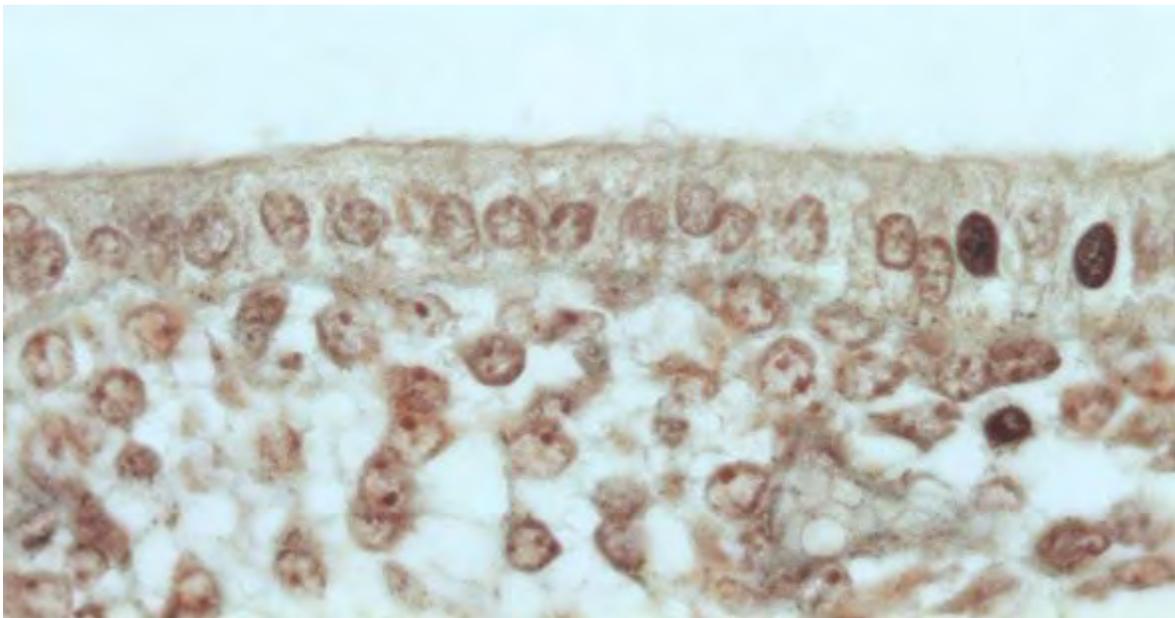
G R A C I A S.



*Para que pueda surgir lo posible,
es preciso intentar una y otra vez lo imposible.*

HERMAN HESSE

**“PARTICIPACIÓN DE HORMONAS EN LA
PROLIFERACIÓN EN LAS CÉLULAS DEL EPITELIO
SUPERFICIAL DEL OVARIO EMBRIONARIO DE
POLLO”**



Í N D I C E

I. R E S U M E N.....	1
I.1 ABSTRACT.....	2
II. I N T R O D U C I Ó N.....	3
II.1 BIOLOGÍA DEL EPITELIO SUPERFICIAL DEL OVARIO.....	4
II.2 HORMONAS GONADOTRÓPICAS.....	6
II.3 HORMONAS ESTEROIDES	8
II.4 FACTORES DE CRECIMIENTO	10
II.5 EPITELIO SUPERFICIAL DEL OVARIO EN POLLO.	12
III. O B J E T I V O S.....	15
IV. H I P Ó T E S I S.....	16
V. M A T E R I A L E S Y M É T O D O S.....	17
VI. R E S U L T A D O S.....	21
VII. D I S C U S I Ó N.....	29
VIII. C O N C L U S I O N E S.....	37
IX. B I B L I O G R A F Í A.....	38

I. R E S U M E N

El epitelio superficial del ovario (OSE, por sus siglas en inglés) se rompe y regenera cada vez que se libera un ovocito; debido a esta constante remodelación el epitelio sufre una intensa actividad proliferante en respuesta al ciclo hormonal y cambios en el ambiente, situación que puede provocar una transformación neoplásica e iniciar el desarrollo del cáncer epitelial ovárico, la principal causa de muerte por cáncer ginecológico a nivel mundial.

La gallina ovula y pone huevos casi diariamente. Se ha reportado que la gallina desarrolla cáncer ovárico de manera espontánea y, por consiguiente puede utilizarse como un modelo que asemeja la historia reproductiva de la mujer.

El objetivo del presente trabajo es evaluar, en un modelo *in vitro* de células aisladas del epitelio superficial del ovario de embrión de pollo de 14 días de incubación (d.i.), el efecto de las hormonas gonadotrópicas y esteroides sobre la proliferación celular así como su interacción con dos factores de crecimiento. Las células aisladas del OSE se cultivaron 48 horas y fueron sometidas durante 12 horas adicionales de cultivo, a diferentes esquemas de tratamiento con: hormona folículo estimulante recombinante humana (FSHr), gonadotropina coriónica humana (hCG), 17 β -estradiol o con progesterona; también se sometieron al tratamiento con la combinación de alguna de las hormonas mencionadas con el factor de crecimiento transformante α (TGF α) o con el factor de crecimiento semejante a la insulina tipo I (IGF-I).

La proliferación celular del OSE se evaluó mediante la cuantificación de la incorporación de bromodeoxiuridina (BrdU) por las células del epitelio superficial. Las células del OSE respondieron al tratamiento con hCG con un incremento en la incorporación de BrdU después de 12 horas de cultivo con esta hormona gonadotrópica, no así con la FSH ni con las hormonas esteroides estudiadas, el 17 β -estradiol y la progesterona.

Al realizar las combinaciones de cada una de las hormonas con el TGF- α , las células epiteliales ováricas no mostraron una diferencia en cuanto a la incorporación de BrdU con respecto a los resultados obtenidos con este factor de crecimiento por sí solo. Las células epiteliales ováricas no mostraron un incremento en su proliferación al ser tratadas con el IGF-I. Finalmente cuando las células fueron cultivadas con la combinación de alguna de las hormonas mencionadas y el IGF-I, se observó que sólo la combinación de FSH y el factor de crecimiento IGF-I aumentó la proliferación celular del OSE.

I.1 A B S T R A C T

The ovarian surface epithelium (OSE) is broken and regenerated each time an egg is released. Because this constant remodeling the epithelium undergoes intense proliferative activity in response to hormonal cycle and changes in the environment; this condition can lead to a neoplastic transformation, and initiate the development of epithelial ovarian cancer, which is the leading cause of gynecological cancer death worldwide.

Hens ovulate and lay chicken eggs almost daily. It has been reported that the hen spontaneously develops ovarian cancer and therefore, this model resembles the reproductive history of women.

The aim of this study is to evaluate in an *in vitro* model of isolated ovarian surface epithelium cells of 14 days of incubation chicken embryos, the effect of gonadotropic and steroid hormones on cell proliferation, and its interaction with two growth factors. The isolated ovarian surface epithelium cells were cultured during 48 hours and after that time were subjected during 12 additional hours of culture, to different schemes of treatment with: recombinant human follicle stimulating hormone (rFSH), human chorionic gonadotropin (hCG), 17 β -estradiol or with progesterone. They were also subjected to the treatment of the combination of one of the above mentioned hormones and the transforming growth factor- α (TGF α) or the insulin-like growth I (IGF-I).

OSE cell proliferation was assessed quantifying the bromo-deoxyuridine (BrdU) incorporated by cells of the superficial epithelium. OSE cells responded to the hCG treatment increasing their incorporation of BrdU after 12 hours of culture with this gonadotropic hormone, but not with FSH or the 17 β -estradiol or progesterone treatment.

When the combinations of one of the mentioned hormones and TGF- α were applied, the epithelial cells showed no difference in regard to their incorporation of BrdU, with respect to the results obtained with the TGF- α by itself. The ovarian surface epithelium cells showed no increase in their proliferation when treated with IGF-I

Finally, when cells were cultured in presence of the combination of one of the hormones mentioned and IGF-I, only the combination of FSH and IGF-I increased the cell proliferation of the OSE.

II. I N T R O D U C I Ó N

El estudio del ovario se concentró en sus funciones endocrinas y reproductoras, por mucho tiempo, en los últimos años el Epitelio Superficial del Ovario (OSE, por sus siglas en inglés) ha cobrado gran importancia. Aunque todos los tipos celulares que conforman el ovario pueden sufrir transformaciones neoplásicas, la gran mayoría de los tumores malignos o benignos ováricos derivan del OSE. Se ha propuesto que en él se originan 90% de los cánceres ováricos (Para una revisión ver: Scully, 1995, Auersperg y col., 2001, Gava, 2008). El cáncer de ovario continúa siendo la patología ginecológica más letal, cerca de 21,397 casos de cáncer ovárico fueron diagnosticados en Estados Unidos y de estos 13,490 murieron en 2009 (American Cancer Society, 2010). En México hay 2012 nuevos casos por año de cáncer de ovario, padecimiento que ocupa el tercer lugar en cuanto a mortalidad por cáncer, por lo que ya se ha considera un problema de salud pública. Este padecimiento se presenta principalmente entre mujeres perimenopáusicas y la distribución más frecuente es entre los 45 y 69 años de edad. (Gallardo, 2008, citado por Herrero, 2008).

Las causas exactas del cáncer de ovarios se desconocen. Se produce por una acumulación de alteraciones genéticas que provoca un crecimiento y proliferación incontrolado de las células epiteliales. No obstante, algunos factores pueden aumentar la probabilidad de desarrollar un cáncer de ovarios, entre ellos están los antecedentes familiares: las parientes de primer grado (madre, hija, hermana) de una mujer que ha tenido cáncer de ovario tienen un mayor riesgo. La edad también es importante, ya que el riesgo de padecer cáncer de ovarios aumenta a medida que la mujer envejece, la mayoría de los tipos de cáncer ováricos ocurren después de la menopausia. La mitad de estos cánceres se encuentran en mujeres mayores de 63 años de edad. Otro factor para desarrollar cáncer ovárico son condiciones elevadas de gonadotropinas, como es el caso de las mujeres peri y postmenopausicas, así como en mujeres que han recibido tratamientos para inducir la ovulación (American Cancer Society, 2009). Además, las mujeres que nunca han tenido hijos tienen más probabilidades de desarrollar cáncer de ovarios que las que han sido madres (Fatalla, 1971). En cambio, el

riesgo disminuye en las que han tomado anticonceptivos orales, han amamantado ó han tomado terapias de reemplazo de estrógenos, los cuales están asociados a niveles bajos de gonadotropinas y reducen la exposición del OSE a gonadotropinas (Bose, 2005).

Las gonadotropinas parecen estar asociadas con la transformación maligna y la progresión del cáncer ovárico, por lo que se ha postulado la Teoría del "exceso de gonadotropinas" por la cual hay un incremento de la estimulación epitelial provocando un aumento en la proliferación y diferenciación con riesgo de que en un momento exista una transformación maligna por asociación con agentes carcinogénicos. Desde el desarrollo embrionario, durante los ciclos reproductivos de la mujer y la menopausia el OSE está sujeto a la influencia de hormonas y factores de crecimiento, en respuesta a estos estímulos el OSE lleva a cabo procesos de regeneración del tejido epitelial del ovario por medio de la proliferación celular (Para una revisión ver: Risch, 1998; Clow y col., 2002).

II.1 Biología del Epitelio Superficial del Ovario.

El epitelio superficial del ovario, anteriormente llamado epitelio germinativo o mesotelio ovárico, está compuesto de una sola capa de células, que forman un epitelio cúbico simple, el cual recubre la superficie del ovario y se continúa con el mesotelio de la cavidad peritoneal.

El OSE proviene del epitelio celómico. En el feto humano su desarrollo comienza en la décima semana y continúa hasta el quinto mes de gestación, prolifera rápidamente y se invagina para formar los cordones sexuales. En diferentes especies de mamíferos se advierte una lámina basal común entre el epitelio superficial y los cordones sexuales, lo que sugiere que las células del epitelio superficial contribuyen a la formación de los cordones sexuales (Motta y Makabe, 1982; Juengel y col., 2002; Sawyer y col., 2002). Durante la foliculogénesis de bovinos y ovinos se observa una notable proliferación de las células del OSE, se propone que aporta elementos celulares para el empaquetamiento de los ovocitos, formando los folículos primarios (Juengel y col.; 2002; Sawyer y col., 2002).

En el ovario adulto el OSE es un epitelio que expresa queratinas, proteínas típicas de las células epiteliales (7, 8, 18 y 19); el contacto intercelular y la integridad de las células del epitelio son mantenidos por medio de especializaciones de la membrana lateral, del tipo desmosomas y uniones estrechas. Asimismo, participan en esas funciones familias de proteínas transmembranales, como las integrinas y otras como las caderinas. La N-caderina es expresada en el OSE normal así como en algunas neoplasias, mientras que la expresión de la E-caderina es rara, pero se incrementa en los tumores neoplásicos y benignos (Para una revisión ver Auersperg y col., 2001; Löffler y col., 2000).

El OSE juega un papel importante en la fisiología ovárica normal. Durante cada ciclo reproductor, el epitelio superficial del ovario toma parte en el ciclo ovulatorio, se rompe y repara; sufre apoptosis en el momento de ovulación. El OSE se ha demostrado que produce enzimas proteolíticas, que se piensa que degrada la túnica albugínea y la teca folicular subyacente, debilitando la superficie ovárica provocando la ruptura. Después de la ovulación, la proliferación de las células del OSE reparan la superficie rota y reconstituye un mesotelio intacto. Existen evidencias que en el sitio de la ruptura ovulatoria el OSE se expone a citocinas inflamatorias u otros factores producidos durante la ruptura folicular que aumenta la probabilidad del daño de ADN. Así la actividad mitogénica de las células del OSE en el proceso reparador puede favorecer la supervivencia de OSE con mutaciones acumuladas, que llevan a la transformación de sus células a cáncer ovárico (Para una revisión ver: Wong y Leung, 2007).

El tamaño del ovario varía con la edad, disminuye conforme el aparato folicular decae por atresia, aumentando la irregularidad del contorno del ovario. El epitelio superficial forma invaginaciones y quistes de inclusión en la corteza ovárica. Se cree que los quistes de inclusión se forman a partir de fragmentos de epitelio superficial ovárico, los cuales son atrapados dentro o cerca de la ruptura del folículo. También podrían ser desarrollados a partir de adhesiones del tejido epitelial superficial posterior a la ovulación en combinación con la proliferación del estroma. Los quistes de inclusión son más numerosos en ovarios de multíparas con respecto a los de mujeres nulíparas, quienes ovulan con más frecuencia. Los quistes son particularmente numerosos en mujeres con ovarios poliquísticos (Para una

revisión, ver: Scully, 1995; Auersperg y col., 2001). Se ha propuesto que los ciclos de ovulación conducen a las células del epitelio superficial del ovario a una exposición a largo plazo de un ambiente rico en estrógenos, el cual promueve la proliferación celular, la formación de quistes y la posibilidad de una transformación maligna de éstos (Para una revisión ver: Risch, 1998). Estudios epidemiológicos sugieren que la ovulación incesante es un factor de riesgo en el desarrollo de cánceres en epitelio ovárico, por el incremento de la actividad mitótica requerida para la reparación de la superficie después de cada ovulación (Fathalla, 1971). Se ha observado que se reduce significativamente el riesgo de cánceres ováricos de origen epitelial con el incremento en el número de embarazos, partos, con el uso de anticonceptivos orales y con la duración del periodo de lactancia (Schildkraut y col., 2002). Se ha observado que mujeres que han sido expuestas a niveles altos de gonadotropinas durante la menopausia o por tratamientos hormonales desarrollan cánceres ováricos. Además los estrógenos tomados durante la postmenopausia como terapia de remplazo hormonal son también propuestos como factor de riesgo para el desarrollo del cáncer ovárico. El ovario es una fuente rica de múltiples hormonas, factores del crecimiento y citocinas, que están a menudo en una concentración más alta que los encontrados en el suero, estos factores son candidatos fuertes para regular el OSE.

II.2 Hormonas Gonadotrópicas.

El control de la función ovárica es llevado a cabo por las hormonas gonadotrópicas hipofisiarias, que incluyen a la Hormona Luteinizante (LH), la Hormona Folículo Estimulante (FSH), la prolactina y la Gonadotropina Coriónica humana (hCG). Las gonadotropinas son hormonas proteínicas producidas por la glándula pituitaria en la mujer y el hombre. En la mujer, la FSH promueve la maduración de los folículos ováricos y los óvulos que ellos contienen. Las células que forran cada folículo producen estrógeno, que a su vez fomentan el crecimiento del revestimiento uterino (endometrio), para así crear un ambiente favorable para la implantación del embrión. La LH se secreta en pequeñas cantidades en forma pulsátil hasta la ovulación, cuando se libera una gran cantidad. Concentraciones bajas de LH ayudan a promover y sustentar el desarrollo del cuerpo lúteo

que se ha formado del folículo, después de la ovulación. La hCG tiene como objetivo mantener la funcionalidad del cuerpo lúteo como ente endócrino en la secreción de progesterona durante el primer trimestre de embarazo (Richards y col., 2002).

Las gonadotropinas actúan a través de receptores de membrana, que pertenecen a la familia de receptores acoplados a proteínas que se unen a nucleótidos de guanina, llamadas proteínas G. Los receptores acoplados a proteína G se caracterizan por tener una región extracelular amino-terminal muy extensa, una porción con 7 dominios transmembranales, y una región intracelular carboxilo-terminal (Johnson y Dhanasekaran, 1989). Cuando la LH/CG (gonadotropina coriónica) y la FSH se unen a su receptor específico se activa la proteína G estimuladora, que tiene como consecuencia la activación de la adenilato ciclasa. Es bien conocido que las células de la granulosa y teca en los folículos en desarrollo y el cuerpo lúteo expresan los receptores tanto de FSH y LH/hCG, mientras que la presencia de estos receptores en el OSE y en las células de carcinomas ováricos ha sido controversial, esto debido a la dificultad en obtener suficiente tejido del OSE para su análisis, así como el cultivo celular del OSE humano. Sin embargo, Zheng y colaboradores (1996) fueron los primeros en reportar la expresión del RNA mensajero del receptor a FSH (FHSR) en OSE humano y la trompas de Falopio utilizando hibridación *in situ*. Después, Kuroda y colaboradores (1997, citado por Konishi, 2006) reportaron que en células del OSE humano *in vivo* la expresión de la proteína para el receptor para LH/hCG (LH/hCGR), usando inmunohistoquímica y en cultivos primarios de células del OSE la expresión del RNAm para LH/hCGR. A partir de estos hechos, se detectó la presencia tanto del FSHR como LH/hCGR en cultivos de células de OSE normales e inmortalizadas, por medio de la expresión del RNAm y su proteína, esto fue confirmado por varios investigadores (Syed y col., 2001, Choi y col., 2002). Todos estos hallazgos indican que en las células normales del OSE se expresa tanto el FSHR y LH/hCGR y que son sensibles a gonadotropinas.

En 2001, Kuroda y colaboradores reportaron que utilizando hCG en cultivos primarios de células del OSE se estimuló la proliferación celular de estas células de una manera dosis-dependiente e inhibió la apoptosis en las células del OSE bajo condiciones libres de suero, en relación a la regulación a la alta del factor de crecimiento semejante a la insulina tipo I.

Syed y colaboradores (2001) también reportaron el crecimiento de las células del OSE provocado por el efecto tanto de la FSH, así como el de la LH. Aunque hay un reporte afirmando que la FSH muestra un efecto supresor y la LH no tiene un efecto significativo sobre la proliferación celular del OSE (Ivarsson y col., 2001a); en reportes subsecuentes se observó un efecto sobre estimulación de la proliferación celular de la FSH y hCG en células de OSE normales e inmortalizadas (Choi y col., 2002, Tashiro y col., 2003). Resultados similares de la acción de las gonadotropinas sobre las células del OSE fueron obtenidos en conejo (Osterholzer y col., 1985), ratón (Davies y col., 1999), rata (Stewart y col., 2004), vaca (Parrot y col., 2001) y embriones de pollo (Méndez y col., 2003), pero no en el OSE del macaco *Rhesus* (Wright y col., 2002).

Así, el conocimiento acerca de la acción de las gonadotropinas sobre las células del OSE *in vitro* que se ha ido gradualmente acumulando, indicando que cada gonadotropina tiene un efecto específico sobre las células del OSE, aunque aún hay resultados controversiales. Sin embargo, la función fisiológica de las gonadotropinas en la biología de las células del OSE *in vivo* aún se desconoce, se especula que la FSH y la LH pueden estar involucradas en la reparación del OSE después de la ovulación. (Para una revisión consultar: Konishi, 2006).

II.3 Hormonas esteroides

Las hormonas esteroides femeninas producidas en el ovario fundamentalmente son el estradiol y la progesterona, aunque también se producen en pequeñas cantidades estrona, androstendiona, testosterona, 17 α -hidroxiprogesterona y varias hormonas no esteroideas, como la inhibina, la relaxina y algunos factores locales. El más importante y potente de los estrógenos secretados por el ovario es el 17 β -estradiol.

Las hormonas esteroides regulan la expresión génica y el ciclo celular, por lo que son fundamentales en el desarrollo del ovario. La FSH induce la síntesis de estrógenos a partir de los andrógenos producidos en las células de la teca interna bajo el estímulo de la LH, por lo que conforme el folículo madura, se produce una cantidad cada vez mayor de estrógenos (Yen y Jaffe, 1999). Los estrógenos promueven el crecimiento ovárico, reducen la atresia folicular e incrementan la respuesta ovárica a FSH.

La expresión del RNAm y la proteína para los receptores de estrógeno, progesterona y andrógeno, se han encontrado en el OSE humano y en células de cáncer ovárico (Lau y col., 1999; Li y col., 2003). Los efectos del estrógeno son mediados por dos tipos de receptores, el receptor a estrógeno alfa ($RE\alpha$) y el receptor a estrógenos beta ($RE\beta$). En el cáncer ovárico, varios estudios han mostrado la expresión disminuida de RNAm del $RE\beta$ y su proteína (o un incremento en la proporción de $RE\alpha$: $RE\beta$) al compararse con ovarios normales, esto sugiere una expresión diferencial de los $RE\alpha$ y $RE\beta$ en el OSE normal y el neoplásico. Así, se supone que la expresión diferencial de $RE\alpha$ y $RE\beta$ en tumores ováricos pudiera constituir un paso crucial en carcinogénesis ovárica (Para una revisión ver: Wong y Leung, 2007). En algunos modelos experimentales se ha observado que el 17β -estradiol no parece tener un efecto mitogénico sobre las células del epitelio superficial ovárico (Wright y col., 2002), pero en cultivos celulares de OSE de conejo, Bai y colaboradores (2000) muestran que estimulan la proliferación celular de manera dependiente con la expresión del receptor alfa. El estrógeno es el mayor regulador de crecimiento y diferenciación en ovarios normales. A pesar de los abundantes estudios acerca del crecimiento inducido por estrógeno, poco se conoce sobre la potencia reguladora del estrógeno sobre los genes del tejido ovárico. Algunos genes que han mostrado que pueden ser regulados por estrógeno son: el *c-myc*, el receptor de progesterona, el receptor de GnRH, las proteínas transportadoras el factor de crecimiento similar a la insulina, y el factor 1 derivado de las células estromales. (Para una revisión ver: Wong y Leung, 2007).

La progesterona es otra hormona esteroide secretada por el cuerpo lúteo del ovario, durante el ciclo menstrual normal. Esta hormona es responsable de los cambios cíclicos en la morfología celular de cuello uterino y la vagina, así como los que se presentan en el endometrio, necesarios para la implantación y crecimiento inicial del embrión. Durante la fase folicular, la progesterona es secretada en cantidades mínimas y permanece baja durante el periodo pre-ovulatorio. Horas después de la iniciación del pico de LH, y a medida que los estrógenos declinan, la concentración de progesterona aumenta lentamente, en forma coincidente con la formación del cuerpo lúteo. Las células de la granulosa del cuerpo lúteo continúan produciendo cantidades crecientes de progesterona, alcanzando el máximo a mitad de la fase lútea (Norman y Litwack, 1997).

El receptor de la progesterona (RP) existe en dos isoformas, RP-A y RP-B. Una reducción marcada de la expresión de RP-A fue observada en especímenes ováricos del carcinoma y en variedades de células de cáncer en comparación con las células de OSE normal, mientras que los niveles de la expresión de RP-B seguían estando sin un cambio relativo. Los dos subtipos de RP son regulados de forma diferenciada por el estrógeno (Lau y col., 1999, Starczewski y col., 2008). La causa de la pérdida de la expresión del RP es desconocida, pero al parecer el estrógeno puede ser uno de los mecanismos de esta regulación a la baja (Syed y col., 2005). La progesterona se le ha propuesto un papel protector en contra del desarrollo de cánceres ováricos (Ivarsson y col., 2001b). Al parecer la progesterona inhibe la proliferación celular, esto sugiere que la elevación en la exposición de progestágenos puede proteger contra la tumorigénesis (Wright y col., 2002; para una revisión ver: Ho, 2003).

Varios estudios *in vitro* proporcionan evidencias del papel proapoptótico de la progesterona en OSE y en cultivos de células ováricas de cáncer, estos demuestran que progesterona induce apoptosis, utilizando una vía extrínseca de apoptosis que implica la señal de Fas/FasL y la activación de caspasa-8, más bien sería una vía intrínseca relacionada con la vía de la caspasa-9 mitocondrial (Para una revisión ver: Leung y Choi, 2007). La progesterona se ha reportado también que inhibe la proliferación de las células del OSE mediada por estrógenos. Los efectos inhibitorios propuestos de la progesterona están conforme a la actividad proliferante a la baja de las células de OSE durante el embarazo (Para una revisión ver: Wong y Leung, 2007).

II.4 Factores de Crecimiento

Los factores de crecimiento son sustancias de naturaleza polipeptídica y solubles, que regulan el crecimiento, diferenciación y fenotipo de numerosos tipos de células. Las células ováricas secretan algunos factores de crecimiento como los factores de crecimiento de tipo insulina 1 y 2 (IGF-1, IGF-2), también llamados somatomedinas, son proteínas con propiedades semejantes a la insulina y a la vez promotoras del crecimiento. Las somatomedinas, tanto plasmáticas como ováricas, circulan unidas a proteínas transportadoras

(Tresguerres y Castillo, 2005). Se han descrito dos tipos de receptores que su estructura se conforma por un tetrámero, formado por dos subunidades α y dos subunidades β unidas por puentes disulfuro; el receptor tipo I, que interacciona fundamentalmente con el IGF-1 y más débilmente con la insulina, y el tipo II, que tiene más afinidad por el IGF-2 y una afinidad muy débil por la insulina (Para una revisión ver: Vincent y Feldman, 2002).

El IGF-1 es un mediador de la progresión, desarrollo y sobrevivencia de tejidos, de gran importancia tanto en el desarrollo embrionario como en el crecimiento postnatal. Es esencial en el proceso de señalización para la iniciación del ciclo celular (Para una revisión ver: Allan y col., 2001). El IGF-I se produce en casi todos los tejidos pero principalmente en el hígado; su producción y secreción en este órgano es regulada por la hormona del crecimiento. Los niveles de IGF-1 ovárico se relacionan con los niveles de GH circulante, de la que son dependientes y, a pesar de que la concentración de IGF-1 en el líquido folicular excede la encontrada en el suero, existe controversia sobre el lugar en que se sintetiza y su control (Tresguerres y Castillo, 2005). La biodisponibilidad del IGF depende de las proteínas transportadoras específicas (IGFBP) que regulan los efectos de IGF, ya que pueden impedir la unión del receptor con el factor de crecimiento (Hooghe-Peters y Hooghe, 1995).

Se ha observado en cultivos celulares de OSE normal que el IGF-I estimula la sobrevivencia celular y el metabolismo e interactúa con la gonadotropina coriónica humana (hCG) inhibiendo la apoptosis del OSE vía IGF-I (Kuroda y col., 2001).

Otro factor de crecimiento que se encuentra en el ovario es el factor de crecimiento epidérmico (EGF), que presenta homologías con el factor de crecimiento transformante alfa (TGF- α) pudiendo este último reaccionar con el receptor del primero siendo sus acciones en ocasiones casi idénticas. El ovario es uno de los órganos capaces de sintetizar EGF, habiéndose determinado la presencia de actividad EGF en el líquido folicular y en cultivos de células tecales. El EGF inhibe algunas acciones de la FSH, tanto la inducción de receptores para LH como la síntesis de estrógenos, y también disminuye la secreción de inhibina. Por el contrario, parece incrementar el número de receptores de FSH en estas

mismas células. Sobre las células de la teca, el EGF inhibe la respuesta androgénica al estímulo con LH. (Tresguerres y Castillo, 2005)

Con todo, la acción más notable del EGF reside en su poder mitogénico, puesto de manifiesto a nivel de la granulosa.

El TGF- α presenta importantes analogías con el EGF, tanto en lo que respecta a su secuencia de aminoácidos como a su capacidad de unión al receptor. Se ha podido comprobar que el TGF- α tiene mayor efecto angiogénico, y se ha postulado que esta acción puede tener importancia en la neoformación masiva de vasos que tiene lugar en el cuerpo lúteo.

Las células del OSE normal secretan factores de crecimiento que pueden participar en la reparación de las rupturas de este generadas por la ovulación. Uno de los factores que pueden colaborar en esta acción es el factor de crecimiento transformante α (TGF α), que es un polipéptido de 5.6 kDa, estructuralmente homólogo con el factor de crecimiento epidérmico (EGF). El TGF α se expresa durante el desarrollo embrionario y en numerosos tejidos adultos participa como un regulador del crecimiento y desarrollo (Para una revisión en Kumar y col., 1995). Se sugiere que puede actuar de una forma autocrina regulando la proliferación celular del epitelio superficial. Este factor de crecimiento se une al receptor del EGF (EGFR) con gran afinidad, el cual se expresa en las células del OSE (Doraiswamy y col., 2000). El TGF α aumenta sus propios transcritos y éstos son reducidos por el factor de crecimiento β (Jindal y col., 1995).

II.5 Epitelio Superficial del Ovario en pollo.

Los pocos casos de cáncer ovárico ocurren espontáneamente en algunas especies, distinta a la humana, con una excepción: la gallina doméstica. Ha sido demostrado por varios investigadores que el pollo desarrolla cáncer ovárico espontáneamente (Campbell, 1951, MacLachlan, 1987, Fredrickson, 1987). La gallina es un ovulador persistente y pone casi diariamente huevos, y por consiguiente este modelo se asemeja a la historia reproductiva de las mujeres, que a menudo tienen 10–20 años de ovulaciones mensuales antes de 1 o 2 embarazos seguida, por 10–20 años de ovulaciones antes de la menopausia. Fredrickson (1987) dirigió un estudio por 3.5 años, en el que él evaluó la incidencia de neoplasia del

tracto reproductor en gallinas de la raza *white leghorn* en un rango de 2 a 7 años de edad. Él encontró que 24% de todas las gallinas desarrollaron adenocarcinoma ovárico maligno dependiente de la edad. Fredrickson (1987) evaluó el origen de los tumores ováricos en la gallina tanto en el epitelio superficial, como en las células de la teca. El origen epitelial de los tumores ováricos fue apoyado por la falta de actividad esteroidogénica perceptible y la falta de similitud ultraestructural entre los tumores epiteliales y los tumores de las células tecales. Aunque él no observó ningún crecimiento de las células de capa de epitelial en la corteza del ovario, Fredrickson (1987) informó que había una similitud moderada de la ultraestructura entre el epitelio superficial y las células del adenocarcinoma ovárico. Además, el fenotipo maligno de las células del adenocarcinoma fue consistente con el de las células de epiteliales.

Más recientemente, Rodriguez-Burford y colaboradores (2001) validaron la ocurrencia de cáncer ovárico en la gallina demostrando que los tumores ováricos frecuentemente eran inmunopositivos para un panel de anticuerpos que caracterizan a los tumores ováricos humanos. Además, Barnes y colaboradores (2002) mostró que la incidencia de cáncer ovárico en gallinas pudiera ser manipulada por hormonas. Estos autores informaron que el tratamiento de gallinas con progestina (acetato del medroxiprogesterona) disminuyó la incidencia de tumores en las gallinas de 4 años. Además, Murdoch y colaboradores (2005) han mostrado que las células del epitelio, cerca del estigma, muestran evidencias de daño oxidante del ADN.

Aunque hay abundantes investigaciones en células de OSE humanas y en líneas celulares de tumores ováricos, y existe un interés significativo en la gallina como un modelo animal de estudio del cáncer de ovario, no se ha desarrollado un modelo como tal.

En estudios *in vivo* realizados en embriones de pollo de 14 días de incubación (d.i.) expuestos a FSH, se observó que la proliferación celular del epitelio superficial del ovario se incrementa por efecto de esta hormona, mostrando un aumento en su índice mitótico (Méndez y col., 2003). En el embrión de pollo de 14 d.i., el ovario está organizado en compartimentos celulares bien definidos que permiten distinguir el epitelio superficial, la corteza y la médula. El epitelio superficial es de tipo cúbico simple y cubre la superficie

ovárica; en algunas zonas se aprecian ligeras depresiones de éste hacia la corteza, dándole una apariencia plegada. Entre el epitelio y la corteza se encuentra una membrana basal. Durante la foliculogénesis es notable la proliferación de las células del epitelio superficial, ya que éstas aportan elementos celulares para el empaquetamiento de los ovocitos (Callebaut, 1976).

En embriones de pollo hembras se detecta FSH plasmática a los 8 d.i., y se observa un incremento de esta hormona el día 10 (Rombauts y col., 1993), mientras que la progesterona y 17β -estradiol son detectados en el plasma en el día 7.5 (Weniger y col., 1991). Estas hormonas podrían jugar un papel importante en la embriogénesis del ovario y dentro de este en la proliferación del epitelio superficial, ya sea actuando de forma directa sobre las poblaciones celulares del ovario o tal vez por medio de la acción de uno o varios de los factores de crecimiento, como el factor de crecimiento semejante a la insulina tipo I, que ha sido detectado entre el día 9.5-10.5 d. i. (Scanes y col., 1997).

Por lo anterior se propone caracterizar los cultivos de células de OSE, que son la fuente probable de los tumores de ovario de la gallina, utilizando embriones de pollo de 14 d.i. La capacidad de aislar y cultivar las células del epitelio superficial nos proporcionarán una herramienta para examinar las alteraciones neoplásicas involucrados en la carcinogénesis de ovario con relación al efecto de algunas hormonas y factores de crecimiento, estudiando el ovario fetal nos permitirá entender la ontogenia de este órgano. La espontánea aparición de cáncer de ovario en la gallina puede estar relacionada con la etiología del cáncer ovárico en humanos, siendo este un modelo viable para su estudio.

III. O B J E T I V O S

OBJETIVO GENERAL

Estudiar en un modelo *in vitro* el efecto proliferante de hormonas gonadotrópicas y hormonas esteroideas en el epitelio superficial del ovario del embrión de pollo y su interacción con factores de crecimiento.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

1. Caracterizar a las células del epitelio superficial del ovario del embrión de pollo de 14 días de incubación en un modelo *in vitro*.
2. Valorar el efecto proliferante de la hormona folículo estimulante y la gonadotropina coriónica humana en las células del epitelio superficial.
3. Evaluar el tratamiento con 17β -estradiol y la progesterona sobre las células del epitelio superficial del ovario.
4. Cuantificar el efecto proliferante del factor de crecimiento semejante a la insulina I y el factor de crecimiento transformante α , sobre las células del epitelio del epitelio superficial.
5. Evaluar el tratamiento combinado de factores de crecimiento, gonadotropinas y hormonas esteroideas sobre la proliferación de las células del epitelio superficial.

IV. H I P Ó T E S I S.

Si durante el desarrollo embrionario la proliferación celular del epitelio superficial del ovario, está regulada por hormonas gonadotrópicas y esteroides que interactúan con factores de crecimiento, entonces el tratamiento con estas hormonas y/o factores de crecimiento, producirán cambios en la proliferación celular del OSE en este modelo *in vitro*.

V. MATERIALES Y MÉTODOS

Animales

Los embriones de pollo se obtuvieron de huevos fértiles de gallina raza White Leghorn, BabCock B-300 adquiridos en ALPES, S. A., (Aves Libres de Patógenos Específicos, Tehuacán, Puebla). Los huevos se colocaron en una incubadora Jamesway a 37.8 °C con circulación de aire forzado y un 80% de humedad relativa. A los 14 d.i. se seleccionaron los embriones y se determinó su estadio de desarrollo de acuerdo con las tablas de Hamburger y Hamilton.

Metodología

1. Cultivo de células del epitelio superficial del ovario.

Se aislaron células del epitelio superficial del ovario izquierdo de embriones de pollo de 14 d.i., las células epiteliales fueron disociadas del ovario con una solución de Tripsina-Versene [0.01% Tripsina (Gibco); 0.1 mM EDTA en solución libre de Ca^{++} y Mg^{++}]. Para lo cual los ovarios se incubaron 6 minutos (min) a 37 ° C en un baño con agitación de 90 ciclos/min. Disociadas las células epiteliales del ovario, se agregó inhibidor de tripsina para detener la acción de la enzima. Las células del OSE disociadas se centrifugaron a 200xg durante 10 min. El botón celular se resuspendió en 400µl de una mezcla de medio 199 (Sigma) y medio MCDB105 (1:1) (Sigma). Las células fueron contadas en un hemocitómetro para evaluar su viabilidad con azul tripano. Se sembraron 15×10^4 células del OSE en cajas de 36 mm (Nunc) con 2.5 mL del medio 199 y MCDB 105 (1:1), suplementado con penicilina-estreptomicina-glutamina (100U/mL; 100µg/mL; 2.92 mg/mL) y de suero bovino fetal 10%. Los cultivos primarios fueron incubados a 37° C con CO_2 al 5% durante 48 h.

2. *Inmunocitoquímica.*

La identificación de células de la estirpe epitelial se efectuó mediante la inmunodetección de citoqueratinas en las células del OSE, obtenidas por disgregación enzimática. Con ellas se hicieron extendidos celulares sobre portaobjetos recubiertos con poli-L-lisina. Posteriormente, en los extendidos se realizó la inmunodetección de queratinas utilizando el anticuerpo monoclonal Pan Cytokeratin (ScyTeck), este anticuerpo reconoce a las queratinas 5, 6, 8 y 18. Como segundo anticuerpo se utilizó IgG + IgM anti-mouse (ScyTek).

Con la técnica de disociación que se describe al inicio de la metodología para obtener una fracción enriquecida en células del epitelio superficial, el 80% de las células aisladas fueron positivas a citoqueratinas.

3. *Tratamiento hormonal y factores de crecimiento.*

Las células del epitelio superficial aisladas e identificadas fueron cultivadas durante 48 h, cuando se detectó una confluencia de entre un 30 y un 40%, se procedió a realizar los diferentes tratamientos. Se eliminó el medio de cultivo suplementado con 10% de suero bovino fetal en el que había permanecido. Se agregó una mezcla de medio 199 y MCDB 105 (1:1) suplementado con penicilina-estreptomicina-glutamina (100U/mL; 100µg/mL; 2.92mg/mL) y de suero bovino fetal 1% libre de esteroides. Posteriormente, se les aplicaron diferentes tratamientos hormonales y con factores de crecimiento a los cultivos, quedando conformados los siguientes grupos experimentales:

		FSHr	hCG	17β-estradiol	Progesterona
		0.25 UI/mL	0.25 UI/mL	10 ⁻⁷ M/mL	10 ⁻⁷ M/mL
TGF-α	10 ng/mL 5 ng/mL	0.25UI/10 ng/mL	0.25UI/10 ng/mL	10 ⁻⁷ M /5 ng/mL	10 ⁻⁷ M /5 ng/mL
IGF-I	10 ng/mL 5 ng/mL	0.25UI/10 ng/mL	0.25UI/10 ng/mL	10 ⁻⁷ M /5 ng/mL	10 ⁻⁷ M /5 ng/mL

En cada caso, se obtuvo su respectivo grupo control, el cual no recibió ninguna hormona, ni factor de crecimiento.

Se incubaron las células epiteliales con los tratamientos previamente descritos durante 12 h, y posteriormente se llevó a cabo la valoración de la proliferación celular mediante la incorporación de BrdU.

4. *Evaluación de la proliferación.*

La proliferación celular del OSE se evaluó mediante la cuantificación de células epiteliales que incorporaron BrdU a su núcleo. Se sabe que la BrdU identifica a las células que se encuentran en etapa de síntesis del ciclo celular.

Se realizó la evaluación de la proliferación celular al término del tratamiento hormonal y/o factores de crecimiento, las células cultivadas del OSE fueron incubadas con una mezcla de medio 199 (Sigma) y medio MCDB105 (Sigma) (1:1) que contenía BrdU (10 μ mol/L) durante 45 min. Pasado ese tiempo de incubación, las células se recuperaron de las cajas de cultivo, utilizando una solución de Tripsina-Versene [0.05% Tripsina (Gibco); 0.1 mM EDTA en solución libre de Ca⁺⁺ y Mg⁺⁺]. Las cajas fueron incubadas por 6 min más a 37° C. Una vez separadas las células

epiteliales de las cajas de cultivo se agregó inhibidor de tripsina para detener la reacción. Se centrifugó la suspensión celular a 200 xg por 10 min. El botón celular se resuspendió en 1 mL de PBS el que se centrifugó de nuevo en las mismas condiciones, para después tirar el sobrenadante y realizar extendidos celulares sobre portaobjetos recubiertos con poli-L-lisina. Se utilizó el anticuerpo monoclonal anti-BrdU, revelado con un anticuerpo secundario una IgG-anti-mouse-fluoresceínado (Roche). Con microscopía de fluorescencia se realizó el conteo de células positivas (doble ciego, 200 células por frotis). Se cuantificó el porcentaje de células positivas en cada cultivo por duplicado considerando la media para el cultivo como el valor independiente.

5. Análisis Estadístico

El porcentaje de células positivas a BrdU obtenido para las células epiteliales, fue sometido a un análisis de varianza seguido de la prueba de Duncan, con el programa SAS (Statistical Analysis System).

VI. R E S U L T A D O S

En el ovario del embrión de pollo de 14 días de incubación (d.i.), se presenta una capa de células epiteliales cúbicas que cubren el ovario en su superficie, estas células conforman el epitelio superficial como se muestra en la figura 1A. En el ovario del embriones de pollos de 14 d.i. se detectó una tinción positiva en el citoplasma de las células del epitelio superficial del ovario, después de la incubación con un anticuerpo monoclonal a citoqueratina (marcador de las células epiteliales; figura 1B), así como en el interior de la corteza se observan células positivas a citoqueratina, alrededor de unas espacios de tamaño variable llamados espacios lacunares, rodeados por un epitelio de células perilacunares. Las células del OSE antes de ser cultivadas fueron examinadas para detectar la expresión de citoqueratina, para comprobar su procedencia del epitelio superficial del ovario, en donde por medio de un extendido celular se detectó que el 80% de las células aisladas fueron positivas a citoqueratina, como se muestra en la figura 1C.

Para evaluar el efecto de las hormonas gonadotrópicas y estrogénicas, además de los factores de crecimiento IGF-I y TGF- α se establecieron cultivos celulares del OSE. Las células del epitelio superficial aisladas e identificadas fueron cultivadas durante 48 h, cuando se detectó una confluencia de entre un 30% y un 40%, se procedió a realizar los diferentes tratamientos hormonales y/o factores de crecimiento. El efecto proliferante se evaluó por medio del porcentaje de incorporación de bromodeoxiuridina. En la Tabla 1 se muestran los resultados obtenidos, expresados en porcentaje de células del OSE que incorporaron BrdU, después de los tratamientos con hormonas gonadotropicas (FSHr y hCG), con las hormonas esteroides (17 β -estradiol y progesterona), así como los factores de crecimiento (IGF-I y TGF- α) y las combinaciones de hormonas con los factores de crecimiento.

En la gráfica 1 se observa el comportamiento de las células del OSE de embriones de pollo, expuestas a la acción de las hormonas gonadotrópicas (FSHr y hCG) y esteroides (17 β -estradiol y progesterona). Se aprecia que la hCG fue la única que por sí solo incrementó significativamente

la proliferación del tipo celular estudiado. Con el tratamiento con 17β -estradiol las células del OSE muestran una respuesta proliferante igual a la presentada en el grupo testigo.

En presencia de hormona FSHr y progesterona se observaron cifras más altas de proliferación celular, sin alcanzar un significado estadístico.

La respuesta proliferante del OSE, se estimuló por el factor de crecimiento TGF- α , como se advierte en la gráfica 2, el máximo incremento en la incorporación de BrdU de las células del OSE se obtuvo al aplicar este factor. El uso del IGF-I sólo produjo un aumento de las células epiteliales, el cual no fue estadísticamente significativo. Al aplicar una combinación de ambos factores de crecimiento, TGF- α e IGF-I, también se observa un incremento de la proliferación celular con significado estadístico; este incremento no alcanza los valores de proliferación observados en la presencia del TGF- α solo.

En la gráfica 3 se señala que con el tratamiento de FSHr en presencia de TGF- α el incremento de las células que incorporaron BrdU fue casi igual que la presentada por el TGF- α sólo.

El incremento observado en las combinaciones de TGF- α con las otras tres hormonas empleadas en el presente estudio, presentaron una diferencia estadísticamente significativa con respecto al grupo testigo. Aunque este aumento en la incorporación de BrdU no muestra una diferencia con respecto a los resultados obtenidos con el TGF- α *per se*.

La gráfica 4 muestra la combinación de IGF-I con las hormonas gonadotrópicas y esteroides. Se puede observar que la FSHr con este factor de crecimiento incrementaron la proliferación celular en el OSE, no así la hCG, el 17β -estradiol y la progesterona que también fueron evaluadas. El estímulo que se obtiene con el tratamiento con hCG se pierde cuando este se combina con el IGF-I (Tabla 1).

Los resultados obtenidos muestran que se aisló, cultivó y se caracterizó a las células de OSE de gallina de 14 d.i. Se observó que en las condiciones *in vitro* estudiadas, las células del epitelio superficial presenta un aumento en la incorporación de BrdU con el tratamiento de hCG y la combinación de FSHr con IGF-I, lo que indica que bajo estas condiciones las células del OSE en cultivo incrementan su proliferación.

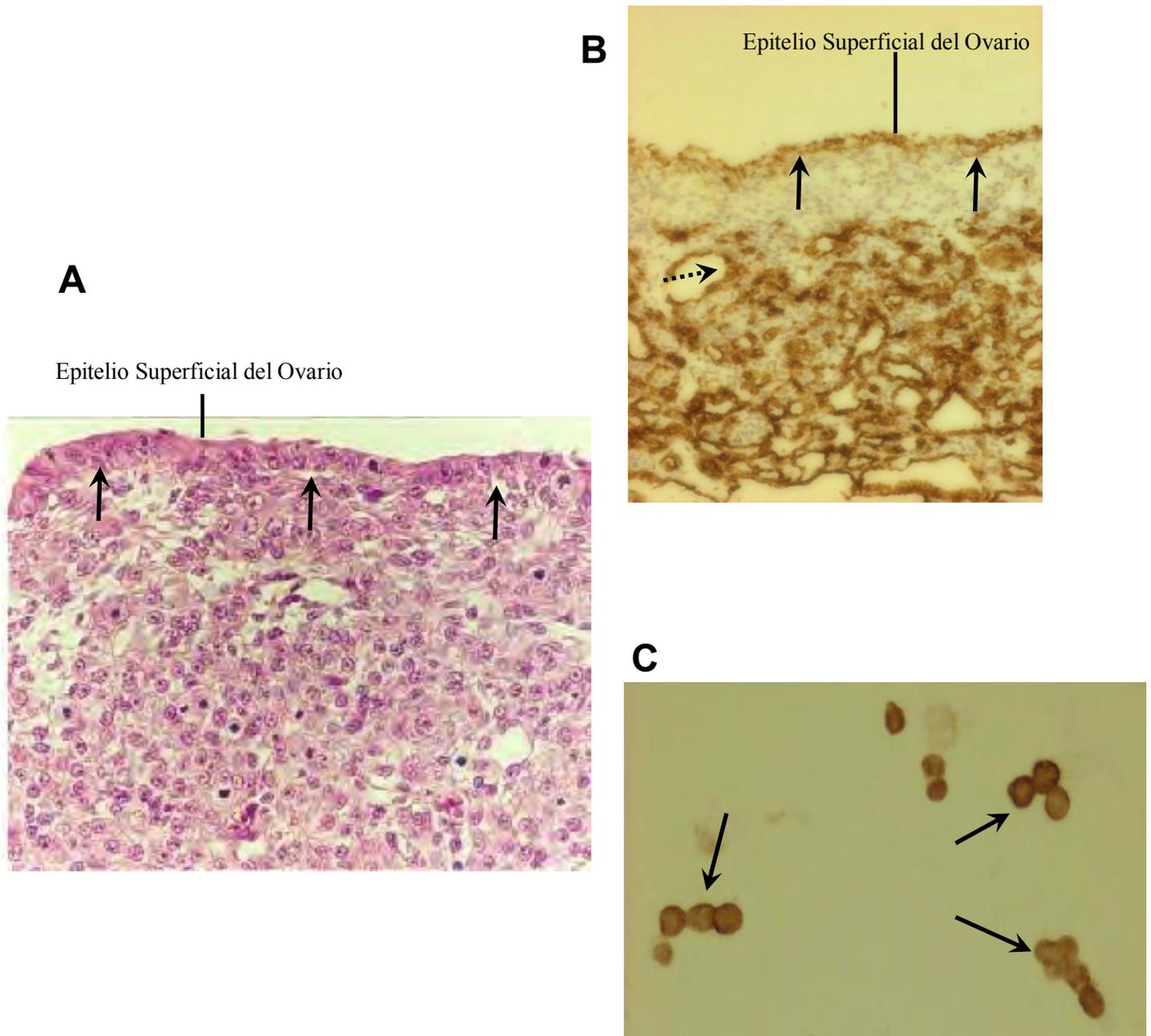


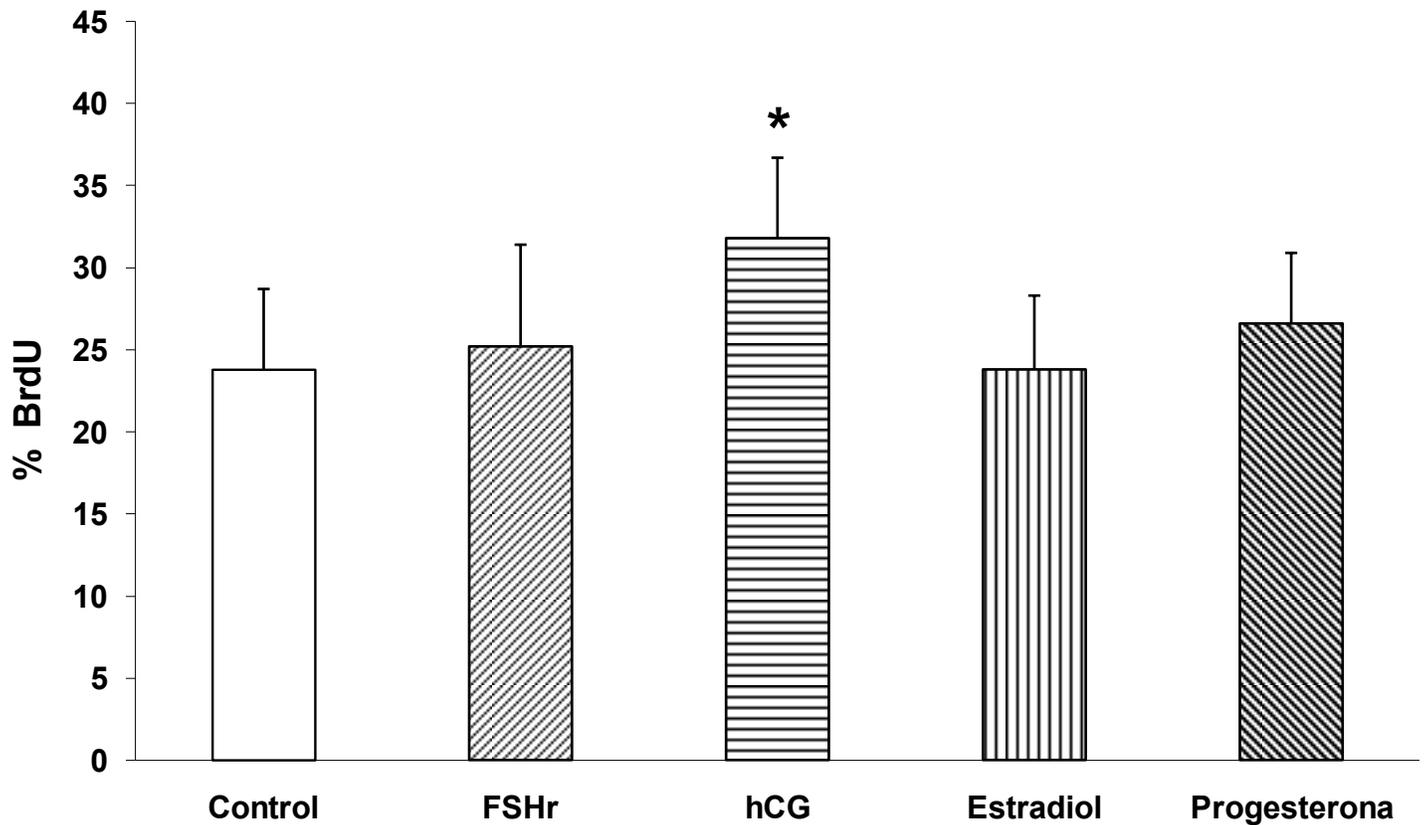
Figura 1. A) Fotomicrografía de un corte de ovario de embrión de pollo de 14 d.i., teñido con hematoxilina y eosina (H & E). Se muestra el epitelio superficial del ovario (400x). B) Detección mediante inmunohistoquímica de citoqueratina en el OSE (↗) y células epiteliales perilacunares (↘) (400x). C) Extendido de células del OSE aisladas para cultivo, donde se marcan células positivas a citoqueratina (↗) (400x).

Tabla 1. Porcentaje de incorporación de BrdU en células del OSE embrionario de pollo de 14 d.i.

<i>Células del epitelio superficial.</i>					
Tratamiento	n	% de BrdU	Tratamiento	n	% de BrdU
Control	42	23.8 ± 4.9	FSHr + TGF-α	6	35.9 ± 1.9 *
FSHr	9	25.2 ± 6.2	FSHr + IGF-I	8	31.2 ± 2.4 *
hCG	6	31.8 ± 4.9 *	hCG + TGF-α	7	34.5 ± 7.9 *
Estradiol	9	23.8 ± 4.5	hCG + IGF-I	6	27.3 ± 5.9
Progesterona	10	26.6 ± 4.3	E2 + TGF-α	6	31.9 ± 3.2 *
TGF-α	36	35.8 ± 5.7 *	E2 + IGF-I	8	24.8 ± 5
IGF-I	27	28 ± 5.9	P4 + TGF-α	11	34.9 ± 6.4 *
TGF-α+IGF-I	7	31.2 ± 5.2*	P4 + IGF-I	6	24.4 ± 1.8

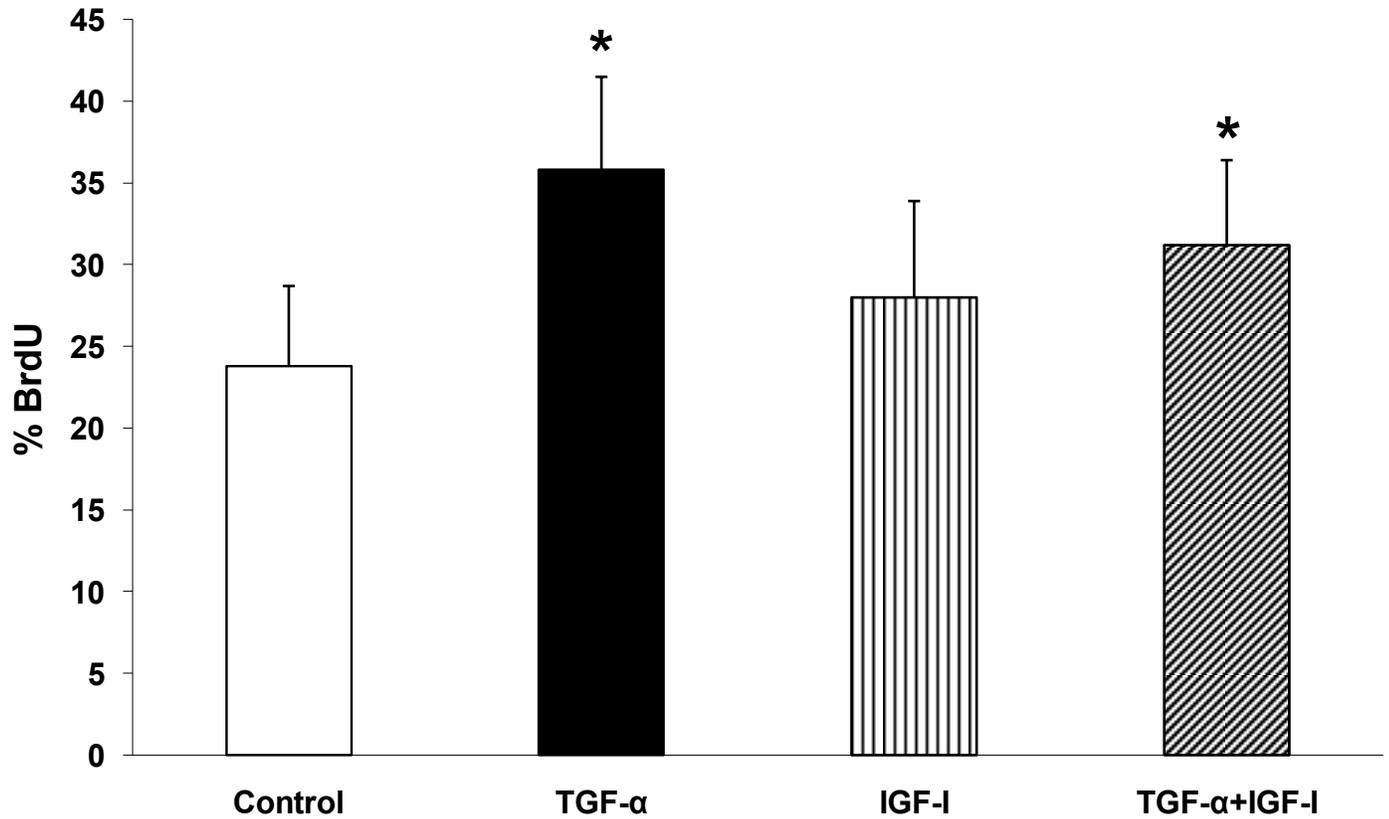
* $p < 0.05$ % con la prueba de Duncan. Se reporta el porcentaje de BrdU de cada tratamiento como la media \pm d.e.

Efecto del tratamiento hormonal sobre la proliferación OSE en cultivo evaluado por la incorporación de BrdU

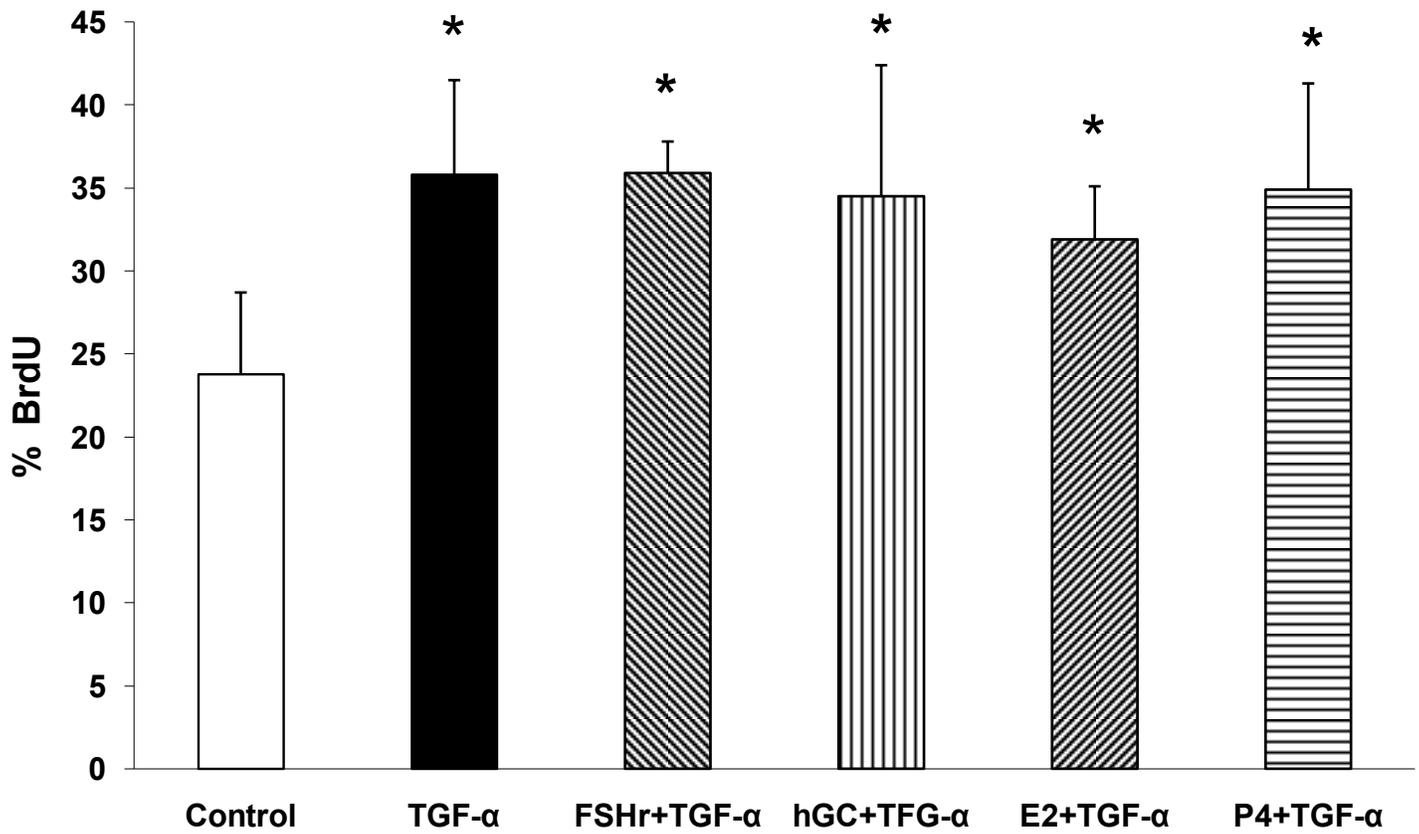


Gráfica 1. Las células del OSE al recibir el tratamiento hormonal presentaron un incremento en la proliferación al ser expuestas a hCG. * $p < 0.05$ vs control.

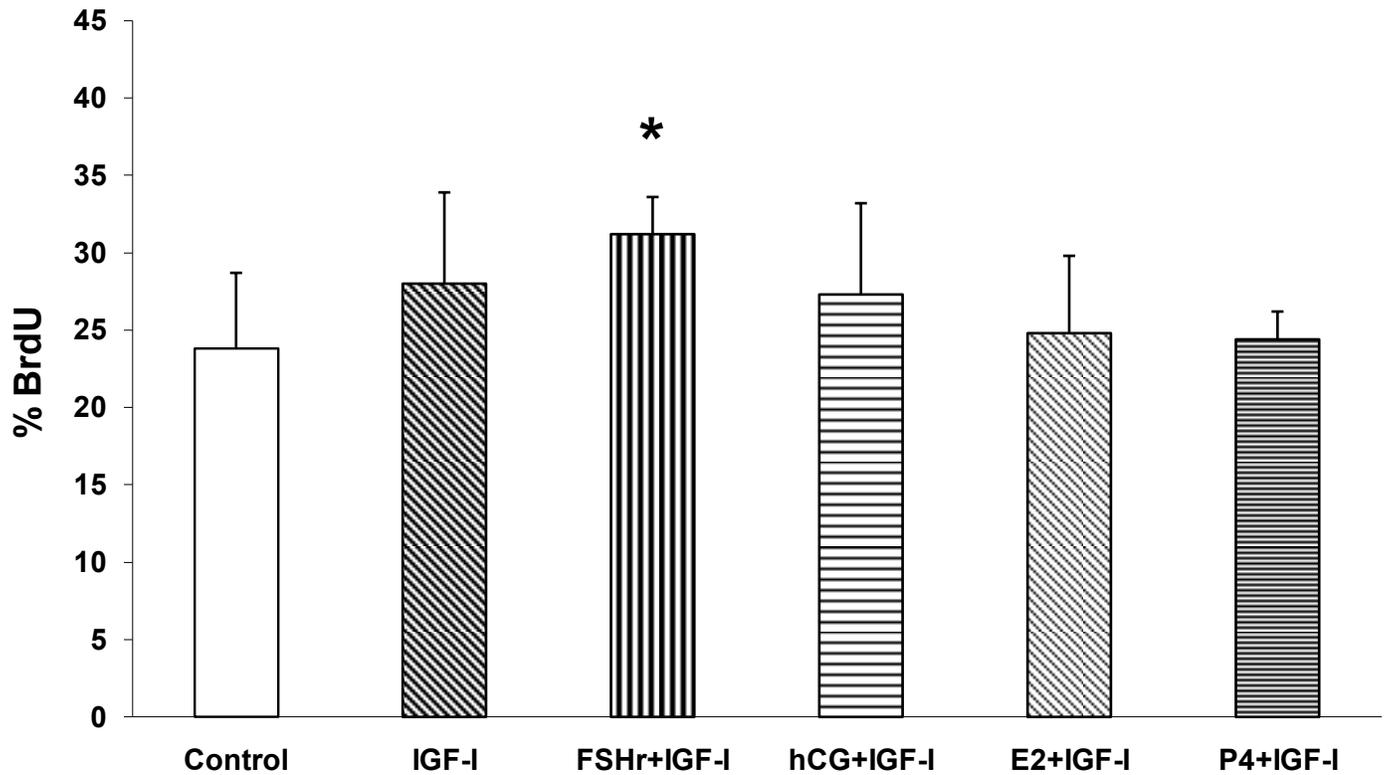
Efecto del tratamiento con factores de crecimiento sobre la proliferación celular del OSE en cultivo evaluado por incorporación de BrdU



Gráfica 2. Las células del OSE tratadas con los factores de crecimiento presentaron un aumento en la incorporación de BrdU al recibir el tratamiento con TGF- α , al igual que la combinación de ambos factores. * $p < 0.05$ vs control.

Efecto del tratamiento hormonal y TGF-alfa sobre la proliferación celular del OSE evaluado por incorporación de BrdU

Gráfica 3. Las células del OSE presentaron un incremento en su proliferación cuando recibieron tratamiento con el factor de crecimiento TGF- α combinado con las hormonas gonadotropicas y esteroides. * $p < 0.05$ vs control.

Efecto del tratamiento hormonal e IGF-I sobre la proliferación celular del OSE en cultivo evaluado por incorporación de BrdU

Gráfica 4. Las células del epitelio superficial ovárico presentaron un incremento en la incorporación de BrdU en la combinación del IGF-I y FSHr, no así en las combinaciones con las otras hormonas. * $p < 0.05$ vs control.

VII. D I S C U S I Ó N

Similar al humano, la gallina desarrolla de forma espontánea cáncer de ovario con una incidencia relacionada con la edad (Fredrickson, 1987), pocos casos de cáncer epitelial ovárico se han documentado en cualquier otra especie además de la humana y el pollo (MacLachlan, 1987). Aunque las células del OSE han sido aisladas y cultivadas de una gran variedad de especies (Para una revisión ver Auersperg y col., 2001), se conoce poco acerca del aislamiento epitelial de los ovarios normales o neoplásicos de aves. La identificación y caracterización de los cultivos de células de OSE de la gallina es crítico, ya que estas células son la probable fuente del cáncer de ovario.

En este trabajo de investigación se busco en primer lugar, evaluar el marcador histológico para células epiteliales en secciones de ovario del embriones de pollo de 14 d.i., para determinar la identidad del OSE. Similar a las células epiteliales ováricas humana (Para una revisión ver Auersperg y col., 2001), la gallina tiene una única capa de células epiteliales cúbicas simples que cubren la superficie del ovario. Estas células de la superficie demostraron un patrón de tinción citoplásmica a citoqueratina, indicativo de las células epiteliales, como se muestra en la figura 1B.

En segundo lugar, se evaluó la proliferación celular inducida por la FSHr, la hCG, el 17β -estradiol y la progesterona, así como los factores de crecimiento TGF- α y el IGF-I sobre las células del epitelio superficial del ovario del embrión de pollo de 14 d.i., por medio de cultivos celulares en dónde se observo la incorporación de BrdU como indicador de la crecimiento celular.

La proliferación celular depende de la regulación de la interacción célula-célula, así como de la interacción con la matriz extracelular y de señales ambientales de los factores de crecimiento, de tal forma que se mantengan el número de células y su organización espacial (Ahmed y col., 2007).

En las condiciones experimentales a las que fueron sometidas las células del OSE, este respondió al tratamiento con hCG con un aumento en la incorporación de BrdU después de

12 h de cultivo con la hormona, no así en los cultivos celulares en donde se aplicaron los tratamientos con FSHr, hCG, 17 β -estradiol y progesterona. Se incrementó la proliferación celular del OSE en cultivo cuando se realizaron las combinaciones con las hormonas gonadotrópicas y TGF- α , así como con la combinación de hormonas esteroides y TGF- α , pero este aumento en la incorporación de BrdU no excede el efecto de los resultados obtenidos con el TGF- α por sí solo. En el tratamiento con IGF-I las células no mostraron un incremento en su proliferación por efecto de este factor de crecimiento. Finalmente cuando las células fueron cultivadas con la combinación del IGF-I y las hormonas gonadotrópicas y esteroides, se observó que la combinación de FSHr e IGF-I aumentó la proliferación celular del OSE en cultivo.

Estudios tanto *in vivo* como *in vitro* reportan datos variables con respecto a la proliferación celular del epitelio superficial del ovario. En algunos modelos experimentales se observa que la FSH induce *in vivo* la síntesis de DNA en las células del OSE de ratón durante la embriogénesis y la etapa postnatal temprana (Davies y col., 1999). También se ha evaluado el efecto de esta gonadotropina en ratas de 6 de semanas de edad, en las que se advirtió un incremento en la proliferación celular del epitelio superficial del ovario como resultado de la administración de esta hormona (Stewart y col., 2004). En embriones de pollo tratados *in vivo* con FSHr a los 14 d.i., se encontró que la proliferación celular del OSE aumenta por efecto de esta hormona mostrando un incremento en su índice mitótico (Méndez y col., 2003); mientras que en estudios *in vitro* se ha observado que las gonadotropinas no tienen un efecto proliferante (Ivarsson y col., 2001a; Wright y col., 2002). En nuestro modelo experimental encontramos que las células del epitelio superficial de embriones de pollo cultivadas con la hormona foliculo estimulante no incrementaron la incorporación de BrdU, estos resultados coinciden con los encontrados en cultivos celulares de OSE de macaco en donde se observó que la FSH no induce una respuesta proliferante sobre estas células (Wright y col., 2002), aunque en cultivos celulares de conejo y humano en donde se administró FSH se vio que esta hormona aumentó la proliferación celular del OSE (Osterholzer y col., 1985; Choi y col., 2002). Estos datos que se tienen acerca de la participación de la FSH en la proliferación del epitelio superficial ovárico aparentemente

son contradictorios, una posible explicación es que la respuesta directa a esta gonadotropina por el OSE pueda ser especie específica, o bien que los receptores a la gonadotropina sean expresados de forma transitoria cambiando en distintas condiciones fisiológicas y experimentales. Se ha detectado la expresión del receptor de la FSH en las células del epitelio superficial de humanos por hibridación *in situ* (Zheng y col., 1996), así como células derivadas de cánceres ováricos por RT-PCR (Syed y col.; 2001; Choi y col., 2002), en el ovario de bovino tanto *in vivo* como *in vitro* también se reporta la existencia del receptor a FSH (Parrot y col., 2001), por lo que permite suponer que el efecto sobre el OSE de la hormona puede ser mediado por su receptor. La discrepancia de los resultados obtenidos en los diferentes estudios en las células del OSE, puede deberse a una diferencia de fenotipos aún en el mismo ovario, ya que el epitelio puede ser cuboidal o plano. La expresión de los receptores puede variar de especie a especie (Edmondson y col. 2006)

La combinación de FSHr y de IGF-I parece ser más eficaz que por sí solos en la proliferación de las células del epitelio superficial del ovario en cultivo, ya que se observa un incremento en la incorporación de BrdU, comparado con los resultados obtenidos con los tratamientos por separado de FSHr e IGF-I. Esto sugiere que los efectos de la FSH y de IGF-I podrían estar mediados por la activación de la vía de la cinasa dependiente del fosfatidilinositol-3 (PI3-K), lo que provoca una cascada de transducción de señales que pueden derivar en la proliferación celular del epitelio superficial, o tal vez incrementar el número de receptores para la hormona como ocurre en las células de la granulosa.

Se ha comprobado que la estimulación de células de la granulosa en presencia de IGF-I y de FSH activa varias vías de señalización, al parecer la FSH activa tanto la cinasa A, así como la vía PI3-K en las células de la granulosa, que conduce a la fosforilación de la cinasa B (PKB) (Gonzalez-Robayna, 2000) teniendo como consecuencia una interacción positiva entre el IGF-I y la FSH en la maduración meiótica, esta sinergia aumenta la síntesis de ADN, la síntesis de proteínas y la esteroidogénesis. Las acciones de IGF-I en las células diana están mediadas por el receptor de tipo I, que provoca la activación de PI3-K, que conduce a la activación de la proteína cinasa B, regulando a la baja el PI3-K en las células blanco. En algunos trabajos se ha demostrado que PKB es expresada constitutivamente,

pero rápidamente fosforilada, en las células de la granulosa por la exposición a la FSH o IGF-I. El IGF-I a través de la vía del PI3-K fosforila la PKB en las células de la granulosa (Westfall y col., 2000; Johnson y col., 2001). La FSH actúa a través de la vía del PI3-K y fosforila a la PKB de una forma similar a la inducida por el IGF-I, amplificando la fosforilación producida por el IGF-I y la activación de PKB. Se reportó que estos efectos sinérgicos son causados principalmente por el aumento de los receptores de IGF-I en células de la granulosa causados por la FSH. La expresión del IGF-I en el ovario sirve para optimizar la respuesta de células de la granulosa a FSH al aumentar la expresión del receptor para la FSH (Sun y col., 2003).

En nuestras condiciones experimentales obtuvimos como resultado que la gonadotropina coriónica humana incrementa la síntesis de DNA en las células del epitelio superficial de embriones de pollo de 14 d.i. Syed y col. (2001) reportaron que la LH incrementa el crecimiento de las células del OSE humano, lo que coincide con nuestros resultados. En cultivos celulares de conejo se observa el mismo efecto proliferante por acción de esta hormona sobre las células del OSE (Osterholzer y col., 1985). Esta estimulación podría ser a través de la elevación de diversos factores de crecimiento autócrinos que interactúan con la hormona promoviendo su proliferación celular o inhibiendo la apoptosis de las células del epitelio superficial ovárico. Se ha observado que la LH estimula la secreción del Factor de Crecimiento de Hepatocitos (HGF) (Hess y col., 1999), el cual promueve la mitosis en las células del epitelio superficial, por lo que podríamos suponer que la gonadotropina coriónica estimulan la expresión del HGF y a través de éste la proliferación de las células del epitelio superficial. Kuroda y col. (2001) reportan que la hCG inhibe la apoptosis de las células del OSE humano vía IGF-I, indicando una interacción entre la hCG-IGF-I pero no de proliferación, se piensa que la hCG regula la expresión del IGF-I, el cual es un posible mediador de la señal anti-apoptótico. El receptor de la LH/hCG se ha encontrado expresado en el OSE de humanos y algunas líneas celulares normales y neoplásicas (Mandai y col., 1997, Kuroda y col., 2001; Parrot y col., 2001; Syed y col., 2001), lo que permite suponer que esta hormona puede estar involucrada en la regulación de la proliferación celular del epitelio superficial ovárico. La LH interactúa con su receptor y estimula la proteína G que guía la producción de AMPc, seguida de la activación de la

proteín cinasa A (PKA) y la subsecuente producción de esteroides. En las células HEY se demostró que el OSE sobrevive a través de la inhibición del inductor-Fas de apoptosis, bloqueado por la activación de la PKA inducida por la producción del AMPc que causa la interacción de la LH con su receptor (Slot y col., 2006).

Estudios epidemiológicos han mostrado un incremento en la frecuencia de cánceres ováricos en mujeres expuestas a altos niveles de FSH y LH/hCG durante la menopausia o tratamientos de infertilidad (Bose, 2005), lo que permite suponer que las gonadotropinas pueden tener un papel importante en el desarrollo de cánceres ováricos, pero es necesario reunir más evidencias.

Los resultados que obtuvimos al realizar los tratamientos con las hormonas esteroides mostraron que estas hormonas no tuvieron un efecto proliferante sobre las células del epitelio superficial en nuestras condiciones. En cultivos celulares de OSE humano las hormonas esteroides no se observa que tengan influencia sobre la proliferación celular (Karlán y col. 1995), esta misma respuesta se advierte en cultivos del OSE de mono *Rhesus* (Wright y col. 2002), está inhibición se piensa que se debe a la concentración del estrógeno. se ha observado que en concentraciones micromolares se presenta un efecto inhibitorio de la proliferación celular del epitelio superficial de mono Rhesus en cultivo (Wright y col., 2005). Sin embargo, en otros trabajos se ha reportado un incremento de la proliferación celular del OSE de conejo, como resultado de la administración del 17β -estradiol *in vitro* e *in vivo* (Bai y col, 2000; Stewart y col., 2004). Se ha reportado la presencia de los receptores para estrógenos $RE\alpha$ y $RE\beta$ en las células del OSE, la respuesta podría ser determinada por combinación en la proporción de receptores alfa y beta expresados en el OSE, en cultivos celulares de OSE de humano y en células neoplásicas se detectó la presencia del $RE\alpha$, en cambio en otros estudios se ha observado la expresión del $RE\beta$ en cultivos celulares de OSE de rata, en dicho modelo se ha sugerido que este receptor juega un papel protector en el epitelio superficial (Lau y col., 1999; Li y col., 2003).

La progesterona al igual que el 17β -estradiol no tuvo ningún efecto sobre el aumento de la proliferación celular del OSE de embrión de pollo en nuestras condiciones de cultivo, se ha reportado en cultivos celulares de OSE de macaco que la progesterona disminuye la

proliferación celular, cosa que no ocurrió en nuestro modelo experimental. Se ha sugerido un papel protector en contra del desarrollo de cánceres ováricos (Ivarsson y col., 2001b). La progesterona se ha propuesto que inhibe la proliferación celular, ya que regula a la alta la expresión de p53 e induce apoptosis tanto en las líneas celulares cancerígenas del ovario como de mama (para una revisión ver. Ho, 2003), lo cual sugiere que una prolongada exposición de progestinas pueden proteger en contra del desarrollo de tumores. El receptor para la progesterona se encuentra presente en las células del OSE (Lau y col., 1999; Li y col., 2003) y se piensa que el mecanismo de acción de la hormona puede estar mediado por la presencia de uno de los dos receptores presentes en las células. Se sabe que la función del receptor A es inhibir la transcripción de los receptores hormonales de esteroides, mientras que el receptor B actúa como un activador de la transcripción de genes que codifican para los receptores de progesterona (Para una revisión ver: Ho, 2003).

La falta de estimulación que se ha observado en los cultivos celulares del OSE, puede ser un reflejo de la pérdida de la expresión del receptor, lo cual puede ocurrir durante el proceso de cultivo o de la interacción celular existentes en el ovario que no se presentan en las condiciones de cultivo.

En el presente modelo experimental se evaluó la participación del factor de crecimiento TGF- α , el cual aumento la incorporación de BrdU significativamente. Este factor de crecimiento es expresado en las células de OSE normal y neoplásicas (Jindal y col. 1994), este factor de crecimiento estimula el crecimiento de las células del OSE de bovino en condiciones de cultivo. El TGF α se une con alta afinidad al receptor de EGF, el cual se expresa en las células del OSE, por lo que se propone que actúa de manera autócrina estimulado la proliferación celular. Además la expresión de otros factores de crecimiento producidos por el OSE como el stem cell factor y el factor de crecimiento de queratinocitos (Doraiswamy y col., 2000). Al combinar el TGF α con las hormonas hipofisiarias y esteroides se observó que no se modificó la respuesta de TGF α y se mantuvo su efecto en todas las combinaciones con respecto al control, lo que sugiere que las hormonas evaluadas no interactúan con este factor de crecimiento. Se sabe muy poco acerca de la interacción de las hormonas gonadotropinas y esteroideas con el TGF α , se ha propuesto que la hCG y la

FSH estimulan la expresión del rEGF en las células del OSE, también se ha reportado que la baja concentración de estradiol durante la menopausia puede contribuirá la sobreexpresión del TGF- α (Doraiswamy y col., 2000), pero todavía hace falta investigar más acerca de estas interacciones.

Otro factor de crecimiento que se evaluó fue el factor de crecimiento IGF-I, el cual en nuestras condiciones de cultivo no ejerció un efecto proliferante sobre las células del OSE de embriones de pollo de 14 d.i. Existen pocos datos de la influencia del IGF-I sobre la biología del OSE, la información previa le confiere un papel regulador de la apoptosis, ya que se ha observado en condiciones de cultivo del OSE de ratas el IGF-I reduce la apoptosis en estas células. Nuestros resultados muestran que el IGF-I no tuvo un efecto proliferante de este factor en las células del OSE. Se ha observado una interacción del IGF-I con la hCG en donde este factor de crecimiento y la hormona reducen la apoptosis de las células del OSE, se observo que el efecto inhibitorio de la apoptosis por hCG fue revertido cuando se agrega un anticuerpo contra el receptor del IGF-I, el cual es expresado en las células del OSE, lo que nos permite suponer esta relación entre el IGF-I y la hCG. (Kuroda y col., 2001). En la combinación del IGF-I con la FSHr se observó un incremento de la proliferación celular de las células del OSE, la hormona folículo estimulante recombinante por sí sola no tuvo efecto sobre la incorporación de BrdU, lo que sugiere que esta hormona necesita interactuar con otros factores para inducir proliferación celular *in vitro* en el epitelio superficial del ovario embrionario; no existen datos de esta relación en las células del OSE, pero se sabe que en el ovario adulto el IGF-I interactúa con la FSH para el desarrollo folicular, se postula que existe un sistema IGF intraovárico que regula este desarrollo folicular, en el ovario las células de la granulosa producen IGF-I e IGF-II y la proteínas de unión las IGFBP inducidas por la FSH y a su vez el IGF-I determina la producción de andrógenos en las células tecaes (Hillier, 2001). Por lo que podemos suponer en el epitelio superficial puede existir un entrecruzamiento de las vías metabólicas de IGF-I y la FSH, que permite la proliferación celular del OSE de embriones de pollo en nuestras condiciones de cultivo.

La complejidad de la regulación de la proliferación celular del OSE hace que a pesar de los diferentes estudios que se han realizado para entender cuáles son los mecanismos de acción que determinan su crecimiento y diferenciación, aun son necesarios muchos estudios para explicar las causas del desarrollo de neoplasias ováricas de este tipo celular. En este estudio analizamos la participación de las gonadotropinas, las hormonas esteroides, así como los factores de crecimiento $TGF\alpha$ e IGF-I, en nuestro modelo experimental de células del epitelio superficial del ovario embrionario de pollo, en dónde se aisló, cultivo y se caracterizó a las células de OSE de gallina de 14 d.i. Se encontraron algunas coincidencias con los modelos antes mencionados en el que las hormonas esteroides no tienen efecto sobre el crecimiento del OSE en cultivo, así como que la FSHr no presentó un efecto proliferante sobre estas células. Mientras que la hCG incrementa la incorporación de BrdU en las células del OSE del embrión de pollo. Con la combinación de la FSHr y el IGF-I inferimos una posible interacción de la hormona y el factor de crecimiento aumentando la proliferación celular del epitelio superficial ovárico en nuestras condiciones de cultivo. Este estudio es importante para la implementación de un nuevo modelo experimental para comprender la etiología del cáncer ovárico, ya que las gallinas en estado adulto presentan el desarrollo del cáncer de ovario espontáneo. Aunque se necesitan mejoras en el sistema para recolectar y mantener estas células *in vitro*, los resultados obtenidos proporcionan una visión del papel que juegan las hormonas y factores de crecimiento en la proliferación del epitelio superficial del ovario de la gallina y, finalmente pueden colaborar para la comprensión del origen del cáncer de ovario en los seres humanos.

VIII. C O N C L U S I O N E S

- ◆ Las células del epitelio superficial del ovario del embrión de pollo de 14 d.i. mostraron un patrón de tinción citoplásmica a citoqueratina, similar al que presentan las células epiteliales ováricas humana

- ◆ La FSHr por sí sola no tiene efecto sobre la proliferación del epitelio superficial del ovario embrionario de pollo en condiciones de cultivo y no modifica la repuesta del factor de crecimiento TGF- α .

- ◆ El factor de crecimiento IGF-I no tuvo efecto sobre la proliferación del OSE en cultivo.

- ◆ La combinación de FSHr con IGF-I aumentó la proliferación en el OSE en cultivo.

- ◆ La gonadotropina coriónica humana en nuestras condiciones de cultivo induce un aumento en la incorporación de BrdU en las células del OSE del embrión de pollo.

- ◆ Las hormonas esteroideas: progesterona y 17 β -estradiol, no incrementaron el crecimiento del OSE del embrión de pollo y no modificaron la respuesta del TGF- α en nuestras condiciones de cultivo.

- ◆ Las células del epitelio superficial del ovario responden al tratamiento con el factor de crecimiento TGF- α incrementando su proliferación.

IX. BIBLIOGRAFÍA

- Ahmed N, Thompson EW, Quinn MA. 2007. Epithelial-mesenchymal interconversions in normal ovarian surface epithelium and ovarian carcinomas: an exception to the norm. *J Cell Physiol*; **213** (3):581-588.
- Allan GJ, Flint DJ, Patel K. 2001. Insulin-like growth factor axis during embryonic development. *Reproduction*. **122** (1):31-39.
- American Cancer Society. 2009. Cancer Facts and Figures 2009. Recuperado el 19 de enero de 2010, de http://www.cancer.org/docroot/PRO/content/PRO_1_1_Cancer_Statistics_2009_Presentation.asp
- Auersperg N, Wong AS, Choi KC, Kang SK, Leung PC. 2001. Ovarian surface epithelium: biology, endocrinology, and pathology. *Endocrine Reviews*. **22** (2):255-288.
- Bai W, Oliveros-Saunders B, Wang Q, Acevedo-Duncan ME, Nicosia SV. 2000. Estrogen stimulation of ovarian surface epithelial cell proliferation. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*. **36** (10):657-666.
- Barnes MN, Berry WD, Straughn JM, Kirby TO, Leath CA, Huh WK, Grizzle WE, Partridge EE. 2002. A pilot study of ovarian cancer chemoprevention using medroxyprogesterone acetate in an avian model of spontaneous ovarian carcinogenesis (Abstract). *Gynecol Oncol*, **87** (1): 57-63.
- Bose K Ch. 2005. Does hormone replacement therapy prevent epithelial ovarian cancer?. *Reproductive BioMedicine* **1** (2): H6-92. Recuperado el 7 de agosto de 2005. *Online: www.rhmonline.cotu/Article/175H on neh 17 May 2005.*
- Callebaut M. 1976. Origin of ovarian follicle cells in birds. *Experientia* **32**: 1337-1339.
- Campbell JG. 1951. Some unusual gonadal tumours of the fowl. *Br J Cancer*. **5** (1):69-78.

- Choi KC, Kang SK, Tai CJ, Auersperg N, Leung PC. 2002. Follicle-stimulating hormone activates mitogen-activated protein kinase in preneoplastic and neoplastic ovarian surface epithelial cells. *J Clin Endocrinol Metab.* **87** (5):2245-2253.
- Clow OL, Hurst PR, Fleming JS. 2002. Changes in the mouse ovarian surface epithelium with age and ovulation number. *Mol Cell Endocrinol* **191** (1):105-111.
- Davies BR, Finnigan DS, Smith SK, Ponder BA. 1999. Administration of gonadotropins stimulates proliferation of normal mouse ovarian surface epithelium. *Gynecol Endocrinol*, **13** (2):75-81.
- Doraiswamy V, Parrott JA, Skinner MK. 2000. Expression and action of transforming growth factor alpha in normal ovarian surface epithelium and ovarian cancer. *Biol Reprod* **63** (3):789-796.
- Edmondson RJ, Monaghan JM, Davies BR. 2006. Gonadotropins mediate DNA synthesis and protection from spontaneous cell death in human ovarian surface epithelium. *Int J Gynecol Cancer*, **16** (1):171-177.
- Fathalla MF. 1971. Incessant ovulation--a factor in ovarian neoplasia? *Lancet*, **2** (7716):163.
- Fredrickson TN. 1987. Ovarian tumors of the hen. *Environ Health Perspect.*, **73**: 35-51.
- Gava N, L Clarke C, Bye C, Byth K, deFazio A. 2008. Global gene expression profiles of ovarian surface epithelial cells in vivo. *J Mol Endocrinol.* **40**(6):281-296.
- Gonzalez-Robayna IJ, Falender AE, Ochsner S, Firestone GL, Richards JS. 2000. Follicle-stimulating hormone (FSH) stimulates phosphorylation and activation of protein kinase B (PKB/Akt) and serum and glucocorticoid-induced kinase (Sgk): evidence for a kinase-independent signaling by FSH in granulosa cells. *Mol Endocrinol*, **14**: 1283–1300.
- Hillier SG. 2001. Gonadotropic control of ovarian follicular growth and development. *Mol Cell Endocrinol.* **179** (1-2):39-46.
- Herrero D. 2008. Cuídate del cáncer de ovario. *Plenilunia* **27**. Recuperado el 18 de agosto de 2009 de <http://beta.plenilunia.com/spip.php?article708>.

- Hess S, Gulati R, Peluso JJ. 1999. Hepatocyte growth factor induces rat ovarian surface epithelial cell mitosis or apoptosis depending on the presence or absence of an extracellular matrix. *Endocrinology*, **140**(6):2908-2916.
- Ho SM. 2003. Estrogen, Progesterone and Epithelial Ovarian. *Reprod Biol Endocrinol*. **1** (1):73.
- Hooghe-Peters LE, Hooghe R. 1995. Growth hormone, prolactin and IGF-I as lymphohemopoietic cytokines. *Springer-Verlag*. 2a Ed. Canadá. 105-111 pp.
- Ivarsson K, Sundfeldt K, Brännström M, Hellberg P, Janson PO. 2001a. Diverse effects of FSH and LH on proliferation of human ovarian surface epithelial cells. *Hum Reprod* **16** (1):18-23.
- Ivarsson K, Sundfeldt K, Brannstrom M, Janson PO. 2001b. Production of steroids by human ovarian surface epithelial cells in culture: possible role of progesterone as growth inhibitor. *Gynecol Oncol* **82** (1):116-121.
- Jindal SK, Snoey DM, Lobb DK, Dorrington JH. 1994. Transforming growth factor alpha localization and role in surface epithelium of normal human ovaries and in ovarian carcinoma cells. *Gynecol Oncol* **53** (1):17-23.
- Johnson GL, Dhanasekaran N. 1989. The G-protein family and their interaction with receptors. *Endocr Rev*. **10**(3):317-331.
- Johnson AL, Bridgham JT, Swenson JA. 2001. Activation of the Akt/protein kinase B signaling pathway is associated with granulosa cell survival. *Biol Reprod* **64**:1566–1574.
- Juengel JL, Sawyer HR, Smith PR, Quirke LD, Heath DA, Lun S, Wakefield SJ, McNatty KP. 2002. Origins of follicular cells and ontogeny of steroidogenesis in ovine fetal ovaries. *Mol Cell Endocrinol* **191** (1):1-10.
- Karlan BY, Jones J, Greenwald M, Lagasse LD. 1995. Steroid hormone effects on the proliferation of human ovarian surface epithelium in vitro. *Am J Obstet Gynecol*. **173** (1):97-104.

- Konishi I. 2006. Gonadotropins and ovarian carcinogenesis: a new era of basic research and its clinical implications. *Int J Gynecol Cancer*, **16** (1):16-22.
- Kumar V, Bustin SA, McKay IA. 1995. Transforming growth factor alpha. *Cell Biol Int*. **19**(5):373-388.
- Kuroda H, Mandai M, Konishi I, Tsuruta Y, Kusakari T, Kariya M, Fujii S. 2001. Human ovarian surface epithelial (OSE) cells express LH/hCG receptors, and hCG inhibits apoptosis of OSE cells via up-regulation of insulin-like growth factor-1. *Int J Cancer* **91** (3):309-315.
- 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. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96** (10):5722-5727.
- Leung PC, Choi JH. 2007. Endocrine signaling in ovarian surface epithelium and cancer. *Hum Reprod Update*, **13** (2):143-162.
- Li AJ, Baldwin RL, Karlan BY. 2003. Estrogen and progesterone receptor subtype expression in normal and malignant ovarian epithelial cell cultures. *Am J Obstet Gynecol*. **189** (1):22-27.
- Löffler S, Horn LC, Weber W, Spänel-Borowski K. 2000. The transient disappearance of cytokeratin in human fetal and adult ovaries. *Anat Embryol*, **201** (3):207-215.
- MacLachlan NJ. 1987. Ovarian disorders in domestic animals. *Environ Health Perspect*. **73**:27-33.
- Mandai M, Konishi I, Kuroda H, Fukumoto M, Komatsu T, Yamamoto S, Nanbu K, Rao CV, Mori T. 1997. Messenger ribonucleic acid expression of LH/hCG receptor gene in human ovarian carcinomas. *Eur J Cancer*. **33** (9):1501-1507.
- Méndez MC, Ramírez M, Varela AR, Chávez B, Pedernera E. 2003 Follicle-stimulating hormone increase cell proliferation in the ovary and the testis of the chick embryo. *Gen Comp Endocrinol* **133**: 181-188.

- Motta PM, Makabe S. 1982. Development of the ovarian surface and associated germ cells in the human fetus. A correlated study by scanning and transmission electron microscopy. *Cell Tissue Res*, **226** (3): 493-510.
- Murdoch WJ, Van Kirk EA, Alexander BM. 2005. DNA damages in ovarian surface epithelial cells of ovulatory hens. *Exp Biol Med (Maywood)*, **230** (6):429-433.
- Norman WA, Litwack G. 1997. Hormones. *Academic Press*. 2a Ed. San Diego, California, 558 pp.
- Parrott JA, Doraiswamy V, Kim G, Mosher R, Skinner MK. 2001. Expression and actions of both the follicle stimulating hormone receptor and the luteinizing hormone receptor in normal ovarian surface epithelium and ovarian cancer. *Mol Cell Endocrinol*. **172** (1-2):213-222.
- Osterholzer HO, Streibel EJ, Nicosia SV. 1985. Growth effects of protein hormones on cultured rabbit ovarian surface epithelial cells. *Biol Reprod* **33** (1):247-258
- Richards JS, Russell DL, Ochsner S, Hsieh M, Doyle KH, Falender AE, Lo YK, Sharma SC. 2002. Novel signaling pathways that control ovarian follicular development, ovulation, and luteinization. *Recent Prog Horm Res*. **57**:195-220.
- Risch HA. 1998. Hormonal etiology of epithelial ovarian cancer, with a hypothesis concerning the role of androgens and progesterone. *J Natl Cancer Inst* **90** (23):1774-1786.
- Rodríguez-Burford C, Barnes MN, Berry W, Partridge EE, Grizzle WE. 2001. Immunohistochemical expression of molecular markers in an avian model: a potential model for preclinical evaluation of agents for ovarian cancer chemoprevention.(Abstract). *Gynecol Oncol*, **81** (3):373-379.
- Rombauts L, Berghman LR, Vanmontfort D, Decuypere E, Verhoeven G. 1993. Changes in immunoreactive FSH and inhibin in developing chicken embryos and the effects of estradiol and the aromatase inhibitor R76713. *Biol Reprod* **49** (3):549-554.

- Sawyer R. Heywood, Smith Peter, Heath A.Derek, Juengel L. Jennifer, St. John Wakefield and Kenneth P. McNatty. 2002. Formation of Ovarian Follicles During Fetal Development in Sheep *Biol Reprod* **66**: 1134–1150
- Scanes CG, Thommes RC, Radecki SV, Buonomo FC, Woods JE. 1997. Ontogenic changes in the circulating concentrations of insulin-like growth factor (IGF)-I, IGF-II, and IGF-binding proteins in the chicken embryo. *Gen Comp Endocrinol.* **106** (2):265-270.
- Schildkraut JM, Calingaert B, Marchbanks PA, Moorman PG, Rodriguez GC. 2002. Impact of progestin and estrogen potency in oral contraceptives on ovarian cancer risk. *J Natl Cancer Inst.* **94** (1): 32-38.
- Scully RE. 1995. Pathology of ovarian cancer precursors. *J Cell Biochem Suppl*, **23**:208-218.
- Slot KA, de Boer-Brouwer M, Houweling M, Vaandrager AB, Dorrington JH, Teerds KJ. 2006. Luteinizing hormone inhibits Fas-induced apoptosis in ovarian surface epithelial cell lines. *J Endocrinol*, **188** (2):227-239.
- Starczewski A, Brodowska A, Laszczyńska M, Piasecka M.(2008). The presence and role of progesterone receptor in the ovaries of postmenopausal women who have not applied hormone replacement therapy. *Folia Histochem Cytobiol.* **46** (3):277-282.
- Stevens A, Lowe J. 1995. Texto y atlas de histología. *Mosby and Doymán*. España
- 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. *J Cell Physiol.*, **198** (1):119-124.
- Sun GW, Kobayashi H, Suzuki M, Kanayama N, Terao T. 2003. Follicle-stimulating hormone and insulin-like growth factor I synergistically induce up-regulation of cartilage link protein (Crtl1) via activation of phosphatidylinositol-dependent kinase/Akt in rat granulosa cells. *Endocrinology*; **144** (3):793-801.

- Syed V, Ulinski G, Mok SC, Yiu GK, Ho SM. 2001 Expression of gonadotropin receptor and growth responses to key reproductive hormones in normal and malignant human ovarian surface epithelial cells. *Cancer Res.* **61** (18):6768-676.
- Syed V, Zhang X, Lau KM, Cheng R, Mukherjee K, Ho SM. 2005. Profiling estrogen-regulated gene expression changes in normal and malignant human ovarian surface epithelial cells. *Oncogene*, **24** (55):8128-8143.
- Tashiro H, Katabuchi H, Begum M, Li X, Nitta M, Ohtake H, Okamura H. 2003. Roles of luteinizing hormone/chorionic gonadotropin receptor in anchorage-dependent and -independent growth in human ovarian surface epithelial cell lines. *Cancer Sci.* **94** (11):953-959
- Tresguerres, JAF y Castillo, C. (2005). Fisiología del eje hipotálamo-hipófiso- ovárico. En: Tresguerres, JAF (Ed). Fisiología Humana (1007-1023). México: McGraw-Hill.
- Vincent AM, Feldman 2002. El. Control of cell survival by IGF signaling pathways. *Growth Horm IGF Res.***12** (4):193-197.
- Weniger JP. 1991. Estrogen secretion by the chick embryo ovary. *Exp Clin Endocrinol*, **98** (1): 9-14.
- Westfall SD, Hendry IR, Obholz KL, Rueda BR, Davis JS. 2000. Putative role of the phosphatidylinositol 3-kinase-Akt signaling pathway in the survival of granulosa cells. *Endocrine*, **12**:315–321.
- Wong AS, Leung PC.2007. Role of endocrine and growth factors on the ovarian surface epithelium. *J Obstet Gynaecol Res.* **33** (1):3-16.
- Wright JW, Toth-Fejel S, Stouffer RL, Rodland KD. 2002. Proliferation of rhesus ovarian surface epithelial cells in culture: lack of mitogenic response to steroid or gonadotropic hormones. *Endocrinology* **143** (6):2198-2207.

- Wright JW, Stouffer RL, Rodland KD. 2005. High-dose estrogen and clinical selective estrogen receptor modulators induce growth arrest, p21, and p53 in primate ovarian surface epithelial cells. *J Clin Endocrinol Metab*, **90** (6):3688-3695.
- Yen SSC, Jaffe R, Barbieri R 1999. Endocrinología de la reproducción, fisiología, fisiopatología y manejo clínico. *Médica panamericana*. 4ª ed. Buenos Aires, Argentina 912 pp
- Zheng W, Magid MS, Kramer EE, Chen YT. 1996. Follicle-stimulating hormone receptor is expressed in human ovarian surface epithelium and fallopian tube. *Am J Pathol*, **148** (1): 47-53.