



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

“EFECTO DE LOS ANDRÓGENOS EN LA EXPRESIÓN DE
N-CADHERINA EN CÉLULAS DEL EPITELIO
SUPERFICIAL DEL OVARIO DEL EMBRIÓN DE POLLO”.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

B I O L O G O

P R E S E N T A

FLORES ALANIS ALEJANDO



DIRECTOR DE TESIS: Dra. MARÍA DEL CARMEN MÉNDEZ HERRERA.
PROYECTO FINANCIADO POR CONACyT 60346 y PAPIIT-IN216807.

TLALNEPANTLA, EDO. DE MÉXICO

ENERO DEL 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.

DEDICATORIA

A mis padres por todo el cariño y amor que me dieron y me siguen dando, por enseñarme a ser una persona responsable, trabajadora y humilde. Pero sobre todo por darme lo más importante que puedo tener en estos momentos, la vida.

A mis abuelos Teresa y Raúl, por haber creído en mi sin excepción alguna, por apoyarme en toda esta travesía llamada vida, y sobre todo por el gran amor y cariño que me han brindado siempre.

A mis tíos y tías por estar siempre en los momentos difíciles, creer en mí y darme palabras alentadoras que me ayudaron a culminar este primer pasó en mi vida profesional.

Gracias a mis queridos hermanos Paola, Héctor y Carlos por haber soportado mis locuras durante tanto tiempo.

Para mis amigos Alejandra, Tania, Carolina, Lizbeth y Aldana, que me permitieron compartir desde el inicio toda esta aventura fantástica llamada biología. Por apoyarme y estar siempre presentes durante los momentos difíciles, pero también en los buenos; momentos que me ayudaron a ser una mejor persona. Por brindarme su amistad incondicional y haberme permitido entrar a sus vidas y compartir infinidad de sueños, tristezas y triunfos.

A mi mejor amigo Daniel López por alentarme, aconsejarme, apoyarme y regañarme durante toda la carrera, por abrirme las puertas de su casa y por creer y seguir creyendo en mí.

AGRADECIMIENTOS.

A mi tutora de tesis, la Dra. María del Carmen Méndez Herrera por permitirme trabajar en su laboratorio, por su atención, apoyo y consejos que me ayudaron durante la realización de este trabajo.

A mis compañeras de laboratorio Carmen, Mari, Silvia y Coqui por sus amistad y sus consejos siempre tan oportunos.

A mis sinodales por su atención, tiempo y valiosas aportaciones hacia mi tesis y hacia mi persona.

A la Universidad Nacional Autónoma de México por abrirme las puertas y dejar que mis sueños se estén haciendo realidad. Por permitirme aprender y formarme como profesional.

A CONACyT por la beca de licenciatura otorgada.

AGRADECIMIENTOS POR APOYO TÉCNICO.

A la Dra. Jeannette Günther por los conocimientos, tiempo y comentarios otorgados durante la realización de esta tesis.

A la Q.F.B Carmen Guadalupe Modragón Huerta, C. María Jose Gómora Herrera y M. en C. Silvia Reyes Maya por haberme enseñado y apoyado en el manejo de las diferentes técnicas y aparatos del laboratorio. Por dedicarme tiempo, atención y paciencia que me facilitaron la culminación de esta tesis.

Al candidato a Doctor en Ciencias Biomédicas Rene Escalona Mujica por apoyarme y facilitarme lo necesario durante la realización de la Hibridación *In situ*.

INDICE.

i.	Abreviaturas utilizadas en el texto.	1
1.	Resumen.	3
2.	Introducción.	4
2.1.	El ovario.	
2.1.1.	Anatomía, histología y fisiología.	
2.1.2.	Epitelio superficial ovárico (OSE).	
2.2.	Cáncer de ovario.	7
2.2.1.	Cáncer epitelial ovárico (CEO).	
2.2.2.	Teorías sobre el desarrollo de CEO.	
2.2.2.1.	Teoría de la ovulación incesante.	
2.2.2.2.	Teoría de la inflamación.	
2.2.2.3.	Teoría de las gonadotropinas.	
2.2.2.4.	Las hormonas esteroides y el riesgo de CEO.	
2.2.3.	Limitaciones para el estudio del CEO.	
2.3.	Hormonas esteroides y CEO.	11
2.3.1.	Andrógenos.	
2.3.1.1.	Producción, síntesis y transporte.	
2.3.1.2.	Función.	
2.3.2.	Receptores nucleares.	
2.3.2.1.	Receptor de andrógenos (AR).	
2.3.3.	Andrógenos y CEO.	
2.4.	Cadherinas.	18
2.4.1.	Estructura.	
2.4.2.	Función.	
2.4.3.	Cadherinas en el ovario.	
2.4.4.	Cadherinas y cáncer.	
2.4.4.1.	Cadherinas y cáncer de ovario.	
2.4.5.	La vía de señalización Wnt y el complejo cadherina-catenina en cáncer.	
2.5.	Modelo biológico.	25
2.6.	PCR en tiempo real.	27
3.	Hipótesis.	30
4.	Objetivos.	30
4.1.	Objetivo general.	
4.2.	Objetivos particulares.	

5.	Material y métodos.	31
5.1.	Modelo biológico.	
5.2.	Obtención de las células del epitelio superficial del ovario.	
5.3.	Cultivos primarios y tratamiento con andrógenos.	
5.4.	RT-PCR.	
5.5.	Sonda para el receptor a andrógenos.	
5.6.	Hibridación <i>in situ</i> .	
5.7.	Procesamiento e inclusión de tejidos en congelación.	
5.8.	Procesamiento e inclusión de tejidos en parafina.	
5.9.	Inmunohistoquímica para el receptor de andrógenos en ovario embrionario de pollo.	
5.10.	Inmunofluorescencia para N-cadherina en células ovario de embrión de pollo.	
5.11.	Inmunofluorescencia para N-cadherina en células del epitelio superficial del ovario.	
5.12.	Tratamientos con andrógenos <i>in ovo</i> para el estudio morfológico del epitelio superficial del ovario.	
5.13.	Procesamiento para cortes en resina epóxica.	
5.14.	PCR en tiempo real.	
6.	Resultados.	38
6.1.	Obtención de una población enriquecida con células del OSE por digestión parcial.	
6.2.	Expresión del RNAm de N-cadherina por PCR punto final.	
6.3.	Localización del RNA mensajero del receptor a andrógenos en ovarios de 14 d.i. por hibridación <i>In situ</i> .	
6.4.	Inmunodetección del AR en el ovario de embrión de pollo de 14 d.i.	
6.5.	Inmunodetección de la N-cadherina en el ovario de embrión de pollo de 14 d.i.	
6.6.	Cambios morfológicos en el epitelio superficial ovárico inducidos por andrógenos.	
6.7.	Validación del método comparativo Delta Ct (ΔCt).	
6.8.	Expresión de N-cadherina por PCR en tiempo real.	
7.	Discusión.	49
7.1.	Modelo biológico.	
7.2.	Cambios morfológicos en el OSE.	
7.3.	Expresión de N-cadherina en células del OSE.	
8.	Conclusiones.	56
9.	Apéndice. Lista de soluciones.	57
10.	Bibliografía.	59

i. Abreviaturas.

Las abreviaturas que se utilizan en el texto se han puesto según su escritura en inglés.

AF-1	Función de activación 1
AF-2	Función de activación 2
AMH	Hormona anti Mülleriana
APC	Adenomatous polyposis coli
AR	Receptor de andrógenos
AR-A	Receptor de andrógenos forma A
AR-B	Receptor de andrógenos forma B
AREs	Elementos de respuesta a andrógenos
cAMP	Adenosina monofosfato ciclico
CBG	Globulinas de unión a corticosteroides
CBS	Sitio de unión a cateninas
CEO	Cáncer epitelial ovárico
CK1- γ	Casein sánasa 1- γ
CREB	Proteína de unión a elementos de respuesta a cAMP
Ct	Ciclo de umbral de detección
CYP11A	Citocromo P450 _{scc}
CYP17	Citocromo P450 _{c17}
CYP19	Citocromo P450 aromatasa
DBD	Dominio de unión a DNA
DHEA	Dehidroepiandrosterona
DHEAS	Dehidroepiandrosterona-sulfato
DHT	Dihidrotestosterona
d.i.	Días de incubación
DNA	Acido desoxiribonucleico
Dsh	Dishevelled
EC	Ectodominio
EGF	Factor de crecimiento epidermico
EMT	Transición epitelio-mesénquima
ER α	Receptor de estrógenos α
ER β	Receptor de estrógenos β
E ₂	Estradiol
FGF	Factor de crecimiento fibroblástico
FGFR	Receptor a factor de crecimiento fibroblástico
FRET	Transferencia de energía resonante fluorescente
FSH	Hormona folículo estimulante
FSHR	Receptor a hormona folículo estimulante
FTD	Flutamida
GAPDH	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
GnRH	Hormona liberadora de gonadotropinas
GnRHR	Receptor a hormona liberadora de gonadotropinas
GSK3 β	Cinasa Glucógeno sintetasa 3 β
GTFs	Factores de transcripción generales
HGF	Factor de crecimiento de hepatocitos
HREs	Elementos de respuesta a hormonas
HSPs	Proteínas de choque térmico
kDa	Kilodaltones

KGF	Factor de crecimiento de queratinocitos
LBD	Dominio de unión a ligando
LBP	Bolsillo de unión a ligando
Lef	Factor de incremento linfoide
LH	Hormona lutenizante
LHR	Receptor a hormona lutenizante
MAPKs	Proteínas cinasas activadas por mitógenos
MET	Transición mesénquima-epitelio
MPCD	Dominio conservado próximo a la membrana
MPED	Dominio extracelular próximo a la membrana
NID	Dominio de interacción del receptor nuclear
NLS	Secuencia de localización nuclear
NTD	Dominio N-terminal
OSE	Epitelio superficial ovárico
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PDGF	Factor de crecimiento derivado de plaquetas
PGCs	Células germinales primordiales
PKA	Proteína cinasa A
PKC	Proteína cinasa C
PR	Receptor de progesterona
P4	Progesterona
P5	Pregnenolona
RNA _m	Acido ribonucleico mensajero
SD	Desviación estándar
SDS	Sistema de detección de secuencias
SHBG	Globulinas de unión a hormonas sexuales
SHBGR	Receptor de globulinas de unión a hormonas sexuales
Tcf	Factor de célula T
TGF- α	Factor de crecimiento transformante α
T _m	Temperatura de desnaturalización
TNF- α	Factor de necrosis tumoral α
Wnt	<i>Wingless</i>
5 α -red	5 α -reductasa
17 β -HSD	17 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa
Δ 4	Vía de la progesterona
Δ 5	Vía de la pregnenolona

1. RESUMEN.

El ovario es un órgano que produce hormonas esteroideas y óvulos fertilizables esenciales para la reproducción, histológicamente está formado por la médula, la corteza, y el epitelio superficial. Hay evidencias que sugieren que este tejido origina el 80% de los casos de cáncer epitelial ovárico. El epitelio esta unido por cadherinas que son moléculas de adhesión dependientes de calcio presentes en las uniones adherentes. En el ovario la unión intercelular del epitelio está mediada por N-cadherina, alteraciones en los niveles de su expresión son relacionados con el desarrollo de cáncer epitelial y su regulación podría estar dada por andrógenos vía su receptor. El propósito de este estudio fue analizar el efecto de los andrógenos en la morfología del epitelio superficial del ovario del embrión de pollo y su participación en la regulación de la N-cadherina. En ovarios de embriones de pollo de 10, 12, 14 y 17 días de incubación (d.i.) se detectó la expresión de la N-cadherina y del receptor a andrógenos (AR) por medio de PCR punto final. Ovarios de 14 d.i. se analizaron por hibridación *in situ* e inmunofluorescencia para la localización del RNAm y la proteína del AR y la N-cadherina respectivamente. Se realizaron estudios morfométricos en el epitelio superficial de ovarios embrionarios tratados con 200ng de testosterona, dihidrotestosterona (DHT) y estradiol (E₂) *in ovo*. En cultivos primarios de células epiteliales también se analizó la localización de la N-cadherina por inmunofluorescencia, además de el tratamiento con andrógenos, para analizar los cambios en la expresión de N-cadherina por PCR tiempo-real (cuantificación relativa, RQ). La localización de la N-cadherina se limita a la región de la membrana celular de las uniones de las células del epitelio superficial y la del AR en el núcleo de las mismas células. El epitelio superficial esta compuesto de una capa simple de células cúbicas; al tratar con E₂ el epitelio pasó de una capa cúbica a una columnar, con testosterona el epitelio se vuelve columnar, con un aumento en la entrada de células epiteliales hacia la región medular, y con DHT se forma una capa de células columnares que presenta gran cantidad de espacios intercelulares, y la entrada de las células epiteliales hacia la médula se hace más evidente. Además, el área celular y el número de mitocondrias por célula se incrementaron con E₂, testosterona y DHT; el área nuclear es aumentada por E₂ y la altura del epitelio, al igual que el número de mitosis por E₂ y DHT. La expresión de la N-cadherina en células del epitelio superficial aumenta en respuesta a la administración de testosterona, pero no de DHT. Hasta donde sabemos este es el primer trabajo que reporta la presencia del AR en el epitelio superficial ovárico del embrión de pollo y que describe el efecto de los andrógenos en la expresión de N-cadherina en este tejido. Se describen también los cambios morfológicos del epitelio como respuesta a la administración de andrógenos. Estos resultados sugieren que el epitelio es un tejido que responde de manera diferencial a la administración de andrógenos *in ovo*, siendo DHT el andrógeno que induce mayores cambios en su morfología y la participación de la testosterona en la expresión de la N-cadherina.

Palabras clave: Epitelio superficial ovárico, andrógenos, receptor a andrógenos, cáncer epitelial ovárico, N-cadherina, PCR tiempo real.

2. INTRODUCCIÓN.

2.1. EL OVARIO.

2.1.1. Anatomía, histología y fisiología.

El ovario es un órgano endócrino que produce hormonas esteroides y óvulos fertilizables esenciales para la reproducción; su morfología y producción hormonal se modifica en relación a la edad de la mujer. Es un órgano pélvico localizado bilateralmente, cada ovario está fijado a la superficie posterior del ligamento ancho del útero a través de un pliegue peritoneal llamado mesoovario, la parte superior del ovario (tubárico) está unido a la pared de la pelvis mediante el ligamento lumboovárico (ligamento suspensorio) que conduce los vasos y nervios ováricos; y la parte inferior (uterina) está unida al útero por medio del ligamento ovárico, manteniéndolo en posición lateral (Roos *et al.*, 2005).

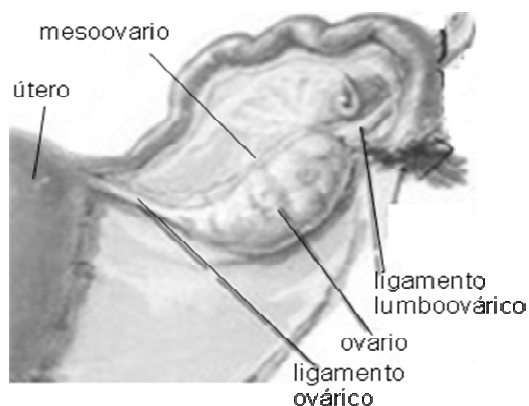


Figura 1. Esquema de los ligamentos que mantienen al ovario en posición lateral dentro de cavidad peritoneal. Para mayor detalle revisar el texto.

Estructural e histológicamente el ovario está formado por tres regiones principales, la médula, la corteza, y el epitelio superficial ovárico (OSE) recubriendo su superficie. Las tres zonas reaccionan y producen un amplio rango de señales hormonales y factores de crecimiento. La zona medular está conformada por células fusiformes asociada a colágeno, tejido conectivo, vasos linfáticos y sanguíneos y células hiliares, además se encuentran las células germinales y folículos medulares en degeneración. La médula es rodeada por la zona cortical la cual a su vez está separada del OSE por la túnica albugínea, embebidos en el tejido conectivo de la corteza hay folículos primordiales localizados en las periferias (cerca del OSE), conforme se desarrollan se profundizan hasta ocupar el grueso de la corteza. Los folículos ováricos están compuestos por las células de la granulosa de forma cúbica que rodean al ovocito, y por encima de estas se encuentra una capa formada por las células de la teca las cuales son más alargadas que las células de la granulosa (DeFrias *et al.*, 2002). Por último el OSE es una capa única de células cúbicas unidas por desmosomas, integrinas y cadherinas (Auersperg y Woo, 2004); morfológicamente el OSE va de epitelio simple escamoso a cúbico o columnar pseudoestratificado, además expresa citoqueratinas, desmoplaquinas, factor de crecimiento transformante alfa (TGF- α), factor de crecimiento epidérmico (EGF), receptores para estrógenos α y β (ER α y β), progesterona (PR), andrógenos (AR), hormona folículo estimulante (FSH-R), hormona luteinizante (LH-R) y hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH-R) (Vanderhyden *et al.*, 2003 y Gadducci *et al.*, 2004) y enzimas esteroidogénicas deshidrogenasa/reductasa (Rae y Hillier, 2005). Además de los componentes principales, se pueden encontrar invaginaciones del OSE que pueden ser

simples o múltiples, distribuidas por debajo del área del epitelio, llamadas quistes de inclusión, presentes en las diferentes etapas de la vida de la mujer, pero sobre todo en la menopausia.

La función ovárica es regulada por el eje hipotálamo-hipófisis-ovario, donde las neuronas del hipotálamo producen y secretan de manera oscilante la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH), esta hormona entra al torrente sanguíneo y por medio del sistema porta hipotálamo-hipófisis, en el área de la eminencia media del hipotálamo llegan a los gonadotropos de la hipófisis anterior en donde estimulan la síntesis y secreción de las hormonas luteinizante (LH) y folículo estimulante (FSH). Los receptores para la LH son expresados en las células intersticiales (células de la teca y células lúteas), mientras que los de la FSH se localizan en las células de la granulosa. La LH estimula la esteroidogénesis al inducir la expresión de los complejos enzimáticos involucrados en la biosíntesis de andrógenos en las células de la teca, de progesterona (P4) en las células de la granulosa luteinizadas y en el cuerpo lúteo y de estrógenos en este último. La FSH regula la función de las células de la granulosa, incluyendo el desarrollo y selección de los folículos ováricos, la maduración del ovocito, la expresión del citocromo P450 aromatasa (CYP19) para llevar a cabo la aromatización de los andrógenos a estrógenos, la expresión gradual de receptores para LH y de forma secundaria, gracias al aumento de estrógenos y LH, la ovulación. EL estradiol (E₂) y testosterona regulan por retroalimentación negativa la síntesis de LH, pero temporalmente durante la fase folicular los estrógenos pueden regular positivamente su síntesis y secreción. Los andrógenos regulan por retroalimentación negativa a nivel hipotálamo e hipófisis la secreción de GnRH y gonadotropinas. La alteración de este eje junto con otros factores naturales, como la ovulación continua, podrían ser un factor de riesgo para la aparición del cáncer ovárico de origen epitelial (Díaz-Cueto y Ulloa-Aguirre, 2003).

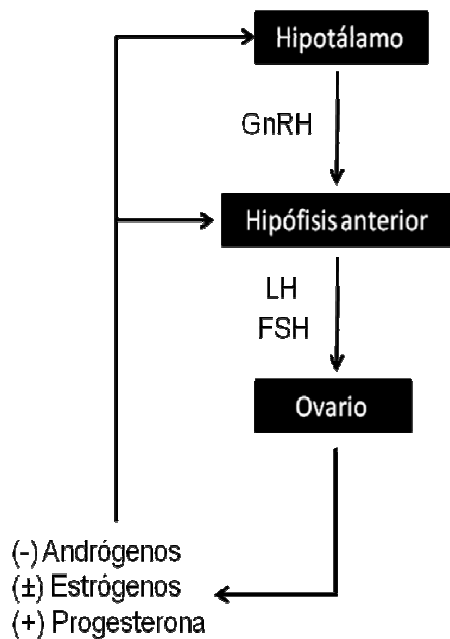


Figura 2. Esquema del eje hipotálamo-hipófisis-ovario. La liberación de GnRH desde el hipotálamo hacia la hipófisis incrementa la síntesis y liberación de LH y FSH, las cuales inducirán la producción de hormonas esteroides en el ovario. Tomado y modificado de Díaz-Cueto y Ulloa-Aguirre, 2003.

2.1.2. Epitelio superficial ovárico (OSE).

El epitelio superficial del ovario anteriormente conocido como el epitelio germinal es un derivado del epitelio que recubre la cavidad celómica del embrión. Durante el desarrollo gonadal el epitelio celómico recubre las crestas genitales, luego prolifera y se introduce en la gónada indiferenciada, en el testículo este tejido forma los cordones sexuales primarios que son el origen de las células de Sertoli, en la gónada femenina se forma una segunda generación de cordones llamados corticales que rodearán a los ovocitos y originan las futuras células de la granulosa, que en conjunto con el ovocito y las células tecales derivadas del mesénquima, constituyen el folículo ovárico. La mayor contribución celular para la formación de las células granulosa proviene de este epitelio (Gilbert, 2008), sin embargo hay autores que proponen que podría haber un aporte celular por parte del mesonefros por su cercanía con la gónada (Sato, 1991). En el ovario de la mujer adulta las células del OSE están continuas al mesotelio del peritoneo y se encuentran separadas del subyacente compartimiento estromal del ovario por la membrana basal y la túnica albugínea (revisado en: Auersperg *et al.*, 2001 y Auersperg y Woo, 2004). El ovocito que no se rodea de células epiteliales se atresia, pero si está dentro de un folículo crece, lleva a cabo la impronta genómica, la maduración citoplásmica y nuclear necesarias para producir un óvulo competente para la fecundación. Esto solo es posible con la integración morfofuncional de las células granulosa derivadas del epitelio que recubre la superficie de la gónada (Gilbert, 2008).

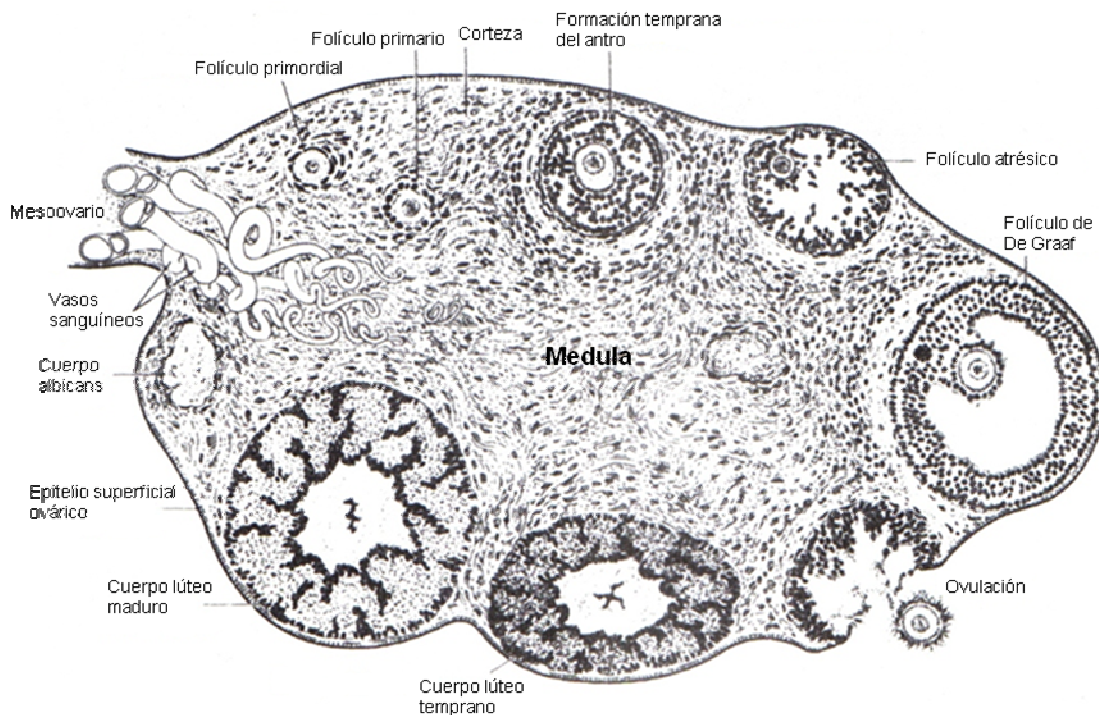


Figura 3. Representación del ciclo ovárico, se muestra las etapas de maduración del folículo ovárico y los compartimientos en los que se divide el ovario de una mujer adulta. Modificado de Yen *et al.*, 2001.

2.2. CANCER DE OVARIO.

Aunque la superficie del ovario es generalmente lisa, con el tiempo el ovario sufre pérdida de los folículos y su superficie pasa a ser más convolucionada. Las invaginaciones del epitelio resultan en criptas o estructuras parecidas a glándulas que pueden llegar a formar quistes de inclusión dentro del estroma ovárico, la aparición de estos se incrementa con el avance de la edad y es común en mujeres postmenopáusicas. Esto podría ocurrir después de la proliferación postovulatoria del OSE, desgaste folicular y/o de la inflamación causada por carcinógenos o irritantes químicos (Auersperg y Woo, 2004). Aunque esos reacomodos son generalmente naturales, pueden potencialmente dar origen a cáncer epitelial ovárico (CEO) (Vanderhyden *et al.* 2003); ya que estas invaginaciones quedan expuestas al microambiente del estroma rico en hormonas y factores de crecimiento (Choi *et al.*, 2007). Las mujeres con síndrome de ovario poliquístico frecuentemente tienen altos niveles de FSH y LH junto con un riesgo elevado de desarrollar CEO, este riesgo también ha sido reportado en mujeres que recibieron tratamientos para la infertilidad basados en gonadotropinas; hechos que apoyan a esta hipótesis (Fleming *et al.*, 2006). Durante el desarrollo folicular temprano hay una alta producción de andrógenos (Drummond, 2006) en comparación con la de estrógenos, luego entonces los quistes de inclusión que se localizan cerca del folículo en desarrollo, podrían estar expuestos a altos niveles de andrógenos (Leung y Choi, 2007).

El ovario puede ser fuente de una gran variedad de tumores, la mayoría de ellos derivados del OSE (80-90%), otros derivan de las células germinales (disgerminoma, teratoma, entre otros) y una minoría se originan de los cordones sexuales, estroma o ambos; estos últimos son usualmente benignos (fibromas-tecomas). Todos los carcinomas ováricos se esparcen por invasión directa a órganos adyacentes y se diseminan por medio del fluido peritoneal (DeFrias *et al.*, 2002; Lukanova y Kaaks, 2005).

2.2.1. Cáncer epitelial ovárico (CEO).

De acuerdo a la Federación Internacional de Ginecología y Obstetricia (FIGO) los tumores derivados del OSE se clasifican en cuatro tipos principales: tumores serosos, mucinosos, endometrioides y de células claras, con base en la diferenciación histológica que toma el epitelio; estos tumores a su vez pueden ser benignos, limítrofes y carcinomas dependiendo del grado de proliferación del epitelio y de la presencia o ausencia de invasión al estroma. La mayoría de estos tumores (50%) son de tipo serosos, estos tumores presentan estructuras papilares complejas y un epitelio cuyas células son cúbicas o columnares ciliadas parecidas al peritoneo que rodea al ovario y a las trompas de Falopio. Los tumores derivados del OSE que ocupan el segundo lugar en frecuencia son los mucinosos (25-30%), que en su mayoría son benignos; las células que presentan estos tumores son de morfología variable parecidas a las células epiteliales endocervicales, gástricas o intestinales, presentan un citoplasma lleno de moco y se acomodan en una forma parecida a un panal de abejas. Los tumores que siguen en frecuencia son los endometrioides (10-20%) que están compuestos de células epiteliales y del estroma, estos tumores se presentan en mujeres postmenopáusicas y por lo regular están asociados con endometriosis. Estas células presentan una histología granular, cribiforme y papilar, su morfología celular depende del grado de diferenciación. Por último los carcinomas de células claras (6%) son los menos frecuentes en los tumores derivados del OSE, estos presentan varios patrones celulares, siendo el más representativos el tipo celular

claro y aplanadas, y poco presentes el cuboidal, oxifílico y raramente componentes anillados. Histológicamente se presentan sólidos, papilares y tubuloquísticos, las células presentan un citoplasma abundante cianofílico y transparente con glucógeno y lípidos, el núcleo es atípico alargado con un nucléolo grande (DeFrias *et al.*, 2002).

2.2.2. Teorías sobre el desarrollo de CEO.

Durante la vida reproductiva de la mujer, el ovario, produce ovocitos fertilizables aptos para iniciar el desarrollo embrionario y sintetizar hormonas esteroides sexuales necesarias para llevar a cabo la función reproductiva. De las tres zonas principales que se reconocen en el ovario, el OSE representa menos del 2% del tejido total y su estudio es de gran importancia; ya que hay evidencias de que origina el CEO en el 80% de los casos. Estudios epidemiológicos sobre los factores asociados al desarrollo de CEO han destacado la participación de eventos hormonales como la infertilidad, el uso de medicamentos para la reproducción asistida, la obesidad, así como también las mutaciones genéticas de (como las que se describen en) los genes *BRCA1* y *BRCA2*. Por otra parte se sabe que el embarazo, la lactancia prolongada y el uso de anticonceptivos hormonales a base de P4, reducen el riesgo de padecer esta enfermedad.

En la menopausia el ovario continúa produciendo testosterona y androstenediona en cantidades importantes aún cuando la síntesis de estrógenos es mínima. También se elevan las concentraciones circulantes de LH y FSH. Las neoplasias epiteliales de ovario se presentan con mayor frecuencia en la menopausia por lo que se propone que las hormonas esteroides sexuales y las gonadotropinas hipofisarias favorecen su desarrollo. Se han propuesto varias hipótesis para tratar de explicar las causas del cáncer epitelial de ovario, las cuales se discuten a continuación.

2.2.2.1. Hipótesis de la ovulación incesante.

Fathalla en 1971, propuso la hipótesis de la ovulación incesante la cual plantea que las lesiones en la superficie del ovario y la proliferación celular provocan alteraciones que predisponen al epitelio a malignizarse. Las células epiteliales vecinas a la zona de la ovulación (el estigma) sujetas a mediadores inflamatorios y especies reactivas de oxígeno producidas durante la ruptura folicular inducen la apoptosis o su desprendimiento del ovario, sin embargo todas aquellas células que sobreviven y proliferan para curar la herida, sufren daños en el DNA acumulando mutaciones, que las hacen susceptibles a transformaciones malignas durante la replicación, elevando el riesgo de CEO (Auersperg, *et al.*, 2001 y Murdoch *et al.*, 2005). En consecuencia una mujer que tiene mayor número de ovulaciones tendría un incremento en el riesgo de padecer esta enfermedad. Se estima que las mujeres modernas ovulan de 400 a 500 veces durante su vida reproductiva, esto sería diez veces más el número de ovulaciones que tenían las mujeres del siglo IX.

2.2.2.2. Hipótesis de la inflamación.

Esta teoría propuesta por Bonello *et al.*, 1996, esta en parte relacionada con la anterior; ya que describe que el proceso ovulatorio es parecido a un proceso inflamatorio con infiltración de leucocitos y producción de citocinas, de esta manera cada vez que ocurre una ovulación se presenta la infiltración de leucocitos, liberación de óxido nítrico y citocinas inflamatorias, vasodilatación, reparación del DNA y remodelación tisular. La persistencia de daño genético por la presencia de factores inflamatorios podría ser un importante factor en la transformación de las células del OSE a CEO (Fleming *et al.*, 2006). Por otra parte, personas que presentan inflamación pélvica, principalmente endometriosis, han sido vinculadas con un mayor riesgo de desarrollar cáncer ovárico (Choi *et al.*, 2007).

2.2.2.3. Hipótesis de las gonadotropinas.

La teoría de las gonadotropinas propuesta por Cramer y Welch en 1983, propone que el desarrollo de cáncer de ovario es debido a los altos niveles circulantes de la FSH y LH, que alcanzan su pico durante los años perimenopáusicos y postmenopáusicos, y siguen elevados a partir de entonces provocando una estimulación excesiva del crecimiento de las células del epitelio superficial, las cuales expresan receptores para FSH y LH/hCG (Auersperg, 2001; Choi *et al.*, 2007 y Leung y Choi, 2007). Su efecto podría ser ejecutado directamente a través de la activación de genes que responden a estas hormonas llevando a esas células a una transformación maligna; o indirectamente a través de la estimulación del ovario a producir hormonas esteroides, que pueden influenciar a la transformación maligna por medio de mecanismos endocrinos o paracrinós. (Lukanova y Kaaks, 2005 y Choi *et al.*, 2007). También se ha demostrado que las gonadotropinas aumentan la angiogénesis y adhesión de células cancerígenas (Leung y Choi, 2007).

2.2.2.4. Las hormonas esteroide y el riesgo del CEO.

El modelo de las dos células, dos gonadotropinas describe el papel de las células de la teca y de la granulosa en la producción de los andrógenos y estrógenos; en donde las células de la teca bajo los efectos de la LH, transforman al colesterol en pregnenolona (P5) y esta es metabolizada a andrógenos, estos últimos pasan a las células de la granulosa en donde la FSH induce su aromatización para formar estrógenos (Drummond, 2006). La teoría de las hormonas esteroides (Risch, 1998) sugiere que factores endocrinos que controlan el crecimiento normal de tejidos blancos puede también proveer condiciones adecuadas para la transformación neoplásica. Además trata de explicar la relación entre niveles elevados de andrógenos que aumentan el riesgo del CEO y la exposición a P4 que disminuye el riesgo del mismo. Después de la menopausia y la pérdida de los folículos ováricos, los niveles elevados de LH estimulan al ovario a sintetizar andrógenos por medio de células intersticiales secundarias y por las células del hilio (Lukanova y Kaaks, 2005). Por otra parte se ha encontrado que los andrógenos estimulan la proliferación celular del OSE, y este hecho es respaldado por la asociación del síndrome de ovario poliquístico (asociado con el aumento en la secreción de andrógenos por el ovario) que lleva al incremento en el riesgo de CEO (Rinaldi *et al.*, 2007).

Algunos trabajos reportan que durante la menopausia, los estrógenos incrementan el riesgo de cáncer ovárico. En mujeres postmenopausicas con CEO se elevan los niveles de hormonas esteroides incluyendo E₂ y estrona, y hay evidencias de que estas dos hormonas son producidas por células cancerosas del OSE. Debido a lo anterior se sugiere que los estrógenos proveen un microambiente que promueve la progresión de las células tumorales y toman un papel activo regulando la proliferación, así como la invasión de estas células (Leung y Choi, 2007). El mecanismo por el cual se supone que los estrógenos puede estar asociados a la carcinogénesis, es que reducen la expresión del GnRH-R, de ese modo disminuyen el efecto antiproliferativo dado por GnRH; además los estrógenos modulan los niveles del factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), el cual estimula el crecimiento del OSE (Vanderhyden *et al.*, 2003).

Por otra parte hay evidencias de que la P4 tiene un efecto protector contra el desarrollo de CEO; ya que durante el embarazo los niveles de P4 son muy altos, y los de andrógenos bajan rápidamente, epidemiológicamente se ha demostrado que el riesgo de CEO disminuye por la presencia de P4, al haberse encontrado efectos inhibitorios de proliferación y aumento de la apoptosis (Auersperg y Woo, 2004; Rae y Hillier, 2005; Fleming *et al.*, 2006 y Leung y Choi, 2007).

Estas hormonas junto con los factores de crecimiento tienen un papel central en los procesos de proliferación, diferenciación y apoptosis. Por lo tanto la desregulación de esos procesos deja a la célula propensa a sufrir mutaciones en proto-oncogenes y genes supresores de tumores para poder sobrevivir y expandirse clonalmente (Lukanova y Kaaks, 2005). Todas estas hipótesis son apoyadas por estudios epidemiológicos que indican que el riesgo de padecer cáncer de ovario se reduce con el decremento del número de ovulaciones, embarazos, el uso de anticonceptivos orales, duración de la lactancia y menopausia temprana (Risch, 1998; Fleming *et al.*, 2006 y Leung y Choi, 2007). No obstante estos indicadores no son suficientes para explicar los acontecimientos que llevan al desarrollo del CEO.

2.2.3. Limitaciones para el estudio del CEO.

Aproximadamente el 60% de las mujeres que desarrollan cáncer ovárico mueren del mismo (Vanderhyden *et al.* 2003). Nuestro poco conocimiento sobre los eventos iniciales en la transformación de este tejido son debido a que el OSE es menos del 2% del tejido que conforma el ovario maduro, además su ubicación, fragilidad y el escaso acceso a tejido normal dificulta su estudio, otro problema es que pocas de las especies animales que comúnmente se utilizan en investigación como modelos experimentales no desarrollan cáncer epitelial de ovario de manera espontánea, lo que ha restringido el desarrollo de modelos en los cuales puedan ser estudiados los eventos tempranos de esta transformación neoplásica. Cultivos primarios del OSE fueron el primer modelo *in vitro* para el estudio de la carcinogénesis ovárica, sin embargo la información que podemos obtener *in vitro* es restringida, la senescencia de los cultivos, la fuente de obtención dependiendo de la edad de la mujer y factores asociados como la herencia y hábitos, y el mismo genoma hacen que las muestras sean diferentes cada vez y como consecuencia también los resultados. Estos modelos solo nos permiten evaluar oncogenes que son activados y quizás contribuyen al desarrollo del cáncer epitelial ovárico, proveen la oportunidad de el uso de acercamientos moleculares, como microarreglos o hibridación sustractiva por supresión para identificar diferencias en la expresión de genes que puedan distinguir a una célula del OSE normal de una cancerígena (Vanderhyden *et al.*, 2003 y Giles *et al.*, 2004 y 2006). Por lo que es necesario encontrar modelos animales en los cuales las células del OSE presenten transformación neoplásica, para poder tener la oportunidad de investigar los cambios moleculares y celulares asociados con la transformación del OSE, y de esta manera poder tener modelos que nos ayuden a estudiar la biología del cáncer ovárico de origen epitelial.

2.3. HORMONAS ESTEROIDES.

Los esteroides forman una subclase de lípidos caracterizados por una estructura esquelética básica denominada ciclopentanoperhidrofenantreno, formada de cuatro anillos fusionados. Se sintetizan por dos vías generales la de la pregnenolona ($\Delta 5$) y la de la progesterona ($\Delta 4$); ambas vías utilizan al colesterol como precursor (Yen *et al.*, 2001). Tienen un papel muy importante en el crecimiento y diferenciación de los tejidos reproductivos, además de mantener la fertilidad. La P4, los andrógenos y estrógenos, se sintetizan en el ovario y en la glándula suprarrenal de una manera secuencial, sirviendo cada uno como sustrato durante la vía esteroidogénica. Además hay aromatización de andrógenos en tejido graso (Drummond, 2006).

2.3.1. Andrógenos.

2.3.1.1. Producción, síntesis y transporte.

Los andrógenos son ampliamente conocidos por su papel en la espermatogénesis, el desarrollo de los genitales masculinos y la adquisición del caracteres sexuales en el varón; en la mujer se conocen por ser sustrato para la síntesis de estrógenos, pero hay menos información sobre la acción directa de estos sobre el ovario.

Testosterona y dihidrotestosterona (DHT) son parte de estos esteroides, los cuales se sintetizan en las células de Leydig de los testículos, en la corteza suprarrenal, el hígado y el ovario. El paso limitante para la síntesis de los andrógenos es la conversión del colesterol a P5 por el desprendimiento de la cadena lateral del colesterol por el citocromo P450c11A (CYP11A) en la mitocondria, después el citocromo P450c17 (CYP17) lo cataliza a 17 α -hidroxipregnenolona y después a dehidroepiandrosterona (DHEA), esta última es convertida por la 3 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa (3 β -HSD) a androstenediona; por otra parte la P5 puede ser convertida a P4 por la 3 β -HSD, después la CYP17 la cataliza a 17 α -hidroxiprogestero y enseguida a androstenediona. Finalmente la 17 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa (17 β -HSD) convierte a la androstenediona a testosterona, la cual actúa localmente o puede salir al torrente sanguíneo (Burger, 2002; Santtini, 2004 y Rae y Hillier, 2005). Este proceso es regulado por la LH de la hipófisis, la cual es controlada a su vez por la GnRH del hipotálamo y la retroalimentación negativa de los niveles de testosterona en la hipófisis como en el hipotálamo. Cuando la testosterona sale al torrente sanguíneo, esta se une a proteínas de transporte (albúmina, globulinas de unión a hormonas sexuales (SHBG) y globulinas de unión a corticosteroides (CBG)), el 44% es secuestrada con un alta afinidad por SHBG, mientras que aproximadamente el 50% están unidas con baja afinidad a albúmina y 4% a CBG, quedando aproximadamente el 2 % libre que es la fracción biológicamente activa. Una vez en tejidos blancos de andrógenos la testosterona es metabolizada a DHT por dos tipos de 5 α -reductasas (5 α -red); la tipo I que es expresada principalmente en glándulas sebáceas e hígado y la tipo II en folículos pilosos, hígado y próstata, así la DHT puede actuar localmente o viajar a otros tejidos (Santtini, 2004 y Gao *et al.* 2005), la afinidad de unión de DHT a SHBG es más alta que la testosterona, aun cuando DHT es solo aproximadamente el 5% de la testosterona en la sangre, por otro lado, una pequeña cantidad de testosterona (0.2%) puede ser convertida a E₂ por la CYP19, lo cual ocurre principalmente en tejidos adiposos y en el ovario. Tanto la reducción 5 α y aromatización por la CYP19 de la testosterona son procesos irreversibles, estos procesos junto con su inactivación en el hígado por reducción y oxidación, seguidos de glucoronidación y excreción renal ayudan a eliminar la testosterona del cuerpo (Gao *et al.*, 2005).

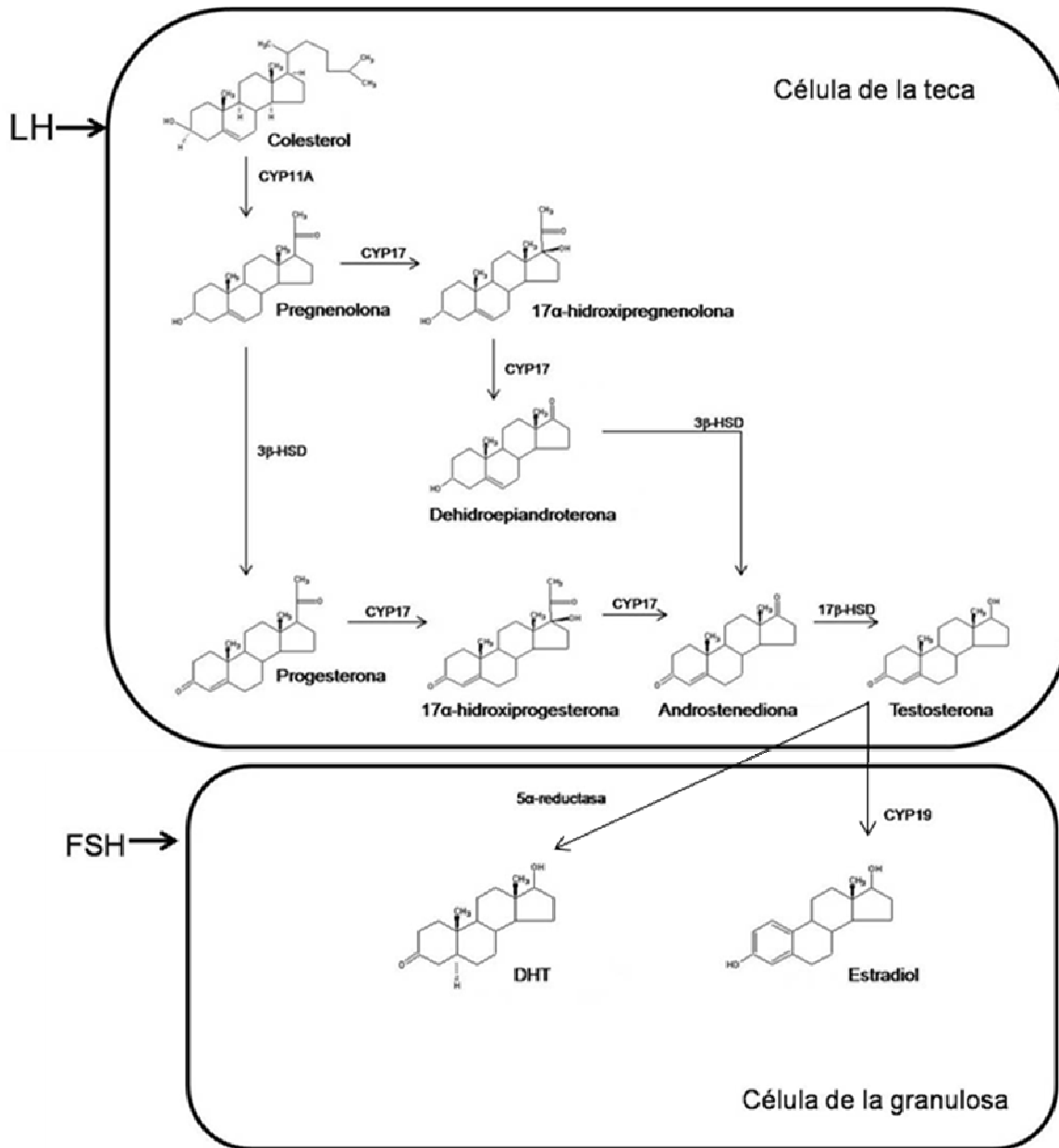


Figura 4. Modelo de las dos células, dos gonadotropinas en la biosíntesis de los andrógenos en los ovarios. La testosterona es sintetizada en las células de la teca y pasa a las células de la granulosa en donde es reducida a DHT o aromatizada para formar estradiol, Tomado de Santtini, 2004 y Drummond, 2006.

2.3.1.2. Función.

La actividad de los andrógenos depende de su concentración dentro de la célula y de su afinidad al AR, la concentración celular es afectada a su vez por la concentración en suero (hombres: androstenediona 1.4-7 nM, testosterona 10-38 nM y DHT 1-10 nM, y en la mujer: androstenediona 1.2-7 nM, testosterona 0.9-2.8 nM y DHT 0.3-1.2 nM); además la concentración interna también depende de la presencia del AR y de las enzimas involucradas en la síntesis de andrógenos. Los andrógenos tienen diferente afinidad para unirse al AR, esta afinidad está estrechamente relacionada con el potencial para activarlo. DHT es el andrógeno endógeno más activo por su alta afinidad al AR, siendo de 5 a 10

veces más potente que la testosterona en células que expresan 5 α -reductasa, mientras que en células con baja expresión de 5 α -red la testosterona es el andrógeno más importante debido a su concentración (Santtini, 2004).

Los andrógenos son vistos como hormonas masculinas, así la testosterona es responsable de estimular la formación de las estructuras reproductoras masculinas (el epidídimo, las vesículas seminales y los conductos deferentes) que se desarrollan desde el primordio del conducto de Wolff. Sin embargo, ésta no masculiniza directamente a la uretra, a la próstata, al pene o al escroto, estas funciones tardías son controladas por la DHT (Gilbert 2008). Los efectos de los andrógenos en los tejidos reproductivos son conocidos como efectos androgénicos (Gao *et la.* 2005), sin embargo, en la mujer tienen un alto significado fisiológico; ya que ayudan a mantener la fuerza y masa muscular, libido y la masa mineral ósea, se sintetizan tanto en los ovarios como en las glándulas suprarrenales (Snyder, 2001; <http://womenshealth.med.monash.edu.au/information.html>), el 50% de la testosterona es producida por ambos órganos, el otro 50% resulta de la conversión del dehidroepiandrosterona sulfato (DHEAS) suprarrenal a testosterona en otros tejidos del cuerpo.

Las glándulas suprarrenales son poco funcionales durante la niñez, pero en la pubertad comienzan a producir suficientes andrógenos induciendo los primeros cambios en ambos sexos conocidos como adrenarquia que los preparan para la maduración sexual. En la juventud los niveles de testosterona varían durante el ciclo menstrual con un pico máximo durante la fase media justo cuando la mujer esta ovulando, cuando hay bajos niveles de SHBG, la testosterona libre aumenta dándole características masculinas a la mujer como hirsutismo y acné. Con la edad la producción de andrógenos baja, junto con la actividad ovárica, la mujer entra a la menopausia, sin embargo después de esta fase, los andrógenos adrenales son los más importantes; ya que son la principal fuente tanto de testosterona como de estrógenos, así un papel importante de los andrógenos en la mujer es ser sustrato para la producción de estrógenos en el ovario y después de la menopausia cuando la actividad ovárica cae, los tejidos adiposos son la principal fuente de estrógenos (<http://womenshealth.med.monash.edu.au/information.html>). En la postmenopausia la concentración de testosterona en suero es ligeramente mas baja que en mujeres premenopáusicas, en contraste la concentración de androstenediona en mujeres postmenopáusicas es aproximadamente 50 veces más baja que en mujeres premenopáusicas, por lo que la secreción de testosterona pero no de androstenediona es mantenida en la menopausia; mientras que DHEAS es secretado en ambas fases de la mujer (Snyder, 2001).

El papel de los andrógenos en el ovario es actuar como sustrato para la CYP19 en las células de granulosa para la producción de estrógenos; en ausencia de gonadotropinas promueven la atresia folicular, estos efectos pueden ser por la pérdida de receptores estrogénicos mediados por el AR, así el aumento de los andrógenos sobre los estrógenos se asocia con las características morfológicas de la atresia; además de ejercer un efecto paracrino directo tanto a nivel hipofisiario como hipotalámico, en la hipófisis estimulan la producción de FSH pero no la LH, por el contrario, en el hipotálamo ejercen una actividad inhibitoria afectando la expresión de GnRH (Yen *et al.*, 2001).

2.3.2. Receptores nucleares.

La familia de los receptores a esteroides pertenece a la superfamilia de los receptores nucleares. Los receptores nucleares regulan la actividad transcripcional por la unión a secuencias específicas del DNA de genes blanco conocidos como elementos de respuesta a hormonas (HREs) (Aranda y Pascual, 2001; Horie-Inoue *et al.*, 2006); estos son encontrados en el promotor y en algunos casos están en las regiones potenciadoras localizadas río arriba del sitio de inicio de la transcripción. La mayoría de los receptores se unen como homo- o heterodímeros a HREs compuestos de dos motivos de seis nucleótidos cada uno configurados como palíndromo, palíndromo invertido o repeticiones directas (Aranda y Pascual, 2001). Una vez unido al DNA se lleva a cabo un reclutamiento de otros co-reguladores de la transcripción y de la maquinaria transcripcional para asegurar la expresión de los genes blanco (Gao *et al.*, 2005).

Un típico receptor nuclear consiste de una región N-terminal variable (A/B) con actividad promotor-célula específica, un dominio de unión a DNA (DBD) o región C, este es el dominio más conservado de los receptores nucleares, una región de bisagra o región D, y una conservada región E que consiste en el sitio de unión a ligando (LBD). Algunos receptores también tienen una región F en el C-terminal, sin función conocida, además contienen una región requerida para la activación transcripcional (A/F), en la cual la función de activación 1 (AF-1), en el extremo del N-terminal está constitutivamente activa, esta es independiente del ligando y es muy poco conservada entre los receptores, mientras que la función de activación 2 (AF-2), dentro del LBD en el lado del C-terminal es dependiente del ligando y es altamente conservado entre la superfamilia de los receptores nucleares (Aranda y Pascual, 2001; Claessens *et al.*, 2008).

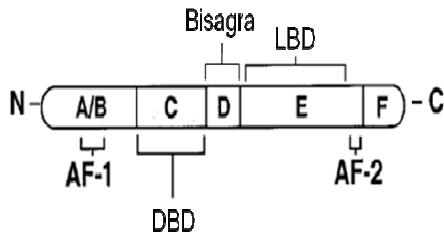


Figura 5. Representación de un receptor nuclear, el cual constan de un dominio de unión a DNA (DBD), un dominio de unión a ligando (LBD) y una región de bisagra, además de dos funciones de activación (AF-1 y 2) en los extremos amino (N) y carboxilo (C) respectivamente. Modificado de Aranda y Pascual, 2001.

2.3.2.1. Receptor a andrógenos (AR).

El AR es un miembro de la familia de los receptores a hormonas esteroides, de esta gran familia se han descrito cinco receptores esteroides en vertebrados, el de estrógenos α y β , progesterona α y β , andrógenos, glucocorticoides y mineralocorticoides (Gao *et al.*, 2005). En el humano el gen que codifica para AR está localizado en el cromosoma X en la posición q11-q12, con un tamaño de aproximadamente 110 kDa y tiene ocho exones en el marco de lectura abierto (Gobinet, *et al.*, 2002; Claessens *et al.*, 2008; Matsumoto *et al.*, 2008). El AR es una proteína soluble que funciona como un factor de transcripción y su función es regulada por la unión de andrógenos, los cuales inician cambios conformacionales del receptor que afectan la interacción proteína-receptor y receptor-DNA. Los ligandos para el AR pueden ser agonistas o antagonistas según su habilidad para activar o inhibir la transcripción de genes blanco del AR (Gao *et al.*, 2005).

El AR es una proteína de 919 aminoácidos que tienen tres dominios funcionales principales, el dominio del N-terminal (NTD), el cual tiene una función moduladora y es

codificado por el exón 1 (1586 pb); el DBD codificado por el exón 2 y 3 (152 y 117 pb respectivamente) confiere la habilidad de reconocer secuencias blanco específicas para activar ciertos genes, el LBD codificado por 5 exones los cuales varían de 131 a 288 pb, el cual es multifuncional; ya que además de la unión del ligando también media la homo y dimerización del receptor, contiene un “bolsillo” de unión a ligando (LBP), el cual acomoda al ligando; este dominio es principalmente hidrofóbico y esta ubicado en el fondo medio del LBD; también hay una pequeña región de bisagra entre el DBD y el LBD. Además en el N-terminal tiene una AF1, y en el C-terminal una AF2, por último el AR tiene una señal de localización nuclear (NLS), que ocupa una región entre DBD y la región bisagra (Aranda y Pascual, 2001; Gao *et al.* 2005; Claessens *et al.*, 2008).

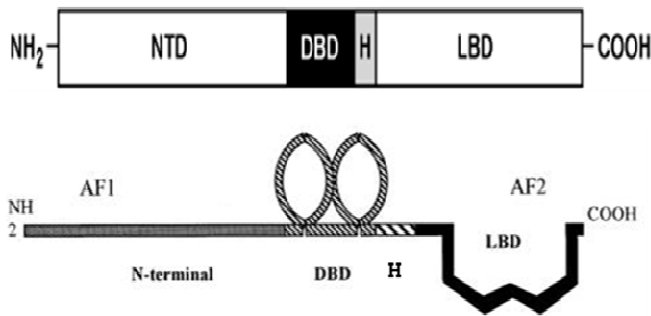


Figura 6. Representación del receptor a andrógenos, en la figura inferior se representan los dedos de zinc en el DBD y el bolsillo de unión a ligando (LBP) localizado dentro del LBD. Modificado de Gobinet *et al.*, 2002; Santtini, 2004.

La estructura de la proteína consta de 11 α -hélices (H1 a H12) y dos β -laminas, a diferencia de otros receptores el AR no presenta la H2. Al unirse el agonista, H12 localizada en el LBD es reposicionada y funciona como tapa para asegurar la unión del ligando y la β 2 trabaja como una cerradura para estabilizar la conformación de tapa creada por H12. Este proceso lleva a que AF2 sea funcional y lleve acabo el reclutamiento de co-activadores que interactúan con el dominio de interacción del receptor nuclear (NID). El DBD es requerido para la expresión de genes regulados por AR, la cual es conocida como la clásica función genómica de AR; en la cual el AR se une elementos de respuesta a andrógenos (AREs), estos AREs se caracterizan por ser palíndromos de una secuencia de 15pb (5'-AGAACAxxxTGTTCT-3') donde (x) son tres nucleótidos al azar, localizada en el promotor o región potenciadora de los genes blancos de AR, y pueden ser acomodadas en repeticiones invertidas o directas para que el AR las reconozca y se una. Por otra parte la vía no genómica involucra la activación rápida de cascadas de señalización de cinasas o modulación de los niveles de calcio intracelular, los cuales podrían estar relacionados con la estimulación de la comunicación por uniones estrechas, la plasticidad neuronal y la relajación aórtica (Gao *et al.*, 2005; Horie-Inoue *et al.*, 2006 y Matsumoto, *et al.*, 2008).

Cuando el AR no esta unido a su ligando esta ubicado en el citoplasma asociado con un complejo de proteínas de choque térmico (HSPs), al unirse el agonista, el AR sufre una serie de cambios conformacionales, liberándose de las HSPs para posteriormente pasar por un proceso de dimerización, fosforilación y translocación al núcleo, esta ultima mediada por la NLS (Gobinet, *et al.*, 2002 y Gao *et al.*, 2005). Una vez en el núcleo se une exclusivamente como homodímeros (Aranda y Pascual, 2001) a AREs, regulando la transcripción génica. Los co-reguladores al unirse a los receptores pueden determinar tres tipos de respuestas generales: una remodelación de la cromatina (cambian su estructura espacial), actuar como co-activadores (el conjunto receptor-cofactor produce una estimulación de la expresión del gen), o como co-represores (represión de la expresión del gen) (Matsumoto *et al.*, 2008).

Se han descrito 2 formas del AR, una de 87 kDa conocida como AR-A, y la otra de 110 kDa conocida como AR-B, esta última es la más abundante. Ambas tienen su extremo C-terminal intacto, pero AR-A tiene su N-terminal truncado, por lo que al parecer no es capaz de mediar todas las acciones androgénicas, siendo así AR-B la forma más activa dentro de las células (Wilson y McPhaul, 1994). El AR es expresado en numerosos tejidos, principalmente en aquellos que son blancos de andrógenos como próstata, músculo esquelético, hígado, sistema nervioso central, y es activado por la unión de andrógenos (Gao *et al.* 2005). Los ligandos endógenos nativos para el AR son la testosterona y DHT (Gobinet *et al.*, 2002; Matsumoto, *et al.*, 2008).

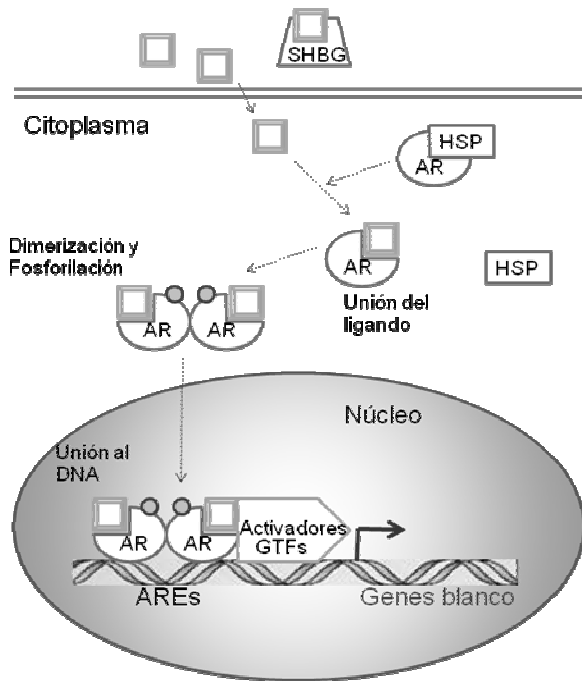


Figura 7. Esquema representativo de la vía clásica del AR, cuando la testosterona está libre pasa por difusión pasiva hacia el citoplasma de la célula, si la célula presenta 5 α -red la testosterona se transforma a DHT, ambos andrógenos se unen al AR induciendo su homodimerización, estos se translocan al núcleo y se unen a AREs para iniciar el reclutamiento de cofactores que ayudan a la amplificación de genes blancos del AR. Tomado de Gobinet, *et al.*, 2002 y Gao *et al.*, 2005

2.3.3. Andrógenos y cáncer epitelial ovárico.

Las hormonas esteroides son fundamentales para la función ovárica, regulan la expresión génica y la proliferación celular en el folículo ovárico. El OSE está en estrecho contacto con el folículo preovulatorio y por lo tanto expuesto a altas concentraciones locales de hormonas y factores de crecimiento presentes en el licor folicular (Lau *et al.*, 1999 y Edmonson *et al.*, 2002). Estudios epidemiológicos sugieren que los andrógenos y su receptor están involucrados en los eventos que favorecen el desarrollo y progresión del cáncer de ovario de origen epitelial (Riman *et al.* 1998; Risch, 1998 y Lukanova y Kaaks, 2005). El 90% de los tumores malignos de ovario son inmunopositivos para el AR y el riesgo de desarrollar cáncer de ovario está involucrado con los altos niveles de andrógenos circulantes; ya que estas hormonas promueven o inhiben la proliferación de células neoplásicas de ovario dependiendo de las características del tumor. Otros factores de riesgo para las neoplasias ováricas están relacionados con eventos hormonales como la perimenopausia, la menopausia, tratamientos hormonales para la inducción de la ovulación y el sobrepeso entre otros (Lukanova y Kaaks, 2005).

La conservación de la expresión del AR después de la transformación de células normales a fenotipos malignos sugiere que los andrógenos podrían tener un papel en la

génesis del CEO (Evangelou *et al.*, 2003 y Gadducci *et al.*, 2004). Se ha demostrado que los niveles de andrógenos en el plasma sanguíneo en pacientes con cáncer ovárico se elevan en comparación con los controles; androstenediona y DHEA se detectan en altos niveles en mujeres que posteriormente son diagnosticadas con cáncer ovárico (Gadducci *et al.*, 2004), además se encontró una correlación de niveles de androstenediona con el estado y volumen del tumor. En cultivos primarios de OSE humano se ha encontrado que el AR se expresa heterogéneamente sin importar la edad y el estado de la menopausia, estos cultivos responden a los andrógenos (1nM) después de 24 horas con una inducción en la síntesis de DNA, proliferación y en algunos casos protección contra la apoptosis (Edmonson *et al.*, 2002). Por otra parte se ha reportado que DHT es mejor estimulante para la proliferación que la testosterona, pero en líneas celulares de cáncer ambos andrógenos son igual de potentes (Gadducci *et al.*, 2004). Sin embargo por medio de estudios prospectivos no se ha observado una relación entre el aumento de los niveles de andrógenos en suero y el riesgo de cáncer de ovario (Helzlsouer *et al.* 1995, Lukanova *et al.*, 2003; Rinaldin *et al.*, 2007; Tworoger *et al.*, 2008). No obstante se piensa que como el OSE es un tejido limitado en vasculatura, las fuentes endócrinas de andrógenos quizás sean más importante que las fuentes paracrinas; por ejemplo, DHEAS que es derivado de las glándulas suprarrenales, no ha sido asociado claramente con el riesgo de cáncer ovárico, mientras que la androstenediona la cual es aproximadamente 50% derivada del ovario se ha relacionado con el riesgo de esta enfermedad en dos de los cuatro estudios mencionados. Por lo que el efecto de los andrógenos en la carcinogénesis ovárica debe de ser estudiado más ampliamente.

2.4. CADHERINAS.

La adhesión célula-célula o entre las células y la matriz extracelular es crítica en la dinámica de los procesos morfogénéticos que ocurren durante el desarrollo embrionario y en el mantenimiento de la integridad de los tejidos en organismos adultos, (Ramburan y Govender, 2002; Patel *et al.*, 2003; Leckband y Prakasam, 2006). Las moléculas encargadas de esta función están divididas en cuatro familias proteicas, las cadherinas, las integrinas, las selectinas y las proteínas parecidas a inmunoglobulinas (Nolletl *et al.*, 2000).

Las cadherinas son una superfamilia de glucoproteínas transmembranales de un solo paso que intervienen en la adhesión celular dependiente de calcio predominantemente a través de interacciones homotípicas entre sus dominios extracelulares (Pötter *et al.*, 1999; Leckband y Prakasam, 2006). Esta superfamilia se divide a su vez en cinco subfamilias que comprenden a las cadherinas clásicas o de tipo I, las atípicas o de tipo II, las desmocollinas, las desmogleinas y las protocadherinas o proteínas parecidas a cadherinas (Nolletl *et al.*, 2000). Las cadherinas clásicas incluyen a E- y N-cadherina, son las más estudiadas y se llaman según el tejido en el cual se encontraron, epitelial y neural respectivamente, aunque esto no indica que sean exclusivas del mismo. E-cadherina, es una glucoproteína de 120 kDa expresada por todas las células epiteliales. El gen que codifica para E-cadherina está localizado en la posición 16q22.1. N-cadherina es una glucoproteína de 135 kDa originalmente encontrada en tejido neural y muscular, pero se ha identificado en tejidos no musculares como testículos, riñón e hígado. El gen que codifica para N-cadherina está localizado en la posición 18q12.1 (Ramburan y Govender, 2002).

2.4.1. Estructura.

La estructura básica de las cadherinas clásicas consisten de un dominio extracelular de aproximadamente 550 residuos de aminoácidos, seguida por una región transmembranal y un dominio citoplasmático altamente conservado de aproximadamente 150 residuos de aminoácidos. Al ser sintetizadas como proteína precursora incluyen una secuencia señal y un propéptido del lado amino terminal de aproximadamente 155 residuos. Este precursor de aproximadamente 135 kDa sufre modificaciones postranscripcionales (glicosilación, fosforilación y segmentación proteolítica) resultando en una proteína madura de un peso aproximado de 120 kDa (Pötter *et al.*, 1999; y Nolletl *et al.*, 2000).

La región extracelular de las cadherinas clásicas está compuesta de 4 ectodominios peptídicos homólogos (EC1-EC4) y un quinto dominio extracelular próximo a la membrana con menos homología (EC5 o MPED), cada EC consiste de 110 residuos de aminoácidos y son responsables del contacto celular y la formación de uniones intercelulares, cada EC se pliega en una estructura de β -barril de 7 filamentos, con un alto grado de conservación en secuencia y la distancia que es requerida para la dimerización y unión de iones calcio; entre cada EC se encuentran secuencias peptídicas altamente conservadas de 12 residuos de aminoácidos con motivos de unión a calcio (LDRE, DXNDN y DXD), la unión de tres iones de calcio entre cada uno de los EC da un cambio estructural, pasando de una forma globular a una forma alargada, rígida y resistente a proteasas ($> 40\mu\text{M}$ de Ca^{2+}), entonces se lleva a cabo un ordenamiento de las cadherinas formando dímeros paralelos en la superficie de una misma célula, estos dímeros se unen a otros dímeros de células adyacentes formando un "zipper", estos dos pasos son necesarios para la función de adhesión. Sin embargo para la funcionalidad completa del complejo de adhesión es necesario que se unan al citoesqueleto de actina (Pötter *et al.*, 1999; Nolletl *et al.*, 2000;

Leckband y Prakasan, 2006), para ello forman complejos a través de varias interacciones específicas con proteínas citoplasmáticas llamadas cateninas, las cuales a su vez se unen a filamentos de actina para la estabilización del complejo (Ramburan y Govender, 2002). Esta estabilización dada por el citoesqueleto de actina es crucial en procesos que ocurren durante la vida de diferentes líneas celulares: epiteliales (polaridad, migración, carcinogénesis, etc.), endoteliales (angiogénesis, función de barrera, trans migración de células blancas, etc.), mesenquimáticas-tumorogénicas (migración) y neuronales (sinapsis, migración del cono de crecimiento, etc.) (Mege *et al.*, 2006).

Las cadherinas clásicas presentan un alto grado de similitud entre sus EC en secuencia proteica del 68 a 78% y comparadas con las demás subfamilias de cadherinas solo presentan una similitud del 43 al 50%, además las cadherinas clásicas en su EC1 tienen un motivo HAV (His-Ala-Val) que media la adhesión celular y determina su selectividad, de igual forma el EC5 contiene 4 cisteínas conservadas importantes para la dimerización intramolecular (Pötter *et al.*, 1999; Nolletl *et al.*, 2000; y Leckband y Prakasam, 2006). El dominio citoplasmático es altamente conservado con un dominio conservado proximal a la membrana (MPCD) y sitio de unión a cateninas (CBS) que consta de aproximadamente 72 residuos en el C-terminal, dentro de este sitio hay un núcleo de 30 residuos esenciales para la unión de las cateninas; este núcleo contiene 8 serinas bien conservadas que son fosforiladas para la unión subsiguiente de las cateninas (Pötter *et al.*, 1999 y Nolletl *et al.*, 2000).

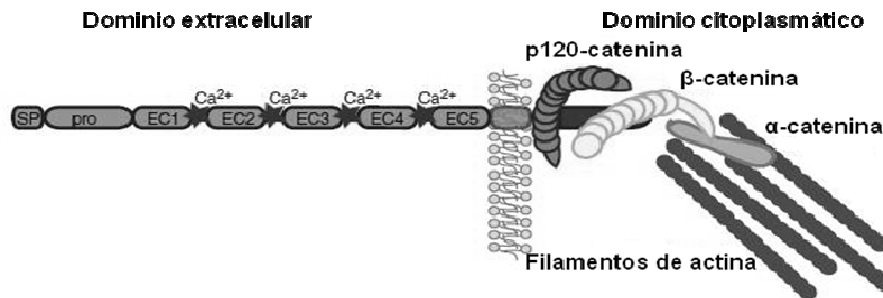


Figura 8. Representación de las cadherinas clásicas. Al ser sintetizada en el complejo de Golgi esta proteína lleva una secuencia señal (SP) y un propéptido (pro) que posteriormente serán degradados para dejar una proteína madura insertada en la membrana celular a través de su región transmembranal. En la región extracelular se encuentran los EC1-5 y entre cada EC se encuentran los sitios de unión a calcio, en la región citoplasmática se encuentra el CBS al cual se unen las cateninas para anclar a la cadherina al citoesqueleto y dar estabilidad al complejo de adhesión. Modificada de Wheelock *et al.*, 2007.

2.4.2. Función.

Las cadherinas tienen múltiples funciones, las cuales incluyen adhesión, selectividad y señalización celular; las dos primeras son llevadas a cabo por el dominio extracelular, mientras que la señalización es realizada por el dominio citoplasmático, estas funciones en conjunto resultan en la regulación de la apoptosis, mantenimiento de la morfología de los tejidos, la diferenciación y motilidad celular y el establecimiento de la polaridad celular (Leckband y Prakasam, 2006).

La adhesión célula-célula en el epitelio es llevada a cabo por uniones estrechas ("tight junctions"), adherentes ("adherence junctions") y de brecha ("gap junctions"). Estas diferentes uniones están formadas de proteínas transmembranales conectadas a un

número de proteínas citoplasmáticas que estabilizan el complejo al unirse al citoesqueleto. Aunque esas uniones comprenden diferentes proteínas especializadas, hay similitudes en el papel que juegan en la formación de los contactos extracelulares entre células, y el vínculo intracelular con el citoesqueleto y la activación de vías de señalización incluyendo la regulación de la transcripción de genes (Hartsock y Nelson, 2007). Las uniones estrechas y adherentes están involucradas en la resistencia y polaridad celular al formar algunos tejidos, e inhiben la proliferación celular durante la tumorigénesis (Sundfeldt, 2003), mientras que las uniones de brecha son fundamentales en el intercambio metabólico del transporte de pequeñas moléculas entre las células (Yen *et al.*, 2001).

Las uniones adherentes se encargan de establecer la adhesión celular, regulación del citoesqueleto, señalización intracelular y regulación de la transcripción. E-cadherina es la cadherina clásica más abundante en las uniones adherentes formando el núcleo transmembranal el cuales interactúan con la familia de las cateninas que a su vez unen el complejo del citoesqueleto para poder controlar la formación, mantenimiento y función de este tipo de uniones. La formación de las uniones adherentes esta asociada con la formación y localización de las proteínas de las uniones estrechas, sin embargo la presencia de E-cadherina no es necesaria para mantener la organización de las uniones estrechas. Por otra parte las uniones estrechas funcionan principalmente como una cerca que previene la mezcla de proteínas membranales entre la membrana apical y la basolateral y como una puerta la cual controla el paso paracelular de iones y solutos. Contienen dos tipos de proteínas transmembranaes, las claudinas y ocludinas, las cuales interactúan con una familia de proteínas citoplasmáticas (ZO-1, ZO-2 y ZO-3) y a su vez estas se unen al citoesqueleto y a las uniones estrechas. (Hartsock y Nelson, 2007).

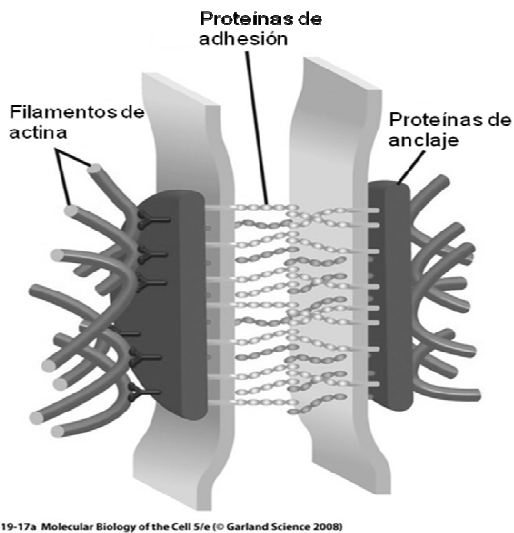


Figura 9. Esquema de las uniones adherentes. Estas uniones están formadas por cadherinas, las cuales a su vez están unidas al citoesqueleto por medio de un complejo de proteínas de anclaje llamadas cateninas. Tomado y modificado de Alberts *et al.*, 2008.

Durante el desarrollo embrionario se presentan cambios espacio-temporales en la expresión de cadherinas los cuales están asociados con la organización durante la segmentación y el reordenamiento celular. El establecimiento de las distintas interfaces tisulares durante el desarrollo es atribuido a reconocimientos específicos entre células adyacentes, y la formación de estas uniones es debido a que las cadherinas de una célula solo se adhieren a otras cadherinas idénticas de la célula adyacente (Leckband y

Prakasam 2006), jugando un importante papel en la formación y mantenimiento de la gastrulación, neurulación y organogénesis. La expresión y función de E-cadherina es esencial para la implantación del embrión al endometrio (Rowlands *et al.*, 2000) y la inducción y mantenimiento de la polarización y diferenciación epitelial durante todo el desarrollo embrionario (Ramburan y Govender 2002); mientras que N-cadherina es requerida para la compactación de las células durante la formación de las somitas y del tejido cardíaco (Rowlands *et al.*, 2000; Peinado *et al.*, 2004).

En tejidos adultos la adhesión mediada por cadherinas genera uniones estrechas, las cuales son lo suficientemente plásticas para la rápida remodelación tisular, dando lugar a la movilidad celular y permitiendo que las células se reordenen durante la morfogénesis. E-cadherina es esencial para la integridad del epitelio el cual a través de las uniones adherentes forma una barrera de transporte entre el lumen y el flujo sanguíneo. Los mayores defectos morfológicos y la pérdida estructural en tejidos resultan de la expresión ectópica o alterada de cadherinas; además la pérdida de la adhesión mediada por E-cadherina se correlaciona en un incremento de la invasión y metástasis en diversos cánceres humanos (Ramburan y Govender, 2002; Leckband y Prakasam, 2006 y Tsuchiya *et al.*, 2006).

2.4.3. Cadherinas en el ovario.

Las cadherinas juegan un papel crucial en el mantenimiento de la estructura, diferenciación y función de los tejidos reproductivos. En el ovario se encargan del mantenimiento de la arquitectura ovárica y la foliculogénesis; dentro de los compartimentos del ovario se expresan de forma específica según el tipo celular, E-cadherina es más abundante en el compartimento teco-intersticial, mientras que N-cadherina en los compartimentos epiteliales como en las células de la granulosa y OSE (Machell *et al.*, 2000; Ramburan y Govender, 2002 y Machell y Farookhi, 2003), además su expresión muestra cambios durante cada uno de los estados por los que pasan las células del ovario. En el OSE normal la expresión de E-cadherina es casi nula, se ha encontrado que su expresión es ausente en cultivos de células del OSE y poco frecuente en células del OSE *in vivo* (Ramburan y Govender 2002). Mientras que N-cadherina es la más abundante de las cadherinas expresada en la superficie de las células de la granulosa y del OSE (Pon *et al.*, 2005). Así la adhesión del OSE es debido a N-cadherina vinculada a cateninas (Peralta *et al.*, 1997). Se ha demostrado que el contacto célula-célula mediado por N-cadherina suprime la apoptosis y mantiene la viabilidad de las células de la granulosa y del OSE por medio de la estimulación de la fosforilación de tirosinas del receptor del factor de crecimiento fibroblástico (FGF-R). En el folículo preantral se encuentran múltiples capas de células de la granulosa, las cuales expresan N-cadherina, con un máximo de su expresión en folículos preovulatorios, al inicio de la lutenización se da un decremento en la expresión y al formarse el corpus albicans desaparece la expresión (Machell y Farookhi, 2003; Tsuchiya *et al.*, 2006). La expresión de E-cadherina tanto en el ovocito como en las células de la granulosa depende del estado folicular, su pérdida está relacionada con la desintegración de las uniones adherentes en células de la granulosa para la formación del antro y maduración folicular, principalmente en folículos preovulatorios (Machell *et al.*, 2000), y el aumento en su expresión comienza de nuevo dentro del folículo lutenizante (Machell y Farookhi, 2003). En los folículos preantrales y antrales la expresión de E-cadherina es mínima, mientras que N-cadherinas es mantenida en ovocitos y células de la granulosa (Machell *et al.*, 2000). Toda esta expresión de cadherinas es regulada hormonalmente por el eje hipotálamo-hipófisis-ovario (Tsuchiya *et al.*, 2006).

Durante la ovulación el OSE humano regula la expresión de N-cadherina por las gonadotropinas FSH y LH/hCG. Esta regulación es a través del sistema ubiquitina-proteosomas o por metaloproteasa de la matriz, las cuales median la degradación de N-cadherina; y a través de la regulación transcripcional del gen codificante para N-cadherina, en donde las gonadotropinas elevan los niveles de adenosin monofosfato cíclico (cAMP) por la vía de la adenilato ciclase, este cAMP activará a la proteína cinasa A (PKA) que fosforila a la proteína de unión a elementos de respuesta a cAMP (CREB) para inhibir la transcripción. Así al bajar los niveles de N-cadherina, esas células son inducidas a apoptosis facilitando la ovulación, por lo que la reducción de N-cadherina es un evento crucial en el ciclo ovulatorio, al controlar la capacidad de supervivencia del OSE humano, el cual juega un papel importante en el control de la ovulación (Pon *et al.*, 2005).

2.4.4. Cadherinas y cáncer.

Cambios en la expresión de cadherinas y cateninas o por la activación de vías de señalización que eviten la formación de uniones adherentes en las células se han relacionado con varios tipos de cáncer. La deficiencia de la adhesión mediada por cadherinas es uno de los principales factores que da a las células una característica tumoral; en las células tumorales contribuyen a que aumenten su motilidad y proliferación obteniendo caracteres invasivos y metastásicos (Conacci-Sorrell *et al.*, 2002). La falta de adhesión en los tumores primarios permite la liberación de las células cancerosas, para posteriormente invadir tejidos que los rodean a través de los nódulos linfáticos y vasos sanguíneos, una vez en los órganos blancos los invaden y proliferan. La expresión de las cadherinas en diversos tipos de cáncer es variable, E-cadherina se puede encontrar en tumores de colón, estómago, mama, piel, vejiga urinaria, pulmón, tiroides y estados metastásicos de cáncer ovárico; mientras que N-cadherina es encontrada en tumores de origen mesodermal y neuroectodermal como mesoteliomas pleurales, astrocitomas y glioblastomas, y rhabdomyosarcomas (Peralta *et al.*, 1997).

2.4.4.1. Cadherinas y cáncer de ovario.

Alteraciones en los niveles de expresión de E- y N-cadherinas ha sido relacionado con el desarrollo de cáncer de ovario. Altos niveles de E-cadherina han sido detectados en el OSE en quistes de inclusión, el precursor más común de las masas tumorales ováricas (Patel *et al.*, 2003), por otro lado una disminución en los niveles de expresión de E-cadherina en esas mismas células hace que pierdan la característica epitelial y adquieran una conducta mesénquimal y al mismo tiempo una capacidad invasiva; proceso también llamado transición epitelio-mesénquima (EMT) (Ahmed *et al.*, 2007). La expresión inapropiada de cadherinas no epiteliales, como N-cadherina, en lugar de E-cadherina, quizá juegue un papel importante en fenotipos invasivos y metastásicos. La alta expresión de N-cadherina sustituyendo la expresión de E-cadherina ha sido llamada switch de cadherinas ("*cadherin switching*"). El switch de E- a N-cadherina es responsable de los cambios en el fenotipo de células epiteliales a dispersión fibroblástica (Hajra y Fearon, 2002). Por lo que E-cadherina es una pieza clave en la transformación neoplásica del OSE humano.

Una de las causas de la patogénesis del CEO son mutaciones en el gen que codifica a E-cadherina (*CDH1*) tanto en la línea germinal como en la somática, resultando en la alteración de la expresión de cadherinas, sin embargo para el caso de cáncer de ovario no se han observado mutaciones en la línea germinal y en la línea somática son muy bajas. Por otra parte alteraciones en la expresión de cadherinas también pueden ser por mecanismos epigenéticos, que incluyen alteraciones en la expresión de factores de transcripción que regulan la expresión del gen que codifica para cadherinas,

hipermetilación del promotor y remodelación de la cromatina. Pero tanto la hipermetilación como el remodelamiento de la cromatina quizás tengan que ver como una consecuencia del efecto represivo de factores de transcripción involucrados en el promotor del gen para cadherinas, ambos procesos juntos resultan en la silenciamiento del gen (Hajra y Fearon 2002; Conacci-Sorrell *et al.*, 2002).

Los carcinomas ováricos tienen diferentes tipos histológicos los cuales muestran diferencias en su conducta y biología. Veitch *et al.*, 1994, Darai *et al.*, 1997; Fujioka *et al.*, 2001 reportaron que hay un aumento en la expresión de E-cadherina en tumores bien diferenciados y casi nula en tumores poco diferenciados, Wong *et al.*, 1999 reportó un aumento en la expresión de E-cadherina en cultivos de OSE de pacientes con historia familiar de cáncer de ovario y Marques *et al.*, 2004 reportó que en la mayoría de los casos de CEO con metástasis son negativos a E-cadherina. Por otra parte la expresión de N-cadherina se encuentra en tumores poco y moderadamente diferenciados, mientras que en los tumores bien diferenciados son negativos. Lo que indica que hay un decremento de la expresión de N-cadherina y aumento en la de E-cadherina en los estados iniciales de la enfermedad y en los estados tardíos del proceso cuando las células están poco diferenciadas y adquieren una capacidad invasiva, los niveles de N-cadherina aumentan y los de E-cadherina bajan. Ambas cadherinas han sido detectadas en neoplasmas benignos y malignos derivados del OSE, encontrando que una alta expresión de E-cadherina funciona como marcador para identificar fenotipos de alto riesgo para cáncer de ovario (Marques *et al.*, 2004). La expresión diferencial de cadherinas puede ser utilizada para distinguir entre algunos tumores ováricos. Tumores serosos y endometriales expresan N- y E-cadherina, mientras que tumores mucinosos solo expresan E-cadherina (Peralta *et al.*, 1997).

2.4.5. La vía de señalización *Wingless* (Wnt) y el complejo cadherina-catenina en cáncer.

Las cateninas han sido clasificadas en α -, con un peso de 102 kDa, β -, con un peso de 92 kDa y γ -catenina de un peso de 83 kDa. β -catenina se une directamente al CBS de las cadherinas, enseguida se une α -catenina a β -catenina, y finalmente el complejo cadherina-cateninas se une al citoesqueleto de actina por medio de α -catenina obteniendo estabilidad. Hay otra catenina llamada p120ctn de 120 kDa y se une directamente al MPCD de las cadherinas (Ramburant y Govender 2002), involucrada con la regulación de la expresión de las cadherinas (Yap *et al.* 2007).

En la célula hay dos pozas de β -catenina una localizada cerca de la membrana plasmática asociada a cadherinas y otra involucrada en la vía de señalización Wnt (*Wingless*) y transcripción de genes que regulan la actividad de la β -catenina citoplasmática. Esta segunda poza es regulada por una serie de proteínas citoplasmáticas: una proteína supresora de tumores adenomatus polyposis coli (APC), la proteína AXIN y por la cinasa glucógeno sintetasa 3 β (GSK3 β). En la ausencia de la señal de Wnt, esta poza de β -catenina se encuentra unida a AXIN y APC y fosforilada por GSK3 β en una o mas serinas o treoninas en su dominio N-terminal; este dominio fosforilado es reconocido por β -TrCP que ubiquitina a β -catenina para después ser degradada por la vía del proteosoma (Polakis, 2001) y en el núcleo la proteína Gaucha se une al factor de célula T (Tcf), que inhibe la transcripción de genes blanco de β -catenina (Clevers, 2006 y McDonald *et al.*, 2007). Cuando Wnt se une a el complejo receptor de Frizzled con una proteína relacionada con el receptor de lípidos de baja densidad (Fz-LRP5/6), la vía de señalización se activa; Fz interactúa con Dishevelled (Dsh), una proteína citoplasmática que inhibe a GSK3 β ; por otro lado casein cinasa 1- γ (CK1 γ)

inducida por Wnt fosforila a LRP5/6 en su dominio citoplasmático que a su vez secuestra a AXIN; dando como resultado la estabilidad de β -catenina; en el núcleo β -catenina desplaza a la proteína Gaucha para formar un complejo con la familia de factores de transcripción Tcf/Lef (Lef: Factor de incremento linfoide), resultando en la transcripción de genes blanco del complejo β -catenina-Tcf/Lef (Clevers, 2006; Hajra y Fearon, 2002) tales como *MYC*, *cyclin D*, *metaloproteasa de la matriz 7(MMP-7)*, *Tcf7*, *Lef-1* (Hajra y Fearon, 2002), *fribronectina* y *matrilisina* entre otros (Sánchez *et al.*, 2005), los cuales inducen a la transformación y proliferación celular (Yang *et al.*, 2002).

La alteración del complejo E-cadherina-catenina, debido a la baja expresión de E-cadherina, provoca que los niveles de β -catenina citoplasmática se eleven, uniéndose al receptor de andrógenos y disparando su actividad transcripcional independiente de ligando (Yang *et al.*, 2002), también el complejo β -catenina-Tcf/Lef aumenta (Hajra y Fearon, 2002), resultando en fenotipos malignos que llevan al desarrollo de cáncer.

Las mutaciones en el gen que codifica para α -catenina (*CTNNA1*) y β -catenina (*CTNNB1*) también se han demostrado en diversos cánceres incluyendo el de ovario. Por otra parte mutaciones en genes de proteínas involucradas en la vía de señalización Wnt, además de las cateninas, también han sido encontradas en cánceres ováricos (Hajra y Fearon, 2002; Conacci-Sorrell *et al.*, 2002).

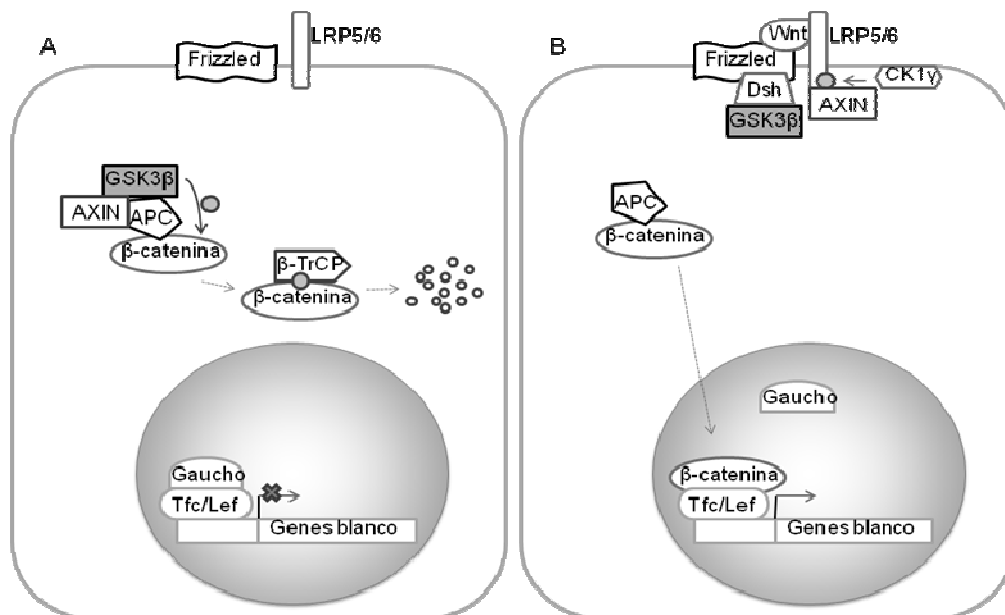


Figura 10. Esquema de la vía de señalización de Wnt. A, cuando no está la Wnt β -catenina se une al complejo formado por APC-AXIN-GSK3 β , esta última fosforila a β -catenina, lo que resulta en su reconocimiento por β -TrCP y la degrada. B, cuando existe Wnt el receptor Frizzled interactúa con Dsh inactivando a GSK3 β , por lo que β -catenina no es fosforilada y puede viajar al núcleo para unirse a los factores de transcripción Tcf/Lef iniciando la transcripción de genes blanco de este complejo. Tomado de Polakis, 2001 y Clevers, 2006.

2.5. MODELO BIOLÓGICO.

Las aves al igual que los mamíferos exhiben una determinación sexual genética, en la cual el sexo es definido en el momento de la fertilización; las aves tienen un sistema de cromosomas sexuales ZZ para machos y ZW para hembras, los cuales tienen genes determinantes del sexo que actúan dentro de las gónadas embrionarias, activándose durante la embriogénesis e induciendo la formación de testículos u ovarios (Villalpando *et al*, 2000; Smith y Sinclair, 2004).

Las crestas gonadales se desarrollan a partir del mesodermo intermedio, por el día 3.5 de 21 días de periodo embrionario, en la superficie medioventral de los riñones embrionarios; las gónadas comprenden una capa epitelial externa, derivada del engrosado epitelio celómico (corteza), debajo de la corteza se encuentra una médula que consta de cordones de células somáticas separadas por la pérdida del mesénquima, los cordones medulares parecen derivar del epitelio celómico. Las células germinales primordiales (PGCs) se originan en el epiblasto y migran dentro de las gónadas por vía del flujo sanguíneo. Las gónadas embrionarias del pollo son indiferenciadas o bipotenciales entre los días 3.5 y 4.5, durante el desarrollo embrionario la corteza prolifera preferencialmente en el ovario y la médula en testículos. La diferenciación se hace evidente al 6.5 (Smith y Sinclair, 2004).

Los embriones de pollo hembra muestran asimetría en el desarrollo gonadal; solo la gónada izquierda pasa a ser ovario, mientras que la gónada derecha crece un poco y después sufre regresión. En la gónada izquierda células somáticas y germinales proliferan dentro de la corteza, engrosándola considerablemente, mientras que los cordones de la médula pasan a ser vacuolados y forman los espacios lacunares. Las PGCs pasan subsecuentemente a fase de meiosis I después del día 8 y comienza la foliculogénesis. Las células de la granulosa y teca derivan probablemente de las células somáticas corticales y/o de las células medulares que migran justamente debajo de la corteza encerrando a las células germinales. La asimetría del desarrollo gonadal podría estar dada por la inactivación, en la gónada derecha, de algunos genes que son esenciales para el desarrollo del ovario (Smith y Sinclair, 2004).

En vertebrados euterios, la biosíntesis y liberación de hormonas gonadales comienza después de la diferenciación de las gónadas; ya que el desarrollo gonadal durante la embriogénesis es resistente a esteroides sexuales y la diferenciación puede proceder en ausencia de esteroidogénesis; en vertebrados no euterios es necesaria la presencia de esteroidogénesis; ya que la diferenciación de las gónadas ocurre fuera del cuerpo materno, por lo que no hay una fuente de esteroides sexuales, de esta manera en aves la presencia de hormonas es necesaria para la diferenciación de las gónadas. Las enzimas CYP19 y 17 β HSD son necesarias para la síntesis de estrógenos, y solo son expresadas en los cordones medulares de gónadas femeninas en el comienzo de la diferenciación morfológica (días 6 a 6.5), por lo que estas enzimas son esenciales para el dimorfismo sexual, y los genes involucrados en la activación de ambas se encuentran en el cromosoma W de la hembra. Dos de estos genes han sido mapeados en este cromosoma, el primero de ellos es el gen ASW (del inglés Avian Sex-specific W-linked) y el segundo es FET1 (del inglés Female-Expressed Transcript 1), ambos con una fuerte expresión en las gónadas, siendo más alta en la gónada izquierda, justo al comienzo de la diferenciación gonadal del embrión. Ambos genes son determinantes para la formación del ovario, y son expresados justo antes de la activación de la CYP19, por lo que podrían estar involucrados en la activación de la misma (Smith y Sinclair, 2004). Entre las 147 y 155 horas de incubación se encuentra un nivel basal de CYP19, pero a las 156 horas

comienza a subir sus niveles, lo que concuerda con la biotransformación de androstenediona a estrona, esta última será transformada a estradiol por la 17- β HSD, y los niveles de esta estrona son altos en el ovario izquierdo en comparación con el derecho. La alta expresión de CYP19 en el ovario izquierdo a las 156 horas de incubación probablemente active la proliferación de la corteza y promueva la diferenciación del ovario (Villalpando *et al*, 2000). El receptor a estrógenos se ha identificado en la corteza de las gónadas de ambos sexos antes de la diferenciación, pero la síntesis de estradiol en la médula de la gónada femenina estimula el desarrollo de la corteza por medio de la unión a estos receptores (Smith y Sinclair, 2004). La expresión de receptor de estrógenos es más alta en la corteza del ovario izquierdo a los 7.5 días de incubación (Villalpando *et al*, 2000).

Se ha demostrado que estrógenos son sintetizados por las gónadas de los embriones de pollo durante su desarrollo temprano, estos parecen jugar un papel importante en la diferenciación gonadal de las aves. Se han encontrado altos niveles de estrógenos en el ovario izquierda a los 6.5 días de incubación, protegiendo al ducto de Müller de la regresión por la hormona antimülleriana (AMH), no obstante al mismo tiempo se han detectado bajos niveles de estrógeno en el ovario derecho, por lo que la AMH lleva una regresión del conducto de Müller (Villalpando *et al*, 2000).

La gallina doméstica, como el humano es la única en desarrollar neoplasmas ováricos espontáneos y con una incidencia relacionada a la edad, además, similar al humano tiene una capa simple superficial de células epiteliales cuboidales que recubren al ovario; también por tener persistentes ovulaciones, se puede comparar con la historia reproductiva de la mujer, quien a menudo tiene 10 a 20 años de ovulación cada mes antes de un embarazo, seguido por otros 10 a 20 años de ovulación antes de la menopausia (Giles *et al*. 2004; Giles *et al*, 2006). Por otro lado el embrión de pollo presenta varias ventajas; ya que es de fácil manejo, se puede controlar los estadios de su desarrollo, su manejo es individual y al ser un sistema cerrado no hay intervención de hormonas esteroides placentarias.

Algunos tumores ováricos también aparecen espontáneamente en algunas cepas de ratones y en ratas Wistar y Sprague-Dawley, con respecto a la edad. Esos tumores muestran una amplia variedad de subtipos histológicos, como adenoma tubular, adenocarcinoma, cistadenoma papilar, mesotelioma, tumor de células de la granulosa y tumor poliquístico del estroma o cordón sexual. Sin embargo el tiempo en el que aparecen y la incidencia son factores que retrasan su estudio (Vanderhyden *et al*. 2003).

Actualmente se sabe que en el OSE se originan el 95% de las neoplasias epiteliales ováricas, cuyo riesgo aumenta durante el climaterio cuando la relación andrógenos/estrógenos producidos en el ovario es mayor, ubicándose dentro de las cinco causas de muerte por cáncer en la mujer. Con base en estos antecedentes proponemos que los andrógenos podrían estar implicados en el crecimiento y diferenciación del epitelio superficial del ovario de manera directa o bien a través de la interacción con las gonadotropinas hipofisarias y con factores de crecimiento. Por lo que en este trabajo se propone estudiar el efecto de los andrógenos en el OSE utilizando un modelo de estudio *in vitro* con células del epitelio superficial obtenidas del ovario izquierdo del embrión de pollo.

2.6. PCR-TIEMPO REAL.

El sistema de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en tiempo real permite observar el aumento del número de copias del amplicón en cada ciclo de amplificación, sin necesidad de análisis posteriores a la PCR, esta característica marca la diferencia entre la técnica de PCR en tiempo real y punto final en la cual la generación del producto de PCR no se detecta hasta que la amplificación haya terminado y posteriormente el amplicón puede ser visualizado en un gel de agarosa. No obstante, el fundamento para ambos procesos es el mismo y si se analiza la cinética de amplificación se puede dividir en tres fases: exponencial, lineal y estacionaria.

Fase exponencial. La eficiencia de amplificación es cercana al 100% y la cinética de amplificación tiene un comportamiento exponencial, en donde a partir de una molécula de DNA se generan 2 moléculas.

Fase lineal. Los componentes de la reacción comienzan a ser limitantes, la actividad enzimática decae afectando la eficiencia de amplificación por lo que la reacción se hace lenta y el producto comienza a degradarse.

Fase estacionaria. La reacción se detiene, la cantidad de producto obtenido es constante sin importar cuantos ciclos más se prolongue.

El ensayo para detectar el producto de PCR en tiempo real utiliza un sistema de detección de secuencias (SDS) y una sonda con una marca fluorescente que se une a la plantilla de DNA específicamente y permite detectar el producto de PCR específico acumulado en un ciclo determinado con una aproximación del 100%.

El SDS permite medir la fluorescencia generada en cada ciclo de amplificación; la cantidad de fluorescencia generada en cada ciclo es proporcional a la cantidad de producto de amplificación generado. La cuantificación en tiempo real se lleva a cabo en la fase exponencial en donde la reacción es muy específica y precisa, para realizar la cuantificación dentro de esta fase se define un punto de intensidad de fluorescencia o umbral de detección (“threshold”), en el cual todas las muestras puedan ser comparadas entre si. Este umbral se establece basándose en la fluorescencia de fondo y cuando las muestras llegan a determinado número de ciclos en la cual la fluorescencia rebasa esta fluorescencia de fondo, se dice que la muestra llegó al ciclo de umbral de detección o “threshold cycle” (C_T). De esta manera el C_T nos permite saber cuantos ciclos le tomó a cada muestra generar la fluorescencia necesaria para llegar al umbral de detección. El valor de C_T es directamente proporcional a la cantidad inicial de la plantilla y es el fundamento para calcular la cantidad de ácido ribonucleico mensajero (RNAm) o DNA. Mientras mayor cantidad de DNA se encuentre en una muestra, menor número de ciclos requerirá para alcanzar el umbral de detección.

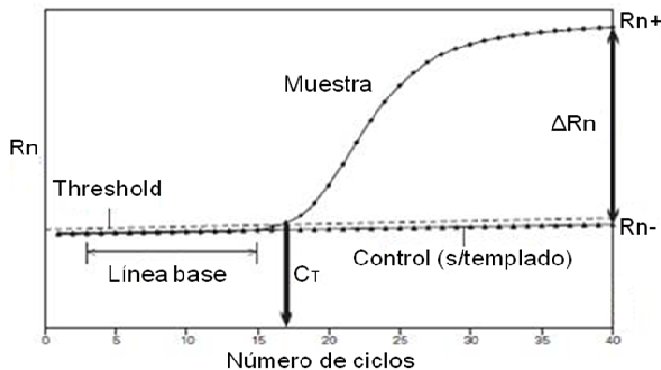
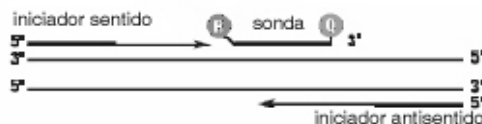


Figura 11. Modelo de un gráfico de amplificación de una PCR en tiempo real, se presentan los parámetros a considerar al realizar un experimento. Ver texto para mayor detalle.

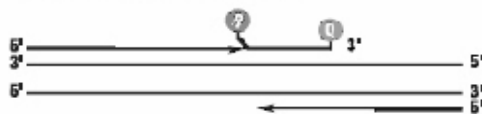
Una sonda (TaqMan[®]) es un oligonucleótido cuya secuencia es complementaria a la región central del amplicón. Tiene una secuencia de 13 a 18 nucleótidos que presenta en su extremo 5' un marcador fluorescente (reportero) y en el extremo 3' un apagador, de tal forma que cuando la sonda esta intacta estas dos moléculas se encuentran muy próximas una de la otra y la fluorescencia emitida por el reportero es absorbida por el apagador, por lo que la fluorescencia global observada es igual a cero, a este fenómeno se le conoce como principio de Transferencia de Energía Resonante fluorescente (FRET). Por otra parte la temperatura de desnaturalización (Tm) de las sondas es mayor que la de los iniciadores, por lo que durante la etapa de alineación, es la primera en unirse y posteriormente se unen los iniciadores, de tal forma que cuando la DNA polimerasa (AmpliTaq Gold[®]) se una al extremo 3' del iniciador y comience la amplificación en su paso se encuentre con la sonda y la degrade gracias a que tiene una actividad 5' exo-nucleasa. Al ser degradada la sonda, se libera el reportero del apagador suprimiendo el fenómeno FRET y la fluorescencia puede ser capturada por el equipo óptico del SDS (ABI Prism 7500). Al ser capturada la fluorescencia se puede graficar una curva de amplificación que contiene los valores de información para la medición cuantitativa. Dado que la fluorescencia emitida es proporcional a la cantidad de sonda degradada y esta a su vez es proporcional a la cantidad de la plantilla generada, este sistema permite visualizar el incremento del amplicón a lo largo de la reacción de PCR.

Las ventajas de este ensayo es que hace al método específico; ya que la sonda hibrida en las regiones próximas en donde se unen los iniciadores. Por lo anteriormente mencionado el sistema de PCR tiempo real es rápido, sensible, reproducible y con un bajo riesgo de contaminación.

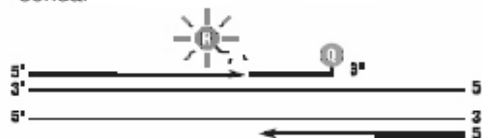
1. Polimerización: Una marca reportera fluorescente (R) y un apagador (Q) son unidos a los extremos 5' y 3' de una sonda TaqMan, respectivamente.



2. Desplazamiento de la sonda: Cuando la sonda esta intacta, la fluorescencia emitida por el reportero es absorbida por el apagador.



3. Separación: Durante cada ciclo de extensión, la DNA polimerasa separa la marca reportera de la sonda.



4. Polimerización completa: Una vez separado del apagador, el reportero emite la fluorescencia.

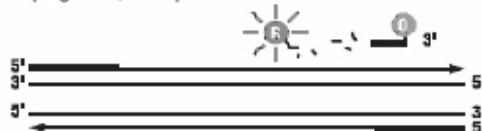


Figura 12. El sistema FRET utiliza una sonda con una marca fluorescente y un apagador (1), la acción exonucleasa de la Taq polimerasa comienza a desplazar la sonda (2), al ser desplazada la sonda el marcador fluorescente se aleja del apagador (3) emitiendo su fluorescencia y al término de cada extensión se puede registrar la fluorescencia total por ciclo (4).

En una cuantificación relativa se analizan los cambios en la expresión de un gen de interés con la expresión de un gen endógeno (mantiene su expresión constante bajo las condiciones del experimento, dentro de los más empleados están las secuencias génicas para gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) y el RNA ribosomal 18S) a partir del mismo DNA o RNA de cada muestra. Para poder medir la expresión génica por el método de cuantificación relativa se hace una curva de validación con un rango de diferentes concentraciones de plantilla sobre las cuales se obtiene la eficiencia de amplificación para el gen blanco y el control endógeno, así como la dilución que se utiliza en los experimentos finales. Cuanto mayor sea el rango dinámico, mayor será la capacidad de detectar muestras con alto y bajo número de copias en el mismo plazo.

3. HIPOTESIS.

Si los andrógenos participan en la expresión de N-cadherina en células del epitelio superficial del ovario, entonces el tratamiento con andrógenos modificará la expresión génica de la N-cadherina en estas células.

4. OBJETIVOS.

4.1. Objetivo general.

Analizar el efecto de los andrógenos en la morfología del epitelio superficial del ovario del embrión de pollo y su participación en la regulación de la N-cadherina.

4.2. Objetivos particulares.

- Detectar la presencia de la N-cadherina y el receptor a andrógenos (AR) en ovarios de embrión de pollo de 10, 12, 14 y 17 días de incubación (d.i.) por medio de PCR punto final.
- Identificar la distribución del RNA mensajero para el receptor a andrógenos en los diferentes compartimientos del ovario embrionario de pollo de 14 d.i. por hibridación *in situ*.
- Detectar la presencia de la proteína de la N-cadherina en el ovario del embrión de pollo de 14 d.i y en cultivos primarios de células del epitelio superficial ovárico de embriones de la misma edad por inmunofluorescencia.
- Evaluar los cambios morfológicos inducidos por andrógenos en las células del epitelio superficial del ovario de 14 d.i. en cortes semifinos incluidos en resina epóxica.
- Evaluar la expresión génica de N-cadherina a nivel de RNAm en cultivos primarios tratados con testosterona y DHT por medio de PCR en tiempo real.

5. MATERIAL Y METODOS.

5.1. Modelo biológico.

Se emplearon embriones de pollo, raza White Leghorn provenientes de la granja Aves Libres de Patógenos (ALPES) en Tehuacan Puebla. Se incubaron a 38°C con 80% de humedad relativa, después de 14 d.i. los embriones se sacrificaron por decapitación para posteriormente identificar a los embriones hembras y diseccionarlos cuidadosamente el ovario izquierdo (único ovario funcional en la gallina). Todos los procedimientos fueron aprobados por el comité de ética de la Facultad de Medicina de la UNAM.

5.2. Obtención de las células del epitelio superficial del ovario.

Los ovarios se recibieron en solución salina balanceada libre de calcio y magnesio (SSB), se lavaron 3 veces con SSB+Ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) 0.1mM y se colocaron en un matraz Erlenmeyer con tripsina al 0.01% disuelta en SSB+EDTA a una razón de 1ml por ovario. Se mantuvieron en baño maría a 37°C por 6 minutos (min) con 70 ciclos/min de agitación, con este método se desprendieron las células epiteliales. Se recuperó la solución y se traspasó a un tubo cónico estéril con la misma cantidad de inhibidor de tripsina al 0.02% disuelto en medio Dulbecco's Modified Medium (DMEM) estéril y se recuperaron las células por centrifugación a 1,200 rpm por 10 min a temperatura ambiente. Se recuperó el botón celular y se resuspendió en ±1 ml de medio de cultivo completo (105/199 1:1 complementado con suero bovino fetal al 10% (SFB) y 10 µg/ml de antibiótico penicilina-estreptomina-glutamina, No. catalogo 10378-016 GIBCO™). Se evaluó la viabilidad celular con la prueba de azul de tripano en un hemocitometro y se sembraron 140,000 células en cajas NUNC™ de 35 mm con 2.5 ml de medio de cultivo completo.

5.3. Cultivos primarios y tratamiento con andrógenos.

Los cultivos primarios se mantuvieron a 37°C en una atmósfera de 5% de CO₂/aire por aproximadamente 48-60 horas (h) hasta que alcanzaron una confluencia del 40-50%. Se les cambio el medio de cultivo por uno con baja concentración de suero (medio de cultivo completo con 1% de suero bovino fetal lavado libre de esteroides (SFL)) por 12 h previas a los tratamientos hormonales. Se hicieron los siguientes grupos experimentales: testigo, testosterona, dihidrotestosterona (DHT) y estradiol (E₂) en dosis de 10⁻⁸ M por 12 h. Para las hormonas se preparó una solución madre a partir de 1 mg de la hormona/1ml de etanol absoluto grado puro MERCK y se hicieron una serie de diluciones en etanol grado puro hasta alcanzar la concentración de 10⁻⁸ M en 2.5 ml de medio.

5.4. RT-PCR.

Es muy importante trabajar bajo condiciones estériles y libres de RNAsas para evitar que el RNA se degrade, para ello es necesario tratar el material con dietil pirocarbonato/agua miliQ o RNaseZap® (No. de catalogo AM9780) Ambion®. Además todos los reactivos deben colocarse en hielo y deben de homogeneizarse por inversión o vortex suave, excepto enzimas e inhibidor de RNAsas, antes de ser usados.

A las células se les agregó búfer de lisis y la extracción del RNA total se realizó por columnas con el RNeasy Micro kit (50) como lo indica el fabricante (No. de catalogo 74004) QIAGEN. Se verificó la concentración y la pureza del RNA total, haciendo una

cuantificación en un espectrofotómetro NanoDrop® ND-1000 a una longitud de onda de 260/280 nm. Para la reversa transcripción se utilizó el kit Transcriptor Reverse Transcriptasa (No. de catalogo 030531295001) Roche. Para cada reacción se utilizaron 2 µg del RNA total y se realizó en dos pasos, el primero con los random primers y agua libre de RNAsas, en un volumen de 13 µl a 65°C por 10 min, y el segundo paso alcanzado un volumen final por reacción de 20 µl con la enzima transcriptasa reversa (AmpliTaq), inhibidor de RNasa I, dNTPs (10 mM) y búfer de reacción 5X, las condiciones de la reacción fueron 55°C por 5 min y 85°C por 30 min en un termociclador Mastercycler gradient Eppendorf.

Para la PCR se utilizaron iniciadores específicos para AR (sentido 5'-CAG CCA GAC TCC TTC TCC AA-3' y antisentido 5'-TTC TGG TTC TTC AGG CCA TC-3') ubicado entre el exón 5 y 8 y se obtuvo un amplicón de un tamaño de 398 pb, para N-cadherina (sentido 5'-AAG CCT TTC GCT ACG GTA CA-3' y antisentido 5'-TCC TTC CAT GTC CGT AGC TT-3') ubicado entre el exón 5 y 8 obteniendo un amplicón de un tamaño de 501 pb, y para β-actina (sentido 5'-CAA AGC CAA CAG AGA GAA GA-3' y antisentido 5'-TCA CGC ACA ATT TCT CTC TC-3') ubicado entre el exón 1 y 2 obteniendo un amplicón de un tamaño de 296 pb. La mezcla de reacción utilizada consistió de búfer de reacción 10X, DMSO, enzima Platinum® Taq DNA Polymerase (No. de catalogo 10966-018) Invitrogen™, Cl₂Mg, dNTPs (10 mM), iniciadores, cDNA y agua grado PCR alcanzando un volumen final de 25 µl; las condiciones de la reacción fueron las siguientes: temperatura de alineación, para AR 59.6°C por 45 segundos (seg), para N-cadherina 60°C por 45 seg y para β-actina 59°C por 45 seg; la temperatura de extensión fue igual para los tres, 72°C por 45 seg. Las secuencias utilizadas se encuentran disponibles en el GenBank, [NM_001040090.1](#) para el AR, [X07277](#) para N-cadherina y [L08165](#) para β-actina. Finalmente las muestras se corrieron por electroforesis en geles de agarosa al 2% teñidos con bromuro de etidio y se visualizaron por luz ultravioleta en un transiluminador Epi chemi II Darkroom de UVP Laboratory Products.

5.5. Sonda para el receptor a andrógenos.

Se utilizaron iniciadores sentido 5'-TTC TGG TTC TTC AGG CCA TC-3' y antisentido 5'-CAG CCA GAC TCC TTC TCC AA-3' obtenidos a partir de la secuencia para el AR que se encuentra en el GenBank [NM_001040090.1](#); el producto de PCR obtenido de 398 pb se inserto en el plásmido pGEM®-T Easy Vector de Promega Corporation, el cual tiene dos promotores para la síntesis de RNA, uno por la T7 RNA polimerasa y el segundo por la SP6 RNA polimerasa.

La secuencia del cDNA para el AR se metió al programa NEBcutter de BioLabs (<http://tools.neb.com/NEBcutter2/index.php>) para verificar que las enzimas de restricción que cortan al vector, no cortaran al fragmento del AR. De esta manera se linealizó el plásmido con las enzimas de restricción Spe I y Apa I, las cuales no cortan la secuencia del AR. Posteriormente se mando a secuenciar el plásmido con el fragmento del AR (ABI PRISM® 3100 Genetic Analyzed Applied Biosystem en el Instituto de Fisiología UNAM) para verificar en que sentido se inserto el fragmento y saber que promotor lo sintetiza, resultando el de la SP6 RNA polimerasa.

La sonda se sintetizó por medio del DIG RNA labeling kit (SP6/T7) de Roche como lo indica el fabricante, posteriormente se purificó con el NucAway™ Spin Columns de Ambion®, como se describe en la hoja técnica.

5.6. Hibridación *In situ*.

El procedimiento se realizó como lo describe Henrique *et al.*, 1995. Se disecaron ovarios de embriones de 14 d.i., se fijaron en paraformaldehído al 4% en PBS-DEPC por 2 h a 4°C, se lavaron en PBT 2 veces por 5 min y se deshidrataron en concentraciones graduales de metanol 25, 50, 75% por 5 min cada uno y dos veces con metanol absoluto.

Al día siguiente se rehidrataron con concentraciones graduales de etanol absoluto, 75, 50 y 25% un cambio de 10 min cada uno y 3 cambios rápidos con PBT, se permeabilizaron con proteinasa K/PBT (10 µg/ml) por 10 min a 37°C y se lavaron con glicina/agua DEPC al 0.2% por 10 min y un cambio rápido con PBT, enseguida se fijaron con paraformaldehído 4%/glutaraldehído 0.2% en PBT por 20 min a temperatura ambiente y se lavaron 2 veces con PBT por 10 min. Se retiró la mayoría del líquido y se enjuagaron con una solución 1:1 de mezcla de prehibridación/PBT y después con 1 ml de mezcla de prehibridación hasta que los ovarios se asentaron en el fondo, posteriormente se incubaron con 1 ml de solución de prehibridación por 8 h a 65°C, después se reemplazó con 1 ml de solución de hibridación (3 µg de sonda/ml) precalentada y se incubaron toda la noche a 65°C en agitación.

Se lavaron con la solución de prehibridación dos cambios rápidos a 65°C, enseguida se lavaron con 1.5 ml de la mezcla de prehibridación tres veces a 65°C por 30 min y después con 1.5 ml de la mezcla de prehibridación/MABT 1:1 por 15 min a 65°C. Se lavaron una vez rápida con MABT y un cambio de 15 min, se prebloquearon con 20% de suero de cabra y 2% de albumina en MABT por 4 h a temperatura ambiente, para después incubar con el anticuerpo anti-digoxigenin-AP diluido 1:2000 (Roche) toda la noche a 4°C.

Se lavaron con MABT 3 cambios rápidos, y después 3 veces por 1.5 h en agitación, se lavaron con NTMT/Levamisol (2 mM) 2 veces de 10 min y se dejó toda la noche en NTMT a 4°C. Se incubó con BM Purple (Roche) toda la noche en oscuridad a temperatura ambiente, una vez que la marca apareció se enjuagaron con PBT cada 6 h por 3 días. Se fijaron en paraformaldehído 4% en PBT a 4°C toda la noche y posteriormente se almacenaron en PBT a 4°C hasta su procesamiento para cortes por congelación. Finalmente se realizaron cortes de 15 µm de grosor y se observaron con el microscopio de luz.

5.7. Procesamiento e inclusión de tejidos en congelación.

Los ovarios se fijaron en paraformaldehído/PBS-DEPC por 4 h a 4°C. Enseguida se lavaron 3 veces con PBS 1X por 10 min, posteriormente se sumergió el tejido en una solución de sacarosa/PBS al 10% estéril hasta que el tejido se precipitó al fondo del recipiente, se repitió el paso anterior en sacarosa al 20% y después en sacarosa al 30%. Se cambiaron a una solución 1:1 de sacarosa al 30% con medio de inclusión para congelación Tissue Tek OCT compound a temperatura ambiente, se incluyó el tejido en Tissue Tek OCT compound puro y se congeló a -70°C. Se almacenaron a esta temperatura hasta el momento de hacer los cortes. Finalmente se hicieron cortes de 4 µm de espesor en un criostato y se colocaron en portaobjetos con Poli-L-glicina.

5.8. Procesamiento e inclusión de tejidos en parafina.

Los ovarios se fijaron en methacarn por 2 h en agitación. Posteriormente se lavaron una vez con metanol absoluto por 10 min, enseguida se lavaron 2 veces con xilol por 10 min, para después incubar en parafina por una hora a 56^oC, se sacaron y se incluyó el tejido con parafina. Se hicieron cortes de 4 µm de espesor en un micrótopo y se colocaron en portaobjetos con Poli-L-glicina.

Previo a la inmunohistoquímica e inmunofluorescencia, las laminillas se desparafinaron por 20 min a 56^oC. Se rehidrataron con una secuencia de baños en xilol-etanol absoluto y una serie de etanol al 96-70-50-30%-agua destilada por 5 min cada una.

5.9 Inmunohistoquímica para el receptor de andrógenos en ovario embrionario de pollo.

Las preparaciones se lavaron una vez con PBS 1X por 5 min, para posteriormente incubar con búfer de citratos pH 6.0 en una olla de presión por 3 min. Se lavaron tres veces con PBS 1X por 5 min y se incubaron con proteinasa K en PBS por 3 min, enseguida se lavaron nuevamente tres veces con PBS 1X por 5 min y se incubaron con PBS 1X-tritón-100 1% por 10 min, después se lavaron tres veces con PBS 1X por 5 min, se incubaron con bloqueador (ABC Kit Vectastain, Vector Laboratories, Inc.) por 30 min y se les aplicó el anticuerpo primario contra AR (No. de catálogo sc-816, Santa Cruz Biotechnology, Inc.), diluido 1:50 en PBS-albúmina-tritón-100, incubando toda la noche a 4°C en cámara húmeda. Al día siguiente se lavaron seis veces con PBS 1X por 5 min y se les aplicó el anticuerpo secundario biotinilado diluido 1:200 (ABC Kit Vectastain, Vector Laboratories, Inc.) incubándolo por 1 h a temperatura ambiente en cámara húmeda. Enseguida se lavaron tres veces con PBS 1X por 5 min y se incubaron con ABC reagent por 30 min a temperatura ambiente, se lavaron nuevamente 3 veces con PBS 1X y se revelaron con diaminobenzidina (DAB) por 3 a 5 min. Se contratiñeron con hemaxilina-eosina y finalmente se observaron al microscopio óptico.

5.10. Inmunofluorescencia para N-cadherina en células ovario de embrión de pollo.

Las preparaciones se lavaron tres veces con PBS 1X por 5 min, posteriormente se incubaron con búfer de citratos pH 6.0 en una olla de presión por 3 min. Se lavaron tres veces con PBS 1X por 5 min y se incubaron con proteinasa K por 1 min, enseguida se lavaron nuevamente con PBS 1X y se bloquearon con albumina/PBS al 1% por 1 h. Se aplicó el anticuerpo primario contra N-cadherina diluido 1:100 en PBS 1X (No. de catálogo 33-3900 ZYMED Laboratories, Inc.) por 12 h a 4°C, enseguida se lavaron 3 veces por 5 min con PBS 1X y se les aplicó el anticuerpo secundario conjugado con el fluorocromo FITC anti-conejo diluido 1:100 (No. de catálogo 81-6111 ZYMED Laboratories, Inc.) incubando por 1 h con 30 min a temperatura ambiente. Se lavaron 3 veces con PBS 1X por 5 min, enseguida se incubaron con DAPI por 1 min en oscuridad, se lavaron una vez con Tween-20/PBS al 0.05% por 5 min y nuevamente con PBS 1X. Finalmente se les agregó medio de montaje para fluorescencia (sin ioduro de propidio) Vectashield® Vector Laboratories, Inc., para observar por el microscopio confocal.

5.11. Inmunofluorescencia para N-cadherina en células del epitelio superficial del ovario.

Las células se cultivaron en cajas NUNC™ de 35 mm con un cubreobjetos, cuando alcanzaron una confluencia del 40-50% se fijaron con paraformaldehído al 4% por 5 min a 4°C, se lavaron tres veces con PBS 1X por 5 min, posteriormente se incubaron con tritón 100/PBS al 0.2% por 15 min a temperatura ambiente. Se lavaron tres veces con PBS 1X por 5 min y se incubaron con proteinasa K por 1 min, enseguida se lavaron nuevamente con PBS 1X y se bloquearon con albumina/PBS al 1% por 1 h. Se aplicó el anticuerpo primario contra N-cadherina diluido 1:100 en PBS 1X (No. de catalogo 33-3900 ZYMED Laboratories, Inc.) por 12 h a 4°C, enseguida se lavaron con PBS 1X y se les aplicó el anticuerpo secundario conjugado con el fluorocromo FITC anti-conejo diluido 1:100 (No. de catalogo 81-6111) ZYMED Laboratories, Inc. incubando por 1 h a temperatura ambiente, se lavaron una vez con Tween-20/PBS al 0.05% por 5 min y nuevamente con PBS 1X. Finalmente los cubreobjetos se pasaron a portaobjetos con poli-L-lisina y se les agregó medio de montaje para fluorescencia con ioduro de propidio Vectashield® (No. de catalogo H-1300) Vector Laboratories, Inc., para observar por el microscopio confocal.

5.12. Tratamientos con andrógenos *in ovo* para el estudio morfológico del epitelio superficial del ovario.

Se seleccionaron los embriones viables por ovoscopia a los 12 d.i., se formaron 5 grupos experimentales a los cuales se les administraron los tratamientos hormonales mediante la técnica de cámara falsa, E₂, testosterona, DHT, DHT+flutamida (un antiandrógeno) y el vehículo al grupo testigo, las hormonas se obtuvieron de STERALOIDS, INC. y la flutamida (FTD) de Sigma (No. de catalogo F9397). Las hormonas se disolvieron en etanol absoluto grado puro MERCK, posteriormente se ajustaron las concentraciones en medio DMEM utilizado como vehículo, quedando 200 ng/50 µl y se inyectó *in ovo* sobre la membrana corioalantoides. Al grupo DHT+FTD, se le aplicó esta última a 20 µg/50 µl 2 h antes de aplicar el tratamiento con la DHT y al grupo testigo se le administró el vehículo. Al día 14 d.i. los embriones se sacrificaron por decapitación y se disecó el ovario izquierdo de las hembras el cual se procesó para microscopía óptica.

5.13. Procesamiento para cortes en resina epóxica.

Fragmentos de ovarios de embrión de pollo de 1 mm³ se fijaron en paraformaldehído al 4%/glutaraldehído al 2.5% en PBS por 1 h con 30 min. Se lavaron en el mismo búfer 3 veces por 15 min y se postfijó el tejido con tetraóxido de osmio/PBS al 1% por 1 h, posteriormente se deshidrataron con concentraciones graduales de etanol, 30, 50, 60, 70, 80, 90% y absoluto 2 cambios de 10 min cada uno y 3 cambios de óxido de propileno de 10 min cada uno. Se preincluyeron las muestras en resina epóxica EPON-812 usando el Kit EMBED-812 Embedding (No. de catalogo 14120) 1:2 en óxido de propileno toda la noche, posteriormente se cambió a una mezcla 1:1 toda la noche y finalmente a una mezcla 2:1 por 72 h. Finalmente se incluyeron en resina pura por 1 h y se dejaron polimerizar a 60°C por 24 h.

Se obtuvieron cortes semifinos (200-250 nm) con un ultramicrotomo Ultracut Reichert-Jung, se colocaron en portaobjetos y se tiñeron con azul de toluidina al 1% para observar al microscopio óptico. Se tomaron fotografías de las muestras a 100X de aumento de las áreas más representativas (3-4 por laminilla) con una cámara digital CoolSNAP-Pro_{cf} colors y se utilizó el programa Image-Pro Plus, ambos de MEDIA CYBERNETICS, para

hacer las mediciones de el área celular y nuclear en μm^2 , el número de mitocondrias/célula, el de mitosis/ μm lineales y la altura del epitelio superficial, y en la región medular el número de mitocondrias/célula por μm^2 de los diferentes tratamientos (E_2 , testosterona, DHT, DHT+FTD y testigo).

Todos los resultados son expresados en media \pm desviación estándar. Se utilizó el programa estadístico SPSS 17.0, realizando la prueba de ANOVA, seguida de la prueba de comparación múltiple de Tukey, para ver las diferencias de medias entre los grupos tratados contra el grupo testigo. Los valores con $P < 0.05$ fueron considerados estadísticamente significantes.

5.14. PCR en tiempo real.

Para evaluar las diferencias en la expresión génica se utilizó la PCR en tiempo real utilizando la plataforma de Applied Biosystem. Las sondas TaqMan® y los iniciadores se diseñaron utilizando el programa File Builder v3.1 Assay-by-DesignSM Service (http://www.appliedbiosystems.com/support/software/assaysbydesign/installs.cfm?prod_id=1542). La sonda para N-cadherina se marcó con el fluorocromo FAM (6-carboxilfluoresceína), quedando 5'-FAM-CAAAGCCAGGAACCTATG-3', y los iniciadores son: sentido 5'-GAATGGGACAGTTCCTGAAGGAT-3' y antisentido 5'-GCATCGATGGCAGTAACAGTCATTA-3'; la sonda para el rRNA 18S (No. de catalogo 4319413E), se marcó con el fluorocromo VIC (2, 7-dimetoxi-4, 5-dicloro-6-carboxilfluoresceína); se verificó que la ubicación de los iniciadores abarque dos exones, 5 y 6 en N-cadherina, en el caso de 18S ya que es RNA ribosomal no tiene exones. Las secuencias utilizadas se encuentran disponibles en el GenBank, [X07277](#) para N-cadherina y [X03205.1](#) para 18S.

Los reactivos utilizados fueron mezcla madre universal para PCR TaqMan® (AmpliAq Gold® DNA polimerasa, AmpErase® UNG, dNTPs y búfer de reacción) (PN 4304437), MicroAmp® platos de reacción ópticos de 96 pozos (PN 4306757) y cubierta adhesiva óptica (PN 4311971) todos de Applied Biosystem, agua libre de nucleasas, tubos de reacción de 1.5 ml y micropipetas de 0.2, 0.5 y 1 ml. Las condiciones de la reacción de PCR utilizando como sustrato cDNA son universales, el paso inicial que consta de un ciclo a 50°C por 2 min para activar a la AmpErase® UNG (uracil-N-glucosilasa) y un segundo ciclo a 95°C por 10 min para activar a la AmpliAq Gold® DNA polimerasa, después se utilizaron 40 ciclos para la PCR que constan de un ciclo de 95°C por 15 seg para la desnaturalización seguido de un ciclo a 60°C por 1 min para la alineación/extensión.

Se determinó la expresión de N-cadherina y el gen endógeno 18S a nivel de mensajero por cuantificación relativa (RQ). Se utilizó el método comparativo Delta Ct (ΔCt) en el cual se hizo un experimento de validación previo a los ensayos finales, para demostrar que la eficiencia de amplificación entre el blanco y el control endógeno es igual. Se realizó una curva de validación con ambos genes en el mismo tubo (dúplex) y genes en tubos separados (monoplex), con un rango de diferentes concentraciones de la plantilla, se usaron diluciones seriales en ordenes de 10 para cada uno de los genes (1:50, 1:500, 1:5000 y 1:50000) a partir de 2 μg de cDNA, las concentraciones de cada dilución fueron: 40, 4, 0.4 y 0.04 ng respectivamente. Se obtuvo el ΔCt ($\text{Ct blanco} - \text{Ct control endógeno}$) para cada uno de los puntos, este ΔCt se graficó contra el logaritmo de la concentración de cada uno de los puntos, la pendiente de la recta obtenida debe de ser de menor o igual

a 0.1. De esta manera se comprueba que la eficiencia de amplificación de ambos genes es igual.

El valor del gen de interés se dividió entre el valor obtenido para el gen endógeno para normalizar los resultados y asegurar que las variaciones observadas en expresión sean realmente debida a cambios de expresión y no a cantidades variables de muestra añadidas entre dos ensayos. Una vez normalizado este valor se dividió entre el valor de otro ensayo elegido como calibrador (tejido, condición, tratamiento, etc.) lo que resulta en un orden de magnitud con respecto al calibrador. La cuantificación relativa se realizó con el método comparativo ΔCt .

Se usaron los siguientes cálculos para determinar la expresión relativa del gen de interés y el gen endógeno.

$$1) \Delta Ct = Ct_{\text{gen interés}} - Ct_{\text{gen endógeno}}$$

En donde el gen de interés es aquel que nos interesa cuantificar y el gen endógeno aquel que es de expresión constitutiva cuyo nivel no cambia en las condiciones experimentales usadas.

$$2) \Delta \Delta Ct = \Delta Ct_{\text{muestra de interés}} - \Delta Ct_{\text{calibrador}}$$

En donde la muestra de interés es la plantilla en estudio (proviene del organismo bajo las condiciones de estudio) y el calibrador es la muestra de estudio en las condiciones experimentales contra las cuales deseamos comparar las diferencias de expresión. Siempre serán condiciones experimentales, como, tiempo, medio de cultivo, condiciones de crecimiento, tratamiento, etc. En nuestro caso fue tratamientos.

3) Se aplica la fórmula $2^{-\Delta \Delta Ct}$ para obtener la cuantificación relativa (RQ).

4) Los resultados se analizaron con el programa estadístico SPSS 17.0 con la prueba de ANOVA seguida de la prueba de Duncan de comparación múltiple de medias. Los valores con $P < 0.05$ fueron considerados estadísticamente significantes.

6. RESULTADOS.

El epitelio superficial del ovario es menos del 2% del tejido que compone la gónada, por lo que es necesario tener un modelo que nos permita la obtención de células epiteliales normales para su posterior estudio. Nosotros proponemos el ovario del embrión de pollo; ya que, similar al humano tiene una simple capa superficial de células epiteliales cuboidales que recubren al ovario; por otro lado el embrión de pollo presenta varias ventajas; ya que, es de fácil manejo, se puede controlar los estadios de su desarrollo, su manejo es individual y al ser un sistema cerrado no hay intervención de hormonas esteroides placentarias, además de presenta esteroidogénesis temprana.

6.1. Obtención de una población enriquecida con células del OSE por digestión parcial.

La digestión parcial de los ovarios embrionarios de pollo con tripsina nos permitió obtener una población enriquecida de un 80% con una viabilidad >95% y una contaminación con células germinales \leq 4%. Después de haber recuperado las células del OSE se logró sembrar y mantener los cultivos primarios hasta el momento de los tratamientos con andrógenos, en la figura 14 se puede observar como la células epiteliales en cultivo se acomodan de una manera adoquinada característica de este tipo celular, sin presencia de filopodios o lamelipodios como en células mesenquimales. Demostrando que este método de recuperación de células epiteliales del OSE es eficiente para nuestros propósitos.

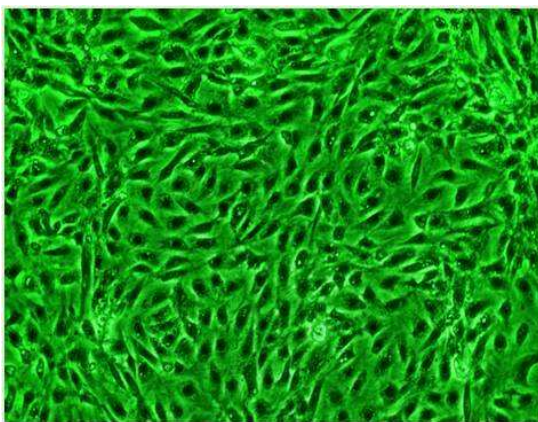


Figura 14. Cultivo primario de células del OSE. Se logro mantener los cultivos hasta el momento de los tratamientos con esteroides. Imágen obtenida por microscopía óptica de un cultivo al 100% de confluencia (10X).

6.2. Expresión de N-cadherina y receptor a andrógenos por PCR punto final.

Se detectó la expresión génica de N-cadherina y el AR en el ovario embrionario de pollo, para ello se extrajo el RNA total de ovarios de 10, 12, 14 y 17 d.i., los productos de PCR se visualizaron por medio de una electroforesis en gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio. En la figura 15 A se observan las bandas de 501 pb correspondientes al amplicón de N-cadherina (carriles 2-5). En B se presentan bandas de 398 pb que corresponden al AR (carriles 6-9) y de 296 pb correspondientes a β -actina utilizada como control endógeno (carriles 10-13). Ambos genes se expresan durante el desarrollo embrionario del ovario. Los fragmentos se secuenciaron en el ABI PRISM® 3100 Genetic Analyzed Applied Biosystem en el Instituto de Fisiología de la UNAM, para identificar su identidad.

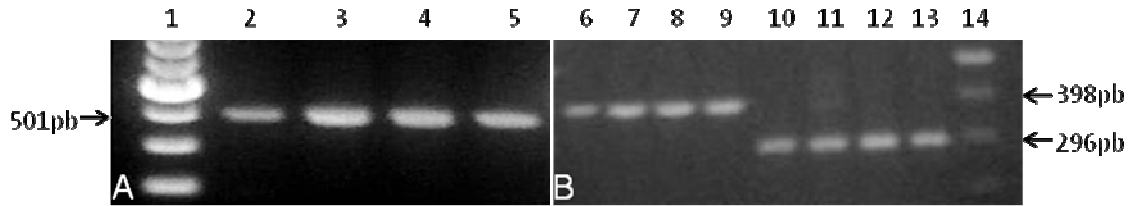


Figura 15. Productos de PCR de N-cadherina, AR y β -actina. A. Expresión de la N-cadherina (carriles 2-5) y B. del receptor a andrógenos (carriles 6-9) en ovarios de embriones de pollo de 10, 12, 14 y 17 d.i. Se utilizó β -actina como control endógeno (carriles 10-13), el marcador de peso molecular de 100 pb (carriles 1 y 14). Los productos se corrieron en un gel de agarosa al 2% tenido con bromuro de etidio.

6.3. Localización del RNA mensajero del receptor a andrógenos en ovarios de 14d.i. por hibridación *in situ*.

La hibridación *in situ* es una poderosa técnica de la biología molecular que nos permitió detectar espacialmente la expresión génica del RNAm del AR en el ovario izquierdo del embrión de pollo de 14 d.i. La distribución se limitó a las células del epitelio superficial y los cordones medulares o esteroidogénicos (figura 16 A), pero no se detectó en el área de la corteza. No obstante, Katho *et al.*, 2006 reportó la presencia del mensajero del AR tanto en células de la médula como en las de la corteza, pero no en el epitelio superficial del ovario.

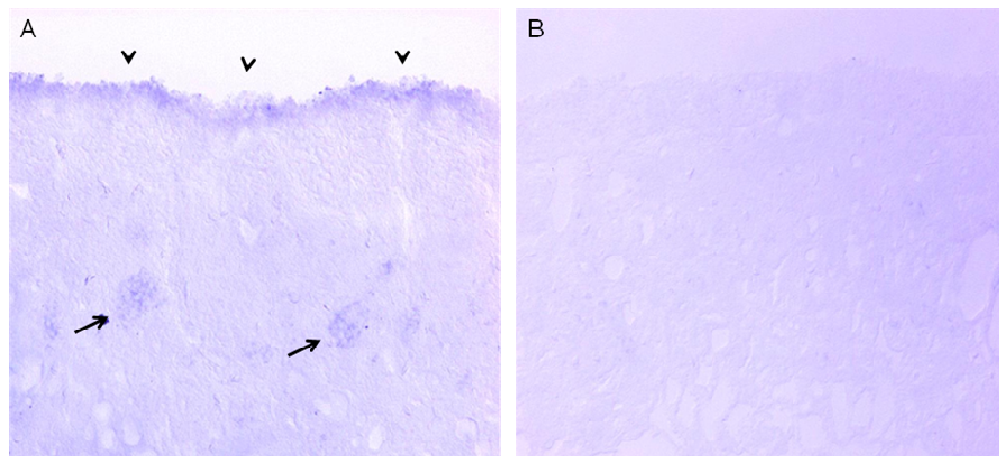


Figura 16. Hibridación *in situ* del RNAm del AR. A. La expresión del RNAm del AR se observa en el epitelio superficial (cabeza de flechas) y en los cordones medulares (flechas) del ovario izquierdo del embrión de pollo de 14 d.i. B. Control negativo. Imágenes tomadas por microscopía óptica a 10X.

6.4. Expresión del receptor a andrógenos por inmunohistoquímica.

El AR es un miembro de la familia de los receptores nucleares, es activado por andrógenos y para que sea transcripcionalmente activo debe trasladarse al núcleo en donde se une al DNA. La inmunohistoquímica realizada en el ovario de embrión de pollo de 14 d.i demuestra la presencia del AR con localización en el núcleo de las células del epitelio superficial y en el de las células germinales, indicando que es transcripcionalmente activo en este tipo de células, por el contrario en las células mesenquimáticas de la corteza no se detecta su presencia.

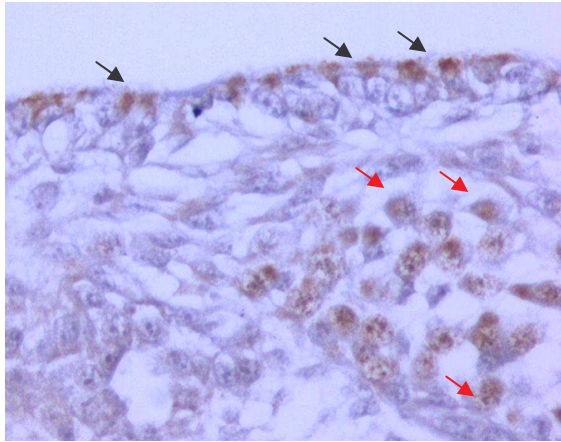
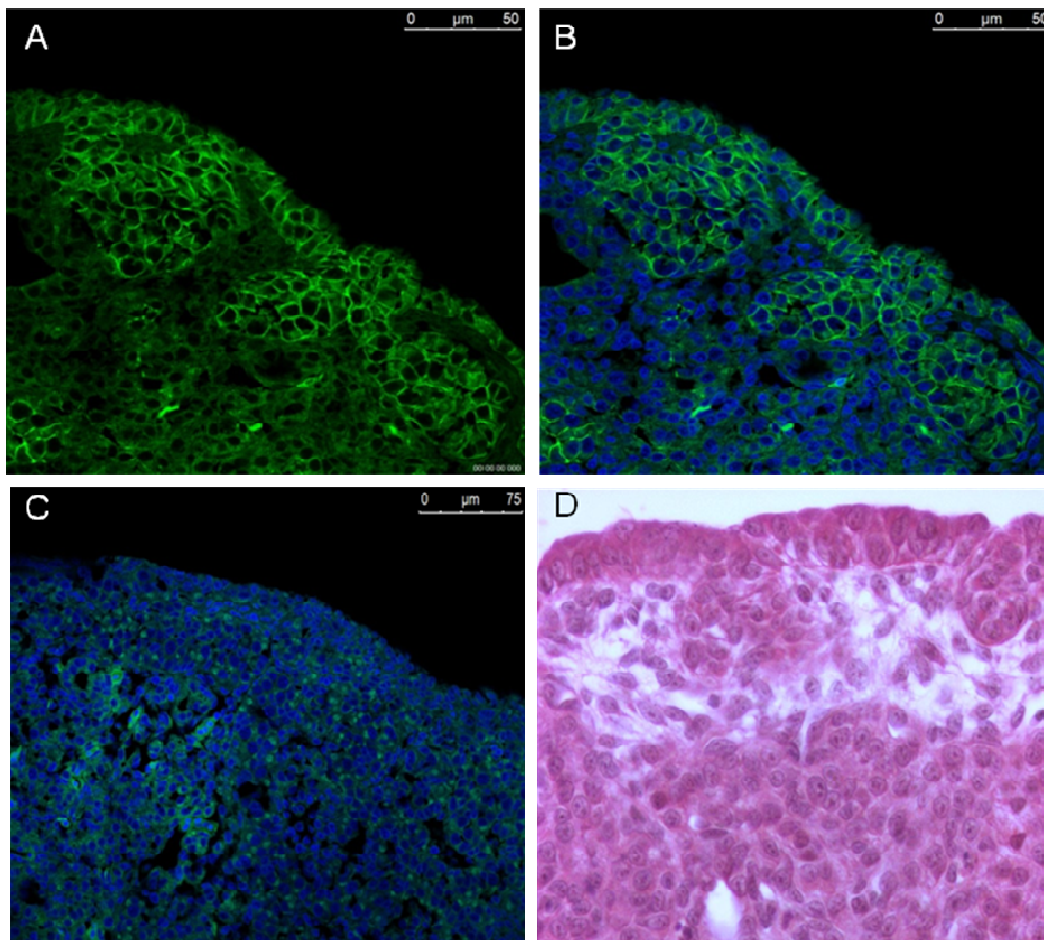


Figura 13. Inmunodetección de la proteína del AR. Se localizo el AR en el núcleo de las células del OSE (flechas negras) y en el de las ovogonias (flechas rojas) del ovario embrionario de pollo de 14 d.i. Imagen obtenida por microscopía óptica (40X) en cortes en parafina.

6.5. Inmunodetección de la N-cadherina en el ovario de embrión de pollo de 14d.i.

Ovario completo

Se detectó la proteína de la N-cadherina por inmunofluorescencia en ovarios de embriones de pollo de 14 d.i. La señal se observa en la membrana plasmática de las células del epitelio superficial y en los nidos de células germinales en la región cortical del ovario (figura 17).



Células del epitelio superficial

La proteína de la N-cadherina se conserva en cultivos primarios de estas células. La señal es intensa en la zona de las membranas en donde se establece el contacto intercelular (figura 18).

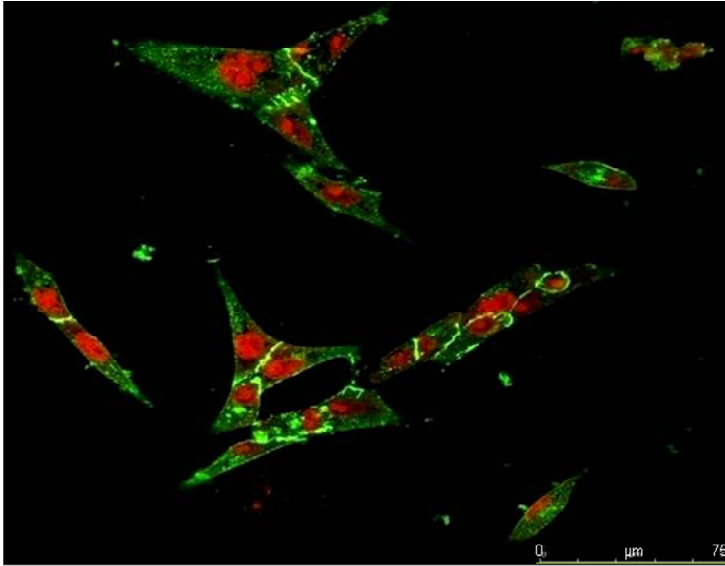


Figura 18. La N-cadherina se conserva en las células epiteliales cultivadas; la señal es más intensa en las uniones intercelulares (verde), los núcleos se tiñeron con ioduro de propidio (rojo). La imagen fue tomada con microscopio confocal.

6.6. Cambios morfológicos en el epitelio superficial del ovario inducidos por hormonas.

En el presente trabajo los tratamientos con E_2 , testosterona y DHT por 48 h *in ovo* en embriones de 14 d.i., modificaron la morfología del epitelio superficial *in vivo*. Los cortes semifinos obtenidos del grupo testigo muestran un epitelio cúbico simple con zonas en donde las células epiteliales se introducen hacia la corteza para rodear a los ovocitos que se encuentran agrupados en nidos o cordones en la zona cortical. Las células epiteliales presentan núcleos grandes y redondos con uno o dos nucleolos, en su parte apical presentan microvellosidades y en el citoplasma mitocondrias. Las células germinales son más grandes con núcleos redondos y de cara abierta, estos cordones son aplanados y están seguidos por los cordones medulares y por espacios lacunares, siguiendo el mismo patrón a todo lo largo del ovario. Además, al igual que en el ovario humano y de conejo, se pueden identificar dos poblaciones celulares características del OSE: claras y oscuras. En la región cortical, además de los cordones, se encuentran células mesénquimatosas y tejido conectivo laxo; por debajo de la corteza hay células esteroideogénicas, las cuales contienen vesículas que almacenan lípidos.

Figura 17. Inmunodetección de la proteína de la N-cadherina. A. Se localiza en la membrana celular del epitelio superficial y en los nidos de células germinales de la corteza ovárica (verde). B. Sobreposición, los núcleos se tiñeron con DAPI (azul). C. Control negativo. Imágenes tomadas con microscopio confocal. D. Tinción de H y E en ovario de embrión de pollo de 14 d.i. Fotografía tomadas por microscopía óptica (40X) en cortes en parafina.

TESTIGO

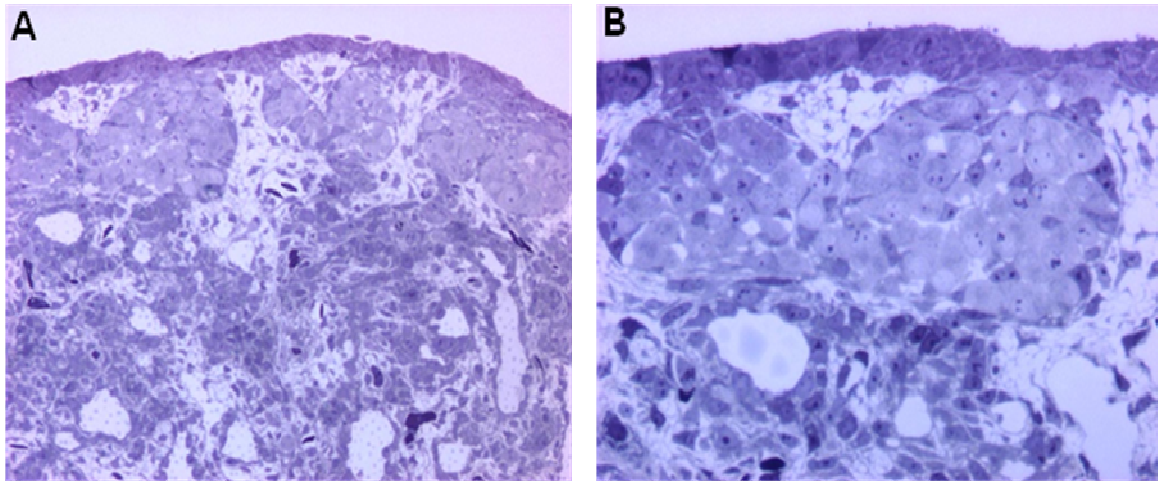


Figura 19. Cortes semifinos del ovario de pollo de 14 d.i. El epitelio superficial esta compuesto de una monocapa de células cúbicas, por debajo del OSE se observan los cordones corticales seguidos de los medulares y los espacios lacunares, entre los cordones se observan células mesenquimaticas y tejido conectivo. Fotografías tomadas por microscopía óptica A (20X) y B (40X) en cortes semifinos (200-250 nm).

En los ovarios de los embriones tratados con estradiol se favorece el crecimiento del OSE; ya que el número de células/área aumenta significativamente (fig. 20), además se presenta un epitelio columnar bien estructurado. Las células pasaron de forma cúbica a columnar aumentando su citoplasma y su tamaño nuclear, y como consecuencia la altura del epitelio aumento significativamente, el número de mitocondrias/célula también aumenta significativamente. La entrada de las células epiteliales es mayor favoreciendo la formación de cordones corticales e incluso medulares y los espacios lacunares se dilataron.

ESTRADIOL

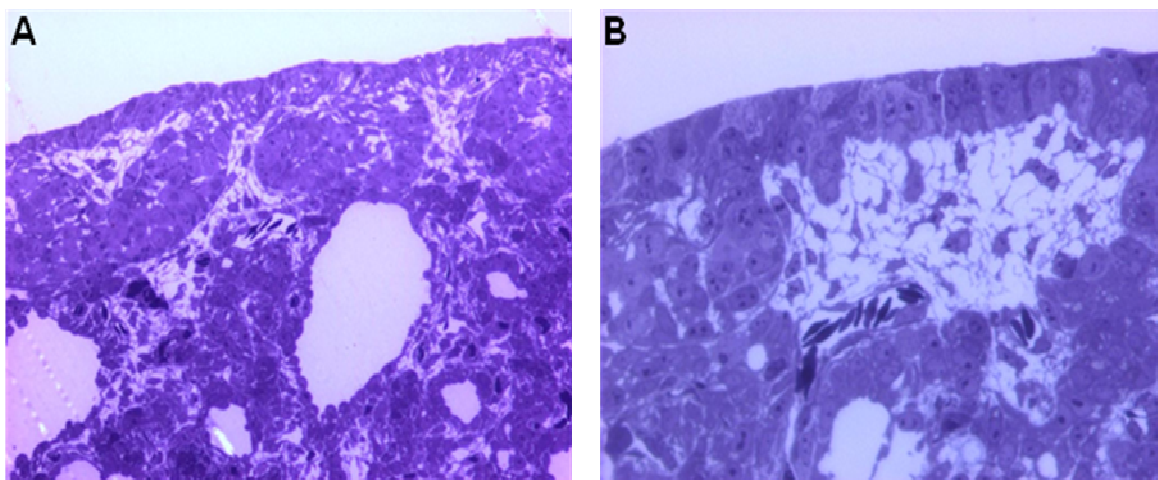


Figura 20. Cortes semifinos del ovario de pollo de 14 d.i. tratados con estradiol. El epitelio superficial paso de una monocapa de células cúbicas a una de células columnares, aumentando la altura del epitelio; en la región medular se ven los espacios lacunares dilatados. Fotografías tomadas por microscopía óptica A (20X) y B (40X) en cortes semifinos (200-250nm).

El grupo tratado con testosterona presenta un epitelio columnar simple, la presencia de microvellosidades es menor y la entrada de las células epiteliales hacia la región cortical es mayor, en donde, los cordones son muy grandes y los espacios lacunares se redujeron. Las células aumentaron su área citoplasmática y número de mitocondrias/célula significativamente, presentan pleomorfismo nuclear, pero no se presentan cambios en la altura del epitelio.

TESTOSTERONA

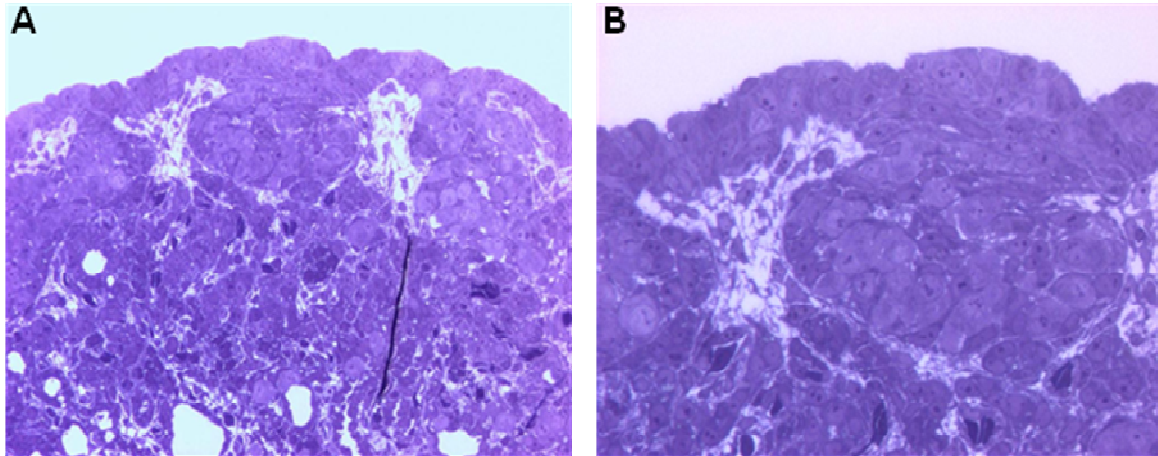
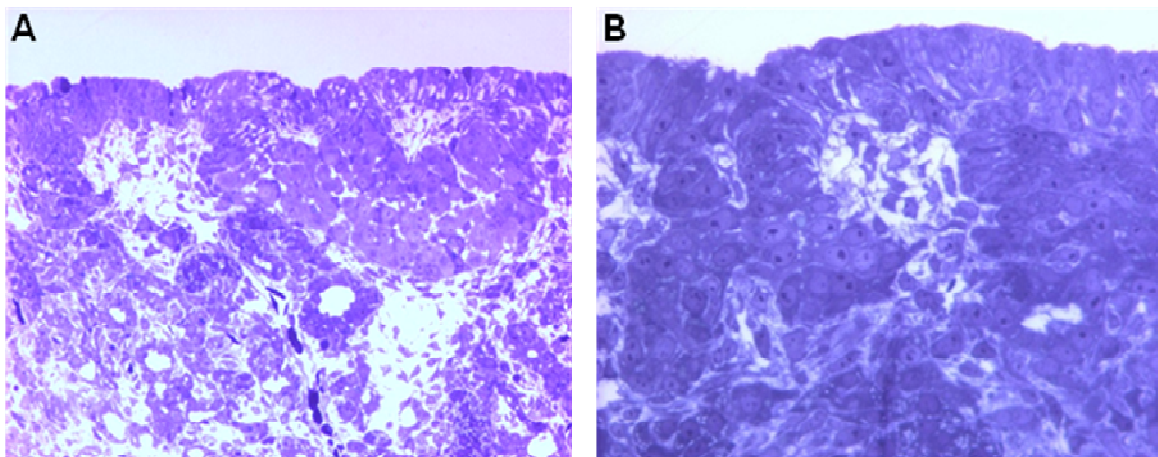


Figura 21. Cortes semifinos del ovario de pollo de 14 d.i. tratados con testosterona. El epitelio del grupo tratado con testosterona esta compuesto de una monocapa de células cúbicas o columnares, por debajo se observan los cordones corticales con un aumento en la entrada de células epiteliales. Fotografías tomadas por microscopía óptica A (20X) y B (40X) en cortes semifinos (200-250nm).

Los embriones tratados con DHT presentan un epitelio cubico estratificado, con aumento significativo en el número de mitosis en el OSE, la presencia de microvellosidades es menor y en las membranas basolaterales se aprecian espacios intercelulares. La entrada de las células epiteliales hacia la médula, para formar los cordones corticales es mayor, aumentando el tamaño de los mismos; las células aumentan significativamente el área citoplasmática y nuclear, así como el número de mitocondrias/célula, además presentan nucleolos prominentes y “vesículas” en su parte apical.

DHT



El epitelio del grupo tratado con flutamida previamente y posteriormente con DHT, es parecido al grupo testigo, las células presentan una disminución significativa en el tamaño del citoplasma y del núcleo respecto al grupo tratado con DHT quedando en manifiesto el efecto antiandrogénico de la flutamida, sin embargo no hay diferencia en la altura del epitelio entre estos dos grupos.

Tabla 1. Análisis morfométrico del ovario de embrión de pollo tratado con hormonas esteroides.

Tratamiento	Epitelio Superficial							
	<i>n</i>	Área μm^2		<i>n</i>	Altura μm	<i>n</i>	Número de mitocondrias/célula	
		Celular	<i>n</i>	Nuclear				
Testigo	12	37.4 ± 6.9	8	14.1 ± 3.1	15	12.2 ± 2.4	8	8.88 ± 3.25
Estradiol	10	53.4 ± 12*	7	19.9 ± 4.1*	14	16.5 ± 3.4*	7	14.6 ± 3.00*
Testosterona	7	50.8 ± 6.1*	7	15.8 ± 2.9	11	14.8 ± 2.6	7	15.4 ± 5.15*
DHT	11	52.7 ± 10*	7	16.9 ± 2.3	12	15.4 ± 3.0*	7	14.2 ± 2.41*
DHT+FTD	5	30.8 ± 7.3 [†]	5	12.8 ± 1.7 [†]	5	12.8 ± 4.3	7	

Tabla 1. El área celular y el número de mitocondrias por célula se incrementaron en el epitelio superficial de ovarios de embriones de pollo de 14 d.i. tratados con E₂, testosterona y DHT a una concentración de 200 ng por 48 h, el área nuclear es aumentada por E₂ y la altura del epitelio por E₂ y DHT. La flutamida (20 μg /embrión) bloqueó el efecto de la DHT en el área celular, nuclear y altura del epitelio. Se reporta la media \pm SD ($P < 0.05$) de acuerdo a la prueba de Tukey, * tienen diferencia significativa con el testigo y [†] tienen diferencia significativa con DHT.

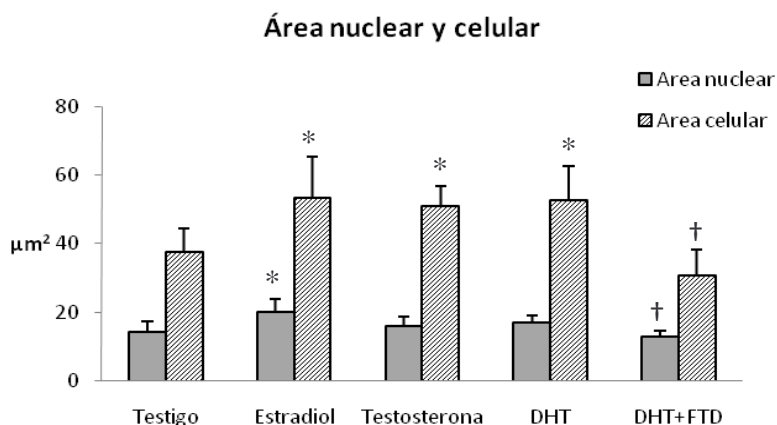


Figura 23. El área celular del epitelio superficial de ovario embrionario de pollo se incrementó con la administración de estradiol y DHT a una concentración de 200 ng por embrión por 48 h. Respecto al área ocupada por el núcleo solo el E₂ produjo un efecto significativo, además el efecto de DHT fue bloqueado por la flutamida en ambos parámetros. Se representa la media \pm SD ($P < 0.05$) con la prueba de Tukey, * tienen diferencia significativa con el testigo y [†] tienen diferencia significativa con DHT.

Figura 22. Cortes semifinos del ovario de pollo de 14 d.i. tratados con DHT. El epitelio de embriones tratados con DHT esta formado por una monocapa de células columnares, presenta gran cantidad de espacios intercelulares; por debajo se observan los cordones corticales que abarcan una mayor área. Fotografías tomadas por microscopía óptica A (20X) y B (40X) en cortes semifinos (200-250nm).

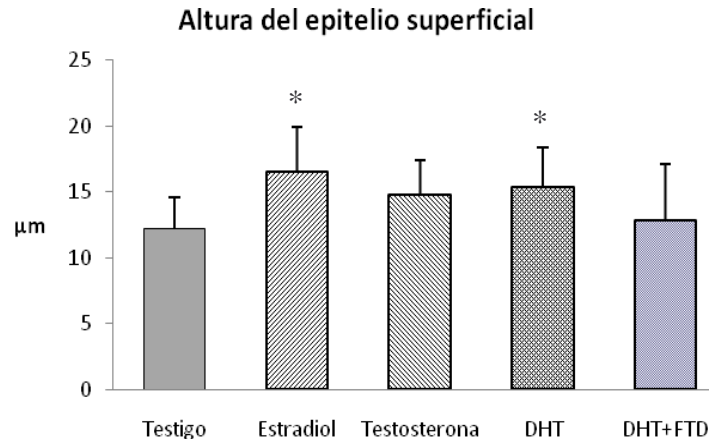


Figura 24. El tratamiento con estradiol y DHT aumentó la altura del epitelio superficial y el efecto de la DHT disminuyó al combinarla con flutamida, los tratamientos se aplicaron a una concentración de 200 ng por embrión por 48 h. Se representa la media \pm SD ($P < 0.05$) de acuerdo a la prueba de Tukey, * tienen diferencia significativa con el testigo y \dagger tienen diferencia significativa con DHT.

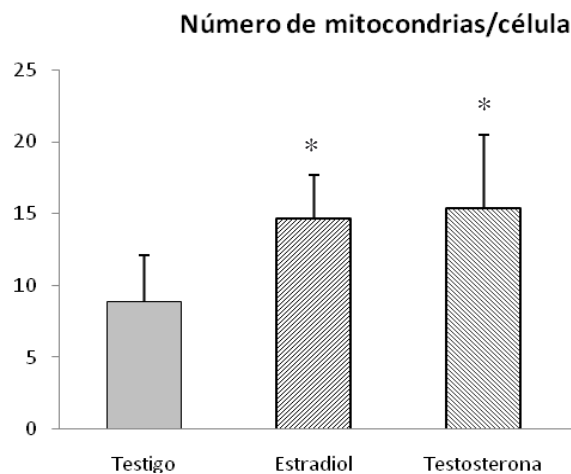


Figura 25. El número de mitocondrias por célula aumenta significativamente en todos los tratamientos hormonales por 48 h. Se representa la media \pm SD ($P < 0.05$) de acuerdo a la prueba de Tukey, * tienen diferencia significativa con el testigo.

Tabla 2. Efecto de las hormonas esteroides en el número de mitosis del ovario del embrión de pollo.

Tratamiento	<i>n</i>	Mitosis/100 μm		Mitosis/ 1000 μm^2
		Epitelio superficial	<i>n</i>	
Testigo	9	2.00 \pm 0.77	9	1.88 \pm 0.42
Estradiol	8	3.75 \pm 0.65*	7	1.97 \pm 0.49
Testosterona	7	3.00 \pm 0.80	7	1.77 \pm 0.24
DHT	7	3.45 \pm 0.73*	8	2.20 \pm 0.39

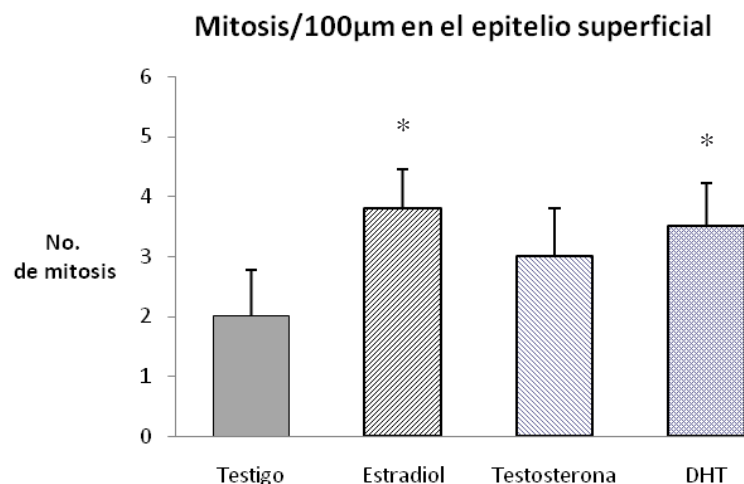


Figura 26. Estradiol y DHT aumentaron el número de mitosis en el epitelio superficial del ovario embrionario de pollo a una concentración de 200 ng por 48 h. Se representa la media \pm SD ($P < 0.05$) de acuerdo a la prueba de Tukey, * tienen diferencia significativa con el testigo.

6.7. Validación del método comparativo Δ Ct.

Se realizaron experimentos dúplex y monoplex, los mejores resultados de amplificación se obtuvieron por el experimento monoplex; ya que, la fluorescencia estadísticamente significativa (Ct) detectada por primera vez, para cada dilución del experimento monoplex (tabla 3) se detecta en ciclos separados por intervalos regulares de aproximadamente 3.5 ciclos entre cada dilución, indicando que las diluciones se realizaron de manera correcta y tienen la concentración de cDNA calculada para cada dilución, por lo tanto los experimentos finales se realizaron de esta manera. En la grafica 27 se puede confirmar lo antes mencionado, las curvas de amplificación se muestran separadas por intervalos regulares, lo que nos sirvió para seleccionar la concentración óptima de cDNA de ambos genes (blanco y endógeno). La dilución con Δ Ct favorable para nuestros experimentos fue la de 1:500 para ambos genes; ya que el número de ciclo en el que se detectan es intermedio (21.5 ciclos para 18S y 28 ciclos para N-cadherina) respecto a los números de ciclos totales (40), esta dilución corresponde a una concentración de 4ng de cDNA.

Tabla 2. Número de mitosis en el epitelio superficial y la médula del ovario de embrión de pollo de 14 d.i. tratado con hormonas esteroides por 48 h. Estradiol y DHT a una concentración de 200 ng incrementan el número de mitosis en el epitelio superficial del ovario. Se reporta la media \pm SD ($P < 0.05$) de acuerdo a la prueba de Tukey * tienen diferencia significativa con el testigo.

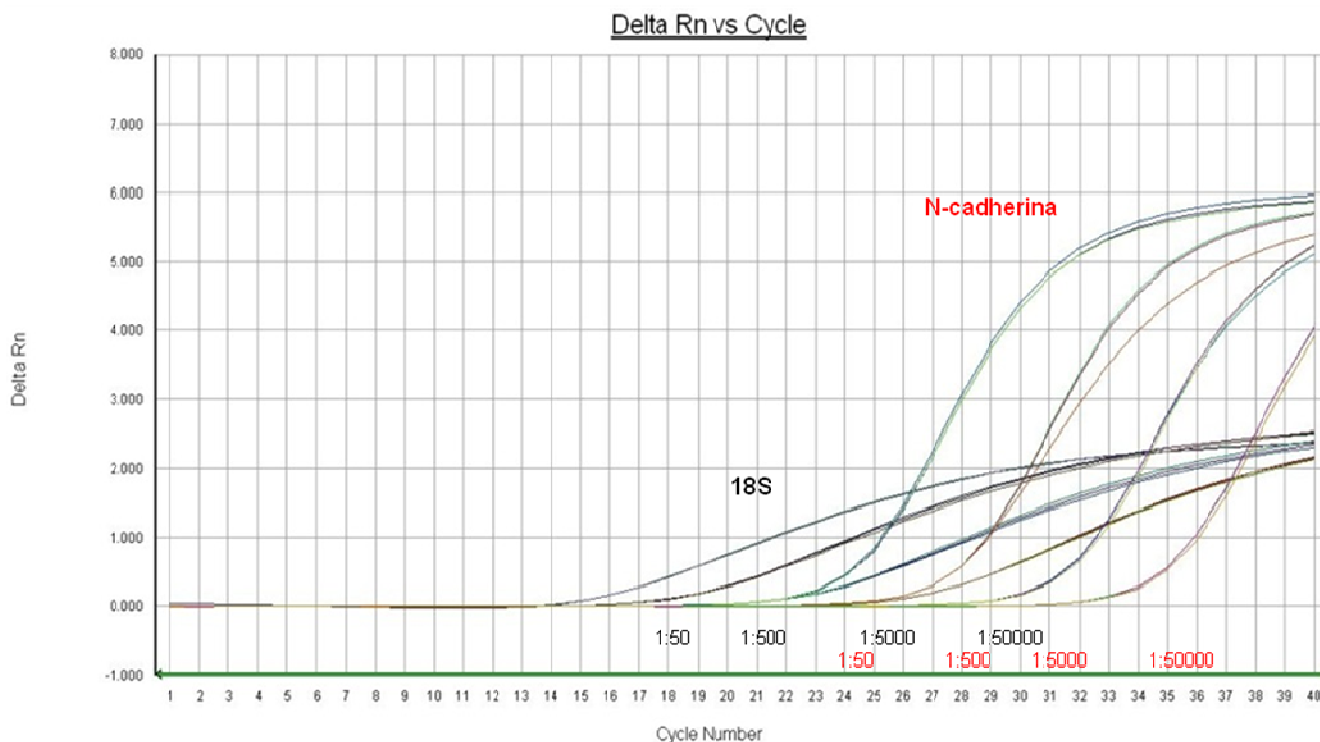


Figura 27. Gráfica de la magnitud de la señal generada (ΔRn) vs número de ciclos (Ct), del experimento monoplex, se muestran los ciclos en los cuales se detecto el Ct para cada dilución utilizada para ambos genes.

Tabla 3. Fluorescencia detectada por primera vez estadísticamente significativa (Ct) del experimento monoplex.

Muestra	Sonda	Gen	Ct
18S 1:50	18S	Endógeno	18.54
18S 1:500	18S	Endógeno	21.50
18S 1:5000	18S	Endógeno	25.45
18S 1:50000	18S	Endógeno	29.23
N-cad 1:50	N-cad	Blanco	24.20
N-cad 1:500	N-cad	Blanco	27.70
N-cad 1:5000	N-cad	Blanco	31.48
N-cad 1:50000	N-cad	Blanco	34.88

Los ΔCt se obtuvieron a partir de los resultados de la tabla 3 y se graficaron contra el logaritmo de la concentración de cada una de las diluciones, para poder validar que la eficiencia de amplificación de ambos genes fuera igual. En la grafica 28 se muestra la curva de validación para el experimento monoplex; para que el experimento quede validado es necesario obtener una pendiente menor o igual de 0.1, en este experimento se obtuvo una pendiente de 0.017, demostrando que la eficiencia de amplificación de ambos genes es igual.

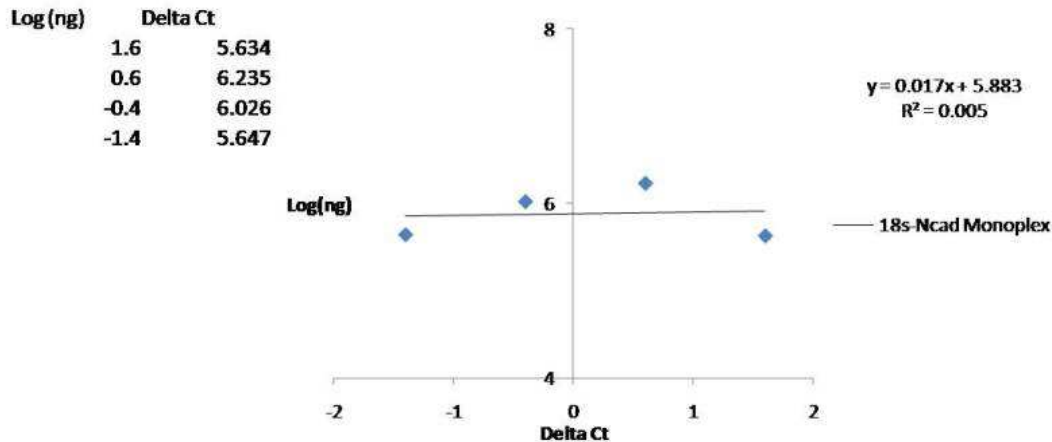


Figura 28. Curva de validación del experimento monoplex. Se obtuvo una pendiente de 0.017 lo cual valida el experimento Δ Ct. En la parte superior izquierda se presentan los valores del logaritmo de la concentración de cada una de las diluciones y sus respectivos Δ Cts.

La elección de un gen endógeno en un experimento de PCR en tiempo real es crucial para poder validar el experimento y obtener los mejores resultados. En este trabajo se probaron dos genes endógenos, β -actina y 18S, este último fue el gen endógeno que mejor respondió a las condiciones experimentales que utilizamos, por otra parte las amplificaciones de β -actina variaron entre cada uno de los experimentos sin poder tener valores que nos permitieran validar la eficiencia de amplificación entre este gen y nuestro gen blanco (datos no mostrado).

6.8. Expresión de N-cadherina por PCR en tiempo real.

Nuestros resultados indican que después de 12 h de tratamiento con testosterona, se inducen la expresión génica N-cadherina con una diferencia significativa en comparación con el control, pero no con el grupo DHT (fig. 29).

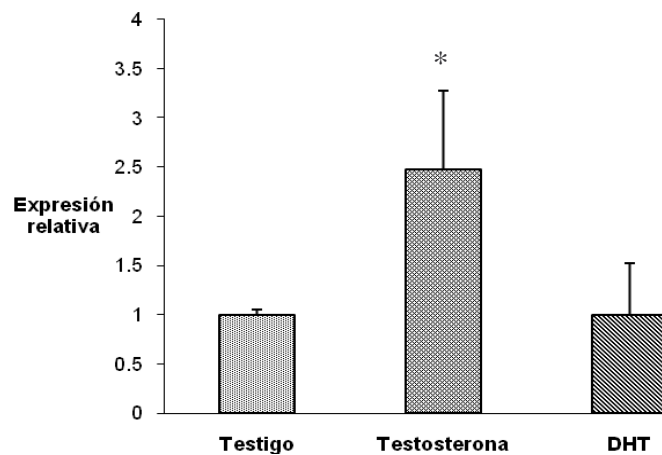


Figura 29. La expresión relativa a nivel de RNAm de N-cadherina por PCR en tiempo real aumento significativamente en células del epitelio superficial tratadas por 12 h con testosterona, respecto a DHT no tuvo un efecto en su expresión. Se aplicó el método Δ Ct y se representa la media \pm SD ($P < 0.05$) de acuerdo a la prueba de Duncan, ($n=4$ para todos los grupos) * tienen diferencia significativa con el testigo.

7. DISCUSION.

Uno de los logros de nuestro estudio fue demostrar que el epitelio superficial del ovario es un tejido que responde a andrógenos y que estos últimos están involucrados en la regulación de N-cadherina y los posibles eventos iniciales que transforman el epitelio superficial del ovario; ya que se ha reportado que el 90% de los tumores ováricos son positivos para el AR y la conservación de su expresión después de la transformación de células normales a fenotipos malignos sugiere que los andrógenos podrían tener un papel en la formación del cáncer ovárico y en el continuo recambio de cadherinas (switch de cadherinas) evento que participa en la génesis del cáncer epitelial ovárico.

7.1. Modelo biológico.

El embrión de pollo es una importante herramienta en la biología del desarrollo, debido a la accesibilidad del embrión que nos permite su manipulación *in vivo*, además nos ofrece grandes ventajas para procedimientos rápidos y fáciles con una alta precisión de manera temporal y espacial, la cual es imposible en un sistema con mamíferos (Mozdziak y Petite, 2004). El embrión de pollo presenta varias ventajas; ya que es de fácil manejo, se puede controlar los estadios de su desarrollo, su manejo es individual, de bajo costo y al ser un sistema cerrado no hay intervención de hormonas esteroides placentarias, además de presentar esteroidogénesis temprana. Durante la morfogénesis, el pollo incrementa dramáticamente el tamaño tanto del embrión como de sus órganos en desarrollo, similar al embrión humano, permitiéndonos hacer comparaciones entre estos dos organismos.

Durante el desarrollo gonadal el epitelio celómico que recubre las crestas genitales, prolifera y se introduce en la gónada indiferenciada, en la gónada femenina, da origen al epitelio superficial y este último tiene una gran importancia; ya que, dará origen a los cordones corticales que rodearán a los ovocitos y originan las futuras células de la granulosa que en conjunto con el ovocito y las células tecales constituyen los folículos ováricos en la corteza. El ovocito que no se rodea de células epiteliales se atresia, pero si está dentro de un folículo crece para producir un gameto competente para la fecundación. Esto solo es posible con la integración morfofuncional de las células granulosas derivadas del epitelio que recubre la superficie de la gónada. (Gilbert, 2008). Por otra parte el epitelio superficial del ovario es menos del 2% del tejido que compone la gónada, por lo que es necesario tener un modelo que nos permita la obtención de células epiteliales normales para su posterior estudio. El ovario del embrión de pollo es un buen modelo; ya que, similar al humano tiene una simple capa superficial de células epiteliales cuboidales que recubren al ovario y por las ventajas antes mencionadas lo hacen un excelente modelo para nuestro propósito.

Las hormonas esteroides son fundamentales para la función ovárica, durante el desarrollo fetal hay un incremento paralelo en la actividad esteroidogénica de las células intersticiales del ovario y un proceso proliferativo del OSE, además este tejido presenta AR, ER α y β , PR entre otros (Edmonson *et al.*, 2002). Se ha demostrado que el ovario embrionario de las aves lleva a cabo esteroidogénesis temprana, estos trabajos reportan que la secreción de testosterona y estradiol en ovario embrionario de pollo comienza a los 8 d.i. e incrementa gradualmente hasta el momento del nacimiento en donde bajan las concentraciones de ambas hormonas. El ovario es más activo en la secreción de estradiol, alcanzando un pico máximo al 14 d.i., que de testosterona la cual alcanza un

pico máximo al 20 d.i., semejante a estos resultados, un estudio en patos demostró que la secreción máxima de ambas hormonas se alcanzan a los 18 d.i. (Tanabe *et al.*, 1983 y 1986). Estos resultados indican que el ovario izquierdo de las aves es activo en la síntesis y secreción de andrógenos durante su desarrollo, sin embargo aun no se sabe la acción directa de los andrógenos en este evento. Por otra parte se tiene la hipótesis de que un exceso de andrógenos durante la vida intrauterina o en el periodo temprano postnatal podría estar vinculado con la acumulación de grasas y resistencia a la insulina, provocando vía el AR aberraciones metabólicas de los andrógenos culminando en PCOS; que se caracteriza por anovulación, hiperandrogenismo y morfología poliquística del ovario (Diamanti-Kandarakis, 2008), el cual está involucrado con el riesgo de padecer cáncer de ovario. Además se ha visto que al aplicar testosterona o DHT se promueve la expresión en el ovario del factor de crecimiento parecido a insulina (IGF) y su receptor (IGFR). Este evento aumenta a su vez la proliferación y la expresión de otros mitógenos como el factor diferencial de crecimiento 9 (GDF9) (Walters *et al.*, 2008), y que al desregularse estas vías se podría iniciar el evento de transformación de las células normales a malignas.

7.2. Cambios morfológicos en el OSE.

En el presente trabajo encontramos que el RNAm que codifica para el AR se expresa en los cordones esteroideogénicos de la región medular y en el epitelio superficial del pollo de 14 d.i., pero además está presente en el ovario entre los 10 y los 17 d.i., tal como lo reporta Katho *et al.*, 2006; sin embargo el trabajo de Katho *et al.*, 2006 no reporta su presencia en el epitelio superficial, por lo que de alguna manera y no se sabe como, la señalización inducida por los andrógenos unidos a su receptor están involucrados en el desarrollo del ovario izquierdo del pollo.

Los cortes semifinos obtenidos del ovario de embrión de pollo testigo de 14 d.i. presentan un epitelio simple aplanado o cúbico compuesto de células claras y oscuras, con microvellosidades en su parte apical, en su citoplasma presentan núcleos irregulares con nucleolos periféricos y mitocondrias. Estos resultados concuerdan con los reportados en ovario embrionario de humano y conejo, en donde el OSE es descrito morfológicamente como una capa de epitelio simple aplanado, cúbico o columnar pseudoestratificado que pasa de un epitelio aplanado o cúbico sin membrana basal distinguible a un epitelio multiestratificado restringido del tejido conectivo denso que se encuentra por debajo de él, por una membrana basal; se ha sugerido que estos cambios podrían ser dependientes de hormonas esteroideas intraováricas. Por otra parte describen que sus células se observan muy próximas entre sí, con la parte apical en forma de domo, cubiertas por abundantes y delgadas microvellosidades y por un atenuado glucocalix rico en ácido hialurónico; en sus membranas basolaterales se encuentran uniones intercelulares (estrechas, de brecha y desmosomas) pobremente desarrolladas, además de estrechos y dilatados espacios intercelulares. Su citoplasma contiene organelos bien desarrollados, incluyendo retículo endoplasmático rugoso (RER) y ocasionalmente liso, mitocondrias, complejo de Golgi, lisosomas, cuerpos multivesiculares, filamentos intermedios y glucógeno, ocasionalmente presentan microtúbulos e inclusiones de lípidos y sus núcleos son irregulares con un nucleolo periférico (Nicosia *et al.*, 1991; Katabuchi y Okamura 2003 y Okamura *et al.*, 2006). Al igual que en nuestros resultados también se describe la presencia de dos poblaciones celulares: células claras y oscuras, pero además hacen su descripción. Las células claras presentan núcleos redondeados con nucleolos grandes y escasa heterocromatina, al parecer presentan mayor número de componentes citoplasmáticos como mitocondrias, RER, vacuolas y ribosomas libres. Por su parte las células oscuras

se presentan con formas irregulares con escaso citoplasma con pocos orgánulos como mitocondrias y RER y sin vesículas, sus núcleos presentan morfología reticulada con poca heterocromatina. Algunos autores consideran a las células claras son más diferenciadas que las oscuras.

Los resultados obtenidos también nos permiten ver que por debajo del epitelio se encuentran los cordones corticales rodeados por una membrana basal y separados uno del otro por tejido conectivo laxo, estos cordones rodean a las células germinales que en algunas zonas hacen contacto con las células del OSE. Se hallan zonas en donde las células epiteliales se acomodan en estructuras aplanadas y apiladas por encima de los cordones y se aprecia la entrada de estas células para formar los cordones corticales, también en la región medular se presentan células esteroideogénicas con múltiples vesículas lipídicas. Satoh *et al.*, 1991 en un trabajo con cortes semifinos seriales de ovarios embrionarios de humano, reporta características muy similares a las que observamos en los cordones corticales del ovario embrionario de pollo, describe que los cordones sexuales primordiales que rodean a las células germinales y están rodeados por una membrana basal, se acomodan por debajo del epitelio superficial y en el momento en que los cordones tienen contacto con el OSE, este último comienza a proliferar y las células comienzan a acomodarse en estructuras aplanadas y apiladas, en ciertas regiones en donde la membrana basal esta ausente las células del OSE entran en contacto con las células germinales y se piensa que estas regiones es el lugar en donde las células epiteliales se introducen para formar los cordones corticales (cordones foliculogénicos). Aunado a este evento, la pronunciada proliferación de las células germinales hace que los cordones primarios se alarguen lateralmente a todo lo largo del epitelio superficial, y junto con la aparición de tejido conectivo en la parte basal del ovario reducen los espacios intersticiales. En este momento el OSE esta separado de los cordones primarios por una lamina basal y la proliferación del OSE disminuye (Satoh *et al.*, 1991). Por otra parte las células del estroma comienzan a diferenciarse adoptando características esteroideogénicas que aumentan gradualmente (Nicosia *et al.*, 1991).

Las células del OSE de ovarios de embrión de pollo de 14 d.i. tratados con hormonas esteroides (testosterona, DHT y estradiol) presentan pleomorfismo nuclear, aumentan el número de mitocondrias, el índice núcleo/citoplasma no aumenta; ya que ambos aumentan de tamaño, resultando en la transformación de las células cúbicas o aplanadas a columnares, y como consecuencia un aumento de la altura del epitelio, por otra parte al parece se induce el movimiento de las células hacia el estroma favoreciendo la formación de cordones corticales, este fenómeno es mucho más evidente cuando tratamos con DHT; además el tratamiento con DHT indujo la aparición de blebs en la parte apical de las células así como la presencia de espacios intercelulares, estos últimos no aparecen con el tratamiento con testosterona y tal vez se deba a que el OSE tanto de humano como de pollo se mantiene unido principalmente por N-cadherina y esta hormona aumenta la expresión de N-cadherina, tal como se muestra por medio de la RQ por PCR en tiempo real, por lo que estas células se mantienen bien unidas sin permitir la formación de estos espacios y la desorganización del epitelio. Se ha reportado que muchos de estos cambios son inducidos por la desregulación de los sistemas hormonales; por lo que los cambios morfológicos que percibimos al administrar hormonas esteroides podría ser el inicio de una atipia celular en el epitelio. Por otra parte, la presencia del AR, el efecto antiapoptótico-proliferativo inducido por los andrógenos en células del OSE (Edmonson *et al.*, 2002) y las propuestas que vinculan al AR y la carcinogénesis (Wang y Chang, 2004), nos hacen pensar que los andrógenos están involucrados en los cambios iniciales del OSE durante transformación neoplásica, en donde, semejante a las células neoplásicas,

los cambios citológicos incluyen: un alto índice núcleo/citoplasma, pleomorfismo nuclear, nucléolo prominente, RER bien desarrollado y ribosomas libres. Además presentan células oscuras y claras, estas últimas en mayor proporción por un incremento en la diferenciación celular, variación en lamelipodios, ondulaciones y blebs, incremento de endocitosis, lagunas intercelulares, vesículas pinocíticas, número de lisosomas y cuerpos multivesiculares, complejidad de la membrana basal y de vesículas con lípidos (Nicosia *et al.*, 1991).

Este es el primer trabajo que estudia el efecto de los andrógenos en el epitelio superficial del ovario embrionario de pollo y nuestros resultados sugieren que es un tejido que responde a los andrógenos y que además los cambios que presenciamos son efecto directo de los andrógenos unidos a su receptor; ya que al pretratar con flutamida se bloquean los receptores a andrógenos de las células y no presentan respuesta ante la administración de DHT; además los cambios morfológicos que se presentan en nuestro trabajo, junto con diversos estudios *in vitro* e *in vivo* del OSE normal que han demostrado que este responde a la administración de hormonas esteroides (Evangelou *et al.*, 2000; Choi *et al.*, 2001; Syed *et al.*, 2001 y Edmonson *et al.*, 2002) respaldan esta hipótesis.

7.3. Expresión de N-cadherina en células del OSE.

Nuestros resultados demuestran que la presencia de la proteína N-cadherina se encuentra en el epitelio superficial y en las células que forman los cordones corticales en el ovario de pollo de 14 d.i., y su expresión se mantiene en las células de cultivos primarios del epitelio de la misma edad, y su localización es en las uniones intercelulares. Similar a nuestros resultados en ovario de pollo, el OSE de humano está unido por N-cadherina y posiblemente también por E-cadherina; no está completamente diferenciado debido a su origen embrionario y mantiene la naturaleza pluripotencial de su precursor, el epitelio celómico (Peralta *et al.*, 1997; Sundfeldt *et al.*, 1997; Wong y Auersperg, 2002 y Patel *et al.*, 2003). Sin embargo la expresión de N-cadherina está involucrada en los procesos de invasión y metástasis de tumores de origen epitelial, explicado por una desestabilización de la adhesión celular al bajar los niveles de E-cadherina y aumentar los niveles de N-cadherina (switch de cadherinas), permitiendo que las células se desprendan del tumor primario y puedan viajar hacia otros tejidos blancos. Por el contrario, en el caso de los tumores derivados del OSE durante los estados tempranos de la enfermedad este tejido indiferenciado comienza a presentar una ganancia de fenotipo epitelial incluyendo la expresión de E-cadherina (Hudson *et al.*, 2008), estableciendo un tumor primario, una vez que se ha establecido y la enfermedad progresa, el tumor comienza a perder sus características epiteliales por medio de la transición epitelio-mesénquima (EMT), es decir, la pérdida del fenotipo epitelial y la adquisición de un fenotipo mesenquimático, involucrando el aumento de N-cadherina, sin la pérdida total de E-cadherina, de esta manera las células se comienzan a desprender del tumor primario y comienzan a viajar por el fluido peritoneal, formando conglomerados de células denominados esferoides, estos esferoides están unidos principalmente por E-cadherina (Wu *et al.* 2007), y así sobrevivir y al llegar a su tejido blanco, en donde llevan a cabo el proceso inverso a la EMT, la transición mesénquima-epitelio (MET), adoptando nuevamente el fenotipo epitelial para poder colonizar al tejido blanco (Ahmed *et al.*, 2007 y Wheelock *et al.*, 2007). De este hecho se deriva una teoría que propone que la transición EMT “parcial o incompleta”, como se observa en la mayoría de los tumores, permite a las células migrar o invadir manteniéndose unidas en conglomerados (Brabletz *et al.*, 2005 y Christiansen *et al.*, 2006), fenómeno observado en el OSE normal durante el proceso de reparación del estigma posterior a la ovulación (Ahmed *et al.*, 2006). Por lo que el CEO presenta una

excepción a la regla, en donde parece seguir un proceso MET a EMT durante la progresión de la enfermedad, contrario a otros carcinomas epiteliales que llevan un proceso EMT a MET. Estas observaciones son respaldadas por trabajos en donde se ha encontrado que tumores primarios son positivos a E-cadherina hasta en un 86% y para N-cadherina en un 33%, confirmando la ganancia de un fenotipo epitelial (Hudson *et al.*, 2008). Es importante resaltar que la regulación a la baja de E-cadherina esta involucrada con el proceso de EMT en muchos carcinomas y es un factor en la progresión de tumores bien diferenciados a tumores pobremente diferenciados y metástasicos, sin embargo la sobreexpresión de N-cadherina no esta bien entendida en este tipo de cáncer y se piensa que no interviene en el proceso; y que la expresión aberrante de N-cadherina puede jugar un papel importante en la progresión tumoral solo en algunos casos dependiendo del contexto celular.

También reportamos que el RNAm para N-cadherina se expresa en el ovario a los 10 d.i. y se mantiene hasta los 17 d.i. No obstante no hay trabajos a la fecha que reporten que los andrógenos regulan la expresión de N-cadherina; en este trabajo, por medio de cuantificación relativa obtenida del RNAm de células en cultivo, encontramos por primera vez, que esta proteína esta siendo regulada positivamente por el efecto de la testosterona (2.03 ± 0.9), pero no por DHT (0.92 ± 0.4) y estradiol (0.8 ± 0.5), las cuales no tienen ningún efecto y se comportan semejantes al control (1 ± 0.1). Se han reportado trabajos en donde se presenta una regulación positiva a nivel transcripcional de N-cadherina en células epiteliales por TGF- β e integrinas (Maeda *et al.*, 2005 y Alexander *et al.*, 2006), sin embargo, la regulación transcripcional que influye en su expresión no esta aun bien caracterizada. Se ha demostrado que en célula CP-3 (línea celular de cáncer de próstata) en cultivo el factor de transcripción Twist (factor que reprime la expresión de E-cadherina) puede activar directamente la expresión de N-cadherina al unirse en la región del primer intrón de *CDH-2* (Oda *et al.*, 1998; Rosivatz *et al.*, 2002 y Alexander *et al.*, 2006). No obstante, en nuestro trabajo no se sabe si Twist esta presente en las células del OSE y si esta siendo sobreexpresado en presencia de la testosterona que causaría como consecuencia la sobreexpresión de N-cadherina. Wong *et al.*, 1999 reportó que en cultivos de OSE normal se presenta un aumento de N-cadherina y Maeda *et al.*, 2005 encontró que la expresión de N- y E-cadherina en células epiteliales depende del grado de confluencia, los cultivos dispersos expresan N-cadherina pero no E-cadherina y al ir aumentando la confluencia comienza a expresarse E-cadherina y N-cadherina baja hasta desaparecer. Sin embargo no se sabe que causas o que factores intervienen en la sobreexpresión de N-cadherina.

Por otra parte el AR juega un papel muy importante como factor de transcripción activado por andrógenos, pero también puede ser activado por modificaciones postransduccionales como la fosforilación (Faus y Haendler, 2006), sin embargo, se ignora como el AR desencadena la respuesta de las células del OSE a la exposición a andrógenos. Se sabe que la DHT es 10 veces más potente que la testosterona (Santtini, 2004), pero los resultados obtenidos indican que DHT no esta teniendo un papel activo en la regulación de la N-cadherina. Takayama *et al.* 2007 reporto que uno de los genes que se regulan positivamente al efecto del AR es el gen que codifica para N-cadherina (*CDH-2*) por la unión directa del AR en la región del exón 1 del gen *CDH-2*. Sin embargo aun cuando esto se sabe y nuestros resultados indican que la expresión de N-cadherina esta regulada a nivel transcripcional por andrógenos (principalmente testosterona) (fig. 29); no se sabe el por que de este fenómeno y que otras vías de señalización intervienen para la elevada regulación positiva de N-cadherina en células del epitelio superficial. Una posible respuesta es que de manera natural durante el desarrollo embrionario del OSE y aun en

la madurez, la presencia de la enzima 5 α -reductasa sea reducida o nula (Rae y Hiller, 2005) y el proceso de transformación de testosterona a DHT sea bajo, siendo la testosterona el andrógeno más abundante en este tipo de células, por lo que tal vez el efecto que estamos presenciando sea debido a la vía clásica de la testosterona unida al AR y de la vía no clásica que en conjunto elevan la transcripción de los genes blancos de los andrógenos, entre ellos *CDH-2*. El 35% de los genes regulados por el AR no contienen AREs dentro de los 6 Kb cercanos al sitio de inicio de la transcripción y cuando los presentan, muchos de esos genes no son regulados directamente por el AR, si no por vías alternativas o no clásicas. Previos estudios han demostrado que el estímulo con testosterona puede inducir mecanismos no genómicos y la subsiguiente activación de la proteína cinasa-cinasa-cinasa activada por mitógenos (MAPKKK-ERK) independiente de la unión del AR al DNA, además de la vía clásica uniéndose a AREs; una posible explicación es que el estímulo con testosterona induce a que una poza de AR se transporte hacia la membrana celular por un tiempo aproximado de 60 minutos, este mecanismo aun no esta bien entendido, pero esa poza de receptores al estar cerca de la membrana puede interactuar con la proteína asociada a membrana principalmente con Src (una proteína tirosina cinasa, involucrada en muchas funciones incluyendo la adhesión celular) esta interacción causa la activación de Src la cual a su vez fosforila al EGFR el cual parece ser indispensable para la vía de señalización rio abajo hasta la cinasa ERK, interesantemente aun cuando la relación AR-Src dura solo 30 minutos la actividad de ERK persiste hasta por 24 horas. Esto es posible a que una vez que el EGFR es activado, hay una retroalimentación positiva, en donde el EGFR es capaz de fosforila a Src y viceversa, además de seguir con la vía rio abajo que termina con la activación de ERK, todo esto sin la necesidad del AR (Weigel y More, 2006). ERK fosforila numerosos blancos citoplasmáticos y nucleares y su señalización depende del tipo celular regulando proliferación, diferenciación, sobrevivencia, migración, angiogénesis y remodelación de la cromatina (Dhillon *et al.*, 2006). Además la mayoría de los efectos no genómicos de los andrógenos ocurren en la presencia de altas concentraciones no fisiológicas de testosterona (Santini, 2004), nuestros resultados podrían ser efecto de este fenómeno. El aumento de los andrógenos también puede activar vías que involucran a receptores de membrana como el receptor acoplado a proteínas G (GPCR), en donde al interactuar con los andrógenos aumenta los niveles intracelulares de calcio activando a la proteína cinasa C (PKC) y a las proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPKs), todas estas proteínas cinasas pueden modular directamente al AR o fosforilar a sus coactivadores para incrementar la transcripción de sus genes blanco (Heinlein *et la.*, 2002 y Culig *et al.*, 2003).

Aunado a lo anterior, la vía de señalización Wnt es conocida por su habilidad para regular la adhesión celular y control del ciclo celular, pero cuando actúa de tal manera que β -catenina pueda ser transcripcionalmente activa, esta tiene una alta afinidad por el AR y sirve de proteína andamio para translocar al AR hacia el núcleo, una vez en el núcleo β -catenina recluye activadores como CBP/p300, aumentando la transcripción y acelerando la oncogénicidad del AR. Además β -catenina actúa como activador puro del AR; ya que actúa sin diferencia tanto en células silvestres como en mutantes para el AR y sigue actuando aun cuando los niveles de andrógenos bajen (Yang *et al.*, 2002 y Mulholland *et al.*, 2005).

Finalmente como consecuencia de lo antes mencionado, la expresión de N-cadherina puede estar dada por la activación dependiente de cinasas y de los coactivadores que se unen a la región rio arriba del sitio de transcripción, los cuales posteriormente reclutaran los factores de transcripción generales (GTFs) acelerando el comienzo de la transcripción.

Por ejemplo, los coactivadores ARA54 y E6-AP que tienen actividad de ubiquitina ligasa pueden aumentar la transcripción inducida por el AR debido a que degradan los co-represores de receptores nucleares permitiendo que el AR se una a la región reguladora del gen blanco, (Culig, *et al.*, 2003 y Lee *et al.*, 2003) en este caso *CDH-2*.

8. CONCLUSIONES.

- El método de digestión parcial con tripsina es un método eficiente para la obtención de células epiteliales de ovarios de embrión de pollo de 14 d.i. que posteriormente pueden ser cultivadas.
- El receptor a andrógenos esta presente a nivel de el RNA mensajero y de la proteína en el ovarios de embriones de pollo de 14 d.i.
- La N-cadherina esta presente a nivel de RNA mensajero en ovarios de embrión de pollo de 14 d.i. y de proteína en células del epitelio superficial en cultivos primarios.
- La expresión de la N-cadherina en células del epitelio superficial de ovario embrionario de pollo de 14 d.i. aumenta en respuesta a la administración de testosterona, pero no de DHT. Por lo que testosterona podría tener un efecto en el mantenimiento e integridad del epitelio superficial.
- El epitelio superficial del ovario de embrión de pollo de 14 d.i. responde de manera diferencial a la administración de andrógenos *in ovo*. Cada uno de los tratamientos hormonales (estradiol, testosterona y DHT) modifican morfológicamente al ovario, siendo DHT el andrógeno que tiene un efecto más notable en la histología del epitelio superficial.
- Este es el primer trabajo a la fecha que reporta la presencia del AR en el OSE de pollo y que describe el efecto de los andrógenos en la expresión de N-cadherina en el epitelio superficial del ovario de pollo, además de describir los cambios morfológicos que sufre el ovario y principalmente el epitelio superficial como respuesta a la administración de andrógenos.

9. APENDICE.

Lista de soluciones.

Solución libre de calcio y magnesio (SSB) pH 7.4

NaCl 137mM
KCl 2.7mM
KH₂PO₄ 2mM
Na₂HPO₄ 10mM
Agregar gotas de rojo fenol.

Buffer de fosfatos salino (PBS) pH 7.4

NaCl 137mM
KCl 2.7mM
KH₂PO₄ 2mM
Na₂HPO₄ 10mM

PBT

PBS+Tween 20 al 0.1%

SSC 20X pH 7

NaCl 3M
Citrato de sodio 0.3M

Solución de prehibridación

Formamida 50%
SSC 20X pH 7 5X
EDTA (Sigma R-6625) 5mM
tRNA de levadura 50µg/ml
Tween 20 0.2%
CHAPS 0.5%
Heparina (Sigma H-7005) 50µg/ml
Agua DEPC

Solución de hibridación

Solución de prehibridación+3 µg de sonda/ml

MABT pH 7.5

Ácido málico 100mM
NaCl 150mM
Tween-20 0.1%
Agua DEPC

NTMT

NaCl 5M
Tris-HCl pH 9.5 0.01M
MgCl 2M
Tween 20 0.1%
Agua DEPC

Methacarn

Cloroformo 30%

Metanol 60%

Ácido acético 10%

Búfer de citratos pH 6.0

Citrato de sodio 0.1M

Tween-20 0.1%

Agua desionizada

10. BIBLIOGRAFIA.

Ahmed N, Maines-Bandiera S, Quinn MA, Unger WG, Dedhar S, Auersperg N (2006) Molecular pathways regulating EGF-induced epithelio-mesenchymal transition in human ovarian surface epithelium. *Am J Physiol Cell Physiol* 290(6):C1532-C1542.

Ahmed N, Thompson EW, Quinn MA (2007) Epithelial-Mesenchymal interconversion in normal ovarian surface epithelium and ovarian carcinomas: an exception to the norm. *J Cell Physiol* 213:581-588.

Alexander NR, Tran NL, Rekapally H, Summers CE, Glackin C, Heimark RL (2006) N-cadherin gene expression in prostate carcinoma is modulated by integrin-dependent nuclear translocation of Twist1. *Cancer Res* 66:3365-3369.

Aranda A, Pascual A (2001) Nuclear hormone receptors and gene expression. *Physiological Reviews* 81(3):1269-1304.

Auersperg N, Wong AST, Choi K, Kang SK, Leung PCK (2001) Ovarian surface epithelium: biology, endocrinology, and pathology. *Endocrine Reviews* 22(2):255-288.

Auersperg N, Woo M (2004) Development and differentiation of ovarian surface epithelium: cues for the basis of this malignant potential. En: The ovary. 2d. Ed. Leung CK P and Adash L Eds. Elsevier, USA.

Bonello N, McKie K, Jasper M, Andrew L, Ross N, Braybon E, Brannstrom M, Norman RJ (1996) Inhibition of nitric oxide: effects on interleukin-1 beta-enhanced ovulation rate, steroid hormones, and ovarian leukocyte distribution at ovulation in the rat. *Biol Reprod* 54:436-445.

Brabletz T, Jung A, Spaderna S, Hlubek F, Kirchner T (2005) Opinion: migrating cancer stem cells-an integrated concept of malignant tumour progression. *Nat Rev Cancer* 5:744-749.

Burger HG (2002) Androgen production in women. *Fertility and Sterility* 77(4) Suppl. 4.

Choi JH, Wong AST, Huang HF, Leung PCK (2007) Gonadotropins and ovarian cancer. *Endocrine Reviews* 28(4):440-461.

Christiansen JJ, Rajasekaran AK (2006) Reassessing epithelial to mesenchymal transition as a prerequisite for carcinoma invasion and metastasis. *Cancer Res* 66:8319-8326.

Claessens F, Denayer S, Tilborgh NV, Kerkhofs S, Helsen C, Haelens A (2008) Diverse roles of androgen receptor (AR) domains in AR-mediated signaling. *Nuclear Receptor Signaling*. 6: 13.

Clevers H (2006) Wnt/ β -Catenin signaling in development and disease. *Cell* 127:469-480.

Conacci-Sorrell M, Zhurinsky J, Ben-Ze'ev A (2002) The cadherin-catenin adhesion system in signaling and cancer. *J Clin Invest* 109:987-991.

Cramer DW, Welch WR (1983) Determinants of ovarian cancer risk. II. Inferences regarding pathogenesis. *J Natl Cancer Inst* 71:717-721.

Culig Z, Klocker H, Bartsch G, Steiner H, Hobisch A (2003) Androgen receptors in prostate cancer. *J Urol* 170(4):1363-1369.

Darai E, Scoazec JY, Walker-Combrouze F, Mlika-Cabanne N, Feldmann G, Madelenat P, Potet F (1997) Expression of cadherins in benign, borderline, and malignant ovarian epithelial tumors: a clinicopathologic study of 60 cases. *Hum Pathol* 28:922-928.

DeFrias DVS, Okonkwo AM, Keh PC, Nayar R (2002) Cytopathology of the ovary. En Ovarian cancer. Kluwer Academic Publishers. 185-211.

Dhillon AS, Hagan S, Rath O, Kolch W (2006) MAP kinase signaling pathways in cancer. *Oncogene* 26:3279-3290.

Diamanti-Kandarakis E (2008) Polycystic ovarian syndrome: pathophysiology, molecular aspects and clinical implications. *Expert reviews* 10:e3.

Diaz-Cueto L, Ulloa-Aguirre A (2003) Regulación neuroendocrina de la función reproductiva. *Cuad Med Reprod* 9:47-60.

Drummond AE (2006) The role of steroids in follicular growth. *Reproductive Biology and Endocrinology* 4:16.

Edmondson RJ, Monaghan JM, Davies BR (2002) The human ovarian surface epithelium is an androgen responsive tissue. *Br J Cancer* 86:879-885.

Evangelou A, Letarte M, Jurisica I, Sultan M, Murphy KJ, Rosen B, Brown TJ (2003) Loss of coordinated androgen regulation in nonmalignant ovarian epithelial cells with *BRCA1/2* mutations and ovarian cancer cells. *Cancer Research* 63:2416-2424.

Fathalla MF (1971) Incessant ovulation-a factor in ovarian neoplasia? *Lancet* 2 163.

Fleming JS, Beaugié CR, Haviv I, Chenevix-Trench G, Tan OL (2006) Incessant ovulation, inflammation and epithelial ovarian carcinogenesis: Revisiting old hypotheses. *Molecular and Cellular Endocrinology* 247:4-21.

Fujioka T, Takebaiashi Y, Kihanai T, Kusanagi Y, Hamada K, *et al.* (2001) Expression of E cadherin and beta-catenin in primary and peritoneal metastatic ovarian carcinoma. *Oncol Rep* 8(2):249-55.

Gadducci A, Cosio S, Gargini A, Genazzani AR (2004) Sex-steroid hormones, gonadotropin and ovarian carcinogenesis: a review of epidemiological and experimental data. *Gynecol Endocrinol* 19:216-228.

Gao W, Bohl CE, Dalton JT (2005) Chemistry and structural biology of androgen receptor. *Chem Rev* 105:3352-3370.

Gilbert SF (2008) Developmental biology. Sinauer Associates. Octava edición. 817pp.

Giles JR, Olson LM, Johnson PA (2006) Characterization of ovarian surface epithelial cells from the hen: A unique model for ovarian cancer. *Exp Biol Med* 231:1718-1725.

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

Gobinet J, Poujol N, Sultan Ch (2002) Molecular action of androgens. *Molecular and Cellular Endocrinology* 198:15-24.

Gondos B (1975) Surface epithelium of the developing ovary. Possible correlation with ovarian neoplasia. *Am J Pathol* 81:303-21.

Hajra KM, Fearon ER (2002) Cadherin and catenin alterations in human cancer. *Genes, Chromosomes & Cancer* 34:255–268.

Hartssock A, Nelson WJ (2008) Adherens and tight junctions: structure, function and connections to the actin cytoskeleton. *Biochimica et Biophysica Acta* 1778:660-669.

Heinlein CA, Chang C (2002) The roles of androgen receptors and androgen-binding proteins in nongenomic androgen actions. *Mol Endocrinol* 16(10):2181-2187.

Henrique D, Adam J, Myat A, Chitnis A, Lewis J, Ish-Horowicz D (1995) Expression of a delta homologue in prospective neurons in the chick. *Nature* 375:787-790.

Horie-Inoue K, Takayama K, Bono HU, Ouchi Y, Okazaki Y, Inoue S (2006) Identification of novel steroid target genes through the combination of bioinformatics and functional analysis of hormone response elements. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 339:99-106.

Hudson LG, Zeineldin R, Stack MS (2008) Phenotypic plasticity of neoplastic ovarian epithelium: unique cadherin in tumor progression. *Clin Exp Metastasis* 25:643-655.

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

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* 96:5722-5727.

Leckband D, Prakasam A (2006) Mechanism and Dynamics of Cadherin Adhesion. *Annu Rev Biomed Eng* 8:259–87.

Lee DK, Chang C (2003) Molecular communication between androgen receptor and general transcription machinery. *J Steroid Biochem Mol Biol* 84(1):41-49.

Leung PCK, Choi JH (2007) Endocrine signaling in ovarian surface epithelium and cancer. *Human Reproduction Update* 13(2):143-162.

Lukanova A, *et al.* (2003) Circulating levels of sex steroid hormones and risk of ovarian cancer. *Int J Cancer* 104:636–642.

Lukanova A, Kaaks R (2005) Endogenous hormone and ovarian cancer: epidemiology and current hypothesis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 14:98-107.

MacDonald BT, Semenov MV, He X (2007) SnapShot: Wnt/ β -Catenin signaling. *Cell* 131:1204. e1.

Maeda M, Johnson KR, Wheelock MJ (2005) Cadherin switching: essential for behavioral but not morphological changes during an epithelium-to-mesenchyme transition. *J Cell Sci* 118:873-887.

Marques RF, Fonseca-Carvasan GA, De Angelo Andrade LA, Bottcher-Luiz F (2004) Immunohistochemical patterns for alpha- and beta-catenin, E- and N-cadherin expression in ovarian epithelial tumors. *Gynecol Oncol* 94:16-24.

Matchell NH, Blaschuk OW, Farookhi R (2002) Developmental expression and distribution of N- and E-cadherin in the rat ovary. *Biology of Reproduction* 63:797-804.

Matchell NH, Farookhi R (2003) E- and N-cadherin expression and distribution during luteinization in the rat ovary. *Reproduction* 125:791-800.

- Matsumoto T, Shiina H, Kawano H, Sato T, Kato S (2008) Androgen receptor functions in male and female physiology. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology* 109:236–241.
- Mège RM, Gavard J, Lambert M (2006) Regulations of cell-cell junctions by the cytoskeleton. *Current Opinion in Cell Biology* 18:541-548.
- Mozdziak PE, Petite JN (2004) Status of transgenic chicken models for developmental biology. *Developmental Dynamics* 229:414-421.
- Mulholland DJ, Dedhar S, Coetzee GA, Nelson CC (2005) Interaction of nuclear receptors with the Wnt/β-Catenin/Tcf signaling axis: Wnt you like to know? *Endocrine Reviews* 26(7):898-915.
- Murdoch WJ, Van Kirk EA, Alexander BM (2005) DNA damage in ovarian surface epithelial cells of ovulatory hens. *Exp Biol Med* 230:429-433.
- Nicosia SV, Saunders BO, Acevedo-Duncan M, Setrakian S, Degregorio R (1991) Biopathology of ovarian mesothelium. Ultrastructure of the ovary. Kluwer Academic Publishers.
- Nollet F, Kools P, Van Roy F (2000) Phylogenetic analysis of the cadherin superfamily allows identification of six major subfamilies beside several solitary members. *J Mol Biol* 299:551-572.
- Oda H, Tsukita S, Takeichi M (1998) Dynamic behavior of the cadherinbased cell-cell adhesion system during Drosophila gastrulation. *Dev Biol* 203:435-450.
- Patel I, Madan P, Getsios S, Bertrand M, Mac Calman C (2003) Cadherin switching in ovarian cancer progression. *Int J Cancer* 106:172-177.
- Peinado H, Portillo F, Cano A (2004) Transcriptional regulation of cadherins during development and carcinogenesis. *Int J Dev Biol* 48:365-375.
- Peralta SA, Knudsen KA, Tecson-Miguel A, McBrearty FX, Han AC, Salazar H (1997) Expression of E-cadherin and N-cadherin in surface epithelial-stromal tumors of the ovary distinguished mucinous from serous and endometrioid tumors. *Hum Pathol* 28:734-739.
- Polakis P (2001) More than one way to skin a catenin. *Cell* 105:563-566.
- Pon. YL, Auersperg N, Wong AS (2005) Gonadotropins regulate N-cadherin-mediated human ovarian surface epithelial cell survival at both post-translational and transcriptional levels though a cyclic AMP/protein kinase A pathway. *Journal of Biological Chemistry* 280:15438-15448.
- Pötter E, Bergwits C, Brabant G (1999) The Cadherin-catenin system: implications for growth and differentiation of endocrine tissues. *Endocrine reviews* 20. 2:207-239.
- Rae MT, Hillier SP (2005) Steroid signaling in the ovarian surface epithelium. *TRENDS in Endocrinology and Metabolism* 16(7):327-333.
- Ramburan A, Govender D (2002) Cadherins and catenins in pathology. *Current Diagnostic Pathology* 8:305-317.
- Rich HA (1998) Hormonal etiology of epithelial ovarian cancer, with a hypothesis concerning the role of androgens and progesterone. *J Natl Cancer Inst* 90:1774-1786.
- Riman T, Persson I, Nilsson S (1998) Hormonal aspects of epithelial ovarian cancer: review of epidemiological evidence. *Clin Endocrinol* 49:695-707.

Rinaldi S, Dossus L, Lukanova A, Peeters PHM, Allen NE, *et al.* (2007) Endogenous androgens and risk of epithelial ovarian cancer: results from the european prospective investigation into cancer and nutrition (EPIC). *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 16(1):23-29.

Rosivatz E, Becker I, Specht K, Fricke E, Lubber B, Busch R, Hofler H, Becker KF (2002) Differential expression of the epithelial-mesenchymal transition regulators snail, SIP1 and twist in gastric cancer. *Am J. Pathol* 161:1881-1891.

Ross MH, Kaye GI, Pawlina W (2005) Histología. Texto atlas a color con biología celular y molecular. Cuarta edición. Editorial Panamericana. pp. 730.

Rowlands TM, Symonds JM, Farookhi R, Blaschuk OW (2000) Cadherins: crucial regulators of structure and function in reproductive tissues. *Reviews of Reproduction* 5:53-61.

Sánchez SL, Hernández VJM, López MR (2005) Papel de las cadherinas en la metástasis. *REB* 24(3,4):97-103.

Santti H (2004) Molecular determinants of androgen action. Helsinki University Biomedical Dissertations No. 55. Institute of Biomedicine / Physiology University of Helsinki Finland.

Satoh M (1991) Histogenesis and organogenesis of the gonad in human embryos. *J Anat* 177:85-107.

Smith CA, Sinclair AH (2004) Sex determination: insights from the chicken *BioEssays* 26:120-132.

Snyder JP, (2001) Editorial: The role of androgens in women. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 86(3):1006-1007.

Sundfeldt K (2003) Cell-cell adhesion in the normal ovary and ovarian tumors of epithelial origin; an exception to the rule. *Molecular and Cellular Endocrinology* 202:89-96.

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* 61:6768-6776.

Takayama K, Kaneshiro K, Tsutsumi S, Horie-Inoue K, Ikeda K, Urano T, Ijichi N, Ouchi Y, Shirahige K, Aburatani H, Inoue S (2007) Identification of novel androgen response genes in prostate cancer cells by coupling chromatin immunoprecipitation and genomic microarrays analysis. *Oncogene* 26:4453-4463.

Tanabe Y, Saito N, Nakamura T (1986) Ontogenetic steroidogenesis by testes, ovary, and adrenals of embryonic and postembryonic chickens (*Gallus domesticus*). *General And Comparative Endocrinology* 63:456-463.

Tanabe Y, Yano T, Nakamura T (1983) Steroid hormone synthesis and secretion by testes, ovary, and adrenals of embryonic and postembryonic ducks. *General and Comparative Endocrinology* 49:144-153.

Tsuchiya B, Sato Y, Kameya T, Okayasu I, Mukai K (2006) Differential expression of N-cadherin and E-cadherin in normal human tissues. *Arch Histol Cytol* 69. 2:135-145.

Twohoger SS, Lee I-M, Buring JE, Hankinson SE (2008) Plasma androgen concentrations and risk of incident ovarian cancer. *American Journal of Epidemiology* 167(2):211-218.

Vanderhyden BC, Shaw TJ, Ethier JF (2003) Animal models of ovarian cancer. *Reproductive Biology and Endocrinology* 1:67

Veatch AL, Carson LF, Ramakrishnan S (1994) Differential expression of the cell-cell adhesion molecule E cadherin in ascites and solid human ovarian tumor cells. *Int J Can* 58:393-399.

Villalpando I, Sánchez-Bringas G, Sánchez Vargas I, Pedernera E, Villafán-Monroy H (2000) The P450 aromatase (P450 arom) gene is asymmetrically expressed in a critical period for gonadal sexual differentiation in chick. *General and Comparative Endocrinology* 117:325-334.

Walters KA, Allan CM, Handelsman DJ (2008) Androgen actions and the ovary. *Biology of Reproduction* 78:380-389.

Wang PH, Chang C (2004) Androgens and ovarian cancers. *Eur J Gynaecol Oncol* 25:157-163.

Weigel NL, Moore NL (2007) Kinases and protein phosphorylation as regulators of steroid hormone action. *Nuclear Receptor Signaling* 5:e005.

Wheelock MJ, Shintani Y, Maeda M, Fukumoto Y, Johnson KR (2007) Cadherin switching. *Journal of Cell Science* 121(6):727-735.

Wilson CM, McPhaul MJ (1994) A and B forms of the androgen receptor are present in human genital skin fibroblast. *Proc Natl Acad Sci* 91:1234-1238.

Wong AST, Auersperg N (2002) Normal ovarian surface epithelium. *Cancer Treat Res* 107:161-183.

Wong AST, Maines-Bandiera SL, Rosen B, Wheelock MJ, Johnson KR, Leung PCK, Roskelley CD, Auersperg N (1999) Constitutive and conditional cadherin expression in cultured human ovarian surface epithelium: influence of family history of ovarian cancer. *Int J Can* 81:180-188.

Wu C, Cipollone J, Maines-Bandiera S, Tan C, Karsan A, Auersperg N, Roskelley CD (2007) The morphogenic function of E-cadherin-mediated adherens junctions in epithelial ovarian carcinoma formation and progression. *Differentiation* 76:193-205.

Yang F, Li X, Sharma M, Sasaki C, Longo D, Lim B, Sun Z (2002) Linking β -Catenin to androgen-signaling pathway. *Journal of Biological Chemistry* 277(13):11336-11344.

Yap AS, Crampton MS, Hardin J (2007) Making and breaking contacts: the cellular biology of cadherin regulation. *Current Opinion in Cell Biology* 19:508-514.

Yen SSC, Jaffe RB, Barbieri RL (2001) Endocrinología de la reproducción. Editorial Médica Panamericana. Cuarta edición. 118-143.

<http://womenshealth.med.monash.edu.au/information.html> 25 de septiembre 2008.