



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO

---

---

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
CUAUTITLAN

EFFECTO DE LA GONADOTROPINA CORIONICA SOBRE  
LA PROLIFERACION DEL EPITELIO SUPERFICIAL DEL OVARIO

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:  
QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA  
P R E S E N T A :  
CARMEN GUADALUPE MONDRAGON HUERTA

ASESORA: DRA. MA. DEL CARMEN MENDEZ HERRERA

CUAUTITLAN IZCALLI, EDO. DE MEX.

2005



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN  
UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR  
DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

U. N. A. M.  
FACULTAD DE ESTUDIOS  
SUPERIORES CUAUTITLAN



DEPARTAMENTO DE  
EXAMENES PROFESIONALES

DR. JUAN ANTONIO MONTARAZ CRESPO  
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLAN  
P R E S E N T E

ATN: Q. Ma. del Carmen García Mijares  
Jefe del Departamento de Exámenes  
Profesionales de la FES Cuautitlán

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la TESIS:

Efecto de la gonadotropina coriónica sobre la proliferación del  
epitelio superficial del ovario

que presenta la pasante: Carmen Guadalupe Mondragón Huerta  
con número de cuenta: 09951316-4 para obtener el título de:

Química Farmacéutica Bióloga

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

ATENTAMENTE  
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 16 de Mayo de 2005.

PRESIDENTE	<u>QFB. Ma. Esther Revuelta Miranda</u>	
VOCAL	<u>Dra. Ma. del Carmen Méndez Herrera</u>	
SECRETARIO	<u>MC. Francisco López Mejía</u>	
PRIMER SUPLENTE	<u>Dra. Norma L. Delgado Buenrostro</u>	
SEGUNDO SUPLENTE	<u>QFI. Guadalupe Koizumi Castro</u>	

## **AGRADECIMIENTOS.**

A Dios por guiarme y estar conmigo en cada momento de mi vida y permitirme vivir para compartir este momento

A mis papás por su apoyo, su cariño, su guía.

A mi abuelita.

A mis hermanos Pedro, Luz María y Pablo por su cariño, su ayuda.

A mis tíos y primos por estar siempre presentes en todos los momentos importantes.

A la Dra. Carmen Méndez por su guía y su paciencia durante este tiempo.

Al Dr. Enrique Pedernera por su crítica y apoyo académico en la realización de este trabajo.

A Verónica Rodríguez Mata para la realización de la técnica histológica.

A Susana Cano y a la Sra. Celia Villeda por su apoyo en la realización de este trabajo.

A mis compañeros del Departamento de Embriología Leti y Oscar.

A los profesores de la carrera de QFB de la FES Cuautitlán por sus enseñanzas y dedicación.

A mis compañeros y amigos de la Generación 26 de QFB de la FES Cuautitlán Olga, Norma, Ruth, Vladimir, Chucho, Jesús, Lalo, Claudia, Mike, a Gilma y Azucena por su compañía, su amistad y por compartir conmigo muchos momentos importantes.

<b>INDICE.</b>	<b>Pag.</b>
<b>1. RESUMEN</b>	1
<b>2. INTRODUCCIÓN</b>	2
<b>2.1 Ovario</b>	2
2.1.1 Estructura y Función	2
2.1.2 Ovario Embrionario	2
<b>2.2 El folículo Ovárico</b>	3
2.2.1 Ovocitos	3
2.2.2 Células Granulosas	4
2.2.3 Células Tecaes	5
2.2.4 Desarrollo Folicular	6
<b>2.3 Ovulación</b>	8
<b>2.4 Cuerpo Lúteo</b>	10
<b>2.5 Menopausia</b>	11
<b>2.6 Eje Hipotálamo-Hipófisis-Ovario</b>	12
<b>2.7 Hormona Luteinizante</b>	12
2.7.1 Funciones de la Hormona Luteinizante	15
2.7.2 Receptor LH/CG	15
2.7.3 Mecanismo de acción de LH	17
<b>2.8 Desarrollo del ovario de las aves</b>	18
<b>3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b>	21
<b>4. HIPÓTESIS</b>	23
<b>5. OBJETIVOS</b>	24
<b>5.1 Objetivo General</b>	24
<b>5.2 Objetivos Particulares</b>	24

<b>6. MATERIAL Y METODOS</b>	25
<b>6.1 Material Biológico</b>	25
<b>6.2 Reactivos</b>	25
<b>6.3 Control histológico del ovario</b>	25
<b>6.4 Obtención de células epiteliales</b>	26
<b>6.5 Cultivo primario de células epiteliales</b>	26
<b>6.6 Aislamiento de RNA y reverso transcripción (RT)</b>	27
<b>6.7 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)</b>	28
<b>7. RESULTADOS</b>	29
<b>7.1 Detección de Citoqueratinas</b>	29
<b>7.2 Proliferación celular de OSE en cultivos primarios</b>	31
<b>7.3 Receptor de CG/LH en el OSE</b>	35
<b>8. DISCUSIÓN</b>	36
<b>9. CONCLUSIONES</b>	40
<b>10. PERSPECTIVAS</b>	41
<b>11. REFERENCIAS</b>	42
<b>12. GLOSARIO</b>	51
<b>13. APENDICES</b>	53
<b>13.1 Apéndice I (Soluciones)</b>	53
<b>13.2 Apéndice II (Técnicas)</b>	55

**LISTA DE ABREVIATURAS.** (Por sus siglas en Ingles)

AMH	Hormona antimülleriana
AMPc	Adenosín monofosfato cíclico
BrdU	5-Bromo-2'-deoxiuridina
CG	Gonadotropina coriónica
hCG	Gonadotropina coriónica humana
CGP	Células germinales primordiales
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Médium
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
cDNA	Ácido Desoxirribonucleico complementario
EDTA	Etilendiamino triacetato
EGF	Factor de crecimiento epidérmico
EG-VEGF	Factor de crecimiento endotelial derivado de la glándula endocrina
FSH	Hormona foliculo estimulante
GDF-9	Factor de crecimiento y diferenciación 9
GnRH	Hormona liberadora de gonadotropinas
IGF	Factor de crecimiento similar a la insulina
LDL	Lipoproteínas de baja densidad
LH	Hormona luteinizante
LHR	Receptor de la hormona luteinizante
mRNA	Ácido ribonucleico mensajero
OSE	Epitelio superficial del ovario
PGF	Prostaglandina
PKA	Proteincinasa A
PKC	Proteincinasa C
P450 <sub>arom</sub>	P450 aromatasa
SSB	Solución salina balanceada
TGF-β	Factor de crecimiento transformante β
TSH	Hormona estimulante de la tiroides
VEGF	Factor de crecimiento vascular endotelial



## 1. RESUMEN

El ovario produce las hormonas esteroideas sexuales y libera un óvulo en cada ciclo sexual. Su función esta regulada por el eje hipotálamo-hipófisis-ovario a través de la hormona liberadora de gonadotropinas y la secreción de las hormonas luteinizante y folículo estimulante (LH y FSH). La LH pertenece a la familia de hormonas glicoproteicas, estas comparten una subunidad  $\alpha$  y presentan una subunidad  $\beta$  específica. La similitud entre la subunidad  $\beta$  de la LH y la gonadotropina coriónica (CG), permite que actuen a través del mismo receptor. El receptor para la LH/CG pertenece a la superfamilia de receptores de siete dominios transmembranales acoplados a proteínas G; la unión con el ligando enciende las vías de señalización mediadas por las proteincinasas A (PKA) y C (PKC). Morfológicamente, el ovario esta integrado por la corteza, la médula y el epitelio superficial. El epitelio superficial del ovario esta expuesto a la estimulación continua con FSH y LH durante el ciclo sexual y responde a ellas facilitando la ovulación. En este trabajo se estudia el efecto proliferativo de la LH/CG en cultivos primarios de células del epitelio superficial del ovario de embrión de pollo de 14 días de incubación. El porcentaje de las células que incorporaron 5-Bromo-2'-deoxiuridina (BrdU) se tomó como índice de proliferación celular. La CG humana (hCG) no recombinante estimula la proliferación celular en condiciones de no privación de suero, en las células epiteliales a la dosis de 0.5 UI/ml (Testigo 27.82 versus hCG 35.72  $p < 0.05$ ) y en condiciones de privación de suero, con 12 horas de tratamiento con esta hormona (Testigo 13.93 y hCG 16.31  $p < 0.05$ ). Los resultados indican que la hCG estimula "*in vitro*" la proliferación de las células del epitelio superficial del ovario. El mRNA del receptor a la LH/CG esta presente en este tipo celular lo que sugiere que la LH interviene en la regulación de la proliferación de las células del epitelio superficial del ovario del embrión de pollo.

## 2. INTRODUCCIÓN

### 2.1 Ovario

#### 2.1.1 Estructura y función

El ovario maduro es un órgano intra-abdominal en forma de almendra de color rosa o blanco, sus principales funciones son: liberar un óvulo durante cada ciclo sexual que sea competente para la fertilización y el desarrollo embrionario además de preparar a los órganos reproductores para la implantación, mediante la producción de hormonas esteroideas. La unidad estructural y funcional de este órgano es el folículo ovárico, formado por el ovocito, las células de la granulosa y las células de la teca; su maduración está regulada por las gonadotropinas hipofisiarias a través del eje hipotálamo-hipófisis-ovario.

Morfológicamente se observan tres compartimentos que funcionan integrados:

a) La corteza que contiene los folículos ováricos, b) la médula compuesta por células productoras de andrógenos, tejido conectivo fibroelástico laxo, arterias espiraladas y venas contorneadas y c) el epitelio superficial que es un mesotelio derivado del epitelio celómico que recubre la superficie del ovario.

Los folículos primordiales se localizan en una capa avascular en la corteza del ovario debajo de la túnica albugínea. En contraste, los folículos en crecimiento, los folículos atrésicos y el cuerpo lúteo se encuentran en el límite entre la corteza y la médula. (Gougeon, 2004)

#### 2.1.2 Ovario embrionario.

El desarrollo de la gónada inicia con la formación de la cresta urogenital a partir del mesodermo intermedio, posteriormente se organiza en una gónada indiferenciada integrada por células del epitelio celómico, células del mesénquima y células germinales primordiales (CGP), con estos elementos embriológicos puede diferenciarse hacia ovario o hacia testículo.

En el embrión humano de 4 semanas de gestación las CGP migran desde el saco vitelino a través del mesenterio dorsal, llegan a la cresta genital a la 5ta. semana y la gónada queda sexualmente diferenciada en la 7ma. semana. Una vez en el ovario las CGP se conocen como ovogonias y se dividen por mitosis hasta el principio del cuarto mes de gestación. La población de ovogonias esta sujeta a tres procesos simultáneos: mitosis, meiosis y atresia, la mitosis en las ovogonias termina completamente a los 7 meses de gestación, cuando estas células entran en la profase de la primera división meiótica se conocen como ovocitos primarios.

Durante el estado de gónada indiferenciada el epitelio celómico que recubre la cresta genital prolifera y se extiende dentro del mesénquima, formando los cordones sexuales primarios y posteriormente, en el caso del ovario, los cordones sexuales corticales que no penetran profundamente dentro del mesénquima, sino que permanecen en la corteza y rodean a las CGP para formar los precursores de las células foliculares que darán origen a la capa granulosa. El mesénquima gonadal aportará las futuras células tecales. (Gilbert, 2003)

## **2.2 El folículo ovárico.**

Como ya se mencionó la unidad funcional del ovario es el folículo, el cual consta de un ovocito rodeado por células de la granulosa y dependiendo del estado de desarrollo folicular por células de la teca

### **2.2.1 Ovocitos.**

El número de ovocitos decrece progresivamente desde la etapa fetal y durante las distintas etapas de la vida de la mujer, hasta llegar a la menopausia cuando se han depletado la mayor parte de los folículos ováricos y cesa la menstruación. El ovario de la niña recién nacida contiene de 1-2 millones de ovocitos primarios, al inicio de la pubertad quedan cerca de 300 mil de los cuales solo se ovularán alrededor de 500. Durante la maduración folicular, el ovocito crece de 30  $\mu\text{m}$  en folículos primarios hasta 140  $\mu\text{m}$  en el folículo preovulatorio. El crecimiento inicial parece estar controlado por

el sistema KIT (el receptor c-kit y su ligando) y el factor de crecimiento y diferenciación 9 (GDF 9), posteriormente este crecimiento depende del contacto que se establece entre el ovocito y las células granulosas (Gougeon, 2004; Erickson y col., 2001; Thomas y cols., 2005).

La maduración del ovocito es indispensable para que adquiriera la competencia necesaria para llevar a cabo la fertilización y el desarrollo temprano del embrión. Esta ocurre en tres niveles: la maduración nuclear, que se lleva a cabo con el entrecruzamiento y la recombinación de los cromosomas durante la meiosis y la reducción del material genético de diploide a haploide. La impronta genómica o maduración epigenética, que produce modificaciones en la cromatina estables y heredables que afectan la expresión de los genes improntados sin ocasionar cambios en la secuencia del DNA. La maduración citoplasmática es la etapa en la cual los ovocitos acumulan RNA y proteínas de origen materno necesarios para el inicio del desarrollo embrionario, mientras se da la transición a la expresión del genoma del cigoto (Eppig y cols., 2004).

El núcleo del ovocito primario permanece en diploteno de la profase de la primera división meiótica, hasta la pubertad, cuando antes de la ovulación, se reanuda la meiosis por efecto del pico de la LH. El ovocito primario se convierte en un ovocito secundario luego de completar la primera división meiótica y la formación del primer cuerpo polar, posteriormente se detiene en metafase de la segunda división meiótica y solo la concluye si hay fecundación. Durante la ovulación, el ovocito secundario y las células de la granulosa circundantes (acúmulo ovígero) son expulsados del ovario e ingresan a las tubas uterinas (Carlson, 2004).

### 2.2.2 Células granulosas.

Las células de la capa granulosa se relacionan íntimamente con el ovocito y son esenciales para su supervivencia y maduración. La primera interacción funcional se da cuando una capa incompleta de células precursoras de las granulosas rodea al ovocito para formar el folículo primordial. La compleja interacción entre las células granulosas

y el ovocito permite que algunos folículos inicien su desarrollo, otros permanezcan en reposo o bien, entren en atresia. Una vez iniciado el crecimiento folicular las células granulosas se interconectan por uniones en hendidura (gap junctions), de lo que resulta un extenso sincicio integrado y funcional. Las uniones gap son fundamentales en el intercambio metabólico y en el transporte de pequeñas moléculas entre las células foliculares y el ovocito (Juneja y cols., 1999).

En los folículos antrales se distinguen tres poblaciones de células de la granulosa: las de la granulosa mural, las antrales y las células del acúmulo ovigero.

Las células de la granulosa mural son las que contactan con la membrana basal, detienen su proliferación, tienen mayor capacidad esteroidogénica, expresan las enzimas  $3\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa, el citocromo P450 aromatasa ( $P450_{arom}$ ) entre otras y producen estrógenos durante la fase folicular. Además, las células de la granulosa mural adquieren receptores a LH conforme avanza la maduración folicular. Estas características las distinguen de las células de la granulosa antral, que son las más cercanas al antro y de las células del acúmulo ovigero que rodean al ovocito; las cuales continúan proliferando, adquieren pocos receptores a LH y tienen disminuida su capacidad esteroidogénica. Las células del acúmulo ovigero son ovuladas junto con el ovocito mientras que las células foliculares que permanecen en el ovario después de la ovulación se diferencian en células lúteas por acción de la hormona luteinizante (Salustri y cols., 2004).

### 2.2.3 Células tecales.

Las células de la teca son atraídas desde el estroma por las células granulosas para rodear a los folículos en desarrollo secundarios y posteriores. Se postula que hay organizadores moleculares de la teca derivados de las células de la granulosa como el sistema KIT (Parrot y col., 2000), el factor de crecimiento epidérmico ó EGF (Erickson y col., 1983) y el GDF-9 (Burns y cols., 2002) que ocasionan, de acuerdo al estado de maduración, la atracción y diferenciación de las células tecales. Las células de la teca interna poseen receptores a LH y producen andrógenos durante la maduración folicular.

Además, se postula que podrían emitir señales implicadas tanto en el mantenimiento del folículo como en su degeneración por atresia.

#### 2.2.4 Desarrollo Folicular.

La mayoría de los folículos ováricos se encuentran en reposo por largos periodos de tiempo; cuando salen de este estado quiescente tienen dos opciones, degenerar por atresia o bien iniciar su crecimiento desde folículos primordiales hasta transformarse en folículos antrales preovulatorios altamente diferenciados (folículos de Graaf).

Los folículos primordiales miden de 30 a 60  $\mu\text{m}$  de diámetro, contienen a un ovocito primario de 9-25  $\mu\text{m}$  de diámetro rodeado por una capa incompleta de células planas, precursoras de las granulosa y delimitada por la lámina basal o membrana granulosa que las separa de la teca y del estroma ovárico. Este estadio es independiente del estímulo de las hormonas gonadotróficas.

Crecimiento Preantral. Al iniciar el crecimiento folicular, los folículos primordiales se transforman en folículos primarios cuando las células planas que rodean al ovocito primario se convierten en una capa única y completa de células granulosa cúbicas y aumenta el tamaño del folículo a más de 60  $\mu\text{m}$  de diámetro. La proliferación de estas células origina múltiples estratos celulares y transforman al folículo primario en folículo secundario ( $\leq 120 \mu\text{m}$ ) compuesto por un ovocito primario rodeado por dos o más capas de células granulosa cúbicas. Durante la formación del folículo secundario, las células de la granulosa desarrollan receptores a: estrógenos, andrógenos y a la FSH.

La zona pelúcida es una membrana no celular, translúcida que rodea al ovocito desde el estadio de folículo primario; a través de ella pasan las microvellosidades que mantienen el contacto entre las células de la granulosa y el ovocito. Esta constituida por glucosaminoglicanos y tres glucoproteínas, la ZP1, la ZP2 y la ZP3. En varias especies de mamíferos la zona pelúcida es sintetizada por el ovocito con contribución de las células foliculares. (Carlson, 2004)

En el folículo secundario que presenta de 3 a 6 capas de células de la granulosa se organiza la teca a partir de las células del estroma que alcanzan la membrana basal y se alinean en estratos concéntricos paralelas unas a otras. Conforme el folículo crece, la teca se estratifica y diferencia en dos partes, la teca externa y la teca interna. La primera mantiene una apariencia similar a las células del estroma; la teca interna se forma por células precursoras alargadas similares a fibroblastos que adquieren la morfología típica de células productoras de esteroides (microvellosidades y vesículas cubiertas de clatrina, abundante retículo endoplásmico liso, gotas de lípidos citoplasmáticas, mitocondrias con apariencia esférica y crestas túbulo vesiculares). El folículo en crecimiento adquiere arteriolas para su nutrición y aporte hormonal; a medida que se forman vasos capilares en las células de la teca interna, inician su diferenciación con la adquisición de receptores a LH y la biosíntesis de esteroides (Hirshfield, 1991).

Los folículos preantrales van adquiriendo células tecales y se presume que comienzan a responder lentamente a la estimulación gonadotrófica; luego, pasan a folículos antrales y aumentan de tamaño, principalmente a expensas de la proliferación de células de la granulosa y al crecimiento del antro.

El folículo antral temprano, como su nombre lo indica, se forma con la aparición del antro, en el cual el ovocito tiene una ubicación excéntrica y es rodeado por células de la granulosa formando el acúmulo ovígeno, estas células se conectan con el ovocito mediante uniones gap a través de la zona pelúcida para contactar el citoplasma del ovocito, este contacto tiene una función crítica durante la maduración folicular. Las células del acúmulo ovígeno son contiguas a las células de la granulosa murales.

El antro es una cavidad que acumula líquido folicular entre las células de la granulosa, contiene proteínas similares a las que se encuentran en el suero, gonadotropinas, hormonas esteroides, enzimas, factores de crecimiento proteoglicanos y electrolitos.

A través de la acumulación de fluido en la cavidad antral y la proliferación de células de la granulosa y de la teca interna, los folículos progresan a los estados subsecuentes de desarrollo y crecen desde 5 hasta 20 mm de diámetro. Posteriormente ocurre la selección y se alcanza la dominancia folicular por un solo folículo, que es el destinado a ovular (Fig 1) (Gougeon, 2004)

El folículo dominante se caracteriza por un mayor índice mitótico de las células de la granulosa, aumento de los receptores a LH en las células tecaes y una vascularización desarrollada. El aumento de la irrigación conduce a una mayor disponibilidad de LH y lipoproteínas de baja densidad (LDL) para las células tecaes y de FSH para las células de la granulosa (Zeleznik, 2004).

La teoría del umbral propone que el mayor número de receptores a FSH en las células de la granulosa es lo que definirá la dominancia de un folículo sobre los otros; este folículo tiene niveles detectables de FSH en su licor folicular, produce cantidades significativas de estradiol ya que tiene la capacidad para aromatizar andrógenos con mayor eficiencia en respuesta al aumento de AMPc y por lo tanto mayor producción de la enzima P450<sub>arom</sub> generada por la unión de la FSH y LH con sus receptores; esto se acompaña de la caída de los niveles circulantes de FSH privando al resto de los folículos de este estímulo y evitando así que continúen con su desarrollo. Sin embargo, aún no están del todo claros los mecanismos que llevan a la dominancia folicular (Zeleznik, 2004).

### **2.3 Ovulación**

El folículo dominante aumenta rápidamente de tamaño durante la primera mitad del ciclo ovárico, produce una prominencia que sobresale de la superficie del ovario en la que aparece una pequeña mancha avascular llamada estigma. Previo a la ovulación, el ovocito primario termina la primera división meiótica, se convierte en ovocito secundario y junto con él, algunas células del cúmulo ovífero se desprenden del interior del folículo distendido y quedan flotando en el licor folicular. Hormonalmente hay un ascenso notable de estrógenos, seguido de la secreción aguda de LH y en menor medida, de FSH. El pico de LH es la señal para que se lleve a cabo la ovulación; el estigma forma una vesícula que se rompe expulsando el complejo cúmulo-ovocito (el ovocito recubierto por la zona pelúcida con una o más capas de células de la granulosa) y el licor folicular. La expulsión del ovocito es consecuencia del aumento de la presión intrafolicular, de la contracción del músculo liso de la teca externa por estimulación con



prostanglandinas, de la digestión enzimática de la pared folicular y del epitelio que recubre el ovario en la zona de ovulación inducida por LH (Espey y cols., 2004).













Edad	Histología Folicular		Sucesos meióticos en el óvulo	Complemento cromosómico
Periodo fetal	No hay folículo		Ovogonia	2n,2c
Antes o al momento del nacimiento	Folículo primordial		Ovocito primario	2n,4c
			Meiosis en progreso	
Después del nacimiento	Folículo primario		Ovocito primario	2n,4c
Después de la pubertad	Folículo antral temprano		Detenido en la etapa diploteno de la primera división meiótica	
			Ovocito primario	2n,4c
			Se completa la primera división meiótica, comienza la segunda división meiótica	
	Folículo dominante		Ovocito secundario + primer cuerpo polar	1n,2c
	Óvulo ovulado		Ovulación	
	Óvulo ovulado		Ovocito secundario + primer cuerpo polar	1n,2c
	Óvulo fecundado		Detenido en metafase II	
			Fecundación-se completa la segunda división meiótica	
	Óvulo fecundado		Óvulo fecundado + segundo cuerpo polar	1n,1c + espermatozoide

Figura 1. Resumen de los principales acontecimientos en la ovogénesis y el desarrollo folicular en la mujer. (Carlson , 2004)

## 2.4 Cuerpo Lúteo

Después de la ovulación, las células remanentes del folículo dominante se convierten en células lúteas y se reorganizan para formar el cuerpo lúteo. Los capilares y los fibroblastos del estroma circundante proliferan y penetran la membrana basal guiados por factores angiogénicos como el factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF) y el factor de crecimiento endotelial derivado de la glándula endocrina (EG-VEGF), que promueven la proliferación y migración celular, también aumentan la permeabilidad vascular; además factores locales como el IGF-1 e IGF-2 pueden sinergizar con las gonadotropinas para controlar la expresión de VEGF. Las angiotensinas también son esenciales para el crecimiento, mantenimiento y degeneración de los capilares en el cuerpo lúteo (Hazzard y col., 2000).

En el cuerpo lúteo se observan células grandes y pequeñas, se pensaba que las células lúteas grandes se derivan de las células de la granulosa, mientras que las pequeñas de las células de la teca. Actualmente se ha encontrado que las células lúteas grandes también pueden derivarse de las células tecales y aún más se sugiere que en el cuerpo lúteo permanece el modelo de dos células dos gonadotropinas para la producción de hormonas esteroides. En la región paralútea que se cree proviene de las células tecales se expresa la P450<sub>c17</sub> para la síntesis de andrógenos por estímulo de la LH y en las células lúteas originadas de las células de la granulosa, se cataliza su conversión a estrógenos por la P450<sub>arom</sub> que fue producida como respuesta de la célula a la unión con FSH (Stouffer, 2004)

Durante la luteólisis, el cuerpo lúteo involuciona y forma una cicatriz avascular conocida como cuerpo albicans. En este proceso es importante la participación de los diferentes tipos celulares como son las células lúteas, los pericitos y el endotelio vascular. Algunas moléculas relacionadas con la involución del cuerpo lúteo son las endotelinas locales (ET-1) y la prostanglandina PGF<sub>2α</sub>, además de las células del sistema inmune que invaden el cuerpo lúteo. La vida funcional del cuerpo lúteo es de 14 ± 2 días.

## 2.5 Menopausia.

La menopausia se define como el período de transición en la vida de una mujer cuando ya no hay producción de óvulos por el ovario por lo tanto disminuye la producción de estrógenos y progesterona; en consecuencia la actividad menstrual disminuye y finalmente cesa al igual que la fertilidad.

Desde la transición menopáusica se observa una disminución de los estrógenos, la inhibina y la progesterona; al mismo tiempo se da una elevación gradual de la FSH sin que haya aumento paralelo de la concentración de LH. Es hasta la menopausia, alrededor de los 50 años cuando los niveles circulantes de ambas gonadotropinas se elevan como reflejo de un aumento en la velocidad de su producción por la hipófisis. (Jaffe, 2001; Schmidt y cols., 1996)

La pérdida de folículos en el ovario posmenopáusico contribuye a la disminución de su peso y tamaño. En apariencia es una estructura atrófica amarillenta y opaca de aspecto arrugado provocado por el plegamiento de su superficie. La corteza se aprecia adelgazada y generalmente carece de folículos. Se sugiere que la depleción folicular se acelera en la última década de la vida previa a la menopausia ya que pueden encontrarse algunos folículos primordiales y otros en maduración y atresia hasta cinco años después de las últimas menstruaciones.

En la mujer menopáusica la médula del ovario es amplia en comparación con la corteza, En el estroma cortical y las células hiliares se han identificado receptores a FSH y LH que son un componente funcional importante de la médula. En el hilio se observan grupos de células epiteliales grandes conectadas con grupos de fibras nerviosas no mielinizadas. El estroma ovárico produce andrógenos, predominantemente androstenediona y testosterona; pero la producción estrogénica depende casi exclusivamente de la aromatización extraglandular de androstenediona. La estrona es el principal estrógeno encontrado en la circulación de las mujeres posmenopáusicas. (Yeh y Adashi, 2001)

También en esta etapa el epitelio superficial se introduce a la región cortical y potencialmente puede formar quistes de inclusión que pierden contacto con la superficie ovárica (Auersperg, 2001).

## **2.6 Eje Hipotálamo-hipófisis-ovario**

Durante el ciclo sexual la biosíntesis y la secreción de las gonadotropinas está regulada por factores hipotálamicos e hipofisarios. El hipotálamo controla la expresión de estas hormonas mediante la secreción pulsátil de la hormona liberadora de gonadotropinas, (GnRH); alta frecuencia y baja amplitud favorecen la secreción de LH, mientras que baja frecuencia y alta amplitud la de FSH. (Anderson, 1996). La GnRH llega a los gonadotropos de la adenohipófisis a través de la circulación del sistema porta-hipofisario donde induce la producción y secreción de gonadotropinas. Una vez secretadas a la circulación se transportan a las gónadas, se unen a receptores específicos y promueven la producción de hormonas esteroides. (Halvorson y Chin, 2001).

Las gonadotropinas son moduladas principalmente por las hormonas esteroides gonadales y por varios miembros de la familia del factor de crecimiento transformante  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) como la activina, la inhibina y otros reguladores como la folistatina. La inhibina disminuye la función de los gonadotropos mientras que la activina la estimula. La folistatina también suprime la expresión del gen de la FSH al unirse a la activina bloqueando su función (Harrison y cols., 2001).

Las hormonas esteroides gonadales incluyen a los estrógenos, la progesterona y los andrógenos. Los estrógenos regulan a la baja los niveles de las gonadotropinas LH y FSH excepto en el momento en que se produce el máximo aumento de los niveles de LH a la mitad del ciclo sexual cuando ejercen efecto de retroalimentación positiva sobre su secreción (Yeh y Adashi, 2001).

## **2.7 Hormona Luteinizante**

La familia de las hormonas glicoproteicas hipofisarias está formada por la hormonas luteinizante, la hormona folículo estimulante y la hormona estimulante de la tiroides, producidas en la adenohipófisis y por la gonadotropina coriónica que es producida en la

placenta (LH, FSH, TSH y CG respectivamente). Estas hormonas están compuestas por una subunidad  $\alpha$  y una subunidad  $\beta$  asociadas por interacciones no covalentes.

La subunidad  $\alpha$  es común para todas las hormonas mencionadas mientras que la subunidad  $\beta$  es diferente para cada hormona y le confiere especificidad biológica. Cabe mencionar que la glucosilación de las subunidades es clave para su actividad biológica y ésta sólo se consigue cuando se encuentran formando el dímero  $\alpha\beta$ . (Halvorson y Chin, 2001).

La subunidad  $\alpha$  consta de 92 aminoácidos y contiene 10 cisteínas que intervienen en uniones disulfuro entre las subunidades. En el humano el gen que codifica para esta subunidad se localiza en el cromosoma 6q12.21 y consiste de 4 exones de los cuales el primero no codifica. (Bousfield y cols., 1994)

La homología entre la subunidad  $\beta$  de la LH (LH $\beta$ ) y de la CG (CG $\beta$ ) es de 82% esto justifica que compartan el receptor, (Huhtaniemi, 2004). En el humano, los siete genes que codifican para esta subunidad consisten de 3 exones que se localizan en el cromosoma 19q13.32; uno codifica para LH $\beta$  y seis para la CG $\beta$ . La proteína madura de la LH $\beta$  tiene 121 aminoácidos y la de CG $\beta$  145 aminoácidos. Ambas proteínas contienen 12 cisteínas que forman 6 puentes disulfuro entre las subunidades (Bousfield y cols., 1994; Bo y Boime, 1992).

A pesar de que las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  no tienen una secuencia de aminoácidos similar, su estructura tridimensional si es parecida. Incluyen 2 asas  $\beta$  sobre un lado y un asa con un nudo de cisteínas en el lado opuesto. Las estructuras  $\beta$  están estabilizadas por puentes disulfuro adicionales. Las dos subunidades están asociadas en una orientación cabeza-cola que forma una estructura curva ligeramente alargada. La molécula dimérica se estabiliza por una estructura de "cinturón de seguridad" formada por los aminoácidos de la región carboxilo terminal de la subunidad  $\beta$  envuelta alrededor de la subunidad  $\alpha$  y estabilizada por una unión disulfuro.

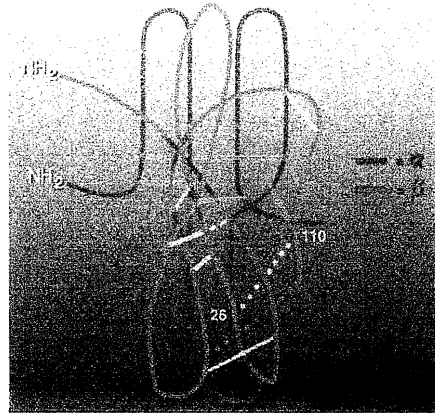


Figura 2. Diagrama de la Estructura Cristalizada de la hCG. Las uniones disulfuro entre las subunidades se muestran en amarillo para la cadena  $\beta$  y naranja para la cadena  $\alpha$ . La union disulfuro de 26-110 pertenece a la estructura de "cinturón de seguridad" (García-Campayo y cols., 2001)

Como se mencionó anteriormente, la glucosilación de las subunidades de las hormonas glicoproteicas es de gran importancia para su actividad biológica. Los grupos de azúcares más significativos son del tipo de los que se unen a asparagina con ligaduras N. El contenido de azúcar de la LH es del 16% de su peso y el de hCG del 30%. Los residuos de monosacáridos incluyen N-acetilglucosamina, manosa, galactosa, fucosa, glucosamina, N-acetilgalactosamina y ácido siálico (o neuramínico). Cada oligosacárido está dividido en ramas bicatenarias o tricatenarias y es muy heterogéneo en sus ramas periféricas, que finalizan principalmente en ácido siálico y fucosa y ocasionalmente en galactosa. Una característica de las gonadotropinas hipofisarias es la presencia de dos grupos de oligosacáridos en la subunidad  $\alpha$  (Asn52 y Asn78) y uno en la subunidad  $\beta$  para la LH (Asn13). Además de los oligosacáridos presentes en la LH $\beta$ , la hCG $\beta$  contiene 4 oligosacáridos O-ligados fijados a residuos de serina en su extensión de 24 aminoácidos de la región carboxilo terminal.

Los residuos de carbohidratos son importantes para el plegamiento y el ensamblaje de las dos subunidades, para la vida media de la hormona, para la secreción y la determinación de la tasa de depuración metabólica de estas gonadotropinas y para la correcta interacción con su receptor. (Halvorson y Chin, 2001)

### 2.7.1 Funciones de la Hormona Luteinizante

En el ovario la LH regula la esteroidogénesis, promueve la producción de andrógenos en las células intersticiales y de la teca a partir de los folículos secundarios. Cerca de la mitad del ciclo ovárico, el incremento de los estrógenos foliculares provoca que la secreción de la LH aumente significativa y temporalmente durante aproximadamente 48 horas. Esta secreción aguda de LH es importante para llevar a cabo la ruptura folicular, la disgregación de la superficie del ovario y en consecuencia la ovulación. También es causa de que el ovocito reasuma la meiosis y continúe con su maduración.

Es indispensable para la luteinización del folículo preovulatorio y la posterior formación del cuerpo lúteo después de la ovulación. También es imprescindible para la síntesis de progesterona y la regulación de la producción de la inhibina (Ascoli y cols., 2002).

### 2.7.2 Receptor de LH/CG.

En el ovario, el receptor para la hormona luteinizante se expresa en las células intersticiales, las tecales, las células de la granulosa y las células lúteas.

Debido a que la LH y la CG se unen al mismo receptor, este se conoce como el receptor de LH/CG ó LHR, pertenece a la superfamilia de receptores de siete dominios transmembranales acoplados a proteínas G, en particular a la familia relacionada con rhodopsina y el receptor  $\beta$ -adrenérgico. (Halvorson y Chin, 2001)

En el ser humanos el gen que codifica para el LHR se localiza en el cromosoma 2p21, consiste de 10 intrones y 11 exones que en total suman 50 kb. Los primeros 10 exones codifican para el dominio extracelular y el exon 11 codifica las regiones restantes del receptor. El propéptido del LHR humano tiene un péptido señal de 24 aminoácidos y la proteína madura contiene 675 residuos de aminoácidos (Huhtaniemi, 2004). El LHR esta formado por un extremo carboxilo terminal intracelular hidrófobo y un extremo amino terminal extracelular que se divide en tres regiones, la región N-terminal rica en cisteínas, el dominio de 8 a 9 repeticiones ricas en leucina (LRRs) donde se da el reconocimiento y la unión de alta afinidad con el ligando y la región bisagra o C-terminal rica en cisteínas. Esta última región tiene seis sitios para glicosilación (Asn-x-

Ser/Thr); el papel de éstas cadenas de carbohidratos es facilitar la síntesis y funciones de la proteína en la membrana plasmática ver Fig. 3 (Ascoli y cols., 2002).

Los dominios transmembranales hidrofóbicos de la LH están orientados de forma perpendicular al plano de la membrana celular y están conectados por tres asas intracelulares y tres extracelulares que están implicadas en la transducción de señales particularmente la parte carboxilo terminal del asa intracelular 3 y las partes mas cercanas al citoplasma de las hélices transmembranales 5 y 6 que activan a la proteína G (Huhtaniemi, 2004)

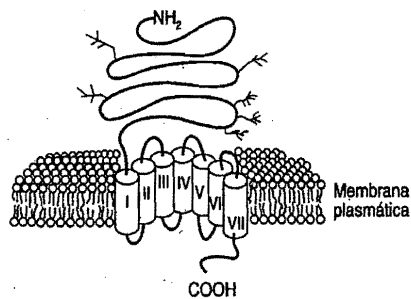


Figura 3. Representación del LHR indicando su dominio amino terminal extracelular con sus sitios glicosilados, los siete dominios transmembranales hidrofóbicos y la región carboxilo terminal intracelular (Halvorson y cols., 2001).



### 2.7.3 Mecanismo de acción de LH

El receptor de la LH/CG está acoplado a un grupo de proteínas que se unen al guanosín trifosfato (GTP) o proteínas G, principalmente a los tipos  $G_s$ ,  $G_i$  y  $G_q$ .

La proteína G es un heterotrímero compuesto por tres subunidades  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$  con actividad de GTPasa. Cuando la LH interacciona con su receptor induce cambios conformacionales que lo capacitan para activar a la proteína G a la que está unido.

El principal mecanismo de acción para la LH se da, cuando su receptor está unido a la proteína  $G_s$ , la formación del complejo LH-receptor determina el reemplazo del GDP unido a la subunidad  $\alpha$  por guanosín trifosfato (GTP), lo que conduce a la disociación de la subunidad  $\alpha$  del complejo  $\beta\gamma$ , la subunidad  $\alpha$  libre activa a la enzima adenilato ciclasa que convierte el ATP en AMPc, el aumento intracelular de este, a su vez activa a la proteína cinasa A (PKA) que modula la expresión de los genes de una gran variedad de proteínas intracelulares. (Halvorson y col., 2001; Alberts y cols., 2002).

Si el receptor está unido a la proteína  $G_q$  la activación de este complejo, activa a la fosfolipasa C- $\beta$ , que rompe el fosfatidil inositol 4,5 bifosfato (PI-4,5P<sub>2</sub>) en la membrana celular para producir inositol 1,4,5 trifosfato (InsP<sub>3</sub> ó IP<sub>3</sub>) y 1,2-diacilglicerol (DAG). El IP<sub>3</sub> determina la liberación del calcio secuestrado en el retículo endoplásmico, lo que aumenta los niveles de calcio citosólico y el DAG activa la proteína cinasa C (PKC); ambos eventos ocasionan respuestas celulares ver Fig. 4 (Halvorson y Chin, 2001).

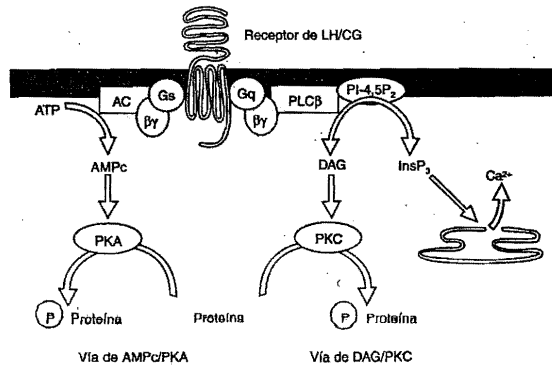


Figura 4. La interacción del ligando (LH ó CG) con el LHR activa múltiples vías de transducción de señales el InsP<sub>3</sub> moviliza el Ca<sup>2+</sup> intracelular desde el retículo endoplásmico. Los segundos mensajeros AMPc y diacilglicerol (DAG) activan a las familias de las proteincinasas de serinatreonina de la proteincinasa A (PKA) y de la proteincinasa C (PKC) respectivamente, las que activan respuestas celulares (Halvorson y Chin, 2001).

## 2.8 Desarrollo del ovario de las aves

En las aves, al igual que en los mamíferos la diferenciación de la gónada depende del complemento cromosómico que se establece en la fecundación; ZW para el ovario y ZZ para el testículo.

En el embrión de pollo, desde el cuarto día de incubación (d.i.), se observa la cresta genital (CG) formada por tejido mesenquimático procedente del mesodermo intermedio recubierto por el epitelio celómico. Con la llegada de las células germinales primordiales (CGP), se constituye la gónada indiferenciada que posteriormente se diferencia en ovario ó testículo.

Las células germinales primordiales se originan en el epiblasto de la zona central del área pelúcida, luego se ubican en el mesodermo extraembrionario del área cefálica formando la creciente germinal antes de migrar por vía sanguínea hasta la CG. Entre el 1.5-1.8 d.i. alcanzan los vasos sanguíneos y viajan a través del torrente circulatorio. A los 2 d.i. salen de los capilares a la altura del mesenterio dorsal y por medio de movimientos amiboideos se dirigen a la cresta genital (Ando y Fujimoto, 1983; Hardisty, 1984)..

A los 2.5 d.i. llegan a la región urogenital y traspasan el epitelio celómico que la recubre conformando una estructura epitelio-mesenquimática con tres elementos embriológicos: el epitelio celómico, las células mesenquimáticas y las células germinales (Fargeix y cols., 1981; Gilbert, 2003). En la corteza se observan las CGP y en la médula los cordones medulares formados por la proliferación de células epiteliales que se introducen al interior de la misma y que se encuentran separados por mesénquima (5 d.i.) La diferenciación gonadal se hace morfológicamente evidente al 6.5 d.i. (para una revisión ver Smith y col., 2004).

En el ovario izquierdo la proliferación de las células germinales y somáticas de la corteza provocan que aumente considerablemente su grosor, mientras que en la médula los cordones se vacuolizan para crear los canales lacunares.

En las hembras se produce una segunda generación de cordones derivados del epitelio celómico, los cordones sexuales secundarios o corticales; éstos rodean a las ovogonias que se encuentran formando nidos. Al iniciarse la meiosis, las ovogonias pasan a ovocitos primarios y las células epiteliales que las rodean las individualizan y establecen

las células precursoras de las células granulosas, de esta manera quedan constituidos los folículos primordiales.

En la mayoría de las aves, el ovario derecho involucre después del décimo d.i.; de tal forma que al momento de la eclosión se considera un órgano vestigial (Clinton, 1998).

La diferenciación gonadal en las aves está influenciada, entre otros factores, por las hormonas esteroides. La asimetría del ovario se extiende a la formación del oviducto quedando sólo el izquierdo funcional mientras que el derecho involucre. Los oviductos derivan de los conductos de Müller ó conductos paramesonéfricos, que a su vez son derivados del epitelio celómico.

Hay evidencias que sugieren la participación del citocromo P450 aromatasa ( $P450_{\text{arom}}$ ), de los estrógenos y sus receptores así como la hormona antimülleriana (AMH) en la diferenciación y la asimetría del aparato reproductor.

Se ha demostrado en los embriones femeninos de las aves que el conducto de Müller y el ovario izquierdo tienen mayor cantidad de receptores a estrógenos que el ovario y el conducto derecho (Teng y Teng, 1975); Gasc (1980), demostró por autorradiografía que el epitelio superficial del ovario izquierdo, une de manera específica a los estrógenos desde los 5.5 d.i.

En las hembras, los niveles de estrógenos son suficientes para proteger al conducto paramesonéfrico izquierdo de la involucre ocasionada por la AMH; sin embargo la concentración de andrógenos favorece la acción de esta hormona sobre la contraparte derecha (Mac Laughlin y cols., 1983).

La importancia de la  $P450_{\text{arom}}$  en la diferenciación gonadal de las aves, se hace evidente con los trabajos de Nomura y cols. (1999), Villalpando y cols. (2000) quienes refieren la expresión de la  $P450_{\text{arom}}$  en gónadas de embriones hembras de 5-6 d.i. La  $P450_{\text{arom}}$  se expresa también en el ovario, pero no en el testículo, de embriones de pollo de 6.5 d.i. (Yoshida y cols., 1996; Clinton, 1998; Shimada, 1998).

La secreción de estrógenos por el ovario embrionario de pollo ha sido documentado por varios autores, Tanabe y cols. (1986) e Imataka y cols. (1989). La secreción  $17\beta$ -estradiol es mayor en el ovario izquierdo que en el derecho. Además, la administración de inhibidores de aromatasa, antes de la diferenciación gonadal provoca la reversión

sexual de aves genéticamente hembras formando un testículo capaz de llevar a cabo la espermatogénesis (Elbrecht y Smith, 1992).

Estas evidencias ponen de manifiesto el papel fundamental de las hormonas esteroides en la diferenciación gonadal y en el desarrollo del ovario de las aves.

### 3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

El epitelio superficial del ovario (OSE) es una monocapa de epitelio cúbico que recubre la superficie del ovario; presenta cilios, microvellosidades apicales y está separado del estroma del ovario por una membrana basal, debajo de ésta hay una delgada túnica albugínea. Proviene del epitelio celómico al igual que los conductos müllerianos que originan el epitelio del oviducto, del endometrio y del endocervix. El OSE es activo durante la embriogénesis porque da origen a las células somáticas que rodean a las ovogonias y posteriormente originan a las células foliculares durante la formación de los folículos primordiales (Gilbert, 2003)

Desde la embriogénesis y durante el ciclo ovárico, el embarazo, la premenopausia y la menopausia, el OSE está sujeto a influencias hormonales de gonadotropinas hipofisarias, hormonas esteroides y factores de crecimiento. En respuesta a estos estímulos el OSE lleva a cabo procesos de proliferación, diferenciación y apoptosis.

Se sugiere que en el ovario de la mujer adulta, el OSE no está completamente diferenciado y mantiene la naturaleza pluripotencial de su precursor, el epitelio celómico (Auersperg, 2001) y lleva a cabo de manera activa y regulada los mismos procesos fundamentales de proliferación, diferenciación, apoptosis e inclusive de migración (en condiciones patológicas) característicos de la embriogénesis. Esto implica que las células del OSE se mantienen competentes para responder constantemente a diversas señales como lo muestra la apoptosis de la zona del estigma para permitir la salida del óvulo o bien la proliferación y diferenciación que permite reparar las lesiones epiteliales que se producen en la superficie del ovario como consecuencia de la ovulación.

En el presente estudio nos propusimos evaluar el efecto de la gonadotropina coriónica sobre la proliferación celular en células de OSE de embrión de pollo mantenidas en cultivo primario

En relación al efecto de la LH/CG sobre la proliferación celular del OSE, se ha descrito la estimulación de la proliferación celular por LH/CG en cultivos primarios de células de ovarios adultos del OSE en diferentes especies de animales: ratones, ratas, conejos y bovinos (Davies y cols., 1999; Stewart y cols., 2004; Osterholzer y cols., 1985; Parrott y cols., 2000) e incluso en células del OSE humano (Tashiro y cols., 2003; Syed y cols., 2001; Kuroda y cols., 2001); mientras que también se ha reportado un efecto nulo de esta hormona en primates (Wright y cols., 2002) y en humanos (Ivarsson y cols., 2001).

El embrión de pollo es un modelo interesante para estudiar el desarrollo del ovario y sus mecanismos de regulación. Su diferenciación morfológica ocurre al 6.5 d.i., la secreción de estrógenos se inicia simultáneamente con su diferenciación morfológica, a los 9 días el ovario inicia una etapa alta de proliferación tanto en células somáticas como en las ovogonias. A los 13-14 d.i. se considera que el eje hipófisis-ovario ya es funcional y hay niveles plasmáticos de LH y FSH.

El conocer el efecto de LH/CG en el desarrollo del OSE es importante porque a partir de las células del OSE se originan las células somáticas de la corteza que luego darán origen a los folículos primordiales del ovario (Gougeon, 2004).

#### **4. HIPÓTESIS**

Si la proliferación del epitelio superficial del ovario embrionario está regulada por las gonadotropinas hipofisarias, entonces esta proliferación se verá modificada por el tratamiento de las células del epitelio superficial con gonadotropina coriónica.

## **5. OBJETIVOS**

### **5.1 Objetivo general.**

Estudiar el efecto proliferativo de la gonadotropina coriónica humana sobre el epitelio superficial del ovario de embrión del pollo mediante la cuantificación de las células en fase de síntesis, y así establecer el efecto mitogénico de la hCG sobre el epitelio superficial.

### **5.2 Objetivos particulares.**

Estudiar la proliferación celular cuantificando el porcentaje de células que incorporaron BrdU en cultivos primarios de células de epitelio superficial del ovario (OSE) del embrión de pollo de 14 días de incubación testigo y tratados con hCG para determinar el índice mitótico.

Evaluar el efecto proliferativo de diferentes dosis de hCG mediante la detección en fase S de las células del OSE en cultivo primario, para establecer el efecto mitogénico de esta hormona.

Comparar el efecto de la hCG no recombinante y recombinante sobre la proliferación celular en cultivos primarios de células del OSE para corroborar el efecto mitogénico de la hCG.

Detectar el RNA mensajero para el receptor de la LH/CG en las células del epitelio superficial del embrión de pollo de 14 días por RT-PCR para determinar la presencia de este receptor en las células del OSE



## **6. MATERIALES Y MÉTODOS.**

### **6.1 Material Biológico**

Los embriones de pollo de 14 días de incubación se obtuvieron a partir de huevo fértil de gallinas White Leghorn, provenientes de la granja avícola ALPES (Aves Libres de Patógenos Específicos) de Tehuacán, Puebla. Se incubaron a 37°C con 80% de humedad relativa.

### **6.2 Reactivos.**

Tripsina, inhibidor de tripsina, Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) baja glucosa, TRIZOL Reagent, antibiótico (penicilina-estreptomicina-glutamina en solución de 10000 UI/ml), azul tripano y suero bovino fetal fueron obtenidos de Gibco-BRL Products (Rockville, MD). 1st Strand cDNA Synthesis Kit for RT-PCR y 5-Bromo-2'-deoxiuridine Labeling and Detection Kit I. de Roche (Indianapolis, IN). Sensi Tek HRP Anti-Mouse (DAB) Kit producidos por Scy Tec (Logan, UTA). Albúmina sérica bovina, poli-L-lisina, medio MCDB 105 y medio 199 fue obtenida de Sigma Chemical (St Louis, MO). DNA Ladder 100pb de Invitrogen (Carlsbad CA). Pregnyl de Organon (Oss Holanda) y Ovidrel de Serono (Bari, Italia).

### **6.3 Control histológico del ovario**

Muestras de ovarios de embrión de pollo de 14 d.i. se fijaron en paraformaldehído al 4% en PBS para la detección inmunohistoquímica de citoqueratinas y en líquido de Bouin para cortes histológico teñidos con H-E. Esto se hizo con el fin de controlar el grado de disociación celular del ovario después de la disgregación fraccionada y para evaluar el grado de contaminación de las células del epitelio superficial con otros elementos celulares de la corteza. Para detalles de la técnica ver apéndice II.

#### **6.4 Obtención de células epiteliales**

La suspensión celular enriquecida con células del epitelio superficial se obtuvo del ovario izquierdo de al menos 30 embriones por experimento de 5 experimentos para Pregnyl y 3 experimentos para Ovidrel. Los ovarios se disecaron cuidadosamente y se recibieron en solución salina balanceada libre de calcio y magnesio (SSB); se lavaron tres veces en la misma solución y tres veces más con versene (SSB + EDTA 0.1mM). Se procedió a la digestión enzimática fraccionada del ovario incubándolo con tripsina/versene al 0.01% (1ml/ovario) en un matraz Erlenmeyer de 1L por 6 minutos a 37°C y 70 ciclos de agitación/min.

Con este tratamiento se disgregan las células del epitelio superficial y quedan suspendidas en la solución, misma que se recibe en un tubo cónico con inhibidor de tripsina al 0.02% en DMEM y albúmina sérica bovina al 0.1%.

Las células se centrifugaron a 200 G durante 10 minutos y el botón celular se resuspendió en 300 µl de medio completo (medio 105/199 1:1 con 10 µl/ml de antibiótico y 10 % de suero bovino fetal).

La densidad celular se calculó contando las células epiteliales en cámara de Neubauer; para controlar su viabilidad se usó el método de exclusión del colorante con azul tripano. Se sembraron 140,000 células/caja con medio completo y se incubaron 48 h a 37°C en atmósfera de 5% CO<sub>2</sub>/aire.

#### **6.5 Cultivo primario de células epiteliales**

Para estudiar el efecto de la LH/hCG en las células epiteliales, se utilizaron células cultivadas por 48 h en medio completo y cuya confluencia celular en la caja fuera del 40-50%. Las cajas con mayor o menor confluencia fueron descartadas.

Después de las 48 h se hicieron dos esquemas de tratamiento, en el primero (sin privación de suero) se reemplazó el medio completo por medio pobre en suero (la misma preparación que el medio completo pero con 1% de suero bovino fetal libre de

esteroides, tratado con carbón activado al 1%) y con diferentes dosis de hCG no recombinante (0.06, 0.12, 0.25 y 0.5 UI/ml) y se mantuvo el cultivo por 12 h a los grupos experimentales.

En el segundo esquema (con deprivación de suero) se reemplazó el medio completo a medio pobre en suero por 12 h para sincronizar las células en la etapa G<sub>1</sub> del ciclo celular, transcurrido ese tiempo se cambió el medio a otro con el tratamiento de 0.5 UI/ml de hCG recombinante en medio pobre en suero por 9h y 12 h, para los grupos experimentales.

En ambos casos, al final del tratamiento hormonal se agregó 5-Bromo-2'-deoxiuridina (BrdU) 10µM en medio de cultivo por 50 minutos. Las células se despegaron de las cajas de cultivo con 500 µl de tripsina al 0.05% disuelta SSB libre de Ca y Mg con ayuda de una pipeta pasteur. Las células se recibieron en inhibidor de tripsina al 0.1% en DMEM y se centrifugaron a 200 G por 10 minutos. El botón celular se lavó dos veces con PBS, se resuspendió en 50 µL de PBS y se elaboraron extendidos celulares en portaobjetos recubiertos con poli-L-lisina. Los extendidos se secaron al aire y se fijaron en alcohol ácido a -20 °C por 30 min.

La detección de las células en síntesis se hizo por inmunohistoquímica con un anticuerpo primario para detectar la BrdU que se reveló con un segundo anticuerpo acoplado a fluoresceína de acuerdo a las instrucciones proporcionadas por el proveedor ver apéndice II.

El índice mitótico de las células cultivadas se evaluó calculando el porcentaje de células positivas a BrdU con ayuda de un microscopio de epifluorescencia, en al menos 200 células por muestra.

## **6.6 Aislamiento del RNA y reverso transcripción RT**

A partir de 2µg de RNA total aislado con TRIZOL Reagent se sintetizó el DNA complementario (cDNA) mediante 1st Strand cDNA Synthesis Kit for RT-PCR de acuerdo a los procedimientos indicados en el apéndice II. El cDNA se utilizó para

detectar el RNA mensajero del receptor a la hormona luteinizante por PCR en el ovario completo del embrión de pollo de 14 d.i. y en las células epiteliales.

### 6.7 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Para amplificar el fragmento del receptor a LH/CG de pollo a partir del cDNA, se emplearon oligonucleótidos sintéticos de 20pb, no complementarias que delimitan un fragmento de 241pb (Mizutani y cols.,1998) con la siguiente secuencia:

SENTIDO            5'- ATG AAA TGA CCG GCT TTG AC -3' →  
ANTISENTIDO      5'- GCA AAG GAG AGG TTG CAC AT -3' →

Se amplificó simultáneamente un fragmento de 300pb del gen de la β-actina de pollo que es un gen constitutivo utilizado como control de PCR. Los oligonucleótidos fueron diseñados de acuerdo al cDNA de la β-actina de pollo reportado por Kost y cols. 1983.

SENTIDO            5'- CAA AGC CAA CAG AGA GAA GA -3' →  
ANTISENTIDO      5'- TCA CGC ACA ATT TCT CTC TC -3' →

Los productos de amplificación se visualizaron por electroforesis en gel de agarosa al 1% y el tamaño del fragmento se obtuvo utilizando un marcador de peso molecular de 100pb. Como solución de corrimiento se empleó TAE (buffer Tris-Acetato EDTA). Ver apéndice I

## 7. RESULTADOS

### 7.1 Inmunodetección de citoqueratinas en OSE.

En el embrión de pollo de 14 d.i., el ovario está cubierto por un epitelio cúbico simple: el epitelio superficial del ovario, por debajo de este se observa la región cortical donde se localizan nidos de ovogonias; enseguida se encuentra la médula, donde se reconocen una zona subcortical y la médula profunda situada en la parte mas interna del ovario. La médula tiene la particularidad de presentar un sistema de canales o lagunas llamados canales lacunares características del ovario de las aves (Fig.1 A).

Previo a la selección de embriones de 14 días de desarrollo se realizaron pruebas piloto con células del OSE en embriones de 9-14 días, obteniéndose el mejor desarrollo en cultivo en los embriones de 14 d.i.

Las células del OSE son positivas a citoqueratinas características de epitelios, no así las células de la corteza o la médula, a excepción de las células que rodean los espacios lacunares que también son positivas como se observa en el ovario antes del tratamiento enzimático. (Fig. 1B)

Para obtener las células epiteliales se empleo el método de digestión fraccionada, luego de 6 minutos de tratamiento con tripsina se logra la disociación del epitelio superficial del ovario (Fig. 1C y 1D) y se obtiene una suspensión enriquecida en células epiteliales (80-85% de pureza) y un bajo porcentaje de ovogonias (Fig 2).

Con esta suspensión celular se hicieron los cultivos primarios; en el periodo inicial de cultivo las células epiteliales son alargadas y con múltiples prolongaciones citoplásmicas. Pasadas 48 h de cultivo se observan zonas confluentes donde las células adquieren una forma poliédrica como formando un “adoquinado”. Esta morfología concuerda con la descrita en la literatura para las células del epitelio superficial mantenidas en cultivo (Auersperg y cols., 2001).

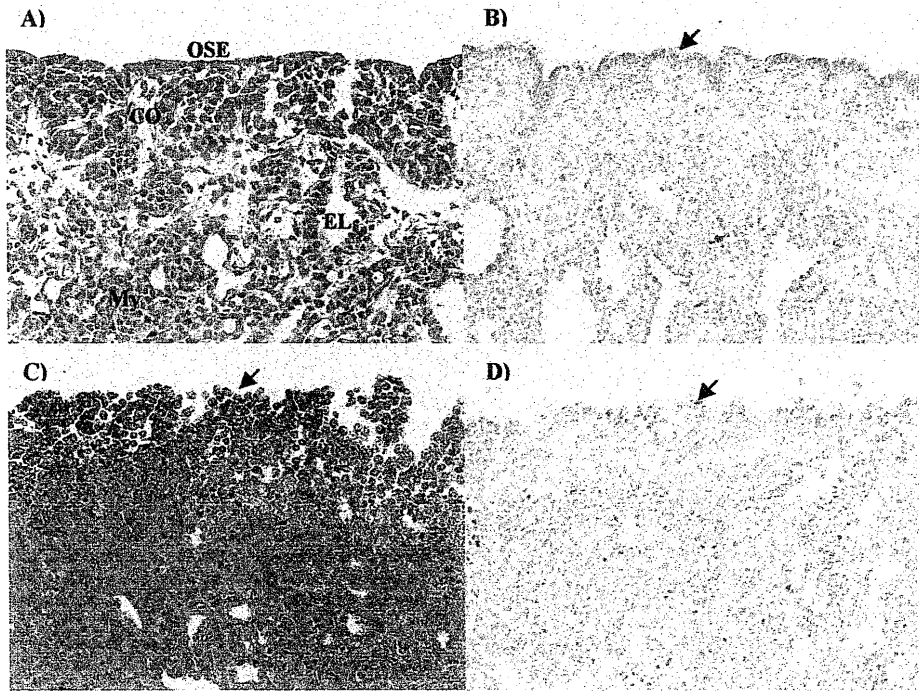


Figura 1. A) Corte histológico del ovario de embrión de pollo de 14 días de incubación teñido con H-E, se observa el epitelio superficial (OSE), la corteza (CO), la médula yuxtacortical (My) y los espacios lacunares (EL). B) las células del OSE muestran reacción positiva a citoqueratinas (en color café) C) el OSE se ha desprendido del ovario después de la disgregación fraccionada con tripsina. Se observa la corteza conteniendo a las ovogonias y la médula que permanecen integrados en el ovario, corte histológico teñido con H-E, D) después de la disgregación del OSE ya no se observan células positivas a citoqueratinas recubriendo la superficie del ovario.

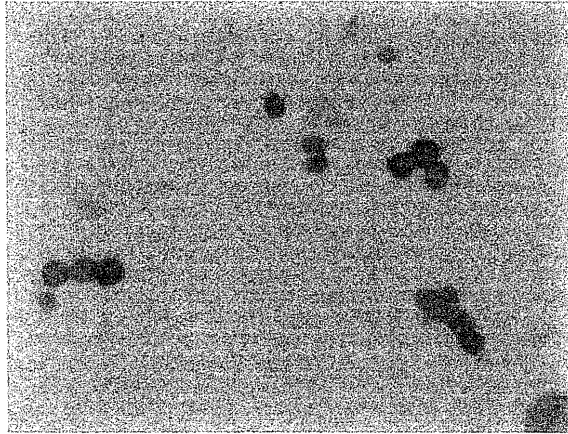


Figura 2. Inmunocitoquímica para la detección de citoqueratinas en la suspensión enriquecida con células del OSE. Se obtiene un porcentaje del 80-85% de células positivas correspondientes a las células del OSE.

## 7.2 Proliferación celular del OSE en cultivos primarios.

En la primer serie experimental se aplicó el tratamiento con hCG no recombinante sin que hubiera un periodo previo de privación de suero. El grupo testigo presentó un 27% de células marcadas con BrdU y luego del tratamiento con hCG se observó un incremento, de las células que incorporaron BrdU, de manera dosis dependiente, siendo estadísticamente significativo a la dosis de 0.5 UI/ml ver Gráfico 1.

En la segunda serie experimental las células del OSE fueron sometidas a un periodo de privación de suero previo al tratamiento con hormona gonadotropina coriónica recombinante rhCG (Ovidrel) a la dosis de 0.5 UI/ml. Este tratamiento incrementó el porcentaje de células que incorporaron BrdU respecto a los controles simultáneos tanto a las 9 como a las 12 h posteriores al tratamiento ver Grafico 2.

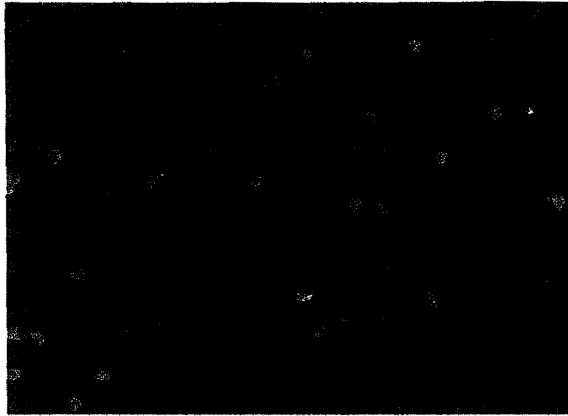


Figura 3. El índice de proliferación celular se evaluó como porcentaje de células que incorporaron BrdU. Se observa una fluorescencia intensa en el núcleo de las células positivas para este compuesto.

Se puede observar que el índice de proliferación celular se ve afectados por la privación de nutrientes suplementado por el suero bovino, encontrando que este índice es de alrededor de 30% en el primer esquema de tratamiento (sin privación de suero) comparado con el segundo esquema (con privación de suero) en el que el índice de proliferación se encuentra alrededor de 20% a las 9 horas y menor de 20% a las 12 horas de tratamiento.



**Proliferación de las células del epitelio superficial del ovario estimuladas con hCG.**

	Tiempo de cultivo	Tratamiento	% de Incorporación de BrdU
Sin privación de suero	12 h	Testigo	27.82 ± 1.39
		hCG 0.06 UI/ml	31.98 ± 2.6
		hCG 0.12 UI/ml	33.62 ± 1.9
		hCG 0.25 UI/ml	33.45 ± 1.62
		hCG 0.5 UI/ml	35.72 ± 2.23
Con privación de suero	9 h	Testigo	18.77 ± 0.2699
		rhCG 0.5 UI/ml	23.12 ± 1.1
	12 h	Testigo	13.93 ± 0.5
		rhCG 0.5 UI/ml	16.31 ± 0.41

Tabla I. Se reporta la media de los tratamientos realizados por triplicado en experimentos independientes ± el error estándar de la media. El análisis estadístico de los datos se realizó mediante ANOVA seguida de la prueba de Duncan.

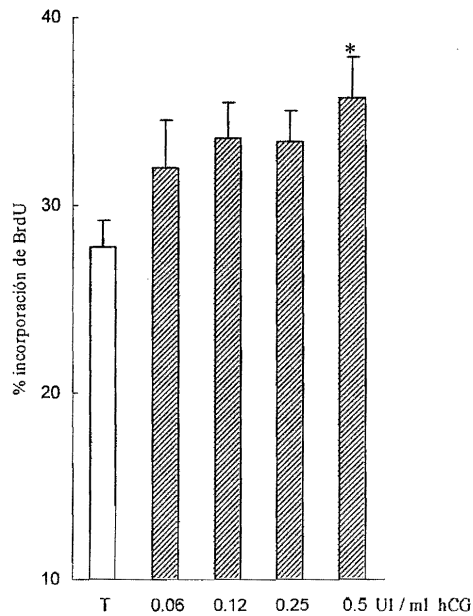


Grafico 1. La proliferación celular, valorada como incorporación de BrdU, en las células del OSE mantenidas en cultivo primarios por 48 h, sin privación de suero se incrementa después de 12 h de tratamiento con 0.05 UI/ml de Pregnyl, (hCG no recombinante).  $p < 0.05$  % comparada con el testigo. Las barras representan la media ± el error estándar de la media (sem).

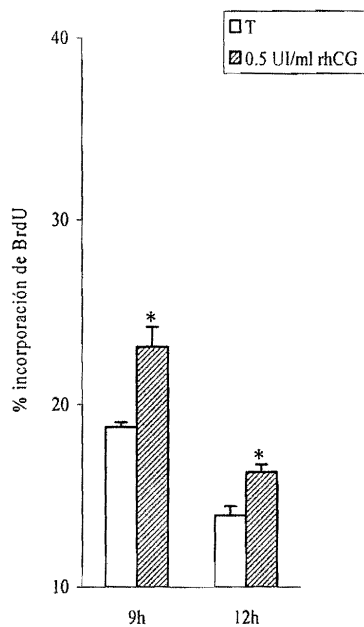


Grafico 2. La proliferación celular, valorada como incorporación de BrdU, en las células del OSE mantenidas en cultivo primarios por 48 h, mas 12 h de privación de suero se incrementa después de 9 y 12 h de tratamiento con 0.05 UI/ml de Ovidrel, (hCG recombinante).  $p < 0.05$  % comparada con el testigo. Las barras representan la media  $\pm$  el error estándar de la media (sem).

### 7.3 Receptor de CG/LH en el OSE

La presencia del RNA mensajero para el receptor a CG/LH se observa en el ovario del embrión de pollo de 14 d.i. Asimismo fue localizado en la población enriquecida de células epiteliales sin cultivar (tiempo cero de cultivo) Fig 6. La identidad del fragmento amplificado se corroboró por un estudio de secuencia de sus bases las cuales corresponden a la secuencia esperada (Mizutani y cols.,1998) tal como se observa en la Fig 5|.

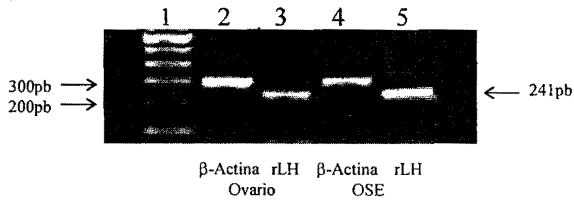


Figura 4. Muestra la amplificación de un fragmento de 241pb del gen del receptor para la hormona luteinizante (LHR) a partir del cDNA. En el ovario completo y en las células del OSE sin cultivar (carriles 3 y 5). Como control de la reacción de PCR se amplificó un fragmento de 300pb del gen de la  $\beta$ -actina (carriles 2 y 4).

La secuencia obtenida, corresponde al mRNA del LHR de pollo en la posición 1109 a 1349 pb flanqueado por los oligonucleotidos diseñados.

**ATG AAA TGA CCG GCT TTG ACT TTG AGT ATG ACT TCT GTC AGC CCA  
AGA TAC TGA CGT GTA CTC CAG AAC CAG ATG CCT TTA ATC CCT GTG  
AAG ACA TCC TAG GAT ACA GCT TTC TCA GGG TCC TGA TCT GGT TCA  
TAA ACA TCC TTG CCC TTG CTG GCA ACT TCA TTG TGC TCC TCG TCC  
TCA TAA CCA GCC ACT ACA AGC TCA CGG TTC CTC GCT TCC TCA TGT  
GCA ACC TCT CCT TTG C**

Fig 5. Secuenciación de las bases del fragmento del mRNA para el LHR.

## 8. DISCUSIÓN.

En el embrión de pollo de 14 d.i. se distingue claramente el epitelio superficial recubriendo totalmente la superficie del ovario, en algunas zonas se invagina hacia la corteza sin perder su morfología característica la cual se mantiene por moléculas de adhesión celular dependientes de calcio como la N caderina (Auersperg y cols., 2001); a diferencia de las células somáticas de la corteza este tejido expresa citoqueratinas características de los epitelios, lo que permite reconocer a las células epiteliales.

Para obtener las células epiteliales se realizó la digestión del ovario con tripsina a baja concentración en soluciones quelantes del calcio lo que digiere suavemente el epitelio superficial, desestabiliza las uniones celulares que mantienen su integridad y permite obtener una suspensión enriquecida con células del epitelio superficial y baja contaminación de otros elementos celulares de la corteza como las ovogonias, las células precursoras de la granulosa y aún menos de las células somáticas de la médula. Esto se muestra con los controles histológicos de los ovarios digeridos, teñidos con hematoxilina y eosina y los procesados para inmunodetección de citoqueratinas.

Las células epiteliales del ovario del embrión de pollo de 14 d.i. se cultivan mejor que las obtenidas de embriones más jóvenes (9-13 d.i.). Esto podría deberse a que en esta edad el ovario izquierdo se encuentra en franco crecimiento, principalmente a expensas de la proliferación las células somáticas y en consecuencia el epitelio superficial esta involucrado en este proceso de crecimiento ya que recubre la superficie de este órgano. A esta edad, ya se considera integrado el eje hipotálamo-hipófisis-ovario por lo que el aporte de gonadotropinas hipofisiarias esta presente en el embrión (Wodds, 1987).

La proliferación del OSE depende del calcio extracelular por medio de receptores sensibles a calcio (Hobson y cols., 2000), por lo que el medio de cultivo fue una mezcla de medio 199/MCDB105 y suero. Esta mezcla fue seleccionada porque aporta los requerimientos de calcio (1.0 a 2.2mM) y nutrientes necesarios para que las células epiteliales proliferen y mantengan su fenotipo epitelial. Este medio ha sido utilizado por otros autores para el cultivo de OSE humano, para una revisión ver: Auersperg y cols., 2001.

Los cultivos primarios se realizaron primero en cajas de cultivo de 48 pozos y en cajas de 35 mm de diámetro con el revestimiento original para cultivo y sin agregar ningún recubrimiento adicional. En ambos casos las células se adhirieron a la superficie, pero la distribución varía, cuando fueron cultivadas en pozos hubo mayor densidad celular en la periferia que en el centro, en contraste con las cajas de 35 mm en las cuáles las células crecían predominantemente en el centro y esto permite un crecimiento hacia la periferia. Con los cultivos celulares en cajas de 35 mm se obtuvo mejor reproducibilidad de los resultados. Estos resultados confirman las observaciones de otros autores que demuestran la plasticidad del fenotipo de las células epiteliales *in vitro* dependiendo de las condiciones del cultivo, como el recubrimiento de la superficie, el tipo y dimensiones de la caja y el medio utilizado (Auersperg y col., 2000).

La LH esta involucrada en el desarrollo folicular, la ovulación y el mantenimiento del cuerpo lúteo, por lo tanto es clave para la función ovárica. Debido a su gran homología con la gonadotropina coriónica ambas se unen al mismo receptor (LHR ó LH/CGR) y desencadenan la misma respuesta biológica (Huhtaniemi, 2004). En este estudio se empleó gonadotropina coriónica humana ya que es más accesible que la LH y produce el mismo efecto.

En este trabajo empleamos la técnica de BrdU para valorar el índice de proliferación celular en los cultivos primarios en monocapa de las células epiteliales testigo y tratados con hormona gonadotropina coriónica. La BrdU es un análogo de la timina la cual se une al DNA durante la fase de síntesis. Su incorporación es uniforme y su detección específica, por lo que proporciona una herramienta accesible y eficaz para evaluar la proliferación de células y tejidos.

Se encontró que las células epiteliales cultivadas (aproximadamente con 50% de confluencia) aumentan su proliferación por efecto de la hCG no recombinante de manera dosis dependiente. Esta hormona se obtuvo de orina de mujeres embarazadas por lo que cabe la posibilidad que estuviera contaminada con otras moléculas con efecto mitogénico como el factor de crecimiento epidérmico, por consiguiente se decidió

corroborar los resultados obtenidos en una segunda serie experimental utilizando hCG recombinante. Además, después de las 48 h de cultivo en medio completo las células se sometieron a un medio pobre en suero (1% de suero libre de esteroides) durante 12 h. La privación del suero sincroniza a las células antes de entrar al ciclo celular (Alberts y cols., 2001; Dedov y cols., 2004) y hace más evidente el efecto mitogénico de la gonadotropina coriónica en las células que estuvieron expuestas a hCG por 9 y 12 horas. Estos experimentos confirman el efecto estimulador de la hCG sobre la proliferación celular del epitelio superficial del ovario del embrión de pollo.

Para ejercer sus funciones, la LH se une a receptores transmembranales específicos presentes en las células diana, por lo que consideramos necesario investigar si el receptor LH/CG está presente tanto en el ovario del embrión de pollo como en las células del epitelio superficial a esta edad. Se detectó por RT-PCR el RNA mensajero del receptor LH/CG en el ovario completo del embrión de pollo de 14 d.i, así como en la suspensión celular enriquecida con células del epitelio superficial, lo que indica que las células expresan el receptor a LH/CG por lo que el efecto de hCG puede estar mediado por su receptor.

A bajas concentraciones la LH estimula la producción de cAMP y activa a la proteína cinasa A; a concentraciones elevadas, aumenta el IP<sub>3</sub> y activa la proteína cinasa C. También se ha demostrado que el receptor a LH/CG media la activación de proteína cinasas activadas por mitógenos (MAPK) (Ascoli y cols., 2002; Huhtaniemi, 2004; Hirakawa, 2002), por lo que el efecto proliferativo de la CG puede ocurrir a través de alguna de estas vías. Otra alternativa, es que la CG active la proliferación celular a través del aumento de la producción de andrógenos y su conversión a estrógenos por aromatización de los primeros como sucede en las células tecaes de los folículos ováricos en desarrollo (Hugues, 2000). El dilucidar el mecanismo de acción de CG sobre las células epiteliales requerirá de otros estudios.

La observación de que la CG estimula la proliferación del epitelio superficial del ovario embrionario es un aporte relevante que no se había descrito previamente. Se conoce que

LH/CG actúa a nivel del folículo ovárico (teca y granulosa) y del cuerpo lúteo, sin embargo, hay pocas evidencias de un efecto a nivel del epitelio superficial (Ivarsson y cols., 2001). Un efecto sobre el crecimiento epitelial podría ser importante durante el ciclo menstrual ya que favorecerá la reepitelialización luego de la ruptura del folículo en la ovulación. Otro aspecto de interés es que en la menopausia, en la que los niveles de LH y FSH están aumentados, un estímulo proliferativo es considerado un factor de riesgo en el desarrollo de neoplasias. En el caso del epitelio superficial del ovario, se sabe que este es el origen de 90% de las neoplasias de ovario de origen epitelial.

## 9. CONCLUSIONES.

La hormona gonadotropina coriónica no recombinante incrementa *in vitro* la proliferación de las células del epitelio superficial del ovario del embrión de pollo de 14 días de incubación .

Se observa un efecto proliferativo de la hCG no recombinante a partir de la dosis de 0.5 UI/ml.

Tanto la hCG recombinante y la no recombinante tienen efecto proliferativo en las células del OSE.

Las células del epitelio superficial del ovario del embrión de pollo expresan el mRNA para el receptor a LH/CG.



## 10. PERSPECTIVAS.

Es interesante estudiar si las células del epitelio superficial del ovario de embriones de pollo responden *in vivo* a la gonadotropina coriónica humana incrementando su proliferación al igual que lo hacen *in vitro*.

Es importante analizar el mecanismo de acción de la hCG ya que ésta podría actuar de manera directa sobre las células de OSE a través de la unión con su receptor, o bien aumentando la secreción de andrógenos que sirven de sustratos para la aromatización a estrógenos.

Es de interés conocer sobre la capacidad esteroidogénica de las células del OSE y los mecanismos que regulan este proceso.

Otra posibilidad es que la gonadotropina coriónica interactúe con otros factores como el factor de crecimiento epidérmico que es un mitógeno potente.

## 11. REFERENCIAS

1. Alberts B, Johnson A (2002) The cell cycle and programmed cell death. In: Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P (eds) *Molecular Biology of The Cell*. Garland Science, New York, NY, pp 986-992
2. Alberts B, Johnson A (2002) Cell communication. In: Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P (eds) *Molecular Biology of The Cell*. Garland Science, New York, NY, pp 986-992
3. Anderson L (1996) Intracellular mechanisms triggering gonadotrophin secretion. *Rev Reprod* 1:193-202
4. Ando Y, Fujimoto T (1983) Ultrastructural evidence that chick primordial germ cells leave the blood-vascular system prior to migrating to the gonadal anlagen. *Dev Growth Differ* 25:345-352
5. Ascoli M, Fanelli F, Segaloff DL (2002) The Lutropin/Choriogonadotropin Receptor, A 2002 Perspective. *Endocr Rev* 23:141-174
6. Auersperg N, Wong AS, Choi KC, Kang SK, Leung PC (2001) Ovarian surface epithelium: biology, endocrinology and pathology. *Endocr Rev* 22:255-288
7. Auersperg N, Maines-Bandiera SL (2000) Cultura and characterization of human ovarian surface epithelium. In: Bartlett JM (ed) *Ovarian Cancer*. Humana Press, Totowa, NJ, pp 169-177
8. Bo M, Boime I (1992) Identification of the transcriptionally active genes of the chorionic gonadotropin beta gene cluster in vivo. *J Biol Chem* 267:3179-3184

9. Bousfield GR, Ward DN (1994) Evidence for two folding domains in glycoprotein hormone alpha-subunits. *Endocrinology* 135:624-635
10. Burns KH, Owens GE, Fernandez JM, Nilson JH, Matzuk MM (2002) Characterization of integrin expression in the mouse ovary. *Biol Reprod* 67:743-751
11. Carlson B (2004) Getting Ready for Pregnancy. In: Carlson BM (ed) *Human Embriology and Developmental Biology*. Mosby Press, Philadelphia, PA, pp. 3-13
12. Carlson B (2004) Transport of gametes and fertilization. In: Carlson BM (ed) *Human Embriology and Developmental Biology*. Mosby Press, Philadelphia, PA, pp. 27-28
13. Clinton M (1998) Sex determination and gonadal development: a bird's eye view. *J Exp Zool* 281:457-465
14. Davies BR, Finnigan DS, Smith SK, Ponder BA (1999) Administration of gonadotropins stimulates proliferation of normal mouse ovarian surface epithelium. *Ginecol Endocrinol* 13:75-81
15. Dedov VN, Dedova IV, Nicholson GA (2004) Equilibrium between cell division and apoptosis in immortal cells as an alternative to the G1 restriction mechanism in mammalian cells. *Cell Cycle* 3:491-495
16. Dolbear F (1995) Bromodeoxiuridine: a diagnostic tool in biology and medicine, Part I: Historical perspectives, histochemical methods and cell kinetics. *Histochem J* 27:339-369

17. Elbretch A, Smith RG (1992) Aromatase enzyme activity and sex determination in chickens. *Science* 252:1643-1650
18. Erickson GF, Case E (1983) Epidermal growth factor antagonizes ovarian theca-interstitial cytodifferentiation. *Mol Cell Endocrinol* 31:71-76
19. Erickson GF, Shimasaki S (2001) The physiology of folliculogenesis: the role of novel growth factors. *Fertil Steril* 76:943-949
20. Eppig JJ, Viveiros MM, Marin C, de la Fuente R (2004) Regulation of mammalian oocyte maturation. In: Leung PC, Adashi EY (eds) *The Ovary*. 2<sup>a</sup> ed. Elsevier Academic Press, San Diego, CA, pp 113-123
21. Espey LL, Bellinger AS, Healy JA (2004) Ovulation: An Inflammatory cascade of gene expression. In: Leung PC, Adashi EY (eds) *The Ovary*. 2<sup>a</sup> ed. Elsevier Academic Press, San Diego, CA, pp 145-165
22. Fargeix N, Didier E, Didier P (1981) Early sequential development in avian gonads. *Rep Nutr Develop* 21:479-496
23. Erickson GF, Case E (1983) Epidermal growth factor antagonizes ovarian theca-interstitial cytodifferentiation. *Mol Cell Endocrinol* 31:71-76
24. Garcia-Campayo V, Boime I (2001) Novel recombinant gonadotropins. *Trends Endocrinol Metab* 12:72-77
25. Gasc JM (1980) Estrogen target cells in gonads of the chicken embryo during sexual differentiation. *J Embryol Exp Morphol* 55:331-342.
26. Gilbert FS (2003) Sex Determination. In: Gilbert SF (ed) *Developmental biology*. 6<sup>a</sup> ed. Sinauer Associates Inc. Publishers, Sunderland, MA, pp. 549

27. Gougeon A (2004) Dynamics for human follicular growth: morphologic, dynamic, and functional aspects. In: Leung PC, Adashi EY (eds) *The Ovary*. 2<sup>a</sup> ed. Elsevier Academic Press, San Diego, CA, pp 25-30
28. Gründker C, Schulz K, Günthert A, Emons G (2000) Luteinizing hormone releasing hormone induces nuclear factor  $\kappa$ B-activation and inhibits apoptosis in Ovarian Cancer Cells. *J Clin Endocrinol Metab*. 85:3815-3820
29. Halvorson LM, Chin WW (2001) Hormonas gonadotróficas: biosíntesis, secreción, receptores y acción. In: Yen SS, Jaffe RB, Barbieri RL (eds) *Endocrinología de la Reproducción*. 4<sup>a</sup> ed. Editorial Médica Panamericana, Buenos aires, Argentina, pp 87-111
30. Hardisty MW (1984) Primordial germ cells and the vertebrate germ line. In: Jones (ed) *The vertebrate ovary*. Plenum Publishing Corp. pp: 1-46
31. Harrison CA, Gray PC, Vale WW, Robertson DM (2005) Antagonists of activin signaling: mechanisms and potential biological applications. *Trends Endocrinol Metab* 16:73-78
32. Hazzard TM, Stouffer RL (2000) Angiogenesis in ovarian follicular and luteal development. *Baillieres Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 14:883-900
33. Hirakawa T, Galet C, Ascoli M (2002) MA-10 cells transfected with the human lutropin/choriogonadotropin receptor (hLHR): a novel experimental paradigm to study the functional properties of the hLHR. *Endocrinology* 143:1026-1035
34. Hirshfield AN (1991) Development of follicles in the mammalian ovary. *Int Rev Cytol* 124:43-101

35. Hugues JN, Durnerin C (2000) Role of luteinizing hormone in follicular development and corpus luteum function. *Gynecol Obstet Fertil* 28:738-744
36. Hobson SA, McNeil SE, Lee F, Rodland KD (2000) Signal transduction mechanisms linking increased extracellular calcium to proliferation in ovarian surface epithelial cells. *Exp Cell Res* 258:1-11
37. Huhtaniemi I (2004) Functional consequences of mutations and polymorphisms in gonadotropin and gonadotropin receptor genes. In: Leung PC, Adashi EY (eds) *The Ovary*. 2<sup>a</sup> ed. Elsevier Academic Press, San Diego, CA, pp 55-62
38. Imataka H, Susuki K, Inano H, Kahmoto K, Tamaoki B (1989) Biosynthetic pathways of testosterone and 17- $\beta$  in slices of the embryonic ovary and testis of the chicken. *Gen Comp Endocrinol* 73:69-79
39. Ivarsson K, Sundfeldt K, Brannstrom M, Hellberg P, Janson PO (2001) Diverse effects of FSH and LH on proliferation of human ovarian surface epithelial cells. *Hum Reprod* 16:18-23
40. Jaffe RB (2001) Menopausia y envejecimiento. In: Yen SS, Jaffe RB, Barbieri RL (eds) *Endocrinología de la Reproducción*. 4<sup>a</sup> ed. Editorial Médica Panamericana, Buenos Aires, Argentina, pp 319-322
41. Juneja SC, Barr KJ, Enders GC, Kidder GM (1999) Defects in the germ line and gonads of mice lacking connexin43. *Biol Reprod* 60:1263-70
42. Konishi I, Kuroda H, Mandai M (1999) Review: Gonadotropins and development of ovarian cancer. *Oncology* 57: 45-48
43. Kost TA, Theodorakis N, Hughes SH (1983) The nucleotide sequence of the chick cytoplasmic beta-actin gene. *Nucleic Acids Res* 11:8287-8301

44. Kuroda H, Mandai M, Konishi I, Tsuruta Y, Kusakari T, Kariya M, Fujii S. (2001) Human ovarian surface epithelial (OSE) cells express LH/hCG receptors, and hCG inhibits apoptosis of OSE cells via up-regulation of insulin-like growth factor-I. *Int J Cancer* 92:309-315
45. Lu JL, Zheng Y, Kang X, Yuan J, Lauchan SC, Pike MC, Zheng W (2000) Decreased luteinizing hormone receptor mRNA expression in human ovarian epithelial cancer. *Gynecol Oncol* 79:158-168
46. Mc Laughlin DT, Hutson JM, Donahue PK (1983) Specific estradiol binding in embryonic mullerian ducts; a potential modulator of regression in male and female chick endocrinology 113:141-145
47. Mandai M, Konishi I, Kuroda H, Fukumoto M, Komatsu T, Yamamoto S, Nanbu K, Rao CV, Mori T (1997) Messenger ribonucleic acid expression of LH/hCG receptor gene in human ovarian carcinomas. *Eur J Cancer* 33:1501-1507
48. Mizutani T, Minegishi T, Nonobe Y, Abe Y, Hasegawa Y, Wakabayashi K, Kamiyoshi M, Miyamoto K (1998) Molecular cloning and functional expression of chicken luteinizing hormone receptor. *Biochim Biophys Acta* 1397:1-8
49. Nomura O, Nakabayashi O, Katsuhiko N, Horoshi Y, Shigeki M (1999) Expresión of five steroidogenic genes including aromatase gene at early developmental stages of chicken males and female embryos. *J Steroid Biochem and Mol Biol* 71:103-109
50. Osterholzer HO, Streibel EJ, Nicosia SV (1985) Growth effects of protein hormones on cultured rabbit ovarian surface epithelial cells. *Biol Reprod* 33:247-258.

51. Parrott J, Doraiswamy V, Kim G, Mosher R, Skinner M (2001) Expression and actions of both the follicle stimulating hormone receptor and the luteinizing hormone receptor in normal ovarian surface epithelium and ovarian cancer. *Mol Cell Endocrinol* 172:213-222
52. Parrott JA, Skinner MK (2000) Kit ligand actions on ovarian stromal cells: effects on theca cell recruitment and steroid production. *Mol Reprod Dev* 55:55-64
53. Salustri A, Fulop C, Camaioni A, Hascall VC (2004) Oocyte-granulosa cell Interactions. In: Leung PC, Adashi EY (eds) *The Ovary*. 2<sup>a</sup> ed. Elsevier Academic Press, San Diego, CA, pp 131-138
54. Schmidt PJ, Gindoff PR, Baron DA, Rubinow DR (1996) Basal and stimulated gonadotropin levels in the perimenopause. *Am J Obstet Gynecol* 175:643-650
55. Shimada K (1998) Gene expression of steroidogenic enzymes in chicken embryonic gonads. *J Exp Zool* 281:450-456
56. Smith CA, Sinclair AH (2004) Sex determination: insights from the chicken. *BioEssays* 26:120-132
57. Stewart SL, Querec TD, Gruver BN, O'Hare B, Babb JS, Patriotas C (2004) Gonadotropin and steroid hormones stimulate proliferation of the rat ovarian surface epithelium. *J Cell Physiol* 198:119-124
58. Stouffer RL (2004) The function and regulation of cell populations comprising the corpus luteum during the ovarian cycle. In: Leung PC, Adashi EY (eds) *The Ovary*. 2<sup>a</sup> ed. Elsevier Academic Press, San Diego, CA, pp 169-178



59. Syed V, Ulinsky G, Mok SC, Yiu GK, Ho S (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
60. Tashiro H, Katabuchi H, Begum M, Li X, Nitta M, Ohtake H, Okamura H (2003) Roles of luteinizing hormone/chorionic gonadotropin receptor in anchorage-dependent and independent growth in human ovarian surface epithelial cell lines. *Cancer Sci* 94:953-959
61. Tanabe Y, Saito NY, Nakamura T (1986) Ontogenic steroidogenesis by testes, ovary and adrenals of embryonic and postembryonic chickens. *Gen and Comp Endocrinol* 63:456-463
62. Teng CS, Teng CT (1975) Studies on sex-organ development isolation and characterization of oestrogen receptor from chick müllerian duct. *J Biochem.* 150-185
63. Thomas, FH, Ethier JF, Shimasaki S, Vanderhyden BC (2005) Follicle stimulating hormone regulates oocyte growth by modulation of expression of oocyte and granulosa cell factors. *Endocrinology* 146:941-949
64. Vassart G, Pardo L, Costagliola S (2004) A molecular dissection of the glycoprotein hormone receptors. *Trends Biochem Sci* 29:119-126
65. Villalpando I, Sánchez-Bringas G, Sánchez-Vargas I, Pedernera E, Villadán-Monroy H (2000) The p450 aromatase gene is asymmetrically expressed in a critical period for gonad sexual differentiation in the chick. *Gen Comp Endocrinol* 117:325-334
66. Woods JE (1987) Maturation of the hypothalamo-adenohypophyseal-gonadal (HAG) axes in the chick embryo. *J Exp Zool Suppl* 1: 265-271

67. Wright JW, Toth-Fejel S, Stouffer RL, Rodland KD (2002) Proliferation of rhesus ovarian surface epithelial cells in culture: lack of mitogenic response to steroid or gonadotropic hormones. *Endocrinology* 143:2198-2207
68. Yeh J, Adashi EY (2001) Ciclo Ovarico. In: Yen SS, Jaffe RB, Barbieri RL (eds) *Endocrinología de la Reproducción*. 4<sup>a</sup> ed. Editorial Médica Panamericana, Buenos aires, Argentina, pp 191-193
69. Yoshida K, Shimada K, Saito N (1996) Expresión of P450 17 $\alpha$ -hydroxylase and p450 aromatase genes in the chicken gonad before and after sexual differentiation. *Gen Comp Mol Biol* 102:233-240
70. Zeleznik A (2004) Dynamics of primate follicular growth: a physiological perspective. In: Leung PC, Adashi EY (eds) *The Ovary*. 2<sup>a</sup> ed. Elsevier Academic Press, San Diego, CA, pp 45-51

## 12. GLOSARIO

### CONDUCTO PARAMESONEFRICO.

También llamados conductos de Müller, son estructuras embrionarias que en el sexo femenino forman los oviductos, el cervix y el útero.

### ECLOSIÓN.

Nacimiento de las aves, cuando salen del cascarón.

### EPIBLASTO.

Capa externa del embrioblasto también llamada ectodermo primario a partir de la cual se formarán las tres capas blastodermicas en el embrión trilaminar.

### EPITELIO CELOMICO.

Es el epitelio que reviste la cavidad celomica que posteriormente dará origen a las cavidades torácica y abdominal embrionarias, también origina los cordones sexuales primarios, el epitelio superficial del ovario, los conductos de Müller y de Wolf.

### ESTIGMA.

Mancha no vascularizada que aparece en el ovario en el sitio donde se disgregara la superficie del ovario para liberar el óvulo al momento de la ovulación.

### ESTROMA.

Trama o armazón de un órgano glándula u otra estructura generalmente de tejido conjuntivo, que sirve para sostener entre sus mallas los elementos celulares.

### FIBROBLASTO.

Célula alargada plana de tejido conjuntivo que constituye el elemento de los tejidos fibrosos.

#### GONADOTROPOS.

Se encuentran en la hipófisis anterior, son las células responsables de la síntesis y secreción de LH y FSH.

#### HILIO.

Fisura o depresión especialmente en el ovario, por la que entran y salen los elementos vasculares, nerviosos y simpáticos.

#### LUTEOLISIS.

Degeneración del cuerpo lúteo para convertirse en un elemento no funcional conocido como cuerpo *albicans*.

#### ORGANO VESTIGIAL.

Estructura rudimentaria en el adulto que en el embrión esta bien desarrollado.

#### QUIESCENTE

En reposo temporal

#### SECRECIÓN PULSATIL.

Que se libera en forma de ondas o pulsos de acuerdo a una determinada frecuencia y amplitud por ejemplo la GnRH (hormona liberadora de gonadotropinas).

#### SINCICIO.

Masa de citoplasma formada por la fusión de varias células cuyos núcleos permanecen independientes.

## 13. APÉNDICES

### 13.1 Apéndice I

#### SOLUCIÓN SALINA BALANCEADA LIBRE DE CALCIO Y MAGNESIO

NaCl	8.09 g.
KCl	0.2 g.
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1.15 g.
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.2 g.

En 1 litro de agua destilada y agregando de 6-8 gotas de rojo de fenol como indicador de pH

#### PBS (BUFFER DE FOSFATOS)

NaCl	137 mM	8 g.
KCl	2,7 mM	0.2 g.
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	10 mM	1.44 g.
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2 mM	0.24 g.

#### ANTIBIÓTICO

Penicilina con Glutamina de Gibco. No. Catalogo 10378-016 (1000 U/ml)

#### SUERO BOVINO FETAL LAVADO

Agregar al Suero bovino fetal carbón activado al 1% agitando toda la noche, luego centrifugar para precipitar el carbón.

#### BUFFER DE GLICINA.

Glicina 0.2 M en agua destilada, ajustar el pH a 2.0 con HCl.

#### ALCOHOL ACIDO

Etanol al 70% en Buffer de Glicina.

#### BUFFER DE INCUBACIÓN (proporcionado en el Kit de Roche)

Buffer Tris                66 mM

MgCl<sub>2</sub>                    66 mM

2-Mercaptoetanol        1 mM

#### AGUA TRATADA CON DEPC (libre de RNAasas)

Agregar a un litro de agua bidestilada 1ml. de dietilpírocarbonato (DEPC) y agitar hasta que se disuelva, dejar en reposo toda la noche y esterilizar en autoclave.

#### PORTAOBJETOS TRATADOS CON POLI-L-LISINA.

Se diluye en proporción 1:10 solución de Poli-L-Lisina de Sigma al 0.1% y se sumergen los portaobjetos que se limpian con alcohol-ácido por 5 minutos

#### AMORTIGUADOR DE CARGA

Azul de bromofenol, xileno cianol con glicerol y TBE 10X

#### BUFFER TBE 20X

Tris base                121g

Ácido Bórico            61.7g

Na<sub>2</sub>EDTA .2H<sub>2</sub>O        7.44g

En un volumen de 1 litro

#### SUPER BLOCK

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 30% en Metanol

#### BUFFER TAE

Tris-Acetato    400mM

EDTA            10mM

## SOLUCIÓN DE BOUIN

Solución acuosa saturada de ácido pícrico 750ml.

Formol (37-40%) 250ml

Ácido acético glacial 50ml.

### 13.2 Apéndice II (Técnicas)

#### INMUNOCITOQUIMICA

Los frotis celulares se fijaron en alcohol-ácido por 30 minutos a  $-20^{\circ}\text{C}$  y se dejaron secar al aire. Se hizo un lavado con PBS frío y tres lavados mas con PBS caliente ( $90^{\circ}\text{C}$ ) por 10 min. Se incubaron las preparaciones con  $30\mu\text{l}$  del anticuerpo primario monoclonal de ratón, Anti-BrdU (contenido en una solución con nucleasas para la desnaturalización del DNA en PBS-glicerina) diluido 1:10 con buffer de incubación, se dejó incubando por 1 hora en una cámara húmeda a  $37^{\circ}\text{C}$  en baño María y protegido de la luz. Se lavaron tres veces con PBS en agitación por 10 minutos. Se incubó por 1 hora las muestras con  $30\mu\text{l}$  del anticuerpo secundario de oveja marcado con fluoresceína anti-Ig de ratón diluido 1:10 con PBS incubando en las mismas condiciones que el anticuerpo primario. Se retiró el segundo anticuerpo lavando con una solución de PBS con Tween 20 al 0.01% por 10 min y se hicieron dos lavados mas con PBS solo. Se montaron antes de su observación al microscopio.

#### OBTENCIÓN DE RNA.

Esta técnica se empleo para obtener el RNA total de los ovarios de embrión de pollo de 14 días y de las células epiteliales y detectar la presencia del mRNA de LHR en estos tejidos.

Una vez obtenidos los ovarios se homogenizaron por 5 minutos a temperatura ambiente (TA) en 1ml por ovario del reactivo de Trizol utilizando pistilos estériles y un

homogenizador, las células epiteliales se homogenizaron en 1ml de reactivo de Trizol por caja en un tubo eppendorf. Para realizar la purificación se agregaron 200µl de cloroformo al tubo que contenía las muestras y se agitó vigorosamente 15 segundos para después incubar a TA por 2-3 minutos, posteriormente se centrifugó a 11,500 rpm/min a 4 °C por 15 minutos y se recuperó la fase acuosa en un tubo limpio cuidando no contaminar con la interfase, se agregaron 500 µl de alcohol isopropílico y se incubó a TA por 10 minutos, se centrifugó a 11,500 rpm/min a 4°C por 10 min. El RNA apareció como un pellet ligeramente blanco, se decantó el sobrenadante y se lavó el pellet en 1 ml de etanol al 75%, y se agitó con vortex, se centrifugó a 8500 rpm a 4 °C por 5 minutos, se desecharon el sobrenadante y seco al aire. El pellet se resuspendió en 20-50 µl de agua DEPC. Para calcular la concentración y verificar la pureza del RNA obtenido se tomó una alícuota de 10 µl y se llevó a 1ml con agua destilada, se leyó la muestra en un espectrofotómetro marca Beckman modelo DU 650 en una cubeta de cuarzo a una densidad óptica de 260/280 nm. Se obtuvo la concentración de RNA mediante la siguiente relación

$$1 \text{ DO} = 40 \text{ µl/ml de RNA.}$$

#### REVERSO TRANSCRIPCIÓN (RT)

2µg de RNA total obtenido se agregó a la siguiente mezcla de reacción; se preparó una mezcla de solución de 2 µl de Buffer 10X constituido por Tris 100mM y KCl 500mM, 4µl de MgCl 25 mM, 2µl de una mezcla de deoxinucleótidos (dNTPs) de 10mM de cada uno (dGTP, dATP, dTTP, dCTP), 1µl de inhibidor de RNAasa de una solución de 50 unidades/µl, 0.8µl de la enzima reverso transcriptasa AMV y se aforó con agua DEPC hasta un volumen de 20µl. Se incubó el tubo con la mezcla de reacción en un termociclador marca Perkin ELMER Gene Amp PCR System a 25°C por 10 minutos, 42°C por 60 minutos, 99°C por 5 minutos y 4°C por 5 minutos. El DNA complementario (cDNA) obtenido se mantuvo a -20°C hasta su uso.



## REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

Esta técnica nos permite amplificar un fragmento del gen que nos interesa a partir del cDNA obtenido por reverso transcripción. Los eventos moleculares que ocurren durante la amplificación son tres:

1. La desnaturalización del DNA la cual ocurre a 94°C
2. El alineamiento de los oligonucleótidos sintéticos iniciadores en cada una de las hebras por separado en dirección 3' → 5' a 59°C
3. La síntesis de ADN a 72°C.

Con estos tres pasos se obtiene un ciclo de la reacción, la cual se comporta de manera exponencial al generar copias idénticas del fragmento flanqueado por los oligonucleótidos sintéticos que sirven como moldes para la síntesis de nuevas copias del DNA (Erlich et al, 1991). A continuación se menciona la técnica empleada.

A cada muestra de 2µl de cDNA se agregó una solución compuesta por 14µl de agua estéril, 2.5µl de Buffer II PCR 10X constituido por KCl 2.6 mM y Tris-HCl 0.53mM, 1.5µl de MgCl 25mM, 1.5µl de una mezcla de dNTPs de 10mM de cada uno, 0.5µl de la enzima Ampli-Taq DNA polimerasa, 1µl de cada oligonucleótido sintético de una concentración 20µM y 2µl de dimetilsulfóxido (DMSO). La mezcla de reacción se incubó en el termociclador a 94°C 5 minutos y 30 ciclos a 94°C, 59°C y 72°C 1 minuto cada temperatura y 72°C por 5 minutos, el producto de la reacción se mantuvo a -20°C.

## ELECTROFORESIS DEL FRAGMENTO AMPLIFICADO.

Se preparó un gel de agarosa al 1% en amortiguador TAE con 1µl de una solución bromuro de etidio concentrada. El marcador de peso molecular utilizado fue el DNA Ladder 100pb de la marca Invitrogen del cual se colocaron 0.75µl de una concentración de 1.0 ug/µl. De cada producto amplificado se tomaron 5µl y se mezclaron con el amortiguador de carga (ver apéndice) y se colocaron individualmente en los pozos del gel. Se agregaron 200 ml. de amortiguador TBE 1X a la cámara de electroforesis y se

aplicaron 90 volts durante media hora y se visualizó en un transiluminador de UV. Cada gel fue fotografiado.

#### TÉCNICA HISTOLÓGICA.

Se obtuvieron los ovarios por disección del embrión de pollo de 14 días y se fijaron en paraformaldehído al 4% a una temperatura de 4° C por 2 horas. Se lavaron dos veces con PBS a 4°C en intervalos de 5 min cada uno. Los ovarios se deshidrataron en etanol aumentando las concentraciones gradualmente desde 30% hasta 100% en intervalos de 10 min cada uno y dos veces mas en Xilol. Posteriormente, los tejidos se sumergieron en dos cambios de parafina a 56°C por 1-2 horas cada vez, se colocaron en moldes para su solidificación. Se realizaron cortes de 5µm de grosor en microtomo y se colocaron en portaobjetos tratados con poli-L-lisina

Los ovarios que se emplearon como controles de la disgregación se fijaron con líquido de Bouin por 2 horas y se procedió de la misma manera para teñirlos con Hematoxilina-Eosina (H-E)

#### INMUNOHISTOQUIMICA.

La inmunohistoquímica para identificar el OSE se hizo con un anticuerpo primario anti-citoqueratinas (CK) por Scy Tek que se reveló con un segundo anticuerpo anti-Ig acoplado a la enzima peroxidasa y revelado con diaminobencidina en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de acuerdo a las instrucciones proporcionadas por el proveedor (kit de Scy Tec, Sensi Tek HRP Anti-Mouse (DAB) No. Cat. AEA080-IFU para revelado de la inmunohistoquímica). La preparación de células se contratiño con el colorante hematoxilina.

Los cortes se desparafinaron a 55°C por 1 hora y se rehidrataron sumergiéndolos por periodos de 5 minutos en las siguientes soluciones Xilol dos cambios, etanol en concentraciones descendentes 100%, 96%, 70%, 50%, agua destilada y PBS dos veces, se incubaron con peróxido de hidrógeno en metanol al 30% por 10 minutos para bloquear la actividad de fosfatasas alcalinas endógenas y se hicieron dos lavados con agua destilada y dos con PBS. La permeabilización del tejido se realizó en olla de

presión Decloaking Chamber sumergidos en buffer de citratos por 3 min y se lavaron 4 veces con PBS. Posteriormente se colocaron en cámara húmeda y se les colocó la solución Super Block por 6 min. para bloquear epítomos inespecíficos lavando después con PBS. Se les colocó el anticuerpo primario anti-CK por 1 día a 4° C ó 1 hora a 37°C en cámara húmeda. Se lavaron 4 veces con PBS y se les colocó el anticuerpo secundario anti-Ig de ratón marcado con la enzima peroxidasa a TA por 20 min. Se les agregó la solución Strep/HRP a TA por 20 min y se hicieron 4 lavados con PBS. Para revelar la reacción se incubaron las muestras en una solución de diaminobencidina (DAB) dilución 1:10 en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> hasta observar la marca en el microscopio óptico. Los núcleos se contratiñeron con Hematoxilina.

#### TINCIÓN HEMATOXILINA Y EOSINA (H-E).

Se sumergieron las muestras en las siguientes soluciones, agua destilada por 5 minutos, Hematoxilina de Harris por 1-2min, alcohol ácido, agua amoniacal, Eosina, después se deshidrataron en concentraciones de etanol de 50%, 70%, 80%, 96% y 100% por 1 segundo varias veces y finalmente en Xilol. Se montaron con resina sintética, cubriéndolas con un cubreobjetos.

#### CONTRATINCIÓN DE LOS NÚCLEOS CON HEMATOXILINA.

Se sumergieron las muestras en agua destilada por 5 minutos, en Hematoxilina de Harris por 1 segundo dos o tres veces, en agua corriente por 1 segundo, en agua amoniacal 5 segundos y nuevamente en agua corriente, después se deshidrataron en concentraciones de etanol de 50%, 70%, 80%, 96% y 100% por 1 segundo varias veces y finalmente en Xilol. Se montó con resina sintética, cubriéndolas con un cubreobjetos.