



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

*Expresión de la hormona anti mülleriana, Cyp11a1 y aromatasasa durante el
envejecimiento ovárico.*

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA

ÁNGEL LUNA CASTELLANOS



CD. UNIVERSITARIA, CD. MX. AÑO 2017



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: DRA. ELENA ZAMBRANO GONZÁLEZ

VOCAL: DR. IGNACIO CAMACHO ARROLLO

SECRETARIO: DRA. VERÓNICA DÍAZ HERNÁNDEZ

1er. SUPLENTE: DRA. CLAUDIA TERESA TOVAR PALACIO

2º SUPLENTE: M. EN C. JOSÉ VERGARA DE LA FUENTE

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

LABORATORIO DE DESARROLLO GONADAL Y ENVEJECIMIENTO OVÁRICO.

DEPARTAMENTO DE EMBRIOLOGÍA.

EDIFICIO A, FACULTAD DE MEDICINA.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO.

ASESOR DEL TEMA:

Dra. Verónica Díaz Hernández, Profesor Titular A de T.C.

SUPERVISOR TÉCNICO:

M.C. José Alejandro Marmolejo Valencia

SUSTENTANTE:

Ángel Luna Castellanos

Este trabajo se realizó bajo la dirección de la Dra. Verónica Díaz Hernández, en el laboratorio de Desarrollo Gonadal y Envejecimiento ovárico, ubicado en el Edificio “A” de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México.

APOYOS FINANCIEROS

Este trabajo se realizó gracias al financiamiento del proyecto:

PAPIIT-UNAM IN216717 Cambios morfológicos, ultraestructurales y funcionales durante el envejecimiento ovárico, a cargo de la Dra. Verónica Díaz Hernández

Este proyecto fue parcialmente financiado por la Facultad de Medicina, UNAM.

AGRADECIMIENTOS ACADÉMICOS

Al M. en C. José Alejandro Marmolejo Valencia, por su apoyo como supervisor técnico en el desarrollo de este trabajo de investigación.

A la Dra. Ivette Caldelas Sánchez por donar las conejas utilizadas en este proyecto, sin su apoyo y disposición este proyecto no podría haberse logrado.

A la Dra. Erika Navarrete Monroy por su apoyo en el manejo y cuidado de los conejos, así como en el seguimiento de las cruzas y partos.

A la unidad de Síntesis y secuenciación de ADN del Instituto de Biotecnología, UNAM: Dr. Paul Gaytán Colín, M.C. Eugenio López Bustos, IQ Santiago Becerra, M.C. Jorge Arturo Yáñez Ponce de León, por la síntesis de los oligonucleótidos utilizados en este proyecto.

A la M. en C. Patricia de la Torre, encargada de la Unidad de secuenciación del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM por la obtención de las secuencias reportadas en esta tesis.

ÍNDICE

ABREVIATURAS	lii
GLOSARIO	iv
ÍNDICE DE TABLAS	vi
ÍNDICE DE FIGURAS	vi
RESUMEN	viii
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Anatomía del Ovario	1
1.2 Crecimiento folicular	2
1.3 Reserva folicular	4
1.4 Fisiología del envejecimiento ovárico	5
1.5 Folliculogénesis en conejo	7
1.6 CYP11a1 y aromatasa en la síntesis de hormonas esteroideas	8
1.7 Hormona anti Mülleriana	11
2. ANTECEDENTES	12
3. JUSTIFICACIÓN	14
4. HIPÓTESIS	15
5. OBJETIVOS	15
5.1 Objetivo general	15
5.2 Objetivos particulares	15
6. MATERIALES Y MÉTODOS	16
6.1 Obtención de la muestra	16
6.2 Extracción de RNA total	17
6.3 Verificación de la integridad de RNA total	17
6.4 Tratamiento con DNAsa	18
6.5 Cuantificación de RNA total	18
6.6 Síntesis de cDNA	18
6.7 Diseño de oligonucleótidos	19
6.8 Estandarización de las condiciones de RT-PCR para los genes de expresión	19
6.9 RT-PCR punto final	20

6.10	Identificación de los genes amplificados	20
6.11	Análisis densitométrico	20
6.12	Secuenciación e identificación de genes	20
6.13	Caracterización histológica	21
6.14	Tinción Tricrómica de Masson	21
7.	RESULTADOS	23
7.1	Extracción de RNA total	23
7.2	Diseño de oligonucleótidos	24
7.3	Estandarización de las condiciones de RT-PCR	26
7.4	Secuenciación e identificación de los genes	31
7.5	Caracterización histológica	36
7.6	Perfiles de expresión	41
8.	DISCUSIÓN	44
9.	CONCLUSIÓN	47
10.	PERSPECTIVAS	48
11.	ANEXOS	49
11.1	Anexo 1	49
12.	REFERENCIAS	50

ABREVIATURAS

AMH	Hormona anti mülleriana (por sus siglas en inglés)
AMH-R	Receptor de hormona anti mülleriana
AMPc	AMP cíclico (AMP: adenosina mono fosfato)
CYP11a1	Citocromo P450 11A1 Colesterol Desmolasa
CYP19	Citocromo P450 19 Aromatasa
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementario
dNTPs	Di-nucleótidos trifosfato
dpc	Días <i>post coitum</i>
dpp	Días <i>post partum</i>
FSH	Hormona folículo estimulante
hprt	Hipoxantina Fosforibosiltransferasa (por sus siglas en inglés)
g	Gramo
LH	Hormona luteinizante
min	Minuto
mL	Mililitro
ng	Nano gramo
NCBI	National Center for Biotechnology Information
RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa
rpm	Revoluciones por minuto
seg	Segundo
TA	Temperatura ambiente
TAE	Tris acetato de EDTA
Tm	Temperatura de alineamiento
µg	Micro gramo
µL	Micro litro
UV	Luz Ultravioleta
V	Volts

GLOSARIO

AMPc. Es un nucleótido que funciona como segundo mensajero en varios procesos biológicos.

Antro folicular. Espacio formado en un folículo por la acumulación de líquido folicular, rodeado de células de la granulosa estratificadas.

Aromatasa. Enzima de la súper familia de citocromos P450. Está involucrada en distintas reacciones como metabolismo de fármacos, síntesis de colesterol, hormonas esteroideas y otros lípidos. Cataliza la conversión de Testosterona a Estradiol, por la adición de dobles enlaces (aromatización) del anillo A.

Arresto meiótico. Inactivación del proceso de meiosis durante una etapa determinada.

Atresia. Proceso de muerte celular de los folículos del ovario.

Células germinales primordiales. Células responsables de diferenciarse en óvulos o espermatozoides. Migran desde la pared del saco vitelino hasta las crestas genitales.

Cuerpo lúteo. Células de la granulosa y de la teca interna con alta vascularización. Producen un pigmento amarillo y secretan gran cantidad de estrógenos y progesterona después de la ovulación.

Estroma. Conjunto de células de tejido conectivo que rodea a los folículos del ovario.

Foliculogénesis. Proceso de desarrollo de los folículos de ovario.

Folículo primordial. Conjunto celular formado por el ovocito rodeado por una capa de células epiteliales planas.

Hibernación. Estado en el que las células y los organismos disminuyen las reacciones con alto gasto energético, que posteriormente pueden reactivarse para continuar con su desarrollo.

Luteinización. Aumento de tamaño y acumulación de lípidos de las células de la granulosa y la teca interna.

Meiosis. Proceso en el cual las células germinales dan origen a los gametos masculinos y femeninos. Se requiere de dos divisiones celulares para reducir el número de cromosomas de 46 a 23 cromosomas.

Menarca: Aparición de la primera menstruación en la mujer.

Ovario. Es el órgano reproductor femenino o gónada femenina. Tiene dos funciones principales: síntesis de hormonas esteroideas (principalmente estradiol) y producción de ovocitos viables para ser fertilizados.

Ovocito. Gameto femenino. Célula que se encuentra en el ovario con proceso meiótico detenido, el cual terminará al ser fecundado.

Parénquima. Zona periférica del ovario constituida por los folículos ováricos.

Zona pelúcida. Espacio formado por secreciones de tipo glucoproteínicas entre el ovocito y las células de la granulosa que le rodean.

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Relación de ejemplares utilizados en la metodología	16
Tabla 2. Diseño de primer para RT-PCR	25
Tabla 3. Resumen de la estandarización de las condiciones de RT-PCR	31
Tabla 4. Identificación de las secuencias de cDNA	32

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Diagrama de la anatomía del ovario humano en la edad reproductiva	1
Figura 2. Representación esquemática de la pérdida de reserva folicular del ovario	5
Figura 3. Representación esquemática de la disminución del número de folículos y la calidad	6
Figura 4. Representación esquemática de los principales eventos de diferenciación gonadal en el conejo	7
Figura 5. Representación esquemática de la síntesis de esteroides en humano	9
Figura 6. Representación esquemática de la síntesis de estradiol	10
Figura 7. Esquema de la acción de AMH en los folículos	11
Figura 8. Verificación de la integridad de RNA total	23
Figura 9. Secuencias del gen de AMH de cuatro especies similares a <i>Oryctolagus cuniculus</i>	25
Figura 10. Gradiente de temperatura del gen de expresión de aromatasa	26
Figura 11. Gradiente de temperatura del gen de expresión de CYP11a1	27
Figura 12. Temperatura de alineamiento del gen de expresión de AMH	28
Figura 13. Curva de ciclos del gen de aromatasa	29
Figura 14. Curva de ciclos del gen de CYP11a1	29

Figura 15. Curva de ciclos del gen de AMH	30
Figura 16. Electroferograma del gen de CYP11a1	33
Figura 17. Electroferograma del gen de aromatasa	34
Figura 18. Identificación de la secuencia del gen de CYP11a1	35
Figura 19. Identificación de la secuencia del gen de aromatasa	35
Figura 20. Fotomicrografía de ovarios de conejas chinchilla de distintas edades	39
Figura 21. Fotomicrografía de ovarios de conejas chinchilla viejas	40
Figura 22. Gráfica de expresión de AMH	41
Figura 23. Gráfica de expresión de CYP11a1	42
Figura 24. Gráfica de expresión de aromatasa	43

RESUMEN

El ovario es un órgano multifuncional, que cambia frecuentemente. Cuenta con dos funciones principales: (1) la generación de ovocitos fértiles capaces de ser fecundados y generar un nuevo organismo y (2) secreción de hormonas esteroideas que preparan al sistema reproductivo para la fertilización y el posterior establecimiento del embrión. El ovario está formado por una corteza: formada por folículos en distintas etapas de desarrollo; y por una médula que contiene el paquete vasculonervioso.

El conjunto de folículos primordiales presentes en el ovario se le denomina reserva folicular ovárica. El ovario funciona como reloj biológico de la fertilidad femenina ya que contiene un número finito de ovocitos. La viabilidad de los ovocitos está en relación directa con la disminución de la reserva folicular. Conforme avanza la edad, la capacidad de los ovocitos para desarrollar embriones viables disminuye considerablemente.

En el proceso de maduración de los folículos y el crecimiento de los mismos intervienen las enzimas CYP11a1, aromatasa y la hormona antimulleriana. La enzima CYP11a1 es una enzima que cataliza la conversión de colesterol a pregnenolona, este sustrato es convertido a una hormona esteroide en específico, dependiendo de qué enzimas o cofactores se encuentren presentes, por este motivo la pregnenolona es considerada el reactivo limitante.

La enzima aromatasa es la encargada de sintetizar estradiol a partir de testosterona. El estradiol es una hormona crítica para el crecimiento de células de la granulosa y la diferenciación de los folículos antrales, así como el mantenimiento de los folículos y promover su ovulación. La hormona antimulleriana juega un papel importante en la regulación de los folículos que van a ser reclutados para su crecimiento, así como para la selección de los folículos dominantes que serán ovulados. En las mujeres, la AMH se expresa únicamente en células de la granulosa de folículos primordiales y folículos pequeños en crecimiento.

En el presente trabajo se buscó establecer un patrón de expresión de la enzima CYP11a1, aromatasa y hormona antimulleriana durante el envejecimiento del ovario utilizando como modelo conejas chinchilla. Se encontró que la expresión de la enzima CYP11a1 es muy baja en ovarios de coneja de 2 meses de edad. En esta misma etapa se encontró una baja expresión de la enzima aromatasa. Asimismo, se detectó la expresión de la hormona antimulleriana, dado que en esta etapa comienza la transformación de folículos germinales primordiales a folículos primarios, donde las células de la granulosa comienzan a tener actividad esteroideogénica.

En el caso de los ovarios de 4 meses de edad se observó que, tanto la expresión de la enzima CYP11a1 como la expresión de la enzima aromatasa, se incrementaron considerablemente en comparación con los ovarios de 2 meses. En cambio, la expresión de la hormona antimulleriana no pudo ser detectable. En esta etapa la coneja alcanza la pubertad, y los folículos en crecimiento tienen una alta actividad esteroideogénica, además, ya se pueden encontrar folículos en etapas de desarrollo más avanzadas, incluso capaces de ser ovulados.

Finalmente, en ovarios de conejas viejas (más de 1 año de edad) se observó una disminución en la expresión de la enzima aromatasa, en cambio la expresión de la enzima CYP11a1 se vio incrementada considerablemente, comparada con los años anteriores. En esta misma etapa, no fue detectable la expresión de la hormona antimulleriana por el método de RT-PCR.

Este trabajo muestra el comportamiento de la expresión de las enzimas CYP11a1, aromatasa y hormona antimulleriana durante el envejecimiento del ovario de conejas chinchilla. Además, puede contribuir a la base de datos de la NCBI con la secuenciación de la hormona antimulleriana, ya que se pudo obtener un fragmento de gran tamaño, comparado con el que actualmente se encuentra en la base de datos.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Anatomía del Ovario

El ovario es un órgano multifuncional, que cambia frecuentemente. Cuenta con dos funciones principales: (1) la generación de ovocitos fértiles capaces de ser fecundados y generar un nuevo organismo y, (2) secreción de hormonas esteroides que preparan al sistema reproductivo para la fertilización y el posterior establecimiento del embrión (Oktem y Oktay, 2008).

Los ovarios son estructuras en forma de almendra, localizada en ambos lados del útero. Están formados por una corteza, en la que se encuentran las unidades funcionales: los folículos en distintos estadios de desarrollo (figura 1).

Un folículo está integrado por un ovocito y células de la granulosa. En el caso de los ovarios adultos, se puede observar la presencia de cuerpos lúteos y múltiples cuerpos blancos, correspondientes a cicatrices de cuerpos lúteos antiguos (Banerjee et al., 2014). La médula es la porción central del ovario donde se encuentran células heterogéneas y el hilio que contiene el paquete vasculonervioso.

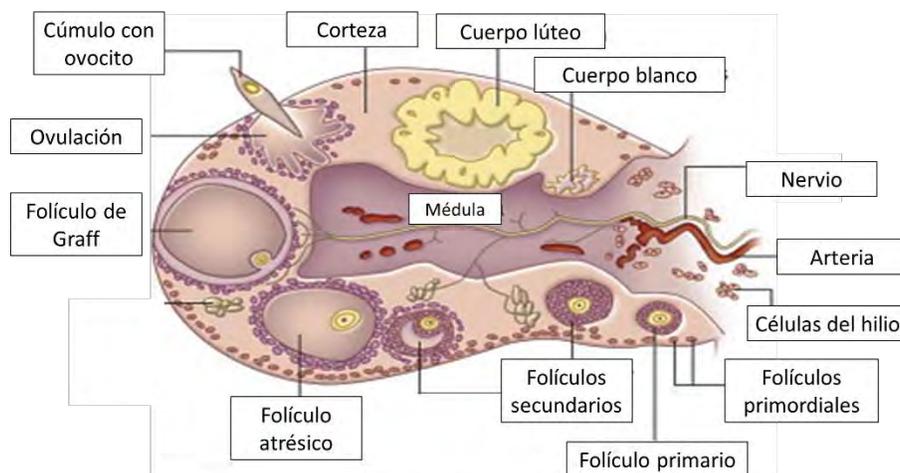


Figura 1. Diagrama de la anatomía del ovario humano en la edad reproductiva. La corteza contiene los folículos en sus distintos estados de desarrollo. El hilio, los nervios y las arterias se localizan en la médula. Tomada y modificada de Goldman L., Schafer A.I. Goldman's Cecil Medicine. 24th edición, 2012. Elsevier, Inc.

1.2 Crecimiento folicular

Los ovocitos se generan a partir de las células germinales primordiales, que comienzan su migración a las crestas gonadales desde la 4ta semana fetal. Una vez ahí se convierten en ovogonias. Estas células proliferan por mitosis y una vez que inician la meiosis, son recubiertas por una única capa de células de la granulosa (Motta et al., 1997). El conjunto formado por un ovocito primario y células granulosas planas que le rodean se conoce como folículo primordial.

Un grupo de folículos primordiales se transforman a folículos primarios por el crecimiento y transformación de las células granulosas planas a células cúbicas. El ovocito primario avanza en el proceso de meiosis hasta alcanzar la profase I, en esta fase ocurre un arresto meiótico y se mantiene en estado de hibernación. Tanto las células de la granulosa del folículo como el ovocito, dan origen a la zona pelúcida.

Las células de la granulosa proliferan y se diferencian: las más próximas al ovocito funcionan como alimentadoras, mientras que las más distantes contienen enzimas implicadas en la síntesis de esteroides. Al proliferar las células de la granulosa, el folículo primario se transforma a folículo secundario y comienza el proceso de diferenciación de las células de la teca interna a partir de células del estroma del ovario (Velázquez, 2009).

El folículo secundario migra hacia la médula y se comienzan a diferenciar las células de la teca externa. Las células de la teca interna adquieren la capacidad para sintetizar esteroides, a partir de su estimulación con LH. Las células de la granulosa adquieren receptores para la FSH, andrógenos y estradiol y comienzan a formarse pequeños espacios llenos de líquido folicular, que darán origen al antro folicular del ovocito (Erickson et al., 1985; Tajima et al., 2007).

El conjunto de folículos que alcanzan este estado de maduración son estimulados por la FSH, que induce la activación de la aromatasa en las células de la granulosa para la síntesis de estradiol. Las células de la teca interna son estimuladas por la LH y secretan androstenediona y testosterona que sirven como precursores de estradiol (Ryan y Petro, 1966). El incremento de esta hormona permite que los folículos tengan una mayor sensibilidad y captación para la FSH (Bjersing, 1967).

Uno de folículos se vuelve más eficiente en la captación de hormonas: sus células de la teca captan mayor cantidad de LH y sus células de la granulosa captan FSH, aumentando la síntesis de estrógenos (Fritz y Speroff, 1982).

Los estrógenos producidos por el folículo en crecimiento suprimen la liberación de FSH. En consecuencia, el resto de folículos en crecimiento carecen de una adecuada estimulación de FSH requerida para su supervivencia (McGee y Hsueh, 2000).

Los folículos quedan desprovistos de la suficiente cantidad de FSH para sintetizar estradiol y comienzan un proceso de atresia inducido por la alta concentración de hormonas androgénicas (Velázquez; 2009).

El folículo con mayor desarrollo acelera su crecimiento de células de la granulosa y de líquido folicular por la estimulación del estradiol y la FSH. El incremento de las concentraciones de estradiol estimula la secreción aguda de LH (pico de LH), lo que provoca la expulsión del ovocito (ovulación) (Gebauer et al., 1978).

Después de la ovulación, las células de la granulosa del folículo se luteinizan y producen la mayor parte de progesterona, utilizando el colesterol como precursor. Las células de la teca se convierten en las principales productoras de estradiol, adquiriendo la capacidad de aromatizar los andrógenos (Velázquez, 2009). A este conjunto de células de la granulosa luteinizadas y células de la teca aromatizantes, se le denomina cuerpo lúteo.

El cuerpo lúteo puede mantenerse activo 14 días después de la ovulación; pasando el periodo ocurre la luteólisis. En caso de haber fecundación, el trofoblasto produce la hormona gonadotropina coriónica (hCG), que mantiene la funcionalidad del cuerpo lúteo (Frederick et al., 1984).

1.3 Reserva folicular

La reserva ovárica folicular es el conjunto de folículos primordiales que existen en el ovario. Esta dotación de células puede estar en mayor o menor cantidad (Franks et al., 2006).

Durante la vida fetal, cada mujer contiene un determinado número de ovocitos. A partir del 4° mes de la vida fetal, cada ovario contiene cerca de 6-7 millones de ovocitos, que son rodeados por una capa de células planas (células de la Granulosa) para formar los folículos primordiales (Broekmans et al., 2009).

En la segunda mitad de la vida fetal, la mayoría de los folículos primordiales formados se pierden por procesos de apoptosis; la recién nacida solo cuenta con 1-2 millones de ovocitos. Al llegar a la pubertad se contará solamente con 300-500 mil folículos primordiales remanentes (Markström et al., 2002; Pelers, 1976).

Durante la edad reproductiva, la reserva folicular disminuye en cada ciclo menstrual (figura 2), así como el número de folículos reclutados (Faddy y Gosden, 1995). La pérdida de ovocitos se incrementa al doble a los 37 años de edad, cuando la dotación folicular es de unos 25 000 (Seifer y Naftolin, 1998).

A los 45 años de edad, la dotación folicular degenera hasta los 1,000 folículos, dando origen a la menopausia y finalmente a la infertilidad (Broekmans et al., 2009; Nikolaou y Templeton, 2004).

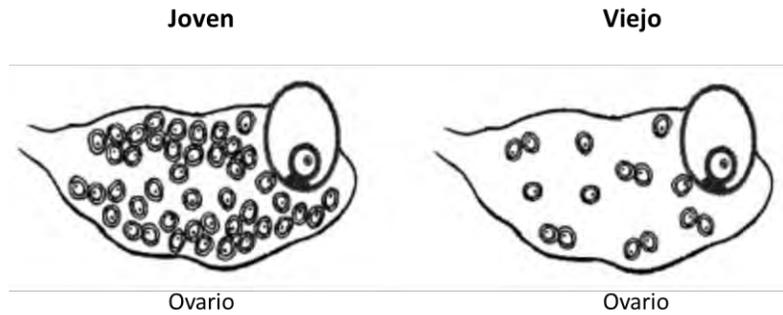


Figura 2. Representación esquemática de la pérdida de reserva folicular del ovario con el aumento de la edad. Tomada y modificada de Broekmans et al., 2009.

1.4 Fisiología del envejecimiento ovárico

La base del envejecimiento ovárico es la disminución de la reserva folicular (Nikolaou y Templeton, 2004), sin embargo, actualmente se sabe que este proceso involucra la pérdida de folículos y la disminución de la calidad de los ovocitos (figura 3) presentes en los folículos de la corteza del ovario (Broekmans et al., 2009; Nikolaou y Templeton, 2004).

Se piensa que la pérdida de la calidad de los ovocitos se debe a un incremento de la no disyunción durante la meiosis (Pellestor et al., 2005) así como a los cambios en la calidad de las células de la granulosa relacionados con la edad (te Velde y Pearson, 2002).

La disminución del número de folículos y la calidad de los ovocitos conlleva a una etapa de infertilidad, que se conoce como la pérdida de la capacidad de generar un ovocito viable para generar un organismo sano (Broekmans et al., 2009).

La edad en la que se presenta la menopausia depende de factores genéticos y ambientales, incluido el ambiente proporcionado durante la vida fetal (Nikolaou y Templeton, 2004), sin embargo, se sugiere que los factores más importantes que intervienen en la aparición de la menopausia en diversas edades, se deben al estilo de vida y la disminución en las actividades reproductivas (van Noord et al., 1997).

Se ha demostrado que los folículos restantes tienen una menor calidad, debido a que hay un menor número de células de la granulosa por folículo, las cuales presentan una funcionalidad suprimida, disminuyendo la producción de glucoproteínas y esteroides y aumentando los procesos de apoptosis (Seifer y Naftolin., 1998).

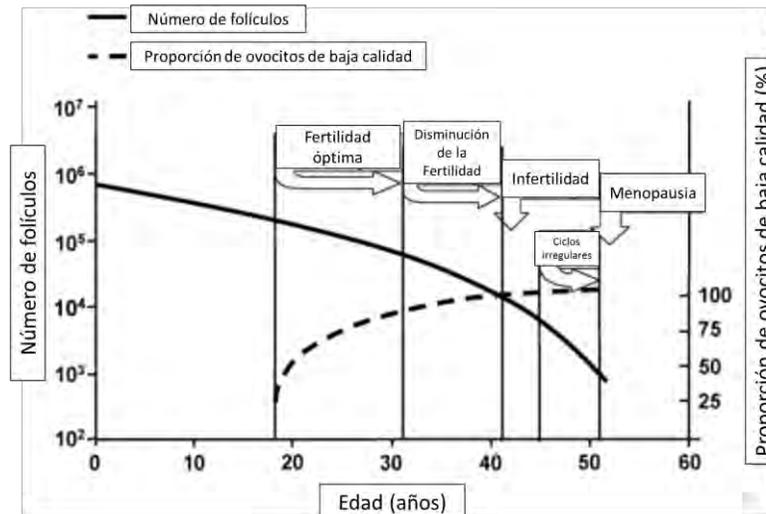


Figura 3. Representación esquemática de la disminución del número de folículos y su calidad con relación al aumento de la edad femenina, así como los eventos reproductivos correspondientes. Tomada y modificada de Broekmans et al., 2009.

El envejecimiento de los distintos compartimentos celulares que componen el folículo genera cambios hormonales y pérdida de su funcionalidad, que conlleva a una etapa de infertilidad y posteriormente a la esterilidad.

Debido a la pérdida de folículos, aumenta la secreción de FSH como mecanismo de compensación; se incrementa el número de folículos dominantes y la implantación de óvulos fecundados, generando un aumento en el número de abortos espontáneos o gestaciones de embriones con malformaciones (Kirsten et al., 2007).

Se ha demostrado que los ovocitos preovulatorios de mujeres con reserva folicular disminuida tienen un menor número de células de la granulosa y un mayor número de células en proceso de apoptosis (Seifer et al., 1996).

1.5 Foliculogénesis en conejo

En el conejo, las células germinales primordiales comienzan a migrar a la gónada embrionaria a partir de 10 *dpc* (días *post-coitum*), y se encuentran completamente en la cresta gonadal a los 26 *dpc* (figura 4).

El periodo de ovogénesis se inicia a partir del nacimiento (Hutt et al., 2006), donde las células germinales comienzan el proceso de meiosis y se diferencian en ovocitos durante los primeros 10 *dpp* (días *post-partum*) y comienzan a agruparse (Hutt et al., 2006; Daniel-Carlier et al., 2013).

A los 14 *dpp* los ovocitos comienzan a rodearse de células planas (de la granulosa) y forman los folículos primordiales. Los folículos primarios comienzan a formarse entre los 18-28 *dpp* y finalmente se diferencian a folículos secundarios a los 2 meses de edad (Daniel-Carlier et al., 2013). La pubertad en estos mamíferos se observa a los 5-6 meses de edad; en este periodo se inicia la etapa reproductiva (Sun y Gondos, 1986).

A diferencia del ciclo menstrual en humanos, el ciclo de maduración folicular en el conejo es de 10-12 días. Los folículos maduros pueden permanecer en espera de ser ovulados durante 7 días. En este caso, la ovulación se induce mediante el coito y los folículos no ovulados degeneran por atresia (Arias-Álvarez et al., 2007).

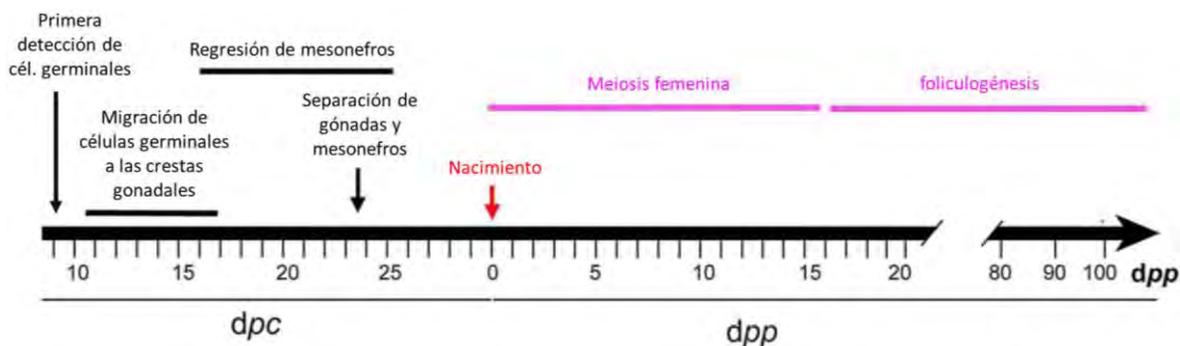


Figura 4. Representación esquemática de los principales eventos en la diferenciación gonadal en el conejo. Tomada y modificada de Daniel-Carlier et al., 2013.

1.6 CYP11a1 y aromatasa en la síntesis de hormonas esteroides

Es muy aceptado que la diferenciación folicular temprana está regida por reguladores ováricos autócrinos-parácrinos (Fortune, 2003; Sirotkin, 2011; Knight y Glister, 2006), que conllevan a una relación estrecha entre el ovocito, células de la granulosa y células del estroma ovárico (Orisaka et al., 2009; Thomas y Vanderhyden., 2006).

Después de la activación de los folículos primordiales, los folículos primarios comienzan a reclutar células del estroma ovárico para diferenciarse a células de la Teca (Orisaka et al., 2006; Honda et al., 2007). Se sugiere que este reclutamiento se debe a la interacción de las células de la granulosa con células del estroma ovárico durante la diferenciación folicular (Orisaka et al., 2006).

Las células de la Teca sintetizan androstenediona y testosterona para la síntesis de estrógenos (Tajima et al., 2007), que promueven la expresión de algunos genes que codifican enzimas esteroidogénicas como CYP11a1(Qiu et al., 2013).

La enzima CYP11a1 cataliza la conversión de colesterol a pregnenolona, este sustrato es convertido a una hormona esteroide en específico, dependiendo de qué enzimas y cofactores se encuentren presentes (figura 5), por lo que se considera como el reactivo limitante en la formación de hormonas esteroides (Parsa y New, 2017).

La conversión de colesterol a pregnenolona requiere de tres pasos: hidroxilación en el C20, hidroxilación en el C22 y un corte en la unión C20-C22. Esta reacción da como productos pregnenolona y ácido isocapróico. La expresión de CYP11a1 está regulada por hormonas gonadotropinas y AMPc, que estimulan la síntesis de esta enzima en células de la granulosa del ovario (Chung et al., 1986; Morohashi et al., 1987).

El gen que codifica a la enzima CYP11a1 se localiza en el cromosoma 15 del humano, formado por 10 exones. En la especie *Oryctolagus cuniculus* este gen está formado por 9 exones.

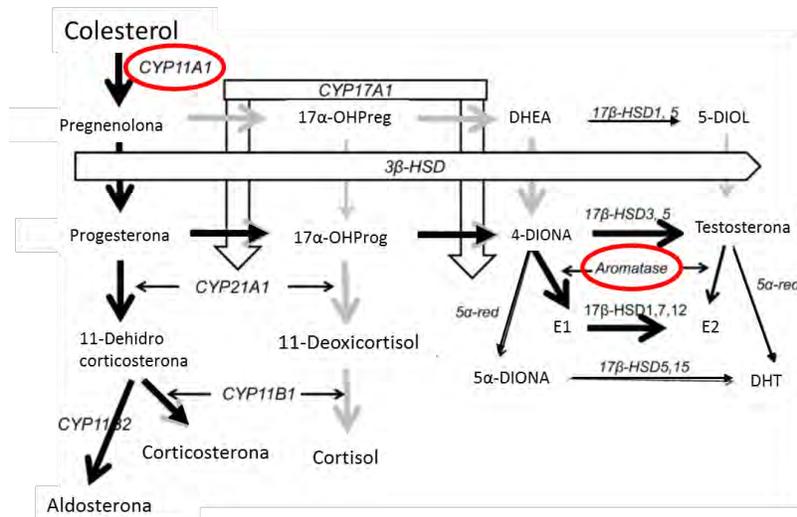


Figura 5. Representación esquemática de la síntesis de esteroides en humano. Las hormonas esteroides se sintetizan a partir del colesterol. En rojo se muestran las enzimas de importancia para este trabajo. Tomada y editada de Luu-The, 2013.

El estradiol es crítico para el crecimiento de células de la granulosa y la diferenciación de los folículos antrales, así como el mantenimiento de los mismos y promover su ovulación (Edson et al., 2009). Para que se mantengan unos niveles adecuados de estradiol se requiere de la actividad de la aromatasa. El gen que codifica la enzima aromatasa se localiza en el cromosoma 15 del humano y está formado por 12 exones; la aromatasa se encuentra en el retículo endoplásmico de las células de la granulosa.

La síntesis de andrógenos y FSH inducen la activación de la aromatasa en las células de la granulosa (Tajima et al., 2007; McNatty et al., 1979). Esta estimulación es crítica para la selección de un folículo dominante que entrará en proceso de maduración (Tajima et al., 2007) y posteriormente su ovulación.

La síntesis de estrógenos es catalizada por la enzima aromatasa (figura 6), codificada en el gen CYP19a1 (Bouraiïma et al., 2001). En muchos mamíferos, la aromatasa se expresa únicamente en gónadas y cerebro (Bulun et al., 2003).

Los estrógenos son sintetizados en las células de la granulosa bajo la regulación de FSH, a partir de los andrógenos provenientes de las células de la Teca (Tajima et al., 2007; Erickson y Shimasaki, 2001).

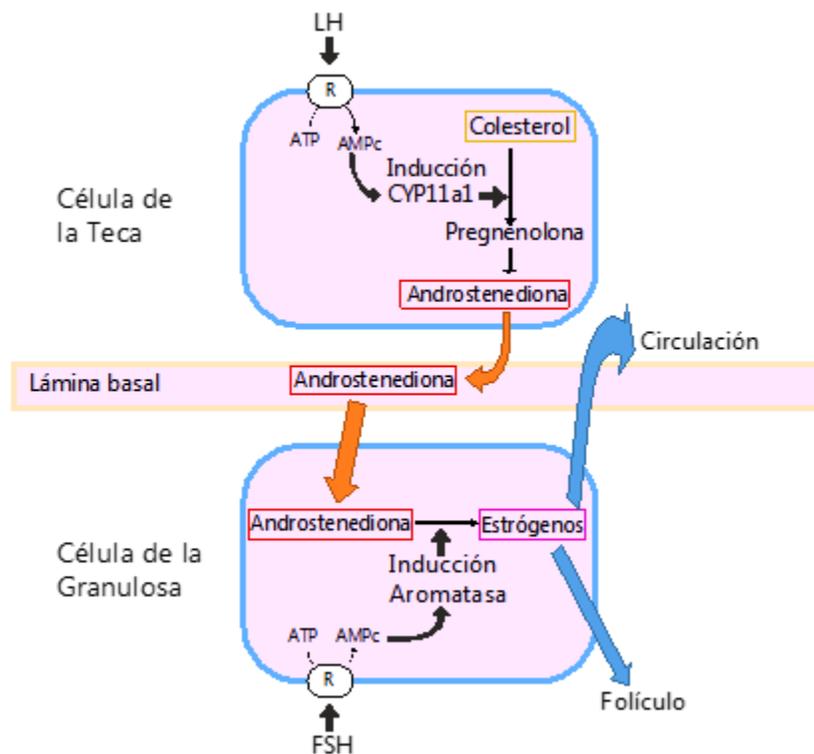


Figura 6. Representación esquemática de la síntesis de estradiol. En esta imagen se muestra la actividad de CYP11a1 y aromatasa durante la síntesis de estradiol, así como la interacción entre las células de la Teca y las células de la Granulosa. R: Receptor; ATP: adenosin trifosfato; AMPc: adenosin monofosfato cíclico. Editada de Erickson et al, 2001.

1.7 Hormona anti Mülleriana (AMH)

En el humano, el gen de la hormona anti mülleriana (AMH por sus siglas en inglés: anti-mullerian hormone) se ubica en el cromosoma 19 y está formado por 5 exones.

La AMH juega un papel importante en la diferenciación sexual masculina. Es producida por las células de Sertoli de los testículos, e induce la regresión del conducto Mülleriano, que da origen a las trompas de Falopio, útero y vagina (Josso et al., 1993).

En el caso del sexo femenino, AMH se produce en las células de la granulosa de folículos pequeños en crecimiento (Broekmans et al., 2009; Hayes et al., 2016).

La AMH se expresa en los folículos primordiales reclutados, y que aún no han sido seleccionados para ser dominantes (figura 7), por lo que juega un papel importante en la regulación del número de folículos en crecimiento y en la selección de estos para ser ovulados (Durlinger et al., 1999).

En los folículos reclutados, la AMH reduce la proliferación de las células de la granulosa; de acuerdo a un estudio de cultivos con estas células, en el que se muestra una disminución en la secreción de aromatasa y la disminución de receptores de LH (di Clemente et al., 1994).

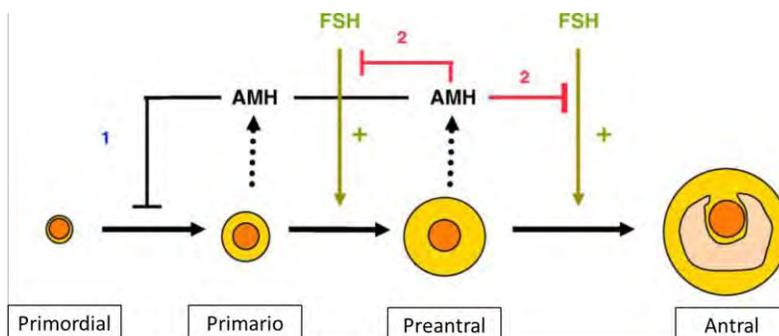


Figura 7. Esquema de la acción de AMH en los folículos. Esta hormona es producida por folículos pequeños en crecimiento (primarios y preantrales). AMH inhibe el reclutamiento de folículos (1) e inhibe la estimulación de FSH en los folículos preantrales en crecimiento (2). Tomada y modificada de Visser y Themmen, 2005.

2. ANTECEDENTES

Yeh et al. (2007) realizaron una investigación utilizando ratones (hembra) jóvenes (26 dpp), adultas (65-75 dpp) y viejas (8-9 meses de edad) con el cual se pretendía demostrar que la disminución de la concentración de la AMH en sangre era dependiente de la disminución en el número de folículos que secretan dicha hormona. En este estudio se midió la concentración de AMH en sangre y la concentración de AMH en ovarios de los ratones (hembra) antes descritas mediante la técnica de Western Blot y ELISA. En ambos casos, se encontró que la cantidad de AMH detectada tanto en sangre como en los ovarios, disminuía conforme aumentaba la edad cronológica de los ratones. Por otro lado, mediante un análisis de inmunofluorescencia, se mostró que, en los tres grupos de edades, los folículos primarios y folículos antrales en crecimiento tuvieron la mayor expresión con el marcaje de AMH. Asimismo, se encontró que el número de folículos antrales en crecimiento AMH positivos disminuían conforme aumentaba la edad cronológica.

En dicho trabajo se mostró una clara asociación entre la concentración de AMH y el número de folículos antrales durante el proceso de envejecimiento, donde la disminución de AMH está altamente relacionada con la disminución del número de folículos primordiales y folículos antrales en crecimiento durante el envejecimiento en ratones de más de 18 meses de edad.

En otro estudio realizado por de Vet et al., (2002) se analizó si la AMH podría ser utilizada como marcador de envejecimiento ovárico. En esta investigación participaron 41 mujeres normo-ovulatorias de 20 a 35 años de edad, así como 13 mujeres sanas con más de 2 años de haber tenido menopausia (56 años \pm 2 años de edad), las cuales se estudiaron en dos visitas: V1 y V2. La segunda visita se realizó después de 3 años.

A las mujeres participantes se les realizó conteo de folículos antrales mediante ultrasonografía vaginal y se midió la concentración de AMH, FSH, inhibina B y estradiol en sangre.

En sus resultados encontraron que la concentración de FSH, inhibina B y estradiol no presentaban un cambio significativo conforme avanzaba el tiempo y aumentaba la edad, en cambio, las concentraciones de AMH mostraron una disminución significativa conforme aumentaba la edad (comparación entre V1 y V2) mientras que en las mujeres postmenopáusicas no fue posible detectar la AMH en sangre.

El estudio de ultrasonografía mostró que la disminución del conteo folicular corresponde a la disminución de folículos primordiales. Como conclusión establecieron que las concentraciones de la AMH en sangre disminuyen conforme avanza la edad. Asimismo, los niveles de expresión de la AMH tienen una fuerte relación con el número de folículos antrales, indicando que la AMH puede ser un marcador de envejecimiento ovárico.

Por su parte, van Rooij et al. (2005) analizaron qué marcador ovárico refleja mejor los cambios ocurridos durante el envejecimiento ovárico. En este estudio participaron mujeres de 25 a 46 años de edad; se colectaron 2 muestras de sangre, una al inicio del estudio (T1) y otra pasando 4 años (T2) para medir los cambios en las concentraciones de estradiol, FSH, inhibina B y AMH, además se realizó el conteo de folículos antrales en los ovarios de las mujeres a los dos tiempos.

En los resultados encontraron que el promedio de concentración de la AMH en todas las mujeres tenía concentraciones muy bajas en T2 comparado con T1, FSH mostró un aumento su concentración medida, mientras que las concentraciones de inhibina B disminuyeron; el estradiol mantuvo concentraciones sin cambios significativos. La evaluación de la reserva ovárica basal reflejó una disminución natural en la fertilidad de las mujeres, sin embargo, se observó que el conteo de folículos antrales permanecía sin cambios significativos; por otra parte, en un estudio realizado anteriormente por los mismos autores, el conteo de folículos antrales fue considerado el mejor marcador de envejecimiento reproductivo.

Se analizó la correlación de la AMH, FSH, inhibina B, estradiol y el número de folículos antrales con el aumento de la edad de las mujeres y se observó que las concentraciones de AMH y el número de folículos tenían una mayor relación el envejecimiento, a diferencia de FSH, inhibina B y estradiol, que sólo mostraron cambios significativos al comienzo de la menopausia. Finalmente concluyeron que la AMH y el conteo de folículos antrales disminuyen gradualmente conforme avanza la edad de la mujer, considerándolos como los mejores marcadores que reflejan el envejecimiento del ovario.

Por lo anterior, se propone estudiar la expresión de CYP11a1, Aromatasa y AMH durante el envejecimiento ovárico, con el fin de establecer un patrón en las expresiones de estos componentes y observar la influencia que tienen durante el envejecimiento del ovario.

3. JUSTIFICACIÓN

Se propone el conejo como modelo de estudio, ya que el su ovario muestra una estructura histológica similar a la humana: cuenta con una corteza y una médula bien definidos, esto permite relacionar la función fisiológica del ovario del conejo con la del ovario del humano. Por otro lado, la formación de los folículos primordiales y la diferenciación folicular ocurren después del nacimiento, por esta razón, se pueden hacer estudios de los distintos procesos involucrados durante el desarrollo y diferenciación folicular, así como de las características morfológicas en cada una de las etapas del proceso de foliculogénesis (Hutt et al., 2006).

Se propone al conejo europeo (*Oryctolagus cuniculus*) como un modelo biológico que nos permita estudiar los cambios morfológicos y moleculares que ocurren durante el envejecimiento del ovario.

4. HIPÓTESIS

El patrón de expresión de la hormona anti mülleriana, CYP11a1 y aromatasa varían a lo largo del tiempo durante el envejecimiento del ovario.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Determinar la expresión de la hormona anti mülleriana, CYP11a1 y aromatasa y su relación con la histología del ovario durante el envejecimiento.

5.2 Objetivos particulares

- Detectar mediante RT-PCR la expresión de hormona anti mülleriana, CYP11a1 y aromatasa en ovarios de coneja chinchilla de distintas edades.
- Comparar las expresiones de hormona anti mülleriana, CYP11a1 y aromatasa entre los ovarios de distintas edades.
- Analizar mediante histología convencional los ovarios de conejas chinchilla a distintas edades.
- Comparar los cambios histológicos entre los ovarios a distintas edades.
- Comparar la histología con la expresión de hormona anti mülleriana, CYP11a1 y aromatasa.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Obtención de la muestra

Para la realización del experimento se utilizaron ejemplares de coneja chinchilla con distintas edades, de acuerdo a la información presentada en la tabla 1. Las conejas fueron proporcionadas por el Bioterio del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM. El proyecto cuenta con la autorización del comité de Ética en Investigación de la Facultad de Medicina-UNAM (CONBIOÉTICA 09CEI06620140212).

Edad de coneja	# de ejemplares
2 meses	2
3 meses	3
4 meses	2
1-2 años	2
Más de 2 años	3

Tabla 1. Relación de ejemplares utilizados en la metodología.

Las conejas se sacrificaron con una sobredosis de pentobarbital sódico (Doléthal[®], 20 g/100 mL) aplicada vía intraperitoneal, de acuerdo a los lineamientos del Comité de Ética de la Facultad de Medicina, UNAM.

Ambos ovarios fueron extraídos y colocados en una solución PBS 0.15 M frío, se eliminó el exceso de grasa y se cortaron en tres porciones para su uso posterior. Un ovario se utilizó para su caracterización histológica, almacenándolo en paraformaldehído; el segundo se utilizó para la extracción de RNA total, se colocó en solución RNAlater[®] Solution (AM7020, Ambion[®], USA) y se almacenaron a -20°C.

6.2 Extracción de RNA total

Se tomó una porción de cada una de las muestras con pinzas para disección, las cuales estaban libres de RNAsas con el uso de toallitas RNase Zap® Ambion®. Se colocaron en un tubo Eppendorf de 1.5 mL y se adicionaron 100 µL de TRIzol® Solution (Ambion, USA).

Con ayuda de un pistilo de plástico estéril y libre de RNAsas se maceraron completamente los tejidos. Una vez homogenizada la muestra se agregó TRIzol hasta completar 1 mL y se mezcló ligeramente con vórtex y se centrifugaron las muestras a 13,000 rpm durante 15 min a 4 °C.

Se tomó el sobrenadante de cada una de las muestras y se colocaron en tubos limpios de 1.5 mL, se agregaron 200 µL de cloroformo frío y se agitaron vigorosamente durante 1 min.

Se dejaron incubar durante 3 min a TA y se centrifugaron a 13 000 rpm durante 15 min a 4 °C. Se tomaron 500 µL de la fase incolora, la cual contiene el RNA total y se colocaron en otro tubo de 1.5 mL. Se adicionaron 500 µL de isopropanol y se mezcló por inversión. Las muestras se incubaron durante 10 min a TA y se centrifugó a 13 000 rpm durante 10 minutos a 4 °C.

Las pastillas de RNA formadas se lavaron con 1 mL de etanol 80% frío y se centrifugaron a 13 000 rpm durante 3 min a 4 °C. Las muestras se dejaron secar a TA, se diluyeron con 25 µL de agua inyectable y se almacenaron a -20°C.

6.3 Verificación de la Integridad del RNA total

Para verificar la integridad del RNA total, se realizó una electroforesis horizontal con gel de agarosa al 1% teñido con GelRed® 10 000x (41003, Biotium, USA) y se utilizó TAE 1x como buffer. El gel se corrió a 90 volts durante 40 min y se fotodocumentó con el equipo Alliance® MINI HD6 UVITEC Cambridge.

6.4 Tratamiento con DNAsa

Se utilizó el kit TURBO DNA-free™ (AM1907, Ambion®, USA). Se agregó 1 µL de buffer con DNAsa por 1 µL de RNA al tubo con la muestra para eliminar los contaminantes presentes en la muestra; se mezcló con micro pipeta hasta homogeneizar y se incubó a 37 °C durante 30 min.

Se adicionó 1 µL de reactivo de inactivación de DNase por cada µL de buffer con DNase, se mezcló hasta homogeneizar y se incubó a TA durante 5 min, mezclando ocasionalmente para evitar la precipitación del reactivo. Se centrifugó a 10 000 rpm durante 1 min y se extrajo el sobrenadante con RNA evitando tomar el precipitado y se trasvasó a otro tubo de 1.5 mL.

6.5 Cuantificación de RNA total

Para la cuantificación del RNA total se utilizó un equipo NanoDrop 2000 Spectrophotometer Thermo Scientific. La pureza del RNA con respecto a proteínas y azúcares se obtuvo con una relación 260/280 y 260/230 respectivamente, con valor de 1.85 +/- 0.15.

6.6 Síntesis de cDNA

Para sintetizar el cDNA se requirieron 2 µg de RNA total, los cuales se colocaron en un tubo de 0.2 mL rotulados con el número de muestra correspondiente. Se agregó 1 µL de Oligo dT 0.5 µg/ µL (18418012, Invitrogen™, USA) y 1 µL de Random P 3µg/ µL (4819001, Invitrogen™, USA), el volumen de RNA (calculado para tener 2 µg de RNA), se completó a 13 µL de volumen final con agua inyectable.

Las reacciones se colocaron en el equipo PTC-100™ Programmable Thermal Controller MJ Research, Inc. Termociclador a 65 °C durante 10 min. Para una reacción, se agregaron 4 µL de buffer para síntesis de cDNA, 2 µL de dNTPs 10mM (18427088, Invitrogen™, USA), 0.5 µL de RNaseout (10777019, Invitrogen™, USA) y 0.5 µL de enzima transcriptasa reversa (28025013, Invitrogen™, USA).

La mezcla se colocó en el termociclador PTC-100™ con el programa cDNA: 10 min a 25°C, 40 min a 55°C y 5 min a 85°C. Los tubos de reacción se rotularon con su muestra correspondiente y se almacenaron a -20 °C.

6.7 Diseño de oligonucleótidos

Se diseñaron los pares de oligonucleótidos iniciadores para amplificar las regiones que codifican para los genes CYP11a1, aromatasa y AMH. Además, se utilizaron los oligos para amplificar el gen de expresión constitutiva: hprt, de la especie *Oryctolagus cuniculus*.

Las secuencias para amplificar CYP11a1 y aromatasa fueron obtenidas de la base de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI), mientras que las secuencias para AMH, fueron obtenidas a través de la selección de regiones conservadas de los genes de AMH de: Humano, Cerdo, Vaca y Perro.

Los oligonucleótidos fueron elaborados por la Unidad de Síntesis y Secuenciación del Instituto de Biotecnología de la UNAM.

6.8 Estandarización de las condiciones de RT-PCR

Se determinaron las condiciones de RT-PCR de los genes de expresión de CYP11a1, CYP19 y AMH. Para ello, se realizó un gradiente de temperatura de alineamiento de 52 a 60 °C, en el equipo Mastercycler gradient Eppendorf.

Una vez obtenida la temperatura óptima de alineamiento, se realizó una curva de ciclos: de 24 a 34; con el termociclador PTC-100™. Asimismo, se determinó el número de ciclo correspondiente a la mitad de la fase exponencial de la RT-PCR.

6.9 RT-PCR punto final

Para una reacción de RT-PCR se utilizaron 3 μL de buffer para PCR 10x (10966018, Invitrogen™, USA), 1 μL de dNTPs 10 mM (10966018, Invitrogen™, USA), 1 μL de MgCl_2 50 mM (10966018, Invitrogen™, USA), 1 μL de primer sentido 10 mM y 1 μL de primer anti-sentido 10 mM, específicos para el gen a amplificar, 21.7 μL de agua inyectable, 0.3 μL de Platinum® *Taq* DNA polimerasa (10966018, Invitrogen™, USA) y 1 μL de cDNA.

Se utilizó una temperatura de desnaturalización a 95 °C, temperatura de alineamiento específica de acuerdo a la estandarización del método, temperatura de extensión a 72 °C, y el número de ciclos correspondiente a la estandarización, utilizando el termociclador PTC-100™.

6.10 Identificación de los genes amplificados

Se realizó una electroforesis horizontal con un gel de agarosa al 1% para identificar los genes amplificados. Se utilizó TAE 1x y GelRed®. El gel se corrió a 90 volts durante 40 min y se documentó fotográficamente con el equipo Alliance® MINI HD6 UVITEC Cambridge.

6.11 Análisis densitométrico

Las imágenes de los geles fueron tomadas con el equipo Alliance® MINI HD6 UVITEC Cambridge y los amplicones obtenidos se analizaron con el programa ImageJ 1.50i.

6.12 Secuenciación e identificación de genes

Los genes de AMH, CYP11a1 y aromatasa se amplificaron en la Unidad de Síntesis y Secuenciación del Instituto de Biotecnología de la UNAM para obtener la secuencia de los mismos. Una vez obtenidas las secuencias, se realizó un alineamiento con ayuda de BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) para verificar su identidad comparándolas con la base de datos de NCBI.

6.13 Caracterización histológica

Los tejidos se trataron con paraformaldehído para iniciar su proceso de parafinado. Posteriormente se procesaron para su inclusión en parafina (ver anexo 1) y se llevaron a cabo los cortes histológicos con un microtomo American Optical Corporation, con un ancho de 10 micras cada uno, los cuales se fijaron en un portaobjeto.

Una vez que los tejidos se fijaron en los portaobjetos, se procedió a su almacenamiento y posterior tratamiento para la tinción.

6.14 Tinción Tricrómica de Masson

Las muestras se colocaron en una plancha de calentamiento a 60 °C durante 10 min. pasado el tiempo, se procedió a remover la parafina y realizar la rehidratación de las mismas.

Se colocaron en Xilol durante 5 min, con agitación continua, pasando el tiempo se colocaron en etanol 100 % durante 2 min para remover el xilol remanente; se trasvasaron a etanol 100 % durante 2 min, a etanol 75% 2 min, etanol 50 %, etanol 25% y finalmente en agua durante 2 min.

Se colocaron en solución Bouin a 56 °C durante 1 hora. Se lavaron con agua corriente y se procedió a la tinción: Hematoxilina férrica de Weigert (Gibco, USA) durante 5 min para los ovarios jóvenes y 10 min para los ovarios viejos; Fucsina Escarlata de Biebrich (Gibco, USA) 2 min y 15 min respectivamente. Entre cada tinción se realizó lavado con agua corriente.

Para fijar los colorantes las muestras se colocaron en solución de ácido fosfotúngstico-fosfomolibdico (Gibco, USA) durante 10 min. y se lavaron con agua corriente. Se colocaron en azul de anilina al 1% (Gibco, USA) 2 min y 10 min respectivamente, se lavaron con agua corriente y se colocaron en ácido acético 1% (Gibco, USA) durante 1 min. lavando con agua corriente.

Para la deshidratación de los tejidos se colocaron en etanol 96% durante 2 min, se pasaron a etanol 100% durante 2 min y finalmente a Xilol 2 min. Se realizó el montaje de las muestras con resina y se tomaron fotografías con el microscopio Carl Zeiss Axioskop 50.

7. RESULTADOS

7.1 Extracción de RNA total

El RNA total extraído de los ovarios de las conejas se muestra en la figura 8 donde se aprecian las bandas representativas de las subunidades 28S y 18S del RNA ribosomal. La presencia de ambas bandas indica que el RNA extraído se mantiene íntegro.

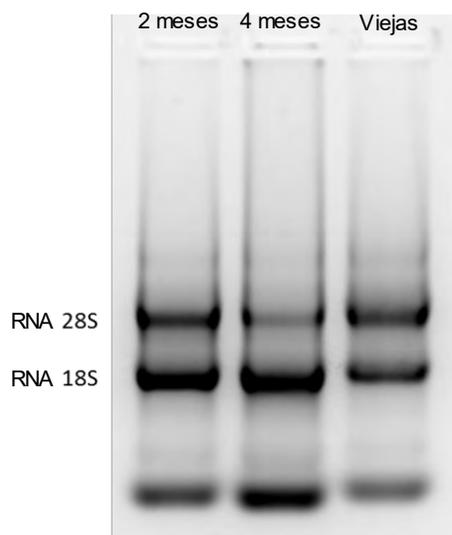


Figura 8. Verificación de la integridad de RNA total. Imagen representativa del RNA obtenido. Se muestra el gel de agarosa al 1% teñido con GelRed, donde se pueden apreciar las bandas de las subunidades 28S y 18S de RNA ribosomal.

Se procedió a realizar la cuantificación del RNA total para calcular el volumen requerido para sintetizar cDNA, ya que de acuerdo al protocolo establecido se requieren 2 μ g de RNA para dicha reacción.

7.2 Diseño de oligonucleótidos

Para el diseño de los oligonucleótidos de CYP11a1 y aromatasa se utilizó el programa Primer-Blast de la página de NCBI. En el caso de AMH, se utilizaron las secuencias del gen en humano, vaca, cerdo y perro, de la sección Nucleotide de la página de NCBI.

Las secuencias de AMH obtenidas se alinearon con el programa Kalign 2.0 Clustal Omega y se procedió a buscar las zonas conservadas en las cuatro especies para diseñar los oligos sentido y antisentido de este gen.

En la figura 9 se muestran las secuencias alineadas del gen que codifica AMH de las cuatro especies. En el primer renglón se muestra el inicio de la secuencia que codifica la AMH, en los renglones posteriores se muestran las zonas donde se seleccionó la secuencia del oligo en color verde y la zona del oligo anti sentido marcado con color azul.

Asimismo, se muestra la distancia a la que se encuentran los oligos en el gen, el cual tiene un tamaño de 1766 pb aproximadamente. En algunas especies se observa la eliminación de secuencias, que están representadas como guiones en la imagen.

Los oligos utilizados para la RT-PCR se muestran en la tabla 2, donde se puede apreciar el tamaño de los mismos. En el caso de los oligos para AMH, su tamaño es de 18 pb. Se diseñó de este modo para que la temperatura de alineamiento no sobrepasara los 60 °C.

En el diseño de los oligos se buscó que los amplicones obtenidos fueran de distintos tamaños, esto permite identificar que el amplicon de la hormona corresponda al gen de interés.

CLUSTAL multiple sequence alignment by Kalign (2.0)

Humano	ATGCGGGACCTGCTCTCACCAGCCTGGCCCTAGTGCTGTCTGCCCTGGGGGCTCTGCTG	60 pb
Perro	ATGGGGGCTCTGGCGCTCTGGCCGCTGGCCCTGGCGCTGTCGGGGATGGGGCCCTGCTG	
Cerdo	ATGCAGGGTCTTCTCTCTCTCAGCTGGTCTGGTGTGGCAGCAATGGGGCCCTGCTG	
Vaca	ATGCCCGGTCCATCTCTCTC---TCTGGCCCTGGTGTGTGCGCCATGGGGGCTCTGCTG	
Humano	CTGAGTACCGCCCGGCTGCAGGCACTGCTGTTTCGGCGACGACCACC	780 pb
Perro	CTGAGCACCCCCAGCTGCAGGAGCTGCTGTTTCGGGCCGATGCCCGCTGCTTCACGCGG	
Cerdo	CTGAGCACCGCCAGCTGCAGGCGCTGCTGTTTGGCGCCGACTCTCCTGCTGCTTCACACGG	
Vaca	CTGAGCACTGCCAGCTGCAGGCGCTGCTGTTTCGGTGCAGGACTCCCCTGCTGCTTCACACGA	
Humano	ATGACCCCGGCCCTGCTCCTGCTGCCGCGGTCCGAGCCC---GCGCCGCTGCCTGCGCAC	840 pb
Perro	ATGACGCCCCGCGCTGCTCGTGTGCTGCGGCTGCCCGGGCCC---ACGGCGGTGCCGCGCGC	
Cerdo	ATGACCCCGGCCCTGCTCCTGTTGCCCGCCAGGGGCG---GTGCCGATGCCCGCACAC	
Vaca	AAGAATGACCCCGGCCCTGTTACTCTTGTGCTGCCGCGGTCTTCGGCACCGATGCCGCGCAC	
Humano	CTGGCGCGCCACCCCTGCTGCGTGCCACCGCCTACGCGGGCAAGCTGCTCATCAGCCTG	1700 pb
Perro	CTGGCTCGCCCGCCCTGCTGCGTGCCACGGCCTACGGCGGCAAGCTGCTCATCAGCCTG	
Cerdo	CTGGCCCGCCCGCCCTGCTGCGTGCCACAGCCTACGCAGGCAAGCTCCTCATCAGCCTG	
Vaca	CTGGCGCGCCCGCCCTGCTGTGTGCCACAGCCTACACCGGCAAGCTCCTCATCAGCCTG	

Figura 9. Secuencias del gen de hormona anti mülleriana (AMH) de cuatro especies similares a *O. cuniculus*. Las secuencias del gen se alinearon con el programa Kalign 2.0 en formato Clustal. Cada renglón contiene 60 pb, el primer renglón muestra el inicio de la secuencia del gen (1-60 pb). En el segundo y tercer renglón se muestra la secuencia seleccionada para el diseño del oligo sentido en color verde, el cual comprende de 767-784 pb. En el último renglón se muestra el fragmento correspondiente a los pares de bases 1641-1700. En esta secuencia se muestra el oligo antisentido (color azul) que comprende de 1683-1700 pb.

Gen	Nombre oligo sentido	Secuencia oligo sentido dirección 5' - 3'	Nombre oligo antisentido	Secuencia oligo antisentido dirección 5' - 3'	Tamaño amplicon (pb)	Tm (°C)
Cyp11a1 conejo	CYP11a1rb Fw	GGG TCC ATT ATC GTC ATG TG	CYP11a1rb Rv	CAG TAG AAG CTC TGG GTG TA	631	60
Cyp19 Aromatasa conejo	CYP19rb Fw	GGC AGT GCC TGC AAC TAT TA	CYP19rb Rv	GGT TTG AGG AGG AGA GCT TG	482	60
Hormona anti mülleriana conejo	AMHrb Fw	GCT GCT TCA CAC GGA TGA	AMHrb Rv	CAG GCT GAT GAG CAG CTT (Daniel-Carlier et al., 2013)	900	56
HPRT	HPRT rb Fw	GAC TCA TTA TGG ACA GGA C (Saldaña, 2014)	HPRT rb Rv	CAA GGG CAT ATC CTA CAA C (Saldaña, 2014)	462	54

Tabla 2. Diseño de oligonucleótidos para RT-PCR. Se muestran las secuencias de los oligonucleótidos utilizados para la amplificación de los genes de interés.

7.3 Estandarización de las condiciones de RT-PCR

Para la determinación de las condiciones de RT-PCR, se utilizaron ovarios de conejas de 3 meses de edad. En la realización del gradiente de temperatura se utilizaron 34 ciclos. Una vez terminadas las reacciones se revisaron con gel de agarosa al 1% teñido con GelRed®.

En la figura 10 se muestran las bandas del fragmento amplificado del gen de aromatasa, con temperaturas de alineamiento de 52 a 60 °C. En el caso de este primer se puede utilizar cualquier temperatura de alineamiento, ya que se puede hibridar a la cadena de cDNA desde temperaturas bajas (52° C) hasta temperaturas altas (60°C), de acuerdo con la información proporcionada por la imagen.

Comparando el amplicon obtenido con la escalera de peso molecular, éste corresponde al gen de aromatasa, ya que se encuentra en la región cercana a 500 pb y, de acuerdo al diseño de los oligos, el tamaño del fragmento resultante es de 482 pb.

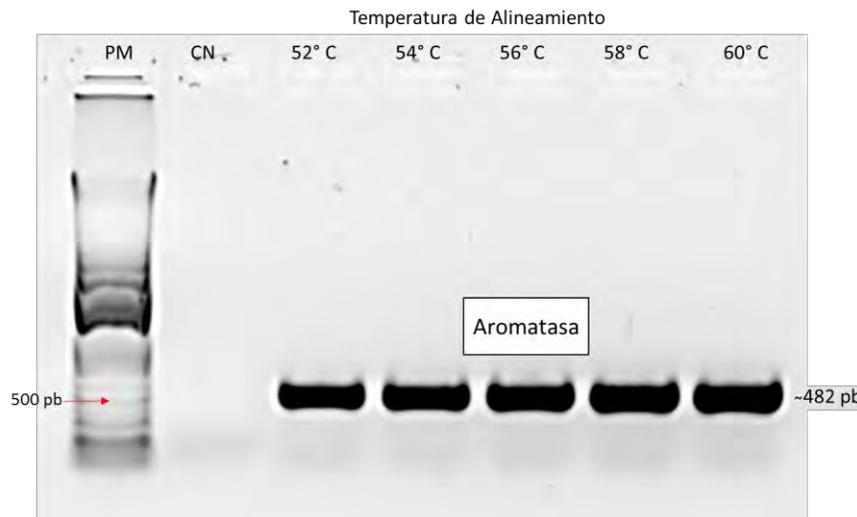


Figura 10. Electroforesis en gel del gradiente de temperatura del gen de expresión de aromatasa (CYP19). Se muestra el gel de agarosa al 1% teñido con GelRed, donde se pueden apreciar los amplicones obtenidos a distintas temperaturas de alineamiento. PM: escalera de peso molecular; CN: control negativo.

En la figura 11 se observa la amplificación del fragmento del gen CYP11a1, se muestra que los oligos se pueden hibridar con la hebra de cDNA en todas las temperaturas de alineamiento utilizadas.

Comparando el tamaño del amplicón obtenido con la escalera de peso molecular, el producto obtenido corresponde al gen de CYP11a1, dado que el tamaño del fragmento obtenido es de 631 pb, de acuerdo al diseño de los oligos.

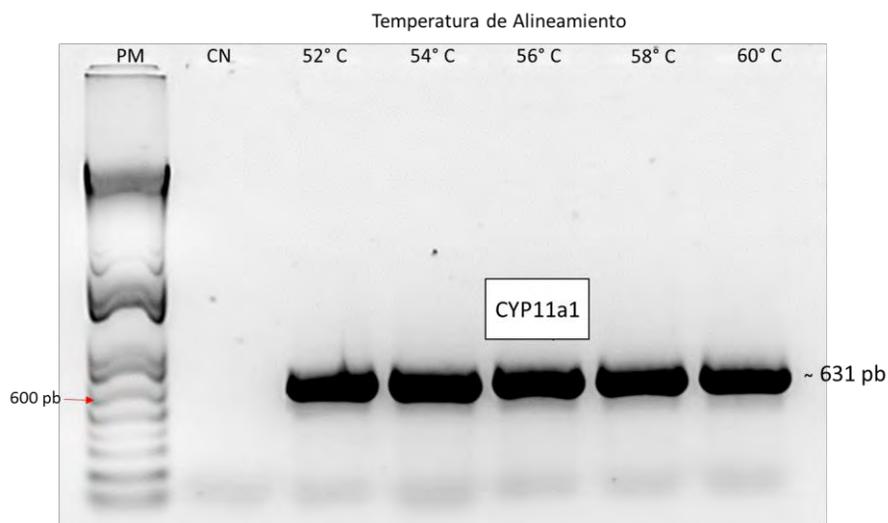


Figura 11. Electroforesis en gel del gradiente de temperatura del gen de expresión de CYP11a1. Se muestra el gel de agarosa al 1% teñido con GelRed, donde se pueden apreciar los amplicones obtenidos a distintas temperaturas de alineamiento. PM: escalera de peso molecular; CN: control negativo.

Para estandarizar las condiciones de RT-PCR de la hormona anti mülleriana, se utilizó cDNA de testículos de conejo de 16, 18, 26 y 30 dpc, ya que en los testículos hay una mayor expresión de AMH, se utilizaron como control de la expresión de hormona anti mülleriana.

En la figura 12 se muestran dos temperaturas de alineamiento de los oligos para el gen AMH, en la que se puede observar que hay amplificación de producto a temperaturas de 54° y 56 °C, por lo tanto se pueden utilizar ambas temperaturas de alineamiento para que los oligos se hibriden a la hebra de cDNA. Comparando el amplicón con la escalera de peso molecular, éste se encuentra en la región cercana a 1 000 pb, por lo cual corresponde al gen de interés, de acuerdo al diseño de los oligos.

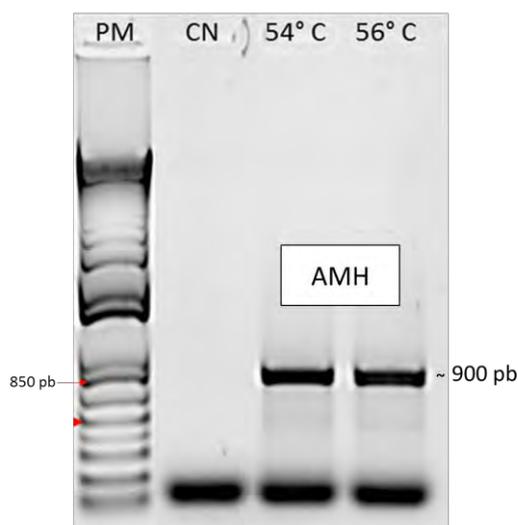


Figura 12. Electroforesis en gel de la temperatura de alineamiento de los oligos de AMH. Se muestra el gel de agarosa al 1% teñido con GelRed. Se observan dos temperaturas de alineamiento confirmatorias para la amplificación del fragmento del gen de interés. PM: escalera de peso molecular; CN: control negativo.

Se seleccionó 56° C como temperatura de alineamiento para los primer de AMH, CYP19 y CYP11a1, dado a que es la temperatura común de amplificación para los tres genes.

Una vez obtenida la temperatura de alineamiento óptima (56 °C) para los tres genes, se llevó a cabo una curva de ciclos. Las figuras 13, 14 y 15 corresponden a los genes de aromatasa, CYP11a1 y AMH respectivamente. En ellas se pueden observar los cambios en la concentración de amplicones obtenidos en los diferentes ciclos de RT-PCR, así como la curva sigmoide de cada gen, la cual representa la cantidad de copias obtenidas en cada ciclo de la RT-PCR.

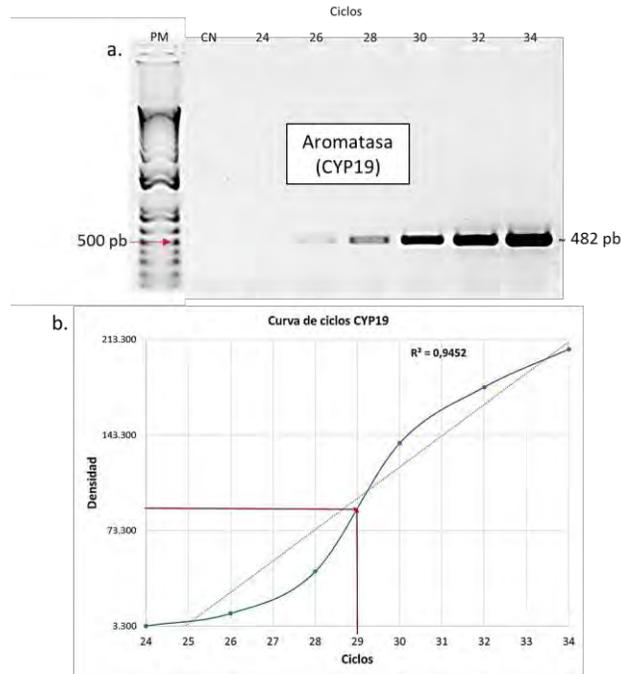


Figura 13. Curva de ciclos del gen de aromatasa. a) Gel de agarosa al 1% teñidos con GelRed, en el que se aprecian los amplicones obtenidos a diferentes ciclos. PM: escalera de peso molecular; CN: control negativo. b) Curva de ciclos del gen amplificado. La línea roja muestra la mitad de la fase exponencial, que corresponde al número de ciclo seleccionado para la reacción de RT-PCR. La línea punteada azul representa la regresión lineal con su valor de R^2 correspondiente.

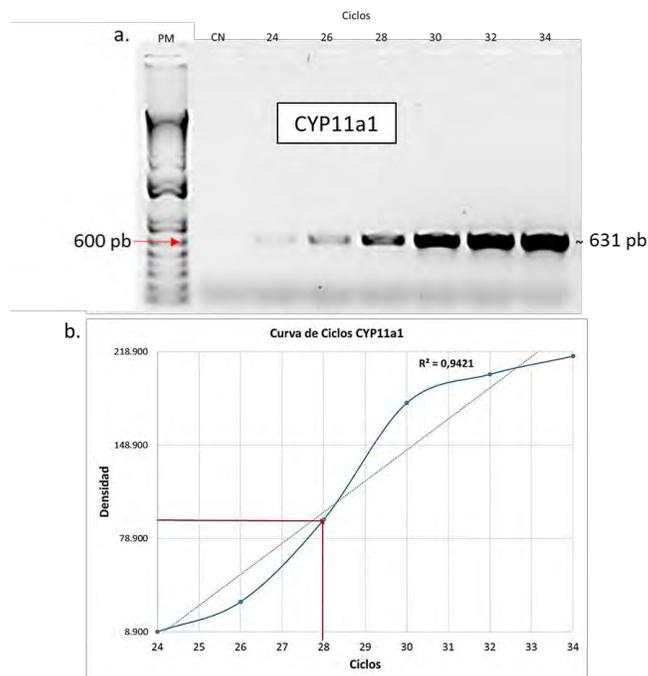


Figura 14. Curva de ciclos del gen de CYP11a1. a) Gel de agarosa al 1% teñidos con GelRed, en el que se aprecian los amplicones obtenidos a diferentes ciclos. PM: escalera de peso molecular; CN: control negativo. b) Curva de ciclos del gen amplificado. La línea roja muestra la mitad de la fase exponencial, que corresponde al número de ciclo seleccionado para la reacción de RT-PCR. La línea punteada azul representa la regresión lineal con su valor de R^2 correspondiente.

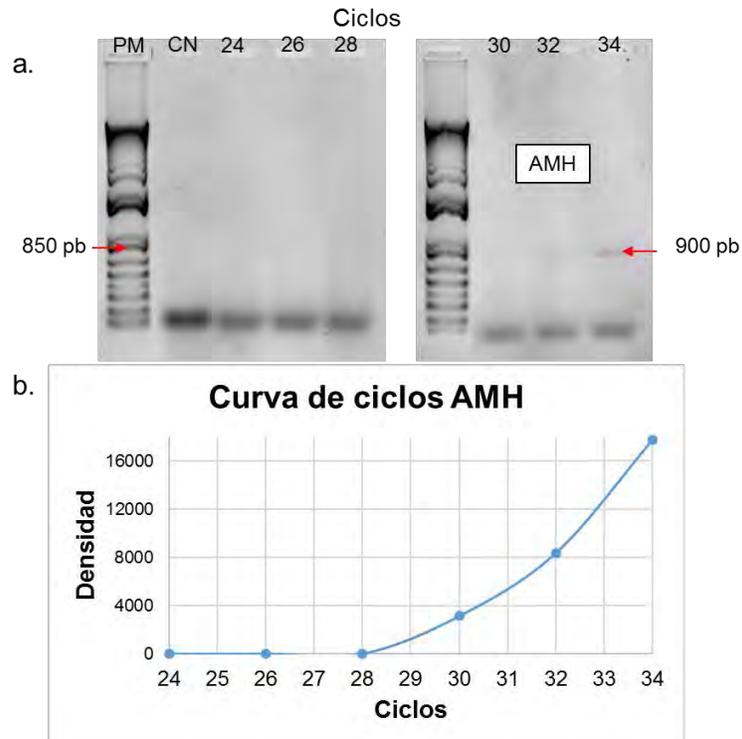


Figura 15. Curva de ciclos del gen de AMH amplificado. a) Gel de agarosa al 1% teñido con GelRed, que muestra los amplicones obtenidos a los distintos ciclos. PM: escalera de peso molecular; CN: control negativo. b) Curva de ciclos del gen amplificado. Al final de los ciclos de reacción comienza a mostrarse una fase exponencial.

De las curvas obtenidas se seleccionó la mitad de la fase exponencial de amplificación del fragmento de gen, con el fin de evitar que se sature el producto clonado y obtener resultados más confiables en el análisis semicuantitativo de la expresión de los genes.

Para el gen CYP19 se seleccionaron 29 ciclos de reacción de RT-PCR y para el gen CYP11a1 se seleccionaron 28 ciclos. En el caso del gen de AMH se seleccionaron 34 ciclos para llevar a cabo las reacciones de RT-PCR, ya que en este ciclo se observó la aparición del fragmento de gen amplificado, y se consideró adecuado para su análisis.

Las condiciones de temperatura y número de ciclos determinadas anteriormente se resumen en la tabla 3. Una vez determinadas estas se llevaron a cabo las reacciones para analizar la expresión de los genes en las muestras correspondientes.

Gen	Tm (°C)	No. De Ciclos	Tamaño del amplicon
CYP19	56	29	482 pb
CYP11	56	28	631 pb
AMH	56	34	900 pb
HPRT (Saldaña, 2014)	56	29	462 pb

Tabla 3. Resumen de la estandarización de las condiciones de RT-PCR.

7.4 Secuenciación e identificación de los genes

El producto de RT-PCR de CYP11a1 fue secuenciado en la Unidad de Síntesis y Secuenciación de DNA (USSDNA) del Instituto de Biotecnología de la UNAM, en donde se obtuvo el electroferograma, en el cual se muestran los nucleótidos que forman parte del gen amplificado (figura 16). Asimismo, se presenta el electroferograma de aromatasa donde se muestra la secuencia de cada una de los nucleótidos que conforman parte del gen amplificado (figura 17).

Las secuencias obtenidas se alinearon con BLAST, comparándolas con la base de datos de NCBI. En este alineamiento la base de datos de NCBI arrojó la secuencia más parecida a los genes que se examinaron.

Se puede observar que el gen de CYP11a1 obtenido experimentalmente (figura 18) es 100 % idéntico a la secuencia del CYP11a1 de la especie *Oryctolagus cuniculus* (*O. cuniculus*), así como la secuencia del gen de aromatasa (figura 19) obtenida en el laboratorio tiene una identidad del 100 % al gen de aromatasa de la especie *O. cuniculus*.

En la tabla 4 se resumen los genes estudiados y su identidad, colocando el número de identificación correspondiente de NCBI. El porcentaje de identidad de los amplicones de CYP11a1 y aromatasa son 100 % idénticos a los genes de *O. cuniculus* reportados en la base de datos de NCBI. Con relación al gen de AMH, la secuencia no se encuentra reportada en NCBI

Gen	% de identidad	ID de NCBI
AMH	-	-
CYP11a1	100 %	XM_008253734.2
CYP19a1 (aromatasa)	100 %	NM_001170921.2

Tabla 4. Identificación de las secuencias de cDNA

CYP11a1

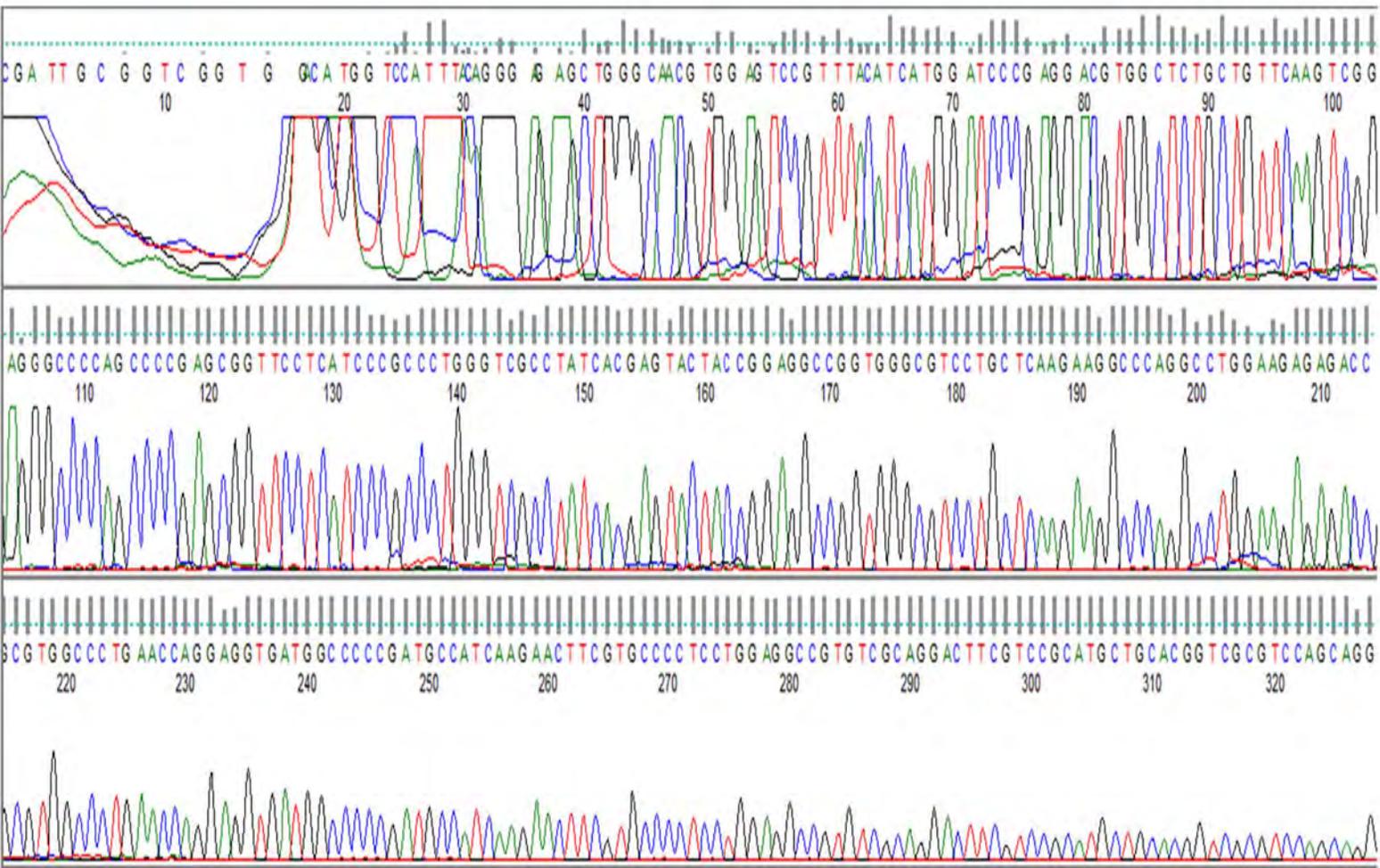


Figura 16. Electroferograma del gen de CYP11a1. Se muestran los picos correspondientes a los nucleótidos que componen el producto de RT-PCR y la secuencia que conforma el gen amplificado.

AROMATASA (CYP19)

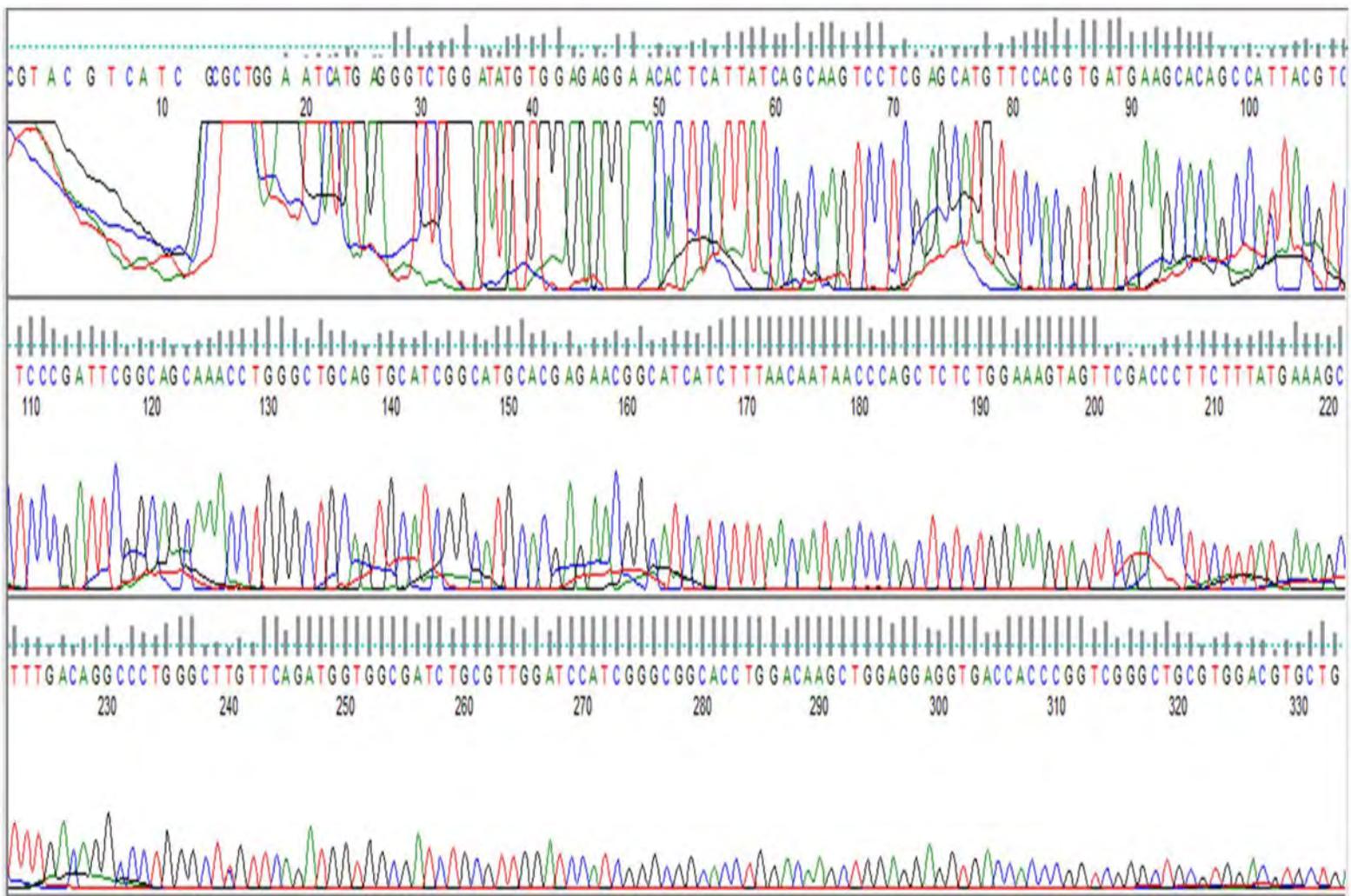


Figura 17. Electroferograma del gen de aromatasa. Se muestran los picos correspondientes a los nucleótidos que componen el producto de RT-PCR y la secuencia que conforma el gen amplificado.

PREDICTED: *Oryctolagus cuniculus* cytochrome P450, family 11, subfamily A, polypeptide 1 (CYP11A1), mRNA
 Sequence ID: [XM_008253734.2](#) Length: 1713 Number of Matches: 1

Range 1: 324 to 915 [GenBank](#) [Graphics](#) ▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1094 bits(592)	0.0	592/592(100%)	0/592(0%)	Plus/Plus
Query 21	GGTCCCATTACAGGGGAAGCTGGCAACGTGGAGTCCGTTACATCATGGATCCCAG	80		
Sbjct 324	GGTCCCATTACAGGGGAAGCTGGCAACGTGGAGTCCGTTACATCATGGATCCCAG	383		
Query 81	GACGTGGCTCTGCTGTTCAAGTCGGAGGGCCCCAGCCCCGAGCGTTCTCATCCGCC	140		
Sbjct 384	GACGTGGCTCTGCTGTTCAAGTCGGAGGGCCCCAGCCCCGAGCGTTCTCATCCGCC	443		
Query 141	TGGGTGCCCTATCACGAGTACTACCGAGGCCGGTGGCGTCTGCTCAAGAAGGCCAG	280		
Sbjct 444	TGGGTGCCCTATCACGAGTACTACCGAGGCCGGTGGCGTCTGCTCAAGAAGGCCAG	503		
Query 201	GCCTGGAAGAGAGACCGCTGGCCCTGAACCAAGAGGTGATGGCCCCGATGCATCAAG	260		
Sbjct 504	GCCTGGAAGAGAGACCGCTGGCCCTGAACCAAGAGGTGATGGCCCCGATGCATCAAG	563		
Query 261	AACCTCGTGCCTCTCTGGAGGCCGTGTCGAGGACTTCGTCGCGATGCTGACGGTGC	320		
Sbjct 564	AACCTCGTGCCTCTCTGGAGGCCGTGTCGAGGACTTCGTCGCGATGCTGACGGTGC	623		
Query 321	GTCCAGCAGGGGGTGTCTCAGCGACATCAGTGACGACCTGTTCCGCTTTCCTTCGAG	380		
Sbjct 624	GTCCAGCAGGGGGTGTCTCAGCGACATCAGTGACGACCTGTTCCGCTTTCCTTCGAG	683		
Query 381	TCCATCACCAACATCATGTTCCGGGAGCGCTGGGGATGCTGGAGGAGCGGTGGACCC	440		
Sbjct 684	TCCATCACCAACATCATGTTCCGGGAGCGCTGGGGATGCTGGAGGAGCGGTGGACCC	743		
Query 441	GAGGCGCAGCGGTTTCATCGACGCGGTTACAGATGTTCCACACAGCGTCCCATGCTC	500		
Sbjct 744	GAGGCGCAGCGGTTTCATCGACGCGGTTACAGATGTTCCACACAGCGTCCCATGCTC	803		
Query 501	AGCCTGCCACCGAGCCTCTTCCGCTCTTCCGACCAAGGACTGGAGGGACACGTGGCC	560		
Sbjct 804	AGCCTGCCACCGAGCCTCTTCCGCTCTTCCGACCAAGGACTGGAGGGACACGTGGCC	863		
Query 561	GCCTGGGACGTGATCTTCAACAACGCTGACAAATACACCCAGAGCTTCTACT	612		
Sbjct 864	GCCTGGGACGTGATCTTCAACAACGCTGACAAATACACCCAGAGCTTCTACT	915		

CYP11a1

Figura 18. Identificación de la secuencia del gen de CYP11a1. Se muestra la alineación con BLAST para confirmar la identidad del gen. Se puede observar que la identificación corresponde al 100% con el gen CYP11a1 de la especie *Oryctolagus cuniculus*.

Oryctolagus cuniculus cytochrome P450, family 19, subfamily A, polypeptide 1 (CYP19A1), mRNA
 Sequence ID: [NM_001170921.2](#) Length: 1782 Number of Matches: 1

Range 1: 365 to 813 [GenBank](#) [Graphics](#) ▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
830 bits(449)	0.0	449/449(100%)	0/449(0%)	Plus/Plus
Query 18	GAATTCATTAGGGTCTGGATATGTGGAGAGGAAACACTCATTATCAGCAAGTCTCGAGC	77		
Sbjct 365	GAATTCATTAGGGTCTGGATATGTGGAGAGGAAACACTCATTATCAGCAAGTCTCGAGC	424		
Query 78	ATGTTCCACGTGATGAAGCACAGCCATTACGTCTCCGATTCGGCAGCAAACCTGGGCTG	137		
Sbjct 425	ATGTTCCACGTGATGAAGCACAGCCATTACGTCTCCGATTCGGCAGCAAACCTGGGCTG	484		
Query 138	CAGTGCATCGGCATGCACGAGAACGGCATCATCTTTAAACAACAACCCAGCTCTCTGGAAA	197		
Sbjct 485	CAGTGCATCGGCATGCACGAGAACGGCATCATCTTTAAACAACAACCCAGCTCTCTGGAAA	544		
Query 198	GTAGTTCGACCTCTCTTTATGAAAAGCTTTGACAGGCCCTGGGCTTGTTCAGATGGTGGCG	257		
Sbjct 545	GTAGTTCGACCTCTCTTTATGAAAAGCTTTGACAGGCCCTGGGCTTGTTCAGATGGTGGCG	604		
Query 258	ATCTGCGTTGGATCCATCGGGCGGCACCTGGACAAGCTGGAGGAGGTGACCACCCGGTGC	317		
Sbjct 605	ATCTGCGTTGGATCCATCGGGCGGCACCTGGACAAGCTGGAGGAGGTGACCACCCGGTGC	664		
Query 318	GGCTGCGTGGAGCTGCTGACCTCATGCGGCGCATCATGCTGGACACCTCCAACACGCTC	377		
Sbjct 665	GGCTGCGTGGAGCTGCTGACCTCATGCGGCGCATCATGCTGGACACCTCCAACACGCTC	724		
Query 378	TTCCTGGGCATCCCCATGGACGAAAGTGCCATCGTGTAAAATCAAGGTTATTTTGAT	437		
Sbjct 725	TTCCTGGGCATCCCCATGGACGAAAGTGCCATCGTGTAAAATCAAGGTTATTTTGAT	784		
Query 438	GCCTGGCAAGCTCTCTCTCTCAAAACAAA	466		
Sbjct 785	GCCTGGCAAGCTCTCTCTCTCAAAACAAA	813		

**AROMATASA
(CYP19)**

Figura 19. Identificación de la secuencia del gen de aromatasa. Se muestra la alineación con BLAST para confirmar la identidad del gen. Se puede observar que el gen es 100% idéntico con el gen aromatasa de la especie *Oryctolagus cuniculus*.

7.5 Caracterización histológica

En este trabajo, las muestras tomadas para el estudio histológico se iniciaron a los 2 meses de edad. A los 2 meses de edad (figura 20 a) se puede observar la presencia de folículos en sus etapas de desarrollo: folículos primordiales (O), formados por un ovocito y células planas rodeando al ovocito; se muestran además folículos primarios (P), en estos folículos las células planas han adquirido estructuras cuboides, que se aprecian claramente en la fotomicrografía.

Otra etapa de desarrollo folicular que se aprecia en la imagen es la presencia de folículos secundarios preantrales (S), se puede observar que las células de la granulosa han formado varias capas estratificadas y además se encuentran rodeadas de células de la teca interna.

A los 4 meses de edad (figura 20 b), la dotación de folículos ha decrecido numéricamente. En esta imagen se aprecian otras etapas del desarrollo folicular como son: folículos secundarios antrales, con presencia de líquido folicular y formación de células de la teca externa y la presencia de un folículo atrésico (A), donde el ovocito ha degenerado al igual que las células de la granulosa que le rodeaban.

En ovario de coneja adulta (figura 20 c) la reserva folicular prácticamente ha desaparecido, en comparación con los ovarios más jóvenes. En el folículo secundario que aparece en la imagen se ve claramente la zona pelúcida de coloración azul claro, la capa de células de la granulosa, las células de la teca interna y la teca externa.

Si se compara el ovario de la coneja de más de un año de edad (figura 20 c) con los ovarios más jóvenes, tiene una mayor cantidad de tejido fibroso donde antes se encontraban los folículos, conformado por células del estroma que ahora han ocupado dicho espacio; además, se observa la aparición de estructuras papilares formadas por células del estroma y células epiteliales estratificadas.

Además, se realizó una comparación observacional entre 8 cortes de ovarios de conejas viejas (figura 21); en ellos se aprecia que la reserva de folículos primordiales prácticamente ha desaparecido y las células del estroma han ocupado el lugar, conformando la totalidad de la corteza del ovario.

En la figura 21 a) se puede observar claramente las células del epitelio que forman una capa delgada, en seguida se encuentra la túnica albugínea, que se presenta como un tejido fibroso y finalmente se presentan las células del estroma, las cuales ocupan ahora la mayor parte de la corteza del ovario.

En la figura 21 b) se aprecia un cuerpo fibroso (B) y un folículo primordial, probablemente en proceso de atresia, ya que el núcleo ya no cuenta con una superficie definida. Se puede observar en algunas zonas que el epitelio se ha estratificado en más de una capa.

En la figura 21 c) se puede observar un folículo secundario en crecimiento (S). En él se distinguen el ovocito cubierto por la zona pelúcida (color azul claro) rodeado de las células de la granulosa con aproximadamente 4 capas. Las células con apariencia más fibrosa y planas que rodean las capas de células de la granulosa corresponden a células de la teca interna.

El epitelio de este ovario tiene más de una capa y se pueden ver claramente distintas estructuras con formas papilares, conformadas por tejido de la túnica albugínea rodeado de células epiteliales.

En la figura 21 d) se observa que el epitelio del ovario ha perdido continuidad y se encuentra sumamente degradado, asimismo, aparecen las estructuras papilares anteriormente descritas. Estos dos últimos ovarios pertenecieron a conejas que tuvieron numerosas camadas durante su etapa reproductiva.

De acuerdo a lo descrito por Pau y Spies (1986), la ovulación en la coneja es inducida mediante el coito, el cual induce un pico de LH y el aumento de FSH para ovular el folículo maduro. Según Osten y Mills (1980), en conejas en las que se induce la ovulación mediante hCG se produce un segundo pico de FSH. Este segundo pico es responsable de estimular el crecimiento de una nueva población de folículos reclutados, por lo que a los 6 días nuevamente se pueden observar folículos preovulatorios.

Las múltiples ovulaciones que se llevaron a cabo durante dicho periodo pueden estar relacionadas con la aparición de las papilas epiteliales, probablemente causadas por la ruptura del epitelio ovárico durante la expulsión del óvulo y su constante regeneración.

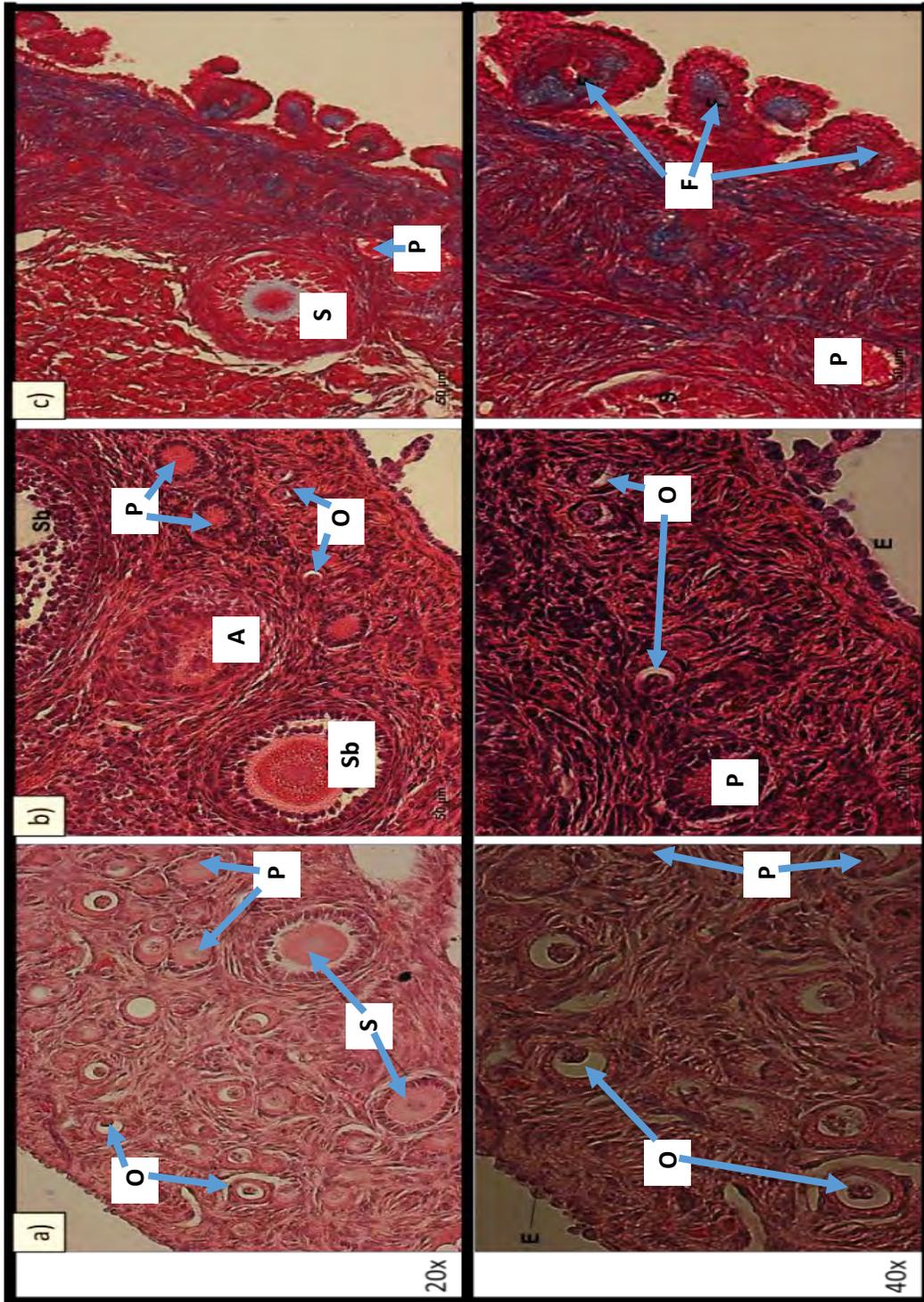


Figura 20. Fotomicrografía de ovarios de conejas chinchilla (*O. cuniculus*) de distintas edades. En la columna a) se presenta un ovario de 2 meses de edad donde se puede observar la reserva de folículos primordiales (O), folículos primarios en desarrollo (P) y folículos secundarios preantrales (S). En la columna b) se muestra un ovario de 4 meses de edad, en el que se observan folículos primordiales, folículos primarios, folículos secundarios antrales (Sb) y un folículo en atresia (A). En la columna c) se muestra un ovario de una coneja de más de un año de edad, en el que se pueden observar papilas sobre la superficie del epitelio superficial (F). Se puede observar un folículo secundario y folículos primarios, ya no es visible una reserva de folículos primordiales. Se utilizó la técnica de tinción hematoxilina-eosina (a) y tinción Tricrómica de Masson (b y c). E: epitelio. Objeto 20x y 40x.

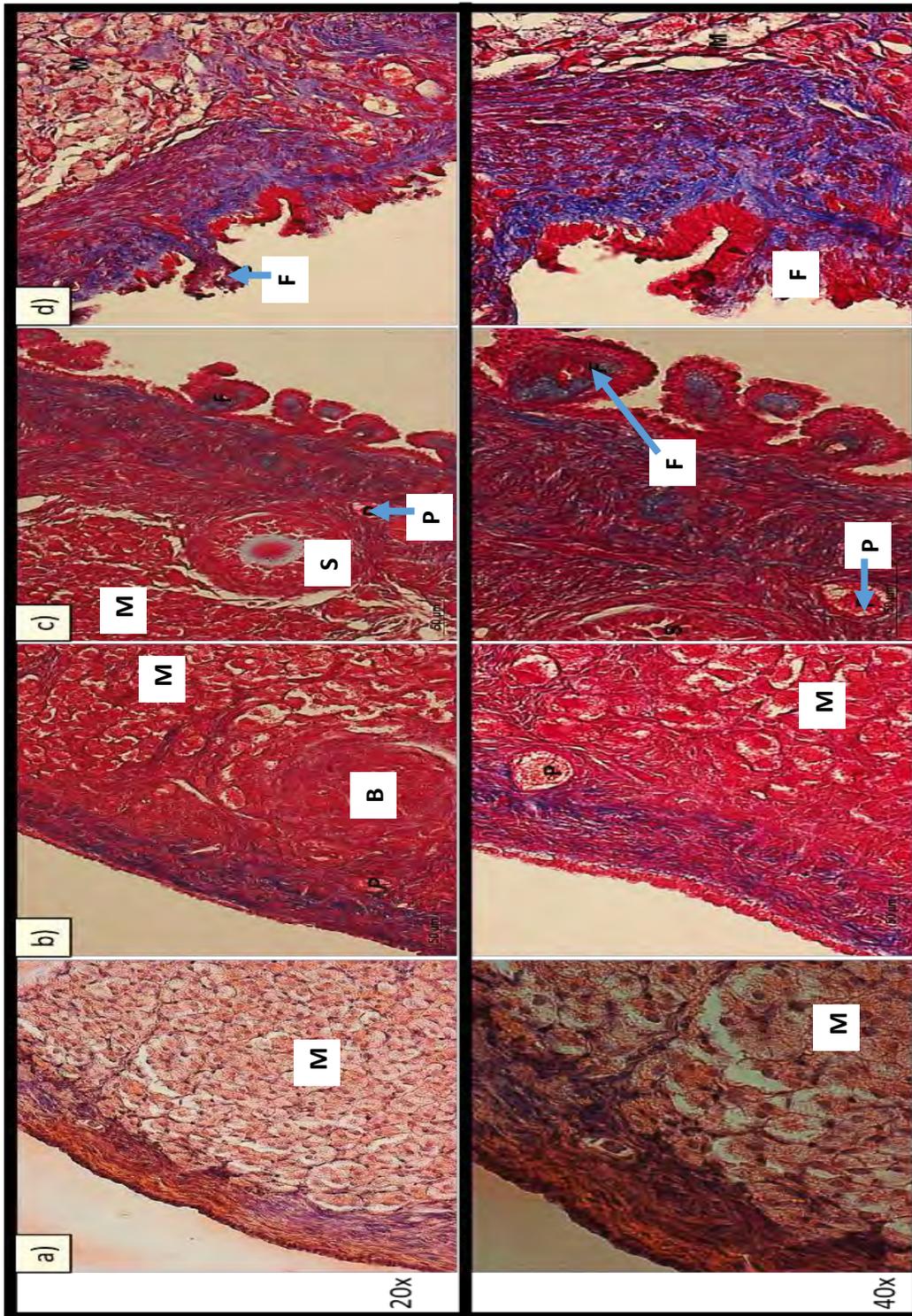


Figura 21. Fotomicrografía de ovarios de conejas chinchilla (*O. cuniculus*) viejas. En todas las figuras se puede observar que las células del estroma (M) ocupan una mayor área, en comparación con el parénquima (zona de reserva folicular). En el ovario de 1 año de edad, figura a), se puede apreciar la ausencia de folículos y la presencia de tejido fibroso en su lugar. En otro ovario de 1 año, figura b), se pueden observar un folículo primario, así como la formación de un cuerpo fibroso dentro del estroma (B). En los ovarios de 2 años y 6 meses, figuras c) y d), se aprecia la formación de papilas compuestas por células del estroma y células epiteliales (F) en la superficie del epitelio. En la figura c) se muestran un folículo secundario preantral (S) y un folículo primario atrésico (P). Se utilizó la técnica de Tinción Tricrómica de Masson. Objetivo 20x y 40x.

7.6 Perfiles de expresión

Los valores relativos de expresión de AMH, CYP11a1 y aromatasa se obtuvieron a partir del análisis densitométrico, en este análisis se relacionó la densidad de pixeles con la expresión de cada uno de los genes. El gen constitutivo de HPRT se utilizó para normalizar la expresión de los genes de estudio, obteniendo las gráficas correspondientes de cada uno.

En los ovarios, la AMH regula el reclutamiento de los folículos para su crecimiento y además funciona como marcador de la reserva ovárica. La expresión de la AMH fue observada en ovarios de conejas de 2 meses de edad (figura 22), en tanto a los 4 meses de edad y en la edad adulta no se detectó la expresión de dicho gen.

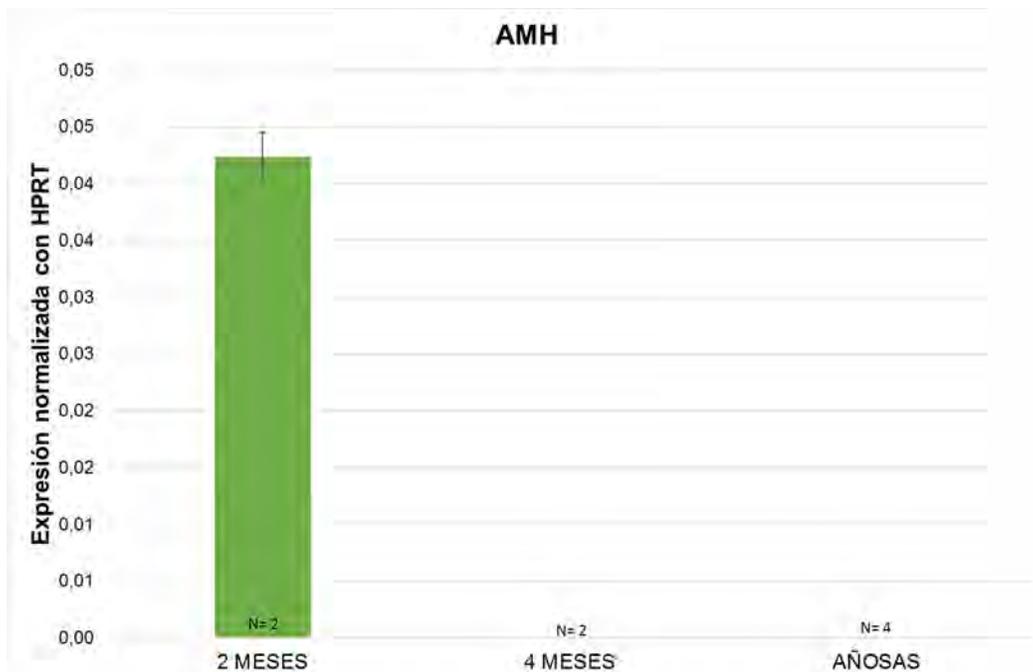


Figura 22. Gráfica de expresión de AMH. Se muestra la expresión de AMH en ovarios de conejas de distintas edades. Se puede observar una expresión a la edad de 2 meses (N=2), mientras que a los 4 meses (N=2) y en la etapa adulta (N=4), no se percibe la expresión de dicha hormona. S: ± 0.02 .

La enzima CYP11a1 es la responsable de convertir el colesterol a pregnenolona: el reactivo limitante para la síntesis de hormonas esteroides.

Se puede observar que la expresión de CYP11a1 (figura 23) es muy baja a los 2 meses de edad. Durante esta etapa comienzan a crecer los folículos y las células de la granulosa comienzan a sintetizar las hormonas necesarias para el futuro desarrollo de los folículos reclutados.

A los 4 meses de edad (figura 23), donde la coneja alcanza el estado de pubertad, ya se pueden encontrar folículos secundarios en crecimiento, así como folículos terciarios que pueden llegar a ser folículos maduros. En esta etapa se observa que la expresión de CYP11a1 se ha triplicado, en comparación con la edad de 2 meses. Finalmente, se observa la mayor expresión de esta enzima en las conejas añosas.

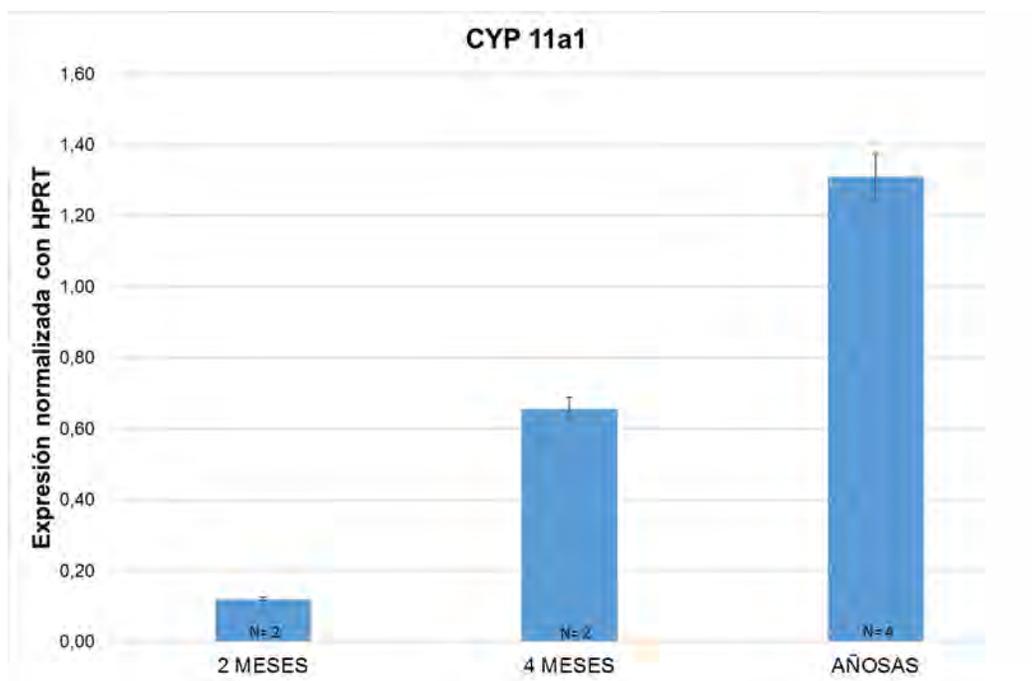


Figura 23. Gráfica de expresión de CYP11a1. Se muestra la densidad de expresión en ovarios de 2 meses (N=2), 4 meses (N=2) y etapa adulta (N=4). Se observa que conforme avanza la edad del ovario, la expresión de esta enzima aumenta. S₁: ± 0.04; S₂: ± 0.21; S₃: ± 0.13.

La aromatasa es codificada por el gen CYP19a1; es la responsable de la conversión de andrógenos a estrógenos. Se puede observar que a los 2 meses de edad la expresión de aromatasa es muy baja (figura 24), esto se relaciona con el estado de crecimiento de los folículos.

Durante esta etapa, los folículos en crecimiento están adquiriendo la capacidad de sintetizar hormonas esteroideas, que son utilizadas para el desarrollo de los mismos en etapas más avanzadas.

La expresión de aromatasa aumenta considerablemente a los 4 meses de edad (figura 24), donde se observan los mayores niveles de esta enzima. Este aumento de aromatasa está relacionado con la etapa de pubertad en la que se encuentra la coneja, donde el grupo de folículos seleccionados está creciendo y sintetizan estradiol en concentraciones óptimas para su desarrollo.

En las conejas añosas (figura 24), la expresión de aromatasa sigue siendo muy alta, pero los niveles de esta enzima son menores comparándola con las conejas de 4 meses de edad. Esto puede estar relacionado con la disminución de folículos en crecimiento causada por la pérdida de la reserva folicular durante la etapa reproductiva de la coneja.

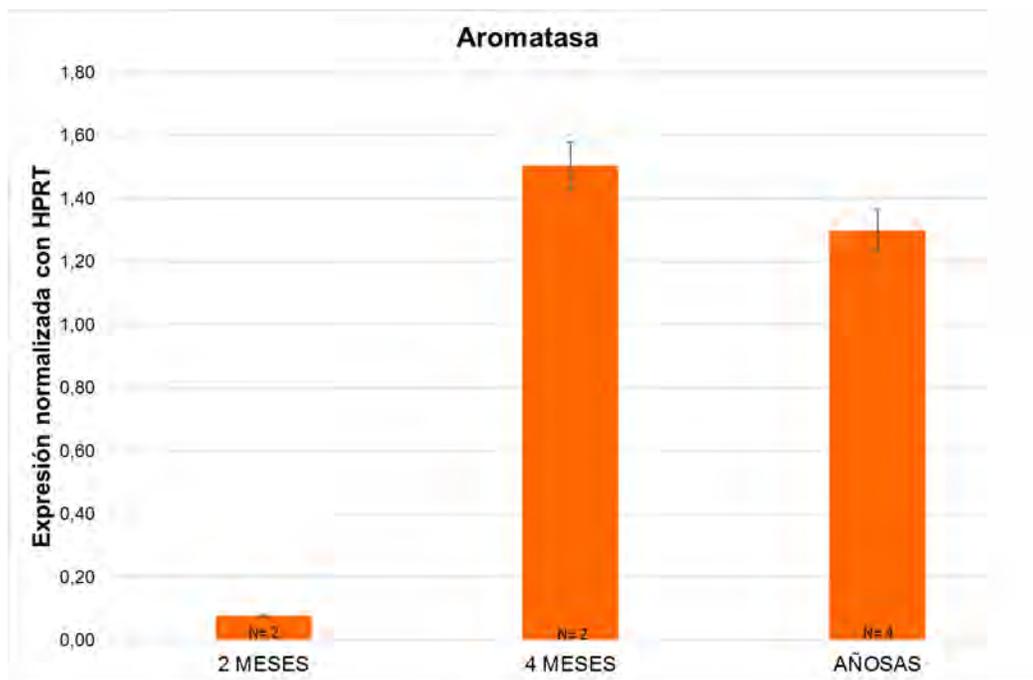


Figura 24. Gráfica de expresión de aromatasa. Se observa que a los 2 meses de edad (N=2) la expresión es muy baja, mientras que a los 4 meses (N=2) hay una expresión aguda de la enzima, la cual disminuye en la etapa adulta (N=4), pero se sigue manteniendo una alta expresión. S1: ± 0.03; S2: ± 0.01; S3: ± 0.15.

8. DISCUSIÓN

Daniel-Carlier et al. (2013) describen que las células germinales primordiales se agrupan y forman los ovocitos a los 4 *dpp*, posteriormente el crecimiento de folículos primordiales a folículos primarios comienza a los 28 *dpp* y pasando los 2 meses de edad, los folículos primarios crecen a folículos secundarios; lo que refiere el inicio de la foliculogénesis.

La importancia de la AMH es que regula la selección de los folículos que van a ser reclutados para su crecimiento; de acuerdo con varios autores, esta hormona tiene un efecto inhibitorio sobre FSH, disminuyendo la sensibilidad de los folículos a FSH (Durlinger et al., 1999; Visser y Themmen, 2005; Pellat et al., 2011).

De este modo, sólo un grupo de folículos tiende a crecer y comienzan a expresar AMH que inhibe el reclutamiento de más folículos, por lo que desempeñaría un papel importante para el mantenimiento de la reserva folicular del ovario y no exista una depleción prematura de esta reserva por el crecimiento y atresia de todos los folículos (Broekmans et al., 2009; Hayes et al., 2016).

En este estudio se detectó una débil expresión de AMH en ovarios de 2 meses (figura 22), sin encontrar una relación con la abundancia de los folículos en crecimiento observados en el corte histológico del ovario (figura 20 a). Esto no corresponde a la descripción de distintos autores que estudian mamíferos domésticos, donde se menciona que la AMH se expresa únicamente en células de la granulosa de folículos primarios y folículos secundarios preantrales en crecimiento (Broekmans et al., 2009; Durlinger et al., 1999; Hayes et al., 2016; Pellat et al., 2011; Visser y Themmen, 2005). Nuestros datos son parecidos a los descritos previamente por Daniel-Carlier et al. (2013), donde la detección de la hormona AMH es prácticamente imperceptible por PCR en tiempo real en los ovarios de conejas de edades perinatales y adultas (6 meses).

La baja expresión, tanto de aromatasa y de CYP11a1, está relacionada con el estado de los folículos presentes en el ovario. Como se pudo observar, el ovario de 2 meses de edad presenta numerosos folículos primordiales (figura 20 a) y la presencia de folículos primarios en crecimiento, así como el desarrollo de folículos secundarios.

Esta baja expresión de aromatasa es consistente con lo reportado por Daniel-Carlier et al. (2013), en el que se muestra una baja expresión de la actividad aromatasa en ovarios de coneja de 2 meses.

Cuando la coneja llega a los 4 meses de edad, entra en la pubertad, comenzando su etapa reproductiva. En esta etapa se observa una alta expresión de aromatasa (figura 24), esto se puede relacionar con el periodo de desarrollo que se encuentra el ovario, ya que se presenta una gran cantidad de folículos secundarios en crecimiento (figura 20 b), así como folículos maduros en espera de ser ovulados (Arias-Álvarez et al., 2007; Pau y Spies, 1986).

De acuerdo con Gougeon (1896), los folículos en este estado de desarrollo tienen numerosas capas de células de la granulosa que expresan una alta actividad de aromatasa que les permite incrementar la capacidad de sintetizar estradiol, lo que les ayuda a mantener su crecimiento, de tal modo que uno de ellos pueda ser seleccionado como folículo dominante y desarrollarse hasta folículo preovulatorio.

Por otra parte, de acuerdo con Qiu et al. (2013), la estimulación de la función esteroideogénica de las células foliculares promueve la expresión de CYP11a1, ocasionando un incremento en la actividad CYP11a1. Esto es consistente con el incremento en la expresión de CYP11a1 encontrada en los ovarios de 4 meses de edad (figura 23).

En los ovarios de conejas viejas se observa que se ha perdido gran cantidad de folículos o casi toda la reserva folicular ovárica (figura 20 c y figura 21) ocasionada por la depleción del conjunto de folículos en cada ciclo de crecimiento folicular, así como los procesos de apoptosis naturales de los folículos (Broekmans et al., 2009).

Según Seifer y Naftolin (1998), los folículos restantes de los ovarios viejos, tienen un menor número de células de la granulosa, además la funcionalidad de estos se encuentra disminuida.

Este suceso se puede relacionar con la disminución de la expresión de aromatasa (figura 24) en los ovarios viejos, ya que se muestra una baja cantidad de folículos o en su defecto, la ausencia total de ellos (figura 21); sin embargo, se puede observar que la expresión de aromatasa sigue siendo alta, de modo que puede haber otro tipo celular que esté manteniendo la expresión de aromatasa.

Pan et al. (2012) realizaron un estudio en folículos de cerdo. En este estudio se utilizaron tres grupos de folículos: folículos sanos, en proceso de atresia y folículos con atresia avanzada. En estos últimos se encontró una alta expresión de CYP11a1; sugiriendo que esta alta expresión conduce a la progresión de la atresia folicular.

Por otro lado, Irving-Rogers et al. (2009) observó que CYP11a1 tiene concentraciones más elevadas en folículos dominantes en comparación con los folículos del resto del grupo. Asimismo, en ambos estudios se encontró una relación en la expresión de CYP11a1 con la de aromatasa, en la que coincidieron que mientras la actividad de aromatasa incrementaba, también lo hacía la actividad de CYP11a1.

El presente estudio incluyó el estudio de ovarios de conejas de más de un año de edad. Encontramos que conforme aumenta la edad, la expresión de CYP11a1 también aumenta. La presencia de altos niveles de CYP11a1 pueden indicar el envejecimiento de los distintos compartimentos celulares que conforman el folículo (ovocito, las células de la granulosa o las células de la teca) y probablemente también puede estar relacionado con el estado atrésico de estos.

9. CONCLUSIONES

La expresión de la AMH mediante RT-PCR solamente se pudo detectar en ovarios de conejas de 2 meses de edad, mientras que en conejas de 4 meses de edad y viejas no fue posible detectarla.

La expresión de aromatasa se incrementó de acuerdo al avance de la edad de la coneja, obteniendo las concentraciones más altas en ovarios de conejas de 4 meses de edad.

La expresión de CYP11a1 se elevó con la edad de la coneja, mostrando la expresión más alta en ovarios de conejas viejas.

Se puede asumir que la expresión de CYP11a1 está correlacionada positivamente con el envejecimiento del ovario, ya que se observó un aumento en sus concentraciones conforme avanza la edad de la coneja.

La disminución en la expresión de aromatasa en ovarios de conejas viejas puede estar relacionada con la disminución de los folículos observados en los cortes histológicos del ovario viejo, sin embargo, la sigue una alta expresión de aromatasa, mantenida probablemente por otro tipo de células presentes en el ovario.

10. PERSPECTIVAS

Para confirmar los eventos que ocurren en los ovarios durante su envejecimiento, se sugiere realizar estudios más detallados, en los que se pueda:

- Analizar la influencia que puede ejercer la expresión de AMH sobre CYP11a1 y aromatasa.
- Analizar la relación entre el número de folículos en crecimiento con la expresión de aromatasa, AMH y CYP11a1.
- Evaluar el número de folículos atrésicos, así como células que conforman el folículo en proceso de envejecimiento presentes en los ovarios y compararlos con los niveles de CYP11a1 y aromatasa
- Determinar qué tipo celular mantiene la expresión de aromatasa y CYP11a1 en los ovarios de conejas viejas.
- Evaluar la influencia que tiene la inducción de AMH sobre los niveles de hormonas esteroides.
- Evaluar la influencia que tiene la inducción de aromatasa y CYP11a1 en la síntesis de hormonas esteroides.
- Analizar los efectos que tiene la FSH sobre la expresión de AMH, CYP11a1 y aromatasa.
- Comparar la expresión de aromatasa, CYP11a1 y AMH de folículos sanos con folículos atrésicos.
- Utilizar una nueva técnica que permita evaluar la expresión de AMH en ovarios de conejas viejas y determinar qué tipo celular los mantiene.
- Medir los niveles de hormonas esteroides y analizar los efectos que tienen sus cambios de concentración sobre la expresión de AMH, CYP11a1 y aromatasa.

Finalmente, se puede realizar un aporte a la base de datos de NCBI con la obtención y secuenciación de AMH de coneja chinchilla (*O. cuniculus*) ya que durante el desarrollo del trabajo no se pudo obtener información de esta hormona.

11. ANEXOS

11.1 Anexo 1

Técnica de Inclusión en parafina.

1. Colocar el tejido en paraformaldehído (4%) toda la noche a 4 °C. Al día siguiente lavar las muestras con PBS 3 veces.
2. Pasar los tejidos a un tubo de centelleo, los cuales deben estar rotulados. Las etiquetas se deben hacer con lápiz y se coloca una doble capa envolvente de cinta masking tape.
3. Deshidratación del tejido:
Se pasa el tejido por los siguientes alcoholes durante 1 hora (no reutilizar el alcohol).
 - a) Etanol (EtOH) al 30 %
 - b) EtOH al 40 %
 - c) EtOH al 50 %
 - d) EtOH al 75 %
 - e) EtOH al 96 %
 - f) EtOH al 100 % (se realizan 2 lavados de 30 min cada uno)
4. Colocar el tejido en Xileno (frasco sin tapa) en estufa durante 30 minutos.
5. Mantener el Xileno 30 min a 60 °C
6. Pasar el tejido a parafina 1 hora a 60 °C.
7. Pasar el tejido a parafina 1 hora a 60 °C.
8. Incluir el tejido en parafina.

12. REFERENCIAS

- Arias-Álvarez M., Gracia-Gracia R.M., Rebollar P.G., Lorenzo P.L. *Desarrollo folicular de la coneja*. ITEA. 2007; 103(4):173-185.
- Baarends W.M., Uilenbroek J.T., Kramer P., Hoogerbrugge J.W., van Leeuwen E.C., Themmen A.P., Grootegoed J.A. *Anti-Müllerian hormone and anti-Müllerian hormone type II receptor messenger ribonucleic acid expression in rat ovaries during postnatal development, the estrous cycle, and gonadotropin-induced follicle growth*. *Endocrinology*. 1995; 136:4951–4962.
- Banerjee S., Banerjee S., Saraswat G., Bandyopadhyay S.A., Kabir S.N. *Female reproductive aging is master-planned at the level of ovary*. *PLoS One*. 2014; 9(5): e96210.
- Bjersing L. *On the morphology and endocrine function of granulosa cells of ovarian follicles and corpora luteal*. *Acta Endocrinol (Copenh)*. 1967; 125:5-24.
- Bouraïma H., Hanoux V., Mittre H., Féral C., Benhaïm A., Leymarie P. *Expression of the rabbit cytochrome P450 aromatase encoding gene uses alternative tissue-specific promoters*. *Eur. J. Biochem*. 2001; 268:4506-4512.
- Broekmans F.J., Soules M.R., Fauser B.C. *Ovarian aging: Mechanisms and Clinical Consequences*. *Endocrines Reviews*. 2009; 30(5):465-493.
- Bulun S.E., Sebastian S., Takayama K., Suzuki T., Sasano H., Shozu M. *The human CYP19 (aromatase P450) gene: update on physiologic roles and genomic organization of promoters*. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol*. 2003; 86:219-224.
- Chung B., Matteson K.J., Voutilainen R., Mohandas T.K., Miller W.L. *Human cholesterol side-chain cleavage enzyme, P450_{scc}: cDNA cloning, assignment of the gene to chromosome 15, and expression in the placenta*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1986; 83:8962-8966.
- Daniel-Carlier N., Harscoët E., Thépot D., Auguste A., Pailhoux E., et al. *Gonad Differentiation in the Rabbit: Evidence of Species-Specific Features*. *PLoS One*. 2013; 8(4): e60451.

- de Vet A., Laven J.S.E., de Jong F.H., Themmen A.P.N., Fauser B.C.J.M. *Antimüllerian hormone serum levels: a putative marker of ovarian aging*. Fertil Steril. 2002; 77(2):357-362.
- di Clemente N., Goxe B., Rémy J.J., Cate R.L., Josso N., Vigier B., Salesse R. *Inhibitory effect of AMH upon aromatase activity and LH receptors of granulosa cells of rat and porcine immature ovaries*. Endocrine. 1994; 2:553–558.
- Durlinger A.L., Kramer P., Karels B., de Jong F.H., Uilenbroek J.T., Grootegoed J.A., Themmen A.P. *Control of primordial follicle recruitment by anti-Müllerian hormone in the mouse ovary*. Endocrinology. 1999; 140:5789–5796.
- Edson, M.A., Nagaraja, A.K., Matzuck, M.M. *The Mammalian Ovary from Genesis to Revelation*. Endocrine Reviews. 2009; 30:624-712.
- Erickson C.F., Shimasaki S. *The physiology of folliculogenesis: the role of novel growth factors*. Fertil Steril. 2001; 76:943–949.
- Erickson G.F., Magoffin D.A., Dyer C. A., Hofeditz C. *The ovarian androgen producing cells: a review of structure/function relationships*. Endocr Rev. 1985; 6(3):371-399.
- Faddy M.J., Gosden R.G. *A mathematical model of follicle dynamics in the human ovary*. Hum Reprod. 1995; 10(4):770-5.
- Fatum M., Yivgi-Ohana N., David S., Joseph O., Simon A., Laufer N. *Levels of steroidogenic acute regulatory protein and mitochondrial membrane potential in granulosa cells of older poor-responder women*. Fertil. Steril. 2009; 91:220-225.
- Franks S., McCarthy M.I., Hardy K. *Development of polycystic ovary syndrome: involvement of genetic and environmental factors*. Int J Androl. 2006; 29:278-285.
- Frederick J.L., Shimanuki T., diZerega G.S. *Initiation of angiogenesis by human follicular fluid*. Science. 1984; 21:213-225.
- Fritz M.A., Speroff L. *The endocrinology of the menstrual cycle. The interaction of folliculogenesis and neuroendocrine mechanisms*. Fertil Steril. 1982; 38:509-522.

- García-Barrado M.J., Blanco E.J., Catalano-Iñiesta L., Sánchez-Robledo V., Iglesias-Osma M.C., Carretero-Hernández M., Rodríguez-Cobos J., Burks D. J., Carretero J. *Relevance of pituitary aromatase and estradiol on the maintenance of the population of prolactin-positive cells in male mice.* Steroids. 2016; 111:121-126.
- Gebauer H., Linder H.R., Amsterdam A. *Synthesis of heparin like glyco saminoglycans in rat ovarian slices.* Biol. Reprod. 1978; 18:350-358.
- Gougeon A. *Dynamics of follicular growth in the human: a model from preliminary results.* Human Reprod. 1986; 1:81-96.
- Hayes E., Kushnir V., Ma X., Biswas A., Prizant H., Gleicher N. Sen A. *Intra-cellular mechanism of Anti-Müllerian hormone (AMH) in regulation of follicular development.* Molecular and Cellular Endocrinology. 2016; 433:56-65.
- Honda A., Hirose M., Hara K., Matoba S., Inoue K., Miki H., Hiura H., Kanatsu-Shinohara M., Kanai Y., Kono T., Shinohara T., Ogura A. *Isolation, characterization, and invitro and in vivo differentiation of putative theca stem cells.* Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America. 2007; 104(30):12389-12394.
- Hutt K.J., McLaughlin E.A., Holland M.K. *Primordial follicle activation and follicular development in the juvenile rabbit ovary.* Cell Tissue Res. 2006; 326:809-822.
- Irving-Rogers H.F., Harland M.L., Sullivan T.R., Rodgers R.J. *Studies of granulosa cell maturation in dominant and subordinate bovine follicles: novel extracellular matrix focimatrix is co-ordinately regulated with cholesterol side-chain cleavage CYP11a1.* Reproduction Research. 2009; 137:825-834.
- Josso N., Cate R.L., Picard J. Y., Vigier B., di Clemente N., Wilson C., Imbeaud S., Pepinsky R.B., Guerrier D., Boussin L., Legeai L., Carre-Eusebe D. *Anti-müllerian hormone: The Jost factor.* Rec. Progr. Horm. Res. 1993; 48:1–59.
- Knight P.G., Glister C. *TGF-beta superfamily members and ovarian follicle development.* Reproduction. 2006; 132(2):191-206.
- Luu-The V. *Assessment of steroidogenesis and steroidogenic enzyme functions.* J. Steroid Biochem. Mol. Biol. 2013; 137:176-182.

- Markström E., Svensson ECh., Shao R., Svanberg B., Billing H. *Survival factors regulating ovarian apoptosis-dependence on follicle differentiation.* *Reproduction.* 2002; 123:23-30.
- McGee E.A., Hsueh A.J.W. *Initial and cyclic recruitment of ovarian follicles.* *Endocri. Rev.* 2000; 21(2):200–214.
- McNatty K.P., Makris A., DeGrazia C., Osathanondh R., Ryan K.J. *The production of progesterone, androgens, and estrogens by granulosa cells, thecal tissue, and stromal tissue from human ovaries in vitro.* *J Clin Endocrinol Metab.* 1979; 49(5):687–699.
- McTavish K.J., Jimenez M., Walters K.A., Spaliviero J., Groome N.P., Themmen A.P., Visser J.A., Handelsman D.J., Allan C.M. *Rising follicle-stimulating hormone levels with age accelerate female reproductive failure.* *Endocrinology.* 2007; 148(9):4432-4439.
- Monniaux D., Drouilhet L., Rico C., Estienne A., Jarrier P., Touzé J., Sapa J., Phocas F., Dupont J., Dalbiès-Tran R., Fabre S. *Regulation of anti-müllerian hormone production in domestic animals.* *Repr. Fert. Develop.* 2013; 25:1-16.
- Morohashi K., Sogawa K., Omura T., Fujii-Kuriyama Y. *Gene structure of human cytochrome P-450scc, cholesterol desmolase.* *J Biochem.* 1987; 101(4):879-887.
- Motta P.M., Makabe S., Nottola S.A. *The ultrastructure of human reproduction. I. The natural history of the female germ cell: origin, migration and differentiation inside the developing ovary.* 1997; 3(3):281-295.
- Nelson, S.M., Telfer, E.E., Anderson, R.A. *The ageing ovary and uterus: new biological insights.* *Human Reproduction Update.* 2013; 19:67-83.
- Nikolaou D., Templeton A. *Early ovarian ageing.* *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology.* 2004; 113(1):126-133.
- Oktem O., Oktay K. *The ovary: anatomy and function throughout human life.* *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 2008; 1127:1-9.
- Orisaka M., Tajima K., Mizutani T. Miyamoto K., Tsang B.K., Fukuda S., Yoshida Y., Kotsuji F. *Granulosa cells promote differentiation of cortical stromal cells into theca cells in the bovine ovary.* *Biology of Reproduction.* 2006; 75(5):734-740.

- Orisaka M., Tajima K., Tsang B.K., Kotsuji F. *Oocyte-granulosa-theca cell interactions during preantral follicular development*. Journal of Ovarian Research. 2009; 2:9.
- Osteen K.G., Mills T.M. *Changes in the size, distribution and steroid content of rabbit ovarian follicles during early pseudopregnancy*. Biol. Reprod. 1980; 22:1040-1046.
- Pan Z., Zhang J., Lin F., Ma X., Wang X., Liu H. *Expression profiles of key candidate genes involved in steroidogenesis during follicular atresia in pig ovary*. Mol. Biol. Rep. 2012; 39:10823-10832.
- Parsa A.A., New M.I. *Steroid 21-hydroxylase deficiency in congenital adrenal hyperplasia*. J. Steroid Biochem. Mol. Biol. 2017; 165:2-11.
- Pau K.Y., Spies H.G. *Estrogen-dependent effects of norepinephrine on hypothalamic gonadotropin-releasing hormone release in rabbit*. Brain. Res. 1986; 399(1):15-23.
- Pelers H. *Intrauterine gonadal development*. Fertil Steril. 1976; 27:493-504.
- Pellat L., Rice S., Dilaver N., Heshri A., Galea R., Brincat M., Brown K., Simpson E.R., Mason H.D. *Anti-Müllerian hormone reduces follicle sensitivity to follicle-stimulating hormone in human granulosa cells*. Fertil. Steril. 2011; 96(5):1246-1251.
- Pellestor F., Anahory T., Hamamah S. *Effect of maternal age on the frequency of cytogenetic abnormalities in human oocytes*. Cytogenetic Genome Research. 2005; 111:206-212.
- Qiu M., Quan F., Han C., Wu B., Liu J., Yang Z., Su F., Zhang Y. *Effects of granulosa cells on steroidogenesis, proliferation and apoptosis of stromal cells and theca cells derived from the goat ovary*. Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology. 2013; 138:325-333.
- Ryan K.J., Petro Z. *Steroid biosynthesis by human ovarian granulosa and thecal cells*. J. Clin Endocrinol Metab. 1966; 20:46-57.
- Saldaña, Pedro C.T.C. *Tesis: Expresión de los genes c-kit, plzf y oct4 durante el desarrollo de la gónada en conejo (Oryctolagus cuniculus)*. Universidad de Guanajuato, División de Ciencias Naturales y Exactas. 2014.

- Seifer D.B., Gardiner A.C., Ferreira K.A., Peluso J.J. *Apoptosis as a function of ovarian reserve in women undergoing in vitro fertilization*. *Fertil Steril* 1996; 66:593-598.
- Seifer D.B., Naftolin F. *Moving toward an earlier and better understanding of perimenopause*. *Fertil Steril* 1998; 69(3):387–8.
- Shaw N.D., Srouji S.S., Welt C.K., Cox K.H., Fox J.H., Adams J.A., Sluss P.M., Hall J.E. *Compensatory increase in ovarian aromatase in older regulatory cycling women*. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2015; 100(9):3539-3547.
- Sirotkin A.V., *Cytokines: signaling molecules controlling ovarian functions*. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*. 2011; 43(6):857-861.
- Sun E.L., Gondos B. *Formation of the blood testis barrier in the rabbit*. *Cell Tissue Res.* 1986; 243: 575–578.
- Tajima K., Orisaka M., Mori T., Kotsuji F. *Ovarian theca cells in follicular function*. *Reprod. BioMed. Online*. 2007; 15(5):591-609.
- te Velde E.R., Pearson P.L. *The variability of female reproductive ageing*. *Human Reproduction Update*. 2002; 8(2):141-154.
- Thomas F.H., Vanderhyden B.C. *Oocyte-granulosa cell interactions during mouse follicular development: regulation of kit ligand expression and its role in oocyte growth*. *Reproductive Biology and Endocrinology*. 2006; 4:19.
- van Noord P.A., Dubas J.S., Dorland M., Boersma H., te Velde E. *Age at natural menopause in a population-based screening cohort: the role of menarche*. *Fertil Steril*. 1997; 68:95-102.
- van Rooij I.A.J., Broekmans F.J.M., Scheffer G.J., Looman C.W.N., Habbema J.D.F., de Jong F.H., Fauser B.J.C.M., Themmen A.P.N., te Velde E.R. *Serum antimüllerian hormone levels best reflect the reproductive decline with age in normal women with proven fertility: a longitudinal study*. *Fertil Steril*. 2005; 83(4):979-987.
- Velázquez C.G. *Fisiología de la reproducción humana*. *Rev. Mex. Reprod.* 2009; 1(4):115-130.
- Visser J.A., Themmen A.P.N. *Anti-Müllerian hormone and folliculogenesis*. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 2005; 234:81–86.

- Welt C.K., Jimenez Y., Sluss P.M. Smith P.C. Hall J.E. *Control of estradiol secretion in reproductive ageing*. Human. Reprod. 2006; 21(8):2189-2193.
- Yeh J., Kim B., Peresie J., Liang Y.J., Arroyo A. *Serum and ovarian müllerian inhibiting substance, and their decline in reproductive aging*. Fertil Steril. 2007; 87(5):1227-1230.