



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

**Caracterización histológica e inmunohistoquímica del
envejecimiento ovárico del conejo**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
LICENCIADA EN BIOQUÍMICA DIAGNÓSTICA

PRESENTA:

GONZÁLEZ MARTÍNEZ JACQUELINE

ASESORA:

Dra. Verónica Díaz Hernández
Facultad de medicina, departamento de embriología

CUATITLAN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO, OCTUBRE 2018



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
SECRETARÍA GENERAL
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES**

ASUNTO: VOTO APROBATORIO

**M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE**

**ATN: I.A. LAURA MARGARITA CORTÁZAR FIGUEROA
Jefa del Departamento de Exámenes Profesionales
de la FES Cuautitlán.**

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el: **Trabajo de Tesis.**

Caracterización histológica e inmunohistoquímica del envejecimiento ovárico del conejo.

Que presenta la pasante: **Jacqueline González Martínez**

Con número de cuenta: **310341044** para obtener el Título de la carrera: **Licenciatura en Bioquímica Diagnóstica**

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

ATENTAMENTE

"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 21 de Agosto de 2018.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	<u>Dra. María Esther Revuelta Miranda</u>	
VOCAL	<u>Q.F.B. Nydia Berenice González Angeles</u>	
SECRETARIO	<u>Dra. Verónica Díaz Hernández</u>	
1er. SUPLENTE	<u>M. en C. Paola Edith Briseño Lugo</u>	
2do. SUPLENTE	<u>M. en D. María Verónica Vázquez Cianca</u>	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: DRA. MARÍA ESTHER REVUELTA MIRANDA

VOCAL: QFB. NYDIA BERENICE GONZÁLEZ ANGELES

SECRETARIO: DRA. VERÓNICA DÍAZ HERNÁNDEZ

1er. SUPLENTE: M. EN C. PAOLA EDITH BRISEÑO LUGO

2º SUPLENTE: M. EN C. MARÍA VERÓNICA VÁZQUEZ CIANCA

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

FINANCIAMIENTO

Investigación realizada gracias al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) de la UNAM IN216717 Cambios morfológicos, ultraestructurales y funcionales durante el envejecimiento ovárico. Agradezco a la DGAPA-UNAM la beca recibida.

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

Agradecimientos académicos

A la Dra. Verónica Díaz Hernández por brindarme la oportunidad y confianza para culminar mis estudios universitarios con la realización del presente proyecto. Agradezco profundamente el invaluable apoyo, tiempo, atención, disposición y paciencia que me ha brindado todo este tiempo, así como todos los conocimientos que me ha transmitido durante la realización del presente proyecto. Con mi más sincera admiración y respeto, gracias.

Al M. en C. José Alejandro Marmolejo Valencia por su apoyo en el procesamiento e inclusión de las muestras en epon, así como la obtención de cortes semifinos y la preparación de las tinciones mostradas en este trabajo.

A la Dra. Ivette Caldelas Sánchez por haber proporcionado parte de los animales utilizados en el proyecto

A la Dra. Erika Navarrete Monroy por su asesoría técnica, así como el manejo y cuidado de las conejas

A la M. en C. Patricia de la Torre, por la obtención de las secuencias reportadas en esta tesis.

Al laboratorista Roman por mantener siempre disponible el material necesario para la realización de todos los experimentos, así como su apoyo y disposición para ayudar en cualquier actividad experimental.

Dedicatoria

Quiero dedicar este trabajo especialmente a la memoria de mi May, María Elena Sánchez Hernández, mi más grande ejemplo de mujer, quien me demostró que el querer es poder y que el que persevera alcanza, quien siempre estuvo orgullosa de mí y siempre creyó en mí, quien a pesar de su ausencia siempre guiara mi camino, quien es y será mi más grande ejemplo de persistencia, fortaleza y arduo trabajo. Espero que estés orgullosa de mí.

A mis padres, porque este sueño cumplido también les pertenece, porque gracias a ustedes y a sus esfuerzos hoy estoy donde estoy.

A mi mamá, Ines Martínez Sánchez por creer en mí en todo momento, incluso cuando ni siquiera yo misma creía en mí, por ser mi fuerza y mi guía para alcanzar mis metas, por su admirable fortaleza y brindarme su apoyo incondicional para seguir adelante a pesar de las dificultades, por ser una mujer ejemplar, guerrera y trabajadora, por estar siempre a mi lado en los momentos más difíciles, por escucharme y motivarme día a día.

A mi papá, Carlos González Ríos, por su apoyo incondicional y su arduo trabajo para que yo pudiera salir adelante en mis estudios, por ser mi fortaleza para seguir adelante, por creer en mí y motivarme a superarme, por ser un ejemplo de trabajo duro y persistencia.

Agradezco, admiro y respeto profunda y sinceramente el arduo trabajo que mis padres han hecho para apoyarme en este camino.

A mi hermana Ivone González Martínez por creer en mí y ser mi compañía y mi mejor amiga en las buenas, en las malas y en las peores, por escucharme siempre y guiarme en momentos difíciles, por regañarme cuando es necesario y ayudarme a concentrarme en lo que es importante, por animarme y motivarme a seguir adelante, por ser un ejemplo de mujer admirable y trabajadora y por traer al mundo a mis amados sobrinos Fernanda y Aaron, quienes me dan fuerza y alegría para seguir adelante.

A mi hermana Lizette González Martínez, quien siempre creyó en mí y me brindó su apoyo y amistad incondicional en todo momento, quien a pesar de las dificultades estuvo para mí, brindándome su cariño incondicional, sus sabios consejos y motivándome siempre, incluso en momentos difíciles, por ser un increíble y admirable ejemplar de fortaleza y persistencia y por enseñarme a no rendirme y luchar por mis metas.

A mi admirable mejor amiga Mayra Elizabeth Nava Tristan por su amistad y cariño incondicionales, por ser un gran apoyo y guía para mí por tantos años, quien a pesar de la distancia y el tiempo siempre está para escucharme y aconsejarme, apoyándome incondicionalmente para seguir adelante en todo momento, agradezco profundamente su invaluable amistad.

A mi sobrina Valeria Mejía Oria, quien ha sido mi amiga y compañía en momentos difíciles, quien a su corta edad me ha enseñado tanto, agradezco su confianza y la alegría que siempre me transmite.

A mi compañero y amigo de laboratorio Jesús Emmir Rosas Castelan, por su amistad, compañía y apoyo, por ser la alegría del laboratorio, agradezco profundamente los momentos tan agradables y divertidos que pasamos.

Dedicado al apoyo moral que toda mi familia me ha brindado a lo largo de mi carrera, gracias por creer siempre en mí y por alentarme en el camino. También quiero dedicar este logro a las nuevas generaciones de la familia que apenas comienzan a construir y lograr sus sueños, quiero que sepan que siempre podrán contar con mi apoyo y guía siempre que lo necesiten, quiero verlos triunfar y cumplir todos sus sueños, nada es imposible y el querer es poder, jamás se dejen vencer, persistan, resistan e insistan y sobre todo creen en ustedes mismos.

Índice general

1. Introducción.....	1
1.1. Anatomía del ovario.....	1
1.2. Fisiología del ovario.....	3
1.3. Ovogénesis y Foliculogénesis.....	5
1.4. Fisiología del envejecimiento ovárico	10
1.5. Hormona Anti-Mülleriana.....	13
1.5.1. Función de la hormona anti-Mülleriana	15
1.5.2. Receptores de AMH tipo I y II (AMHR I y II) y función.....	15
1.6. Factor de transcripción forkhead box L2 (FOXL2).....	17
1.6.1. Función de FOXL2.....	18
1.7. Enzima mitocondrial de escisión de la cadena lateral del colesterol (CYP11A1/P450scc).....	19
1.7.1 Función de Cyp11a1/P450scc.....	19
1.8. Aromatasa (CYP19A1)	20
1.8.1 Función de aromatasa (Cyp19a1)	21
2. Antecedentes.....	23
2.1. Hormona anti-Mülleriana (AMH)	23
2.1.1. El papel de AMH en el desarrollo folicular	23
2.1.2. Expresión de AMH durante el envejecimiento ovárico.....	25
2.1.3. Receptor de hormona anti-Mülleriana tipo II (AMHR-II).....	26
2.2. Aromatasa (CYP19)	28
2.2.1. El papel de la aromatasa en el ovario.....	28
2.2.2. Expresión de aromatasa durante el envejecimiento ovárico.....	29
2.2.3. Relación inversa de la AMH con la expresión de aromatasa	30
2.3. Expresión de CYP11A1 en el ovario.....	34
2.3.1 Cyp11a1 en el envejecimiento ovárico.....	36
2.4. Expresión del factor de transcripción forkhead (FOXL2) en el ovario.....	37
2.4.1. Regulación de aromatasa por Foxl2.....	38
2.4.2. Relación entre Foxl2 y AMH.....	40
2.4.3. Expresión de FOXL2 durante el envejecimiento ovárico.....	41

2.5. Envejecimiento ovárico.....	42
2.6. Conejas chinchilla (<i>Oryctolagus cuniculus</i>) como biomodelo.....	44
3. Justificación.....	45
4. Hipótesis.....	47
5. Objetivos.....	47
5.1. Objetivo general.....	47
5.2. Objetivos particulares.....	47
6. Materiales y métodos.....	48
6.1. Obtención de muestras.....	48
6.2. Histología ovárica.....	49
6.3. Tinción tricrómica de Masson.....	49
6.4. Doble Inmunofluorescencia.....	50
6.5. Extracción de RNA mediante RNeasy plus mini kit.....	52
6.6. Tratamiento con DNAsa.....	52
6.7. Integridad del RNA.....	53
6.8. Cuantificación de RNA total.....	54
6.9. Síntesis de cDNA.....	54
6.10. Estandarización de las condiciones de RT-PCR.....	55
6.11. Purificación de amplificadores para secuenciación.....	56
6.12. Ligación usando el vector pGEM-T.....	56
6.13. Transformación bacteriana.....	57
6.14. Screening (selección) de transformantes para insertos.....	59
6.15. Purificación de plásmidos.....	59
6.16. Microscopía de alta resolución.....	61
6.16.1 Inclusión en Epon.....	61
6.16.2 Obtención de cortes semifinos.....	61
6.17. Análisis estadístico mediante prueba t de Student.....	62
7. Resultados.....	63
7.1 Caracterización histológica del envejecimiento ovárico.....	63
7.2 Perfiles de expresión.....	67
7.2.1 Expresión del gen Foxl2.....	67

7.2.2	Expresión de isoformas larga y corta del gen AMHRII.....	68
7.2.3	Expresión del gen Cyp11a1.....	70
7.2.4	Expresión del gen de Aromatasa.....	72
7.3	Caracterización del envejecimiento ovárico mediante inmunofluorescencia.....	73
8.	Discusión.....	80
9.	Conclusiones.....	85
10.	Perspectivas.....	86
11.	Referencias.....	87
12.	Apéndice.....	100
12.1	Estandarización de la técnica de RT-PCR.....	100
12.1.1	Extracción de RNA total.....	100
12.1.2	Diseño de oligonucleótidos.....	101
12.2	Secuenciación e identificación de genes.....	111
12.3	Clonación de fragmentos de PCR.....	114
13.	Anexos	120
13.1	Técnica de inclusión en parafina.....	120

Índice de figuras

Figura 1.	Esquema de la anatomía del ovario humano femenino en edad reproductiva.....	2
Figura 2.	Esquema del control hormonal de la reproducción en la mujer.....	4
Figura 3.	Secuencia de maduración de los folículos en el ovario.....	10
Figura 4.	Diferenciación sexual de los tractos reproductivos.	14
Figura 5.	Localización cromosómica del gen de AMH en humano.....	14
Figura 6.	Localización cromosómica del gen del receptor de AMH tipo II (AMHR-II) en humano.....	16
Figura 7.	Localización cromosómica del gen forhead box L2 (FOXL2) en humano.....	17
Figura 8.	Localización cromosómica del gen CYP11A1 en humano.....	19
Figura 9.	Localización cromosómica del gen CYP19A1 (aromatasa) en humano.....	21
Figura 10.	Esquema de la esteroidogénesis en humano.....	22
Figura 11.	Histología del ovario de coneja de 4 meses (edad reproductora), usando la tinción tricromica de Masson.....	64
Figura 12.	Histología del ovario de conejas maduras, usando tinción Tricromica de Masson.....	65
Figura 13.	Histología de alta resolución. Cortes semifinos de ovarios de coneja en etapa reproductiva y madura.....	66
Figura 14.	Expresión de Foxl2 en ovarios de conejas en etapa reproductiva y ovarios de conejas de más de 12 meses.....	68
Figura 15.	Expresión de AMHRII en ovarios de conejas en etapa reproductiva y ovarios de conejas de más de 12 meses.....	70
Figura 16.	Expresión del gen Cyp11a1 en ovarios de conejas en etapa reproductiva y ovarios de conejas de más de 12 meses.....	71
Figura 17.	Expresión de aromatasa en ovarios de conejas en etapa reproductiva y ovarios de conejas de más de 12 meses.....	72

Figura 18. Fotomicrografías representativas de la expresión de Foxl2 y AMH por inmunofluorescencia.....	74
Figura 19. Fotomicrografías representativas de la expresión de AMH (rojo) por inmunofluorescencia.....	75
Figura 20. Fotomicrografías representativas de la expresión de Aromatasa por inmunofluorescencia	76
Figura 21. Fotomicrografías representativas de la expresión de Cyp11a1 y alfa actina por inmunofluorescencia.....	77
Figura 22. Fotomicrografías representativas de la detección de Foxl2 (verde) y AMH (rojo) por inmunofluorescencia.....	78
Figura 23. Fotomicrografías representativas de la expresión de Aromatasa (verde) por inmunofluorescencia.....	79
Figura 24. Comprobación de la integridad del RNA total extraído.....	100
Figura 25. Electroforesis de ciclos para la expresión del gen Cyp11a1 en gel de agarosa al 1% teñido con GelRed®.....	102
Figura 25.1. Curva sigmoidea de ciclos de los amplificados del gen Cyp11a1.....	102
Figura 26. Electroforesis de ciclos para la expresión del gen Cyp19 en gel de agarosa al 1% teñido con GelRed®.....	103
Figura 26.1. Curva sigmoidea de ciclos de los amplificados del gen Cyp19.....	103
Figura 27. Electroforesis de gradiente de temperatura para la expresión del gen Foxl2 en gel de agarosa al 1% teñido con GelRed®.....	105
Figura 28. Electroforesis de curva de ciclos para la expresión del gen Foxl2 en gel de agarosa al 1% teñido con GelRed®.....	105
Figura 28.1. Curva sigmoidea de ciclos de los amplificados del gen Foxl2.....	106
Figura 29. Electroforesis de gradiente de temperatura para la expresión del gen AMHRII en gel de agarosa al 2% teñido con GelRed®.....	108
Figura 30. Electroforesis de curva de ciclos para la expresión del gen AMHRII en gel de agarosa al 2% teñido con GelRed®.....	109

Figura 30.1. Curva sigmoidea de ciclos de los amplificadores del gen AMHRII.....	109
Figura 31. Electroforesis de curva de ciclos para la expresión del gen HPRT en gel de agarosa al 1% teñido con GelRed®.....	110
Figura 31.1. Curva sigmoidea de ciclos de los amplificadores del gen HPRT.....	110
Figura 32. Electroferograma de secuenciación del gen Foxl2.....	113
Figura 33. Alineamiento para identificación de la secuencia del gen Foxl2.....	114
Figura 34. Electroferograma de secuenciación del gen AMHRII fragmento corto de 474 pb.....	116
Figura 35. Electroferograma de secuenciación del gen AMHRII fragmento largo de 551 pb.....	117
Figura 36. Alineamiento para la identificación de la secuencia del gen AMHRII del fragmento corto.....	118
Figura 37. Alineamiento para la identificación de la secuencia del gen AMHRII del fragmento largo.....	119

Glosario

Andrógenos: Hormonas sexuales esteroideas masculinas cuya función es estimular el desarrollo de los caracteres sexuales masculinos (Nef y Parada, 2000).

Aromatasa: Enzima que cataliza la conversión de andrógenos a estrógenos (Bulun et al., 2003).

Atresia folicular: Es el proceso por el cual los folículos ováricos se degeneran (Carlson, 2014).

Células de la granulosa: Células de soporte para el gameto femenino en desarrollo en el ovario. Derivan de las células epiteliales celómicas de la cresta gonadal (Edson et al., 2009).

Células de la teca: Células que conforman a los folículos ováricos, que tienen un papel esencial en la fertilidad por la producción de sustrato androgénico requerido para la biosíntesis de estrógenos ováricos (Edson et al., 2009).

Células germinales: Células precursoras de los gametos: óvulos y espermatozoides en organismos que se reproducen sexualmente (Carlson, 2014).

Colesterol: molécula esteroidea, formada por cuatro anillos hidrocarbonados más una cadena alifática de ocho átomos de carbono en el C-17 y un OH en el C-3 del anillo, el cual es precursor de las cinco clases principales de hormonas esteroideas: progestágenos (progesterona), glucocorticoides (cortisol/corticosterona), mineralocorticoides (aldosterona), andrógenos (testosterona) y estrógenos (estradiol) (Miller y Bose, 2011).

Conductos de Müller: Conductos paramesonérficos precursores de las trompas de Falopio, útero, cérvix y los dos tercios superiores de la vagina (Carlson, 2014).

Cromosoma: Es una estructura conformada por cromatina asociada a proteínas histonas y no histonas, que se encuentra en su máximo grado de compactación al interior del núcleo de las células eucariotas (Jiménez y Nuño, 2013).

Cuerpo lúteo: Estructura que surge a partir del folículo preovulatorio cuando el ovocito sale del folículo y se considera la fase final del proceso de foliculogénesis (Carlson, 2014).

Cyp11a1: Enzima que cataliza la conversión de colesterol a pregnenolona (NCBI, 2017).

Embrión: primeras etapas del desarrollo de un ser vivo, producto de la fecundación de un ovocito por un espermatozoide (Carlson, 2014).

Esterilidad: incapacidad de concebir un embarazo, después de un año de mantener relaciones sexuales sin protección (Villa y Colin, 2012).

Esteroidogénesis: Conjunto de reacciones metabólicas que hacen posible la síntesis de hormonas esteroideas en un determinado órgano o tejido (Miller y Auchus, 2011).

Estro: Periodo del ciclo sexual que implica un estado de excitación sexual en las hembras de la mayoría de los mamíferos, exceptuando a los humanos, que inmediatamente precede a la ovulación y durante la cual las hembras son más receptivas al apareamiento (Esbenshade, 2001).

Estrógenos: Hormonas sexuales esteroideas femeninas derivadas del colesterol (estrón y estradiol), producidos por los ovarios, la placenta durante el embarazo y, en menores cantidades, por las glándulas adrenales, esenciales en el crecimiento y desarrollo de las características sexuales secundarias femeninas como los senos, el vello púbico y de las axilas, y la regulación del ciclo menstrual y el sistema reproductivo (Drummond, 2006).

Estroma: Tejido conjuntivo que constituye la matriz de un órgano y sostiene los elementos celulares que lo conforman (Fernández, 2010).

Exón: Región de un gen que no son separadas durante el proceso de splicing y, por tanto, se mantienen en el ARN mensajero maduro y que codifican una proteína (Jiménez y Nuño, 2013).

Fecundación: proceso por el cual dos gametos (masculino y femenino) se fusionan durante la reproducción sexual para crear un nuevo individuo con un genoma derivado de ambos progenitores (Williams, 2012).

Fecundidad: Capacidad de una hembra para concebir y llevar a cabo un embarazo a término, dependiendo de factores de susceptibilidad (menarca, menopausia, anovulación y esterilidad patológica), y factores como la duración de los ciclos ováricos, proporción de ciclos ovulatorios, duración del período fértil, y probabilidad de concepción de una sola inseminación en el período fértil (Williams, 2012).

Fertilidad: Capacidad natural de producir gametos sanos con fines reproductivos, la cual comienza a disminuir alrededor de los 25-30 años de edad en las mujeres, propiciando a su vez la incapacidad de concebir un embarazo y aumentando el riesgo de la pérdida fetal por el avance de la edad materna avanzada (Villa y Colin, 2012).

Foliculogénesis: Proceso de maduración de los folículos ováricos (Carlson, 2014).

Folículo ovárico: Unidad fisiológica fundamental del ovario. Constituida por una célula sexual femenina (ovocito) rodeada por capas de células de la granulosa, y células de la teca dependiendo del estado de desarrollo en que se encuentre (Carlson, 2014).

Foxl2: Factor de transcripción central en la embriogénesis, el desarrollo del ovario y el crecimiento y maduración de folículos ováricos (NCBI, 2017).

Gestación: En mamíferos es el periodo de tiempo entre la concepción y el nacimiento, durante el cual el embrión o feto se desarrollan en el útero (Carlson, 2014).

Glándula: Grupo de células u órgano especializados que sintetizan sustancias químicas que regulan determinadas funciones en el organismo, y se clasifican en endócrinas y exócrinas (Silverthorn et al., 2009).

Glándula intersticial: Conjunto de células especializadas que derivan de la teca interna y elementos del estroma circundante de los folículos atrésicos, la cual se hipertrofia y vasculariza, considerada el tejido esteroideogénico más abundante del ovario (Mossman et al., 1964).

Gónada: Glándulas sexuales femeninas (ovario) o masculinas (testículos) productoras de gametos o células sexuales y secretoras de hormonas sexuales: estrógenos y progesterona en la mujer y andrógenos (progesterona) en el hombre (Carlson, 2014).

Gonadotropinas: Hormonas secretadas por la hipófisis anterior de la glándula pituitaria, que actúan sobre las gónadas (ovarios o testículos) favoreciendo el crecimiento normal, desarrollo sexual y la reproducción. Las gonadotropinas humanas son: la hormona foliculoestimulante (FSH) y la hormona luteinizante (LH) que se producen en la hipófisis y la gonadotropina coriónica (hCG) que es producida por la placenta en mujeres (Silverthorn et al., 2009).

Hipófisis: Glándula de secreción interna del organismo que se encarga de controlar la actividad de otras glándulas y de regular determinadas funciones del cuerpo, como el desarrollo o la actividad sexual (Silverthorn et al., 2009).

Hipotálamo: Parte del encéfalo situada en la zona central de la base del cerebro que controla el funcionamiento del sistema nervioso y la actividad de la hipófisis (Silverthorn et al., 2009).

Hormona anti-Mülleriana: Glicoproteína dimérica que inhibe el desarrollo de los conductos de Müller en el embrión masculino, producida por las células de Sertoli inmaduras y células de la granulosa ováricas postnatales (NCBI, 2017).

Inmunolocalización: Método para detectar la presencia o expresión de proteínas utilizando anticuerpos específicos como marcadores (Frugier y Crespi, 2006).

Isoforma: Es una de las distintas formas de la misma proteína. Pueden ser generadas por genes relacionados, o podrían generarse por el mismo gen a través del proceso de splicing alternativo, o maduración diferencial (Jiménez y Nuño, 2013).

Meiosis: Proceso de división celular, propio de las células reproductoras, en el que se reduce a la mitad el número de cromosomas (Carlson, 2014).

Menopausia: cese natural y permanente de la menstruación y la ovulación dependiente de la edad debido a la falla ovárica, la cual ocurre después de 12 meses de ausencia de

menstruación (amenorrea), y en promedio a una edad de 51 años en mujeres (Atkins et al., 2014).

Mesovario: Pliegue membranoso, cubierto por peritoneo, que rodea y sujeta al ovario (Fernández, 2010).

Mitosis: Proceso que ocurre en el núcleo de las células eucariotas, consistente en el reparto equitativo del material hereditario característico. Ocurre en células somáticas y concluye con la formación de dos núcleos separados, seguido de la separación del citoplasma, para formar dos células hijas genéticamente iguales (Carlson, 2014).

Ovario: Órgano sexual femenino que cumple con la función de producir ovocitos y como glándula endócrina mediante la secreción de hormonas esteroideas (estrógenos y progesterona) (Carlson, 2014).

Ovocito: Célula germinal femenina que se divide por meiosis, precursora del óvulo (Estrada y Uribe, 2002).

Ovogénesis: Proceso de formación de las células sexuales femeninas, desde la ovogonia hasta el óvulo (Estrada y Uribe, 2002).

Ovogonia: Células germinales femeninas, las cuales proliferan por mitosis, precursoras de los ovocitos (Estrada y Uribe, 2002).

Ovulación: Liberación natural de un ovocito maduro del ovario que viaja por la trompa de Falopio adyacente, en donde puede ser fecundado por un espermatozoide. La ovulación generalmente dura un día y ocurre a la mitad del ciclo menstrual de una mujer (Mehlmann, 2005).

Pregnenolona: Hormona esteroidea involucrada en la esteroidogénesis. Es el primer y principal metabolito del colesterol en la esteroidogénesis (Miller y Bose, 2011).

Progesterona: hormona esteroide involucrada en el ciclo menstrual femenino, el embarazo y la embriogénesis, tanto en los seres humanos como en otras especies. Su fuente principal son el ovario (cuerpo lúteo) y la placenta (Miller y Bose, 2011).

Proliferación celular: Aumento del número de células como resultado del crecimiento y la multiplicación celular (Carlson, 2014).

Resumen

El ovario es un órgano endócrino capaz de producir ovocitos cuya viabilidad para desarrollar embriones normales disminuye con la edad. A lo largo de la vida reproductiva, el ovario presenta cambios estructurales y endócrinos en cada ciclo menstrual. La producción de hormonas esteroides que regulan la función reproductiva y el metabolismo de la mujer y de los ovocitos, depende de la reserva folicular conformada por los folículos primordiales con potencial de crecimiento y maduración. Algunos folículos responden al estímulo de las gonadotropinas y producen estrógenos durante la primera mitad del ciclo menstrual. La disminución de la reserva folicular lleva a la pérdida de la capacidad reproductiva y desaparición de la actividad cíclica del sistema endócrino dependiente del ovario.

Aunque existen numerosos estudios sobre los cambios morfológicos, estructurales y fisiológicos durante el desarrollo ovárico hasta la etapa reproductiva, las modificaciones que ocurren durante el envejecimiento permanecen poco estudiadas.

Existe gran interés en conocer mejor la función del ovario durante el proceso de envejecimiento por su relevancia clínica. Actualmente se pueden diseñar estrategias que permiten analizar la reactivación metabólica de los ovocitos de mujeres añosas *in vitro*.

En el presente estudio se empleó como sistema modelo de estudio al conejo, especie en la que Alfred Jost estableció el paradigma clásico de la diferenciación sexual en mamíferos en 1947. El ovario del conejo representa un buen modelo alternativo al ratón por su patrón de desarrollo y sus características histológicas similares al humano.

En el presente estudio se observó que el agotamiento de la reserva folicular demuestra ser un factor determinante en el proceso del envejecimiento ovárico, así como la expresión de los genes *Foxl2*, *AMH*, *AMHRII*, *Cyp11a1* y *Cyp19* durante dicho proceso. La expresión de *Foxl2* en células de la granulosa se observa durante todo el proceso del desarrollo folicular, presentando mayor intensidad en folículos primarios, y tiende a disminuir gradualmente en folículos ováricos al avanzar la edad, pero en el ovario

mantiene una expresión relativamente constante durante el proceso del envejecimiento ovárico. La expresión de AMH en células de la granulosa comienza a expresarse en folículos preantrales, aumentando en folículos antrales tempranos y avanzados y posteriormente disminuye gradualmente en dichos folículos al avanzar la edad, del mismo modo su receptor AMHRII también tiende a disminuir en el ovario. La expresión de aromatasa inicia en la fase folicular antral temprana y aumenta en folículos antrales avanzados y a medida que se da el avance de la edad disminuye gradualmente. Cyp11a1 que se expresa en células de la teca interna a partir de la fase antral temprana aumenta en folículos antrales avanzados y disminuye gradualmente en dichos folículos al avanzar la edad, sin embargo, a diferencia de Foxl2, AMH, AMHRII y aromatasa, la expresión de esta enzima tiende a incrementar gradualmente en el ovario, específicamente en la glándula intersticial, la cual tiende a crecer durante el proceso del envejecimiento ovárico.

Con los resultados obtenidos a partir de estos experimentos, concluimos que los genes Foxl2, AMH, AMHRII, Cyp11a1 y aromatasa también influyen en el proceso del envejecimiento ovárico, como el agotamiento de la reserva folicular y el decremento en la calidad del ovocito, sin embargo, aún es necesario integrar los mecanismos moleculares de dichos genes que conllevan al envejecimiento ovárico, así como profundizar en el funcionamiento de la glándula intersticial y la expresión de Cyp11a1 en dicho proceso de envejecimiento.

El presente estudio brinda información que puede servir de base para profundizar en el estudio del proceso del envejecimiento ovárico, permitiendo así conocer o descubrir nuevos factores involucrados en el deterioro de la función ovárica y con ello palntear nuevas alternativas terapéuticas para el diagnóstico y tratamiento de la baja fertilidad o infertilidad femenina.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 ANATOMÍA DEL OVARIO

El sistema genital femenino está integrado por los órganos genitales femeninos internos y externos. Los órganos internos comprenden dos glándulas sexuales: los ovarios, las trompas uterinas (tubas uterinas o salpinges), el útero (en donde se implanta y desarrollo el embrión) y la vagina. Mientras que los órganos externos están conformados por la vulva, junto con sus órganos anexos (Latarjet y Ruiz, 2004).

Los ovarios son los órganos de la reproducción encargados de la producción de los ovocitos; tienen una configuración ovalada, alargada o irregular de color grisáceo, en las mujeres, tiene una longitud de 2.5 a 4.5cm y un espesor de 0.5 a 1 cm el cual puede depender del momento fisiológico en el que se encuentre la mujer (Holesh y Lord, 2017; Estrada y Uribe, 2002). Están alojados en la pelvis, fijados a la superficie posterior del ligamento ancho por medio de un pliegue peritoneal denominado mesovario, a través del cual entran los vasos sanguíneos, linfáticos y nervios que, con otras estructuras fibromusculares, mantienen el ovario en posición a la entrada de las trompas de Falopio y unido al útero (Fernández-Tresguerres, Ariznavarreta, Cachofeiro, Cardinali, Escrich, Gil-Loyzaga, Lahera, Mora, Romano, Tamargo, 2010). Cada ovario está unido al útero por su ligamento uterino ovárico, y a la pared lateral pélvica por el ligamento infundíbulo-pélvico. Su superficie es lisa antes de la pubertad, pero, a partir de la maduración de los ovocitos y su salida cíclica del ovario (ovulación) va presentando una superficie irregular. En la menopausia, con el cese de las ovulaciones, tiende a volverse liso (Holesh y Lord, 2017).

Cada ovario está rodeado por una fina capa de tejido constituido por epitelio cúbico simple o epitelio germinal. Inmediatamente por debajo se encuentra la corteza, que se condensa en la periferia formando la albugínea falsa del ovario y, por dentro de ésta, la corteza de tejido conectivo o estroma ovárico que alberga los folículos ováricos en distinto estado de maduración y degeneración (Fernández, 2010).



La zona central del ovario es la médula, compuesta por tejido conectivo fibroelástico laxo con vasos sanguíneos, linfáticos y nervios que penetran por un punto de anclaje llamado hilum que conecta el ovario con el mesovario a través del ligamento lumboovárico (Cordova, 2003).

De todas las regiones, la corteza es la más importante ya que contiene como estructuras fundamentales los folículos ováricos, los cuales son estructuras constituidas por una célula sexual femenina (ovocito, precursor del óvulo) rodeadas de una o más capas de células foliculares, de origen epitelial. En el ovario de una mujer adulta se encuentran folículos en diferentes etapas de maduración, ya que estos pasan por etapas de desarrollo cada mes, con el objetivo de madurar para liberar al ovocito con el propósito de fertilización y reproducción. Si el folículo no alcanza su desarrollo completo y no libera al ovocito, degenera en cualquier punto del desarrollo folicular (Fernández, 2010; Cordova, 2003).

Los ovarios cumplen con otra función, la cual es la de ser glándulas endócrinas productoras de estrógenos y progesterona, que son las hormonas responsables del desarrollo de los caracteres sexuales secundarios y del mantenimiento del embarazo (Moor, Dailey, Agur, 2013).

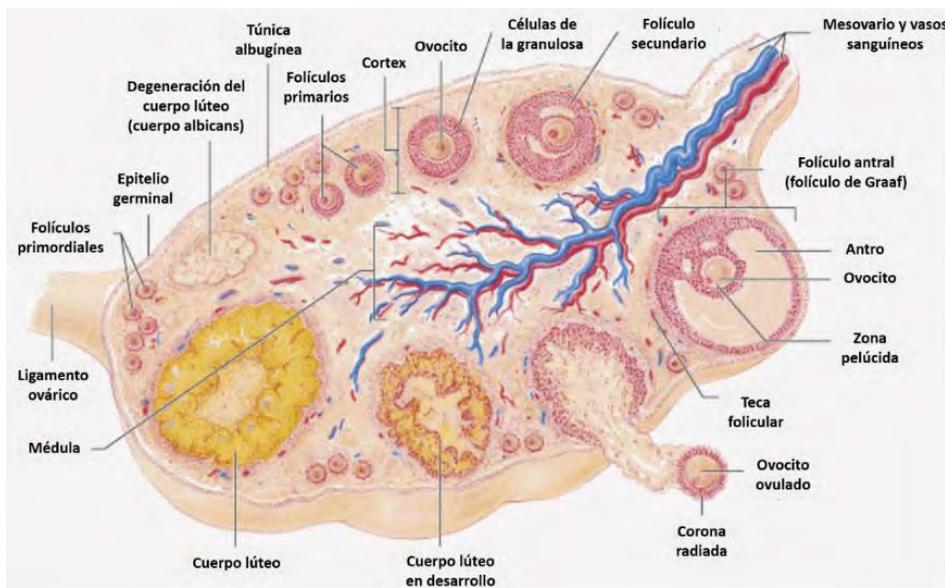


Figura 1. Esquema de la anatomía del ovario humano femenino en edad reproductiva. Tomada y modificada de Benjamin Cumming 2001, una impresión de Addison Wesley Longman, Inc.

1.2 FISIOLÓGÍA DEL OVARIO

Un aspecto importante de la capacidad reproductiva en las mujeres es su actividad cíclica, una característica notablemente reflejada en el crecimiento y desarrollo de los folículos dominantes. Normalmente, los ovarios humanos producen un único folículo dominante que resulta en una sola ovulación por cada ciclo menstrual. El folículo dominante es responsable de la producción de estradiol durante la fase folicular del ciclo. Después de la ovulación, el folículo dominante se transforma en el cuerpo lúteo, que secreta grandes cantidades de progesterona durante la fase lútea del ciclo menstrual. El estradiol y la progesterona actúan sobre el útero para prepararlo para la implantación del embrión humano. Por lo tanto, para comprender el ciclo menstrual y la fertilidad femenina, es necesario comprender el ciclo de la vida del folículo dominante y cómo se controla (Williams y Erickson, 2012).

El ciclo menstrual es un proceso que resulta de varias interacciones entre las hormonas producidas por el hipotálamo, la hipófisis y los ovarios; este proceso se divide en dos fases, la fase folicular o proliferativa y la fase lútea o secretora, lo cual se puede apreciar en la figura 1. La duración media de un ciclo menstrual es de 28 días o bien entre 25 y 30 días en humano (Reed y Carr, 2017).

Para regular el transcurso de la vida reproductiva femenina se requiere de la influencia de las hormonas reproductoras, las cuales interaccionan con los tejidos ováricos induciendo así cambios en los ovarios. Inicialmente el hipotálamo segrega la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH) que estimula la hipófisis anterior para secretar tanto la hormona foliculoestimulante (FSH) como la hormona luteinizante (LH) (figura 2). Los niveles y el momento de la secreción de cada gonadotropina se correlacionan con la GnRH, la retroalimentación de las hormonas esteroides sexuales y otros factores autocrinos y paracrinos, como la inhibina A y B y la activina. Las gonadotropinas estimulan el ovario para producir hormonas esteroides: estrógenos o progesterona, así como varios péptidos clave autocrinos, parácrinos y endócrinos (Carlson, 2014; Hawkins y Matzuk, 2008).



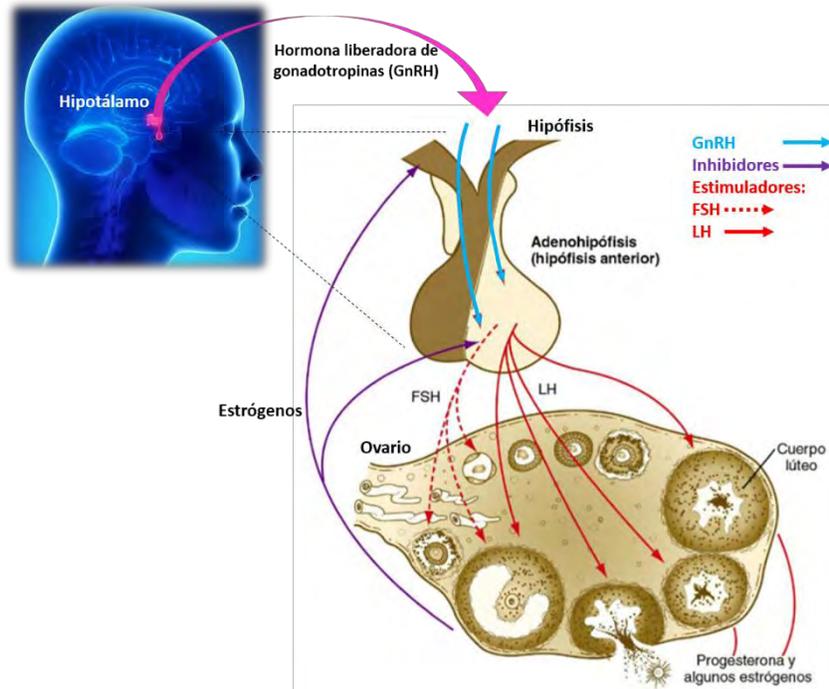


Figura 2. Esquema del control hormonal de la reproducción en la mujer. Los factores inhibidores son indicados por flechas moradas. Los factores estimuladores se indican con flechas rojas. Las hormonas implicadas principalmente en la fase proliferativa del ciclo menstrual están representadas por líneas discontinuas y las que intervienen sobre todo en la fase secretora por líneas continuas. FSH: hormona foliculoestimulante; LH: hormona luteinizante. Tomada y modificada de Carlson Bruce M., 5ta edición, 2014. Elsevier, Inc.

La secreción de FSH y LH desde la hipófisis anterior, antes y durante el periodo menstrual femenino inducen la selección de una corte de folículos ováricos, los cuales comienzan a madurar y secretar 17β -estradiol. Al llegar a la ovulación, la mayoría de los folículos seleccionados inicialmente sufren atresia, favoreciendo la producción de estrógenos requeridos para la ovulación y de ser el caso, la fecundación; solo uno de los folículos inducidos a la maduración continúa su crecimiento hasta llegar a la ovulación. Una vez que se produce la menstruación, los niveles de FSH disminuyen debido a la retroalimentación negativa de los estrógenos y los efectos negativos de la inhibina B producida por el folículo en desarrollo. La FSH activa la enzima aromatasa en las células de la granulosa, que convierte a los andrógenos en estrógenos. La disminución en los niveles de FSH propicia un microambiente androgénico dentro de los folículos adyacentes al folículo dominante en crecimiento, cuyas células de la granulosa secretan una variedad de péptidos importantes para la inhibición del desarrollo de los folículos adyacentes (Reed y Carr, 2017; Carlson, 2014).

La producción de estrógenos del ovario aumenta durante la fase preovulatoria o proliferativa induciendo así la proliferación progresiva del estroma endometrial. Al final del periodo proliferativo aumentan los niveles de estradiol secretado por el folículo ovárico en crecimiento, lo cual a su vez induce al sistema hipotálamo-hipofisiario, propiciando un aumento de la respuesta de la hipófisis anterior a la GnRH y un aumento en la secreción hipotalámica de esta hormona. A las 24 horas posteriores a la máxima secreción de 17β -estradiol en la sangre, la hipófisis envía un pico preovulatorio de LH y FSH a la corriente sanguínea (Carlson, 2014; Hawkins y Matzuk, 2008).

La LH induce la ovulación, y la envoltura de células foliculares del folículo preovulatorio o de De Graaf se transforman en un cuerpo lúteo. Mediante proliferación e hipertrofia, estas células experimentan significativos cambios estructurales y bioquímicos, generando así la secreción de progesterona. El cuerpo lúteo aún secreta estrógenos. En el útero, la progesterona prepara el endometrio estimulado por los estrógenos para la implantación del embrión (Carlson, 2014).

Si no se produce el embarazo, las interacciones hormonales desencadenan el final del ciclo menstrual. Uno de los mecanismos iniciales es la producción de la proteína inhibina por parte de las células de la granulosa. La inhibina es transportada por el torrente sanguíneo hasta la hipófisis anterior, donde inhibe de forma directa la secreción de gonadotropinas, en especial FSH. Esta inhibición induce la regresión del cuerpo lúteo y una reducción de la secreción de progesterona por parte del ovario, causando una isquemia local que causa una hemorragia local y pérdida de integridad de áreas del endometrio. Estos cambios inician la menstruación (1 a 5 días del ciclo menstrual) (Reed y Carr, 2017; Carlson, 2014).

1.3 OVOGÉNESIS Y FOLICULOGÉNESIS

Durante la foliculogénesis se desarrollan el ovocito y las células foliculares, así como el tejido conjuntivo que rodea al folículo el cual organiza las tecas, una de ellas interna (vascularizada), que contiene abundantes vasos sanguíneos y otra externa (fibrosa) con



abundantes fibras de colágeno, que intervendrán en el equilibrio hormonal que controla la ovogénesis (Estrada y Uribe, 2002).

El proceso de foliculogénesis ocurre dentro de la corteza del ovario. La foliculogénesis puede considerarse como un proceso de alcanzar sucesivamente niveles más altos de organización por medio de la proliferación celular y la citodiferenciación.

De manera que el crecimiento y desarrollo folicular puede ser dividido en dos fases:

- I) La fase preantral, la cual se divide en tres: folículo primordial, primario, y secundario. Durante la foliculogénesis preantral, la comunicación bidireccional compleja entre el ovocito y los compartimentos somáticos de los folículos se hacen más evidentes. Aunque el ovocito depende de las células somáticas que lo rodean para apoyar su crecimiento y desarrollo, la tasa de desarrollo folicular es críticamente dependiente del ovocito (Edson, 2009).
- II) La fase antral que comprende al folículo secundario antral que responde al estímulo de FSH y al folículo terciario o preovulatorio.

A continuación, describiremos los eventos que conllevan a la formación de los folículos preantreales.

Durante la cuarta semana de gestación, las células germinales primordiales que se originan en la región caudal del epiblasto migran hacia cresta gonadal, donde se diferenciarán como ovogonias, las cuales se caracterizan por proliferar por mitosis e incrementar en número, hasta llegar a aproximadamente 7 millones en el ovario humano. Hacia el tercer mes de gestación las ovogonias dejan de proliferar e inician un proceso de división reduccional: la meiosis I, en este momento reciben el nombre de ovocitos primarios, los cuales se mantiene rodeados de células somáticas planas, llamadas células foliculares, constituyendo así al folículo primordial. Esto representa la primera etapa de la foliculogénesis, y tiene lugar durante la segunda mitad del desarrollo fetal en humanos y en los días inmediatamente posteriores al nacimiento en ratones. En mamíferos, la población de folículos primordiales sirve como una reserva finita y en



reposo de ovocitos disponibles para la vida reproductiva femenina y generalmente permanecen quiescentes por años. Los folículos primordiales contienen el ovocito que eventualmente será ovulado, sometido a fecundación y que probablemente formará un embrión (Edson et al, 2009).

La entrada de un folículo primordial detenido en el grupo de folículos en crecimiento se denomina reclutamiento o activación folicular primordial el cual se caracteriza por la transformación de células foliculares planas a cúbicas (Williams y Erickson, 2012). En la foliculogénesis, a medida que se configura el folículo primario aparece una membrana prominente, translúcida y acelular entre el ovocito primario y las células foliculares que lo envuelven, llamada zona pelúcida. Las microvellosidades que conectan estos dos componentes se mantienen a través de dicha zona pelúcida, la cual contiene receptores para los espermatozoides y otros factores que son importantes para la fecundación y los primeros estadios del desarrollo embrionario después de la misma (Carlson, 2014).

Una vez que el folículo alcanza dos capas de células de la granulosa, una capa adicional morfológicamente distinta de células somáticas, la teca, se diferencia como la capa más externa del folículo. Las células de la capa interna de la teca, que se forma justo afuera de la membrana basal que rodea las células de la granulosa, tienen características ultraestructurales, incluyendo numerosas mitocondrias con crestas tubulares, retículo endoplasmático liso y abundantes vesículas lipídicas, que se corresponden con su función principal como fuente de andrógenos para que las células vecinas de la granulosa los conviertan en estrógenos. La teca externa, compuesta por fibroblastos, células de músculo liso y macrófagos, es importante durante la ovulación. Las células que constituyen a la teca se diferencian de las células precursoras mesenquimales presentes en el estroma ovárico, adyacentes a los folículos en desarrollo. Al igual que la foliculogénesis preantral, la formación de la teca es independiente de gonadotropina porque las células precursoras carecen de receptores de LH. Sin embargo, al formarse una capa de la teca interna discernible, la LH controla principalmente la producción de andrógenos de las células tecaes (Edson, 2009).



De los millones de folículos presentes antes del nacimiento, solo aproximadamente 400,000 folículos permanecen hasta el comienzo de la pubertad detenidos en fase de diploteno de la primera división meiótica y posteriormente cientos desaparecen cada mes, incluso durante los periodos en que no hay ovulaciones, como en el embarazo y el uso de anticonceptivos orales (Velde y Pearson, 2002). La maduración inicial del folículo primordial en reposo al folículo preovulatorio de De Graaf toma varios meses. La mayoría de los folículos entran en atresia en alguna fase del proceso de maduración.

De una vida reproductiva normal de la mujer, alrededor de 300 a 500 ovocitos maduran, uno por cada ciclo menstrual. Durante el crecimiento folicular, las células somáticas se dividen para formar varias capas, el ovocito es agrandado y comienzan a formarse pequeñas cavidades llenas de líquido folicular que se agregan para formar el antro folicular (Gougeon, 1996; Mehlmann, 2005). Algunos folículos en etapa antral temprana son “reclutados” para continuar creciendo; ahora este crecimiento es dependiente de la gonadotropina pituitaria, la hormona folículo estimulante (FSH, por sus siglas en inglés, follicle stimulating hormone). Durante esta fase, el antro divide las células de la granulosa en dos compartimentos separados: las células de la granulosa mural que forman las capas externas, mientras que las células del cumulus rodean el ovocito. El ovocito crece hasta su tamaño completo (~75 μm de diámetro en el ratón, ~100 μm en el humano), pero permanece detenido en la profase I (Pincus y Enzmann, 1935). Si un ovocito es extraído de un folículo antral, reanuda espontáneamente la meiosis y progresa a segunda metafase. Esto indica que las células del folículo mantienen al ovocito en arresto en profase (Mehlmann, 2005).

La primera división meiótica del ovocito sólo se completa cuando el folículo llega a su máximo desarrollo, y continúa la meiosis hasta la telofase I. Un grupo de cromosomas permanece en el ovocito, mientras los otros son segregados en el primer cuerpo polar. Con la terminación de la primera división, el número de cromosomas es reducido a la mitad. Ahora el ovocito secundario avanza hasta la metafase de la segunda meiosis, momento en el que será liberado para su posible fertilización. La ovulación, la cual es inducida en respuesta al incremento de la hormona luteinizante (LH, por sus siglas en



inglés, luteinizing hormone) proveniente de la glándula pituitaria durante el estro o a la mitad del ciclo, poco antes de la ovulación (Estrada y Uribe, 2002; Mehlmann, 2005; Sükür, Kıvançlı, Özmen, 2014). El resto de los ovocitos primarios degeneran sin abandonar el ovario, aunque muchos de ellos experimentan un cierto desarrollo antes de convertirse en atrésicos (Holesh y Lord, 2017; Carlson, 2014) (Figura 3).

En los primates, como en la mayoría de los mamíferos, cuando el folículo adquiere una única cavidad antral, las células de la granulosa al borde de la membrana basal pierden su estructura cuboidal y adquieren una apariencia columnar, mientras que las células de la granulosa restantes permanecen cuboidales. En los humanos y monos, los folículos pasan de un estado preantral a antral temprano a un diámetro folicular entre 180 y 250 μm . A través de la acumulación de fluido en la cavidad antral y proliferación de las células de la granulosa y de la teca interna, los folículos progresan a través de estados subsecuentes de desarrollo, hasta alcanzar un tamaño de 2mm aproximadamente (Gougeon, 1996).

En conjunto, el desarrollo de un folículo secundario primario a uno maduro requiere aproximadamente 290 días o 10 ciclos menstruales regulares. La fase antral es típicamente dividida en cuatro etapas: las etapas foliculares pequeña, media, grande y preovulatoria o folículo de Graaf. Después de que se produce la formación del antro en una etapa pequeña (~ 0.4 mm de diámetro), la velocidad de crecimiento folicular se acelera. El intervalo de tiempo entre la formación del antro y el desarrollo de un folículo preovulatorio de 20 mm es de aproximadamente 60 días o cerca de 2 ciclos menstruales. Un folículo dominante es seleccionado de un conjunto de folículos al final de la fase lútea del ciclo (Williams y Erickson, 2012).

Una vez culminada la liberación de un óvulo, las células de la granulosa y de la teca del folículo roto experimentan una diferenciación terminal a células luteinizantes, creando así el cuerpo lúteo, el cual es esencial para establecer y mantener el embarazo en caso de efectuarse, esto mediante la secreción de progesterona, y en caso de no ser así, el



cuerpo lúteo se degenera formando el cuerpo blanco o albicans (Rimon-Dahari, Yerushalmi-Heinemann, Alyagor, Dekel, 2016).

El proceso de desarrollo folicular descrito se muestra en la siguiente figura.

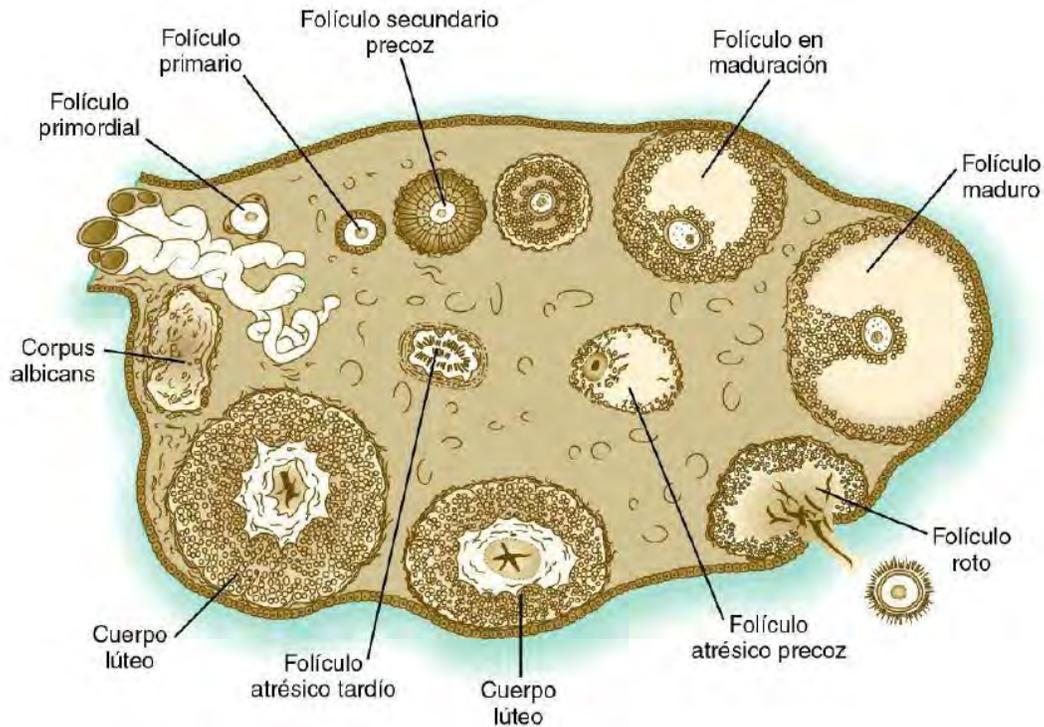


Figura 3. Secuencia de maduración de los folículos en el ovario, comenzando por el folículo primordial y terminando con la formación de un corpus albicans. Tomada de Carlson Bruce M., 5ta edición, 2014. Elsevier, Inc.

1.4 FISIOLÓGÍA DEL ENVEJECIMIENTO OVÁRICO

El tamaño del conjunto de folículos primordial preestablecido perinatalmente y la tasa de agotamiento folicular después del nacimiento determina la duración de la fertilidad femenina. En los ratones, todo el conjunto de células germinales disponible para la mujer se establece cuando las células pregranulosas recubren a los ovocitos para la formación de folículos primordiales. Periódicamente, varios folículos primordiales entran en una fase de maduración o reactivación folicular que se caracteriza por la proliferación de células de la granulosa y el crecimiento de los ovocitos (Uhlenhaut y Treier, 2006).

Grupos de folículos primordiales crecen hasta la fase de folículos secundarios preantrales por una regulación intraovárica, independiente del eje hipotálamo-hipófisis (Edson et al., 2009). Al llegar a la pubertad, se establece el eje hipotálamo-hipófisis-gónada y el crecimiento y maduración de los folículos antrales tempranos dependerá en gran medida del estímulo de la hormona folículo estimulante secretada por la adenohipófisis.

El envejecimiento ovárico resulta en fallo ovárico y menopausia, y los primeros signos de dicho envejecimiento ovárico son el fallo de una adecuada respuesta a la estimulación ovárica, seguido por la irregularidad y la pérdida de las funciones foliculares. El periodo entre el primer ciclo menstrual irregular y la menopausia es aproximadamente constante 6 años y es independiente de la edad de la menopausia.

En el envejecimiento reproductivo humano se asume que el proceso fisiológico de este proviene de la disminución de la cantidad y calidad de los ovocitos de la reserva folicular en la corteza ovárica, lo cual a su vez depende de la edad (Sükür et al., 2014; Velde y Pearson, 2002). Este proceso de reducción de ovocitos es acelerado con el envejecimiento e incrementa especialmente después de los 38 años. La fecundidad mensual decrece aproximadamente a la edad de 30 años.

La línea de tiempo reproductiva para las mujeres es compleja. Una mujer nace con una reserva de ovocitos de los cuales dispondrá a lo largo de su vida reproductiva, donde solo 400 a 500 se ovulan (Liu, Case, Cheung, Sierra, AlAsiri S, Carranza-Mamane B, Case A, Dwyer C, Graham J, Havelock J, Hemmings R, Lee F, Liu K, Murdock W, Senikas V, Vause TD, Wong BC, 2012), y a medida que disminuye tanto el número de ovocitos como su calidad, el ciclo menstrual de una mujer se acorta, aumenta la infertilidad y la irregularidad menstrual comienza alrededor de 6 a 7 años antes de la menopausia. El avance de la edad disminuye la capacidad de una mujer para concebir y mantener un embarazo sano. Cuando es menor de 30 años, las posibilidades de concebir de una mujer pueden ser del 71% ya que la viabilidad de un ovocito joven es mayor; sin embargo, cuando tiene más de 36 años dicha viabilidad decrece y las posibilidades de concebir

disminuyen hasta un 41% (Mutsaerts, Groen, Huiting, Kuchenbecker, Sauer, Land, Stolk, Hoek, 2012).

La primera pero inconsistente señal del proceso de envejecimiento reproductivo es el acortamiento de 2 a 3 días del ciclo menstrual (Treloar, Boynton, Behn, Brown, 1967). La transición a la menopausia es definida como un estado de envejecimiento ovárico y comienza aproximadamente a la edad de 46 años. El último periodo menstrual es esperado aproximadamente a la edad de 51 años (en un rango de 40 a 60 años) y es considerado como consecuencia fisiológica del envejecimiento ovárico (Broekmans, Knauff, te Velde, Macklon, Fauser, 2007; Treloar et al., 1967). Se piensa que el control genético es importante y que los factores ambientales influyen en la determinación de la edad natural de menopausia. Durante la vida reproductiva, la duración de un ciclo menstrual regular es típicamente de 28 días. El incremento temprano en los niveles de FSH folicular antes del comienzo de la irregularidad menstrual durante el periodo de transición a la menopausia podría indicar una disminución del número de folículos. Durante la transición al periodo de la menopausia, el ciclo menstrual empeora aún más debido a la disminución de los folículos sensibles a FSH. Como resultado de la selección de folículos dominantes, la fase folicular se acorta (Sükür et al., 2014).

El envejecimiento reproductivo en las mujeres es un proceso continuo que comienza antes del nacimiento y se extiende a través de la transición menopáusica. El principal mecanismo detrás de este proceso es el agotamiento de la reserva ovárica de folículos (Visser, Jong, Laven, Themmen, 2006). En comparación con otros sistemas de órganos principales, el sistema reproductor femenino humano envejece hasta el punto de fracaso a una edad relativamente joven (media 51 ± 8 años). Aunque la menopausia en sí misma es un punto final fácilmente reconocible de la vida reproductiva, la disfunción como resultado del envejecimiento reproductivo se produce años antes de este evento (Hansen, Knowlton, Thyer, Charleston, Soules, Klein, 2008).

En los últimos 15 años se ha visto que el envejecimiento ovárico es un factor crucial que contribuye a la fertilidad; ocurre como consecuencia de un declive progresivo en el

número y calidad de los ovocitos junto con el avance de la edad y finalmente lleva a la menopausia con el agotamiento de la reserva folicular. El envejecimiento ovárico es un proceso en el cual intervienen factores fisiológicos, genéticos y ambientales (Govindaraj y Rao, 2016). Sin embargo, los mecanismos moleculares involucrados en el envejecimiento ovárico no han sido ampliamente estudiados; en el presente trabajo se abordó el estudio de los niveles de expresión de genes clave como AMH, AMHR2, Cyp11a1, Cyp19a1 y Foxl2 en diferentes etapas de desarrollo y fertilidad, para así entender su influencia en el proceso de selección y dominancia de los folículos ováricos a lo largo de la vida fértil de una mujer y el cese de esta. También se realizará la caracterización inmunohistoquímica para estudiar los cambios que ocurren en los folículos y así entender que les permite madurar o bien llevarlos al decremento de la calidad del ovocito, con el fin de proveer información que permita desarrollar nuevas tecnologías y/o tratamientos de reproducción asistida.

1.5 HORMONA ANTI-MÜLLERIANA

La AMH, también llamada sustancia inhibidora de Müller (MIS, por sus siglas en inglés, Müllerian-inhibiting substance) es una glicoproteína dimérica unida por enlaces disulfuro compuesta por 535 aminoácidos, miembro de la superfamilia de factores de crecimiento transformante-beta (TGF- β , por sus siglas en inglés, transforming growth factor beta). Activa al receptor de la hormona anti-Mülleriana tipo 2 y causa la regresión de los conductos de Müller en el embrión masculino que de otra manera se diferenciarían en el útero y las trompas de Falopio. Esta proteína también juega un papel en la diferenciación y función de las células de Leydig testiculares y el desarrollo folicular en las hembras adultas. Las mutaciones en este gen dan como resultado el síndrome del conducto de Müller persistente (NCBI, 2017).

La acción de la hormona anti-Mülleriana es dimórfica y se expresa en la gónada de ambos sexos, cumpliendo funciones diferentes. En el caso de los machos, es sintetizada por las células fetales de Sertoli en el momento de la diferenciación testicular e induce la regresión de los conductos de Müller precursores del útero, los oviductos y la parte

superior de la vagina (figura 4) (La Marca, Broekmans, Volpe, Fauser, Macklon, 2009; Nef y Parada, 2000; Song, Chen, Kim, Kim, Ryu, Cha, Kang, MacLaughlin, Kim, 2009; Durlinger, Kramer, Karels, de Jong, Uilenbroek, Grootegoed, Themmen, 1999).

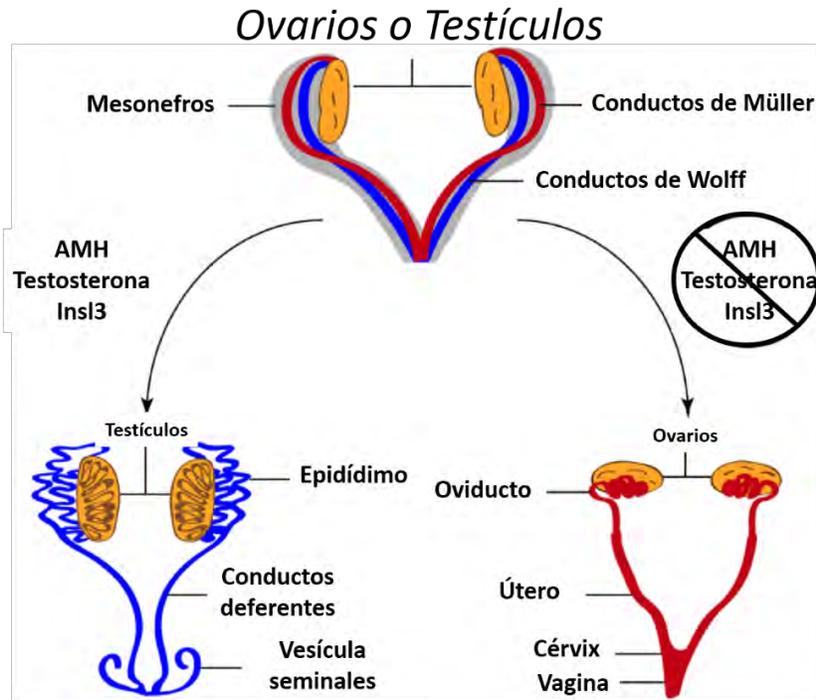


Figura 4. Diferenciación sexual de los tractos reproductivos. Tomado y modificado de Mullen y Behringer, 2014.

El gen AMH humano ha sido localizado en el cromosoma 19p13.2-13.3 y en ratón en el cromosoma 10 (Figura 5) (Lee y Donahoe, 1993).

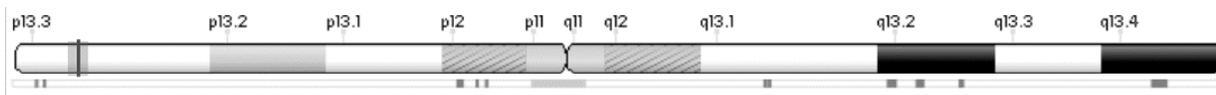


Figura 5. Localización cromosómica del gen de la hormona anti-Mülleriana (AMH) en humano (NCBI, 2017).

La transcripción del gen de la AMH está directamente regulada por múltiples factores en la vía determinante del testículo, incluyendo el gen que contiene SRY-box 9 (Sox9), el factor esteroidogénico 1 (Sf1), el homólogo del tumor de Wilms (Wt1) y la región crítica DSS-AHC en el gen del cromosoma X 1 (Dax1). Las mujeres no expresan AMH durante

el desarrollo fetal lo que permite la diferenciación del conducto de Müller en los derivados antes mencionados (Mullen y Behringer, 2014).

1.5.1 Función de la hormona anti-Mülleriana

La AMH es casi indetectable en el ovario fetal y postnatal. Pero después de la pubertad, las células de la granulosa del folículo ovárico comienzan a producirla. Se cree que está involucrado en el desarrollo folicular y la inhibición de la producción de hormonas esteroides en mujeres en edad reproductiva (Song et al., 2009).

La AMH es expresada en el ovario por las células de la granulosa alrededor de folículos en crecimiento, desde el estado primario hasta el estado de selección. En humanos, esto ocurre cuando los folículos llegan a un estado con un diámetro de 4 – 6 mm (Sacchi, D'Ippolito, Sena, Marsella, Tagliasacchi, Maggi, Argento, Tirelli, Giulini, La Marca, 2016).

La hormona anti-Mülleriana es un nuevo marcador prometedor para la reserva ovárica, porque se cree que los niveles de AMH reflejan el tamaño de la reserva folicular en reposo (Grynnerup, Lindhard, Sorensen, 2012).

1.5.2 Receptores de hormona anti-Mülleriana tipo I y II (AMHR-I y -II) y función

El gen AMHRII localizado en el cromosoma 12q13.13 (figura 6) del humano, codifica un receptor que participa en la diferenciación sexual masculina. El receptor de AMH tipo 2 se encuentra en la superficie de las células del conducto de Müller. El conducto de Müller, que se encuentra tanto en los fetos masculinos como femeninos, es el precursor de los órganos reproductores femeninos. Durante el desarrollo de fetos masculinos, las células de los testículos liberan una proteína llamada AMH. Durante la diferenciación sexual, la proteína AMH se une al receptor de AMH tipo 2, que señala la autodestrucción (apoptosis) de las células del conducto de Müller. Como resultado, el conducto de Müller degenera (regresa) en los hombres. En las mujeres, que no producen la proteína AMH durante el

desarrollo fetal, el conducto de Müller se convierte en el útero y las trompas de Falopio (figura 6) (National Library of Medicine, 2017; NCBI, 2017).

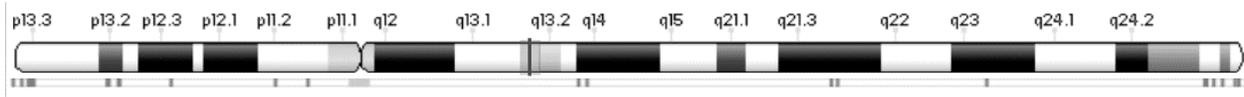


Figura 6. Localización cromosómica del gen del receptor de la hormona anti-Mülleriana tipo II (AMHR-II) en humano (NCBI, 2017).

El gen del receptor AMH tipo II, clonado en rata, conejo y humano contiene 11 exones. Los exones 1-3 codifican el dominio extracelular y el exón 4 para el dominio transmembrana (Faure, Gouédard, Imbeaud, Cate, Picard, Josso, di Clemente, 1996).

Tras la unión del ligando a su receptor de tipo II se fosforila y se activa el receptor de tipo I que se autofosforila para formar un complejo receptor heterotetramérico. La activación del receptor de tipo I a través de la transfosforilación por el receptor de tipo II conduce a la posterior señalización a través de proteínas Smad, por activación de los reguladores transcripcionales de Smad (Uniprot, 2017; Durlinger, Gruijters, Kramer, Karels, Ingraham, Nachtigal, Uilenbroek, Grootegoed, Themmen, 2002a).

La expresión del receptor tipo II para AMH (AMHRII) se encuentra en las células mesenquimáticas del conducto de Müller y en las gónadas de ambos sexos. En el ovario postnatal de ratones y ratas, la expresión de AMHRII se colocaliza con AMH en las células de la granulosa, mostrando una ventana de expresión similar. Además, las células de la teca de los folículos antrales, preantrales y pequeños en ovarios de rata expresan AMHRII (Durlinger, Visser, Themmen, 2002 b).

El receptor de TGF β tipo I no puede unirse a TGF β en ausencia del receptor de tipo II, y la asociación con el receptor de tipo I es esencial para que el receptor de TGF β tipo II indique la inhibición del crecimiento. Se cree que esta asociación obligatoria entre los receptores tipo I y tipo II es una característica funcional de todos los miembros de la familia de receptores serina/treonina cinasa (Baarends, Helmond, Post, Van der Schoot, Hoogerbrugge, de Winter, Uilenbroek, Karels, Wilming, Meijers, 1994). La

señalización de AMH está mediada por los únicos receptores de serina/treonina cinasa transmembrana de tipo I y II. El receptor de tipo II de AMH se une a AMH y luego recluta el receptor de tipo I para formar un tetraheterómero. La señalización río abajo ocurre cuando el receptor I es fosforilado por el receptor AMH tipo II (Nef y Parada, 2000).

1.6 FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN FORHEAD BOX L2 (FOXL2)

El factor de transcripción forkhead (Foxl2) emergió como un factor de transcripción central en el desarrollo del ovario y el crecimiento y maduración de folículos ováricos. FOXL2 es un miembro de una familia de genes forkhead/hepatocito nuclear del factor 3 (FKH/HNF3, por sus siglas en inglés, forkhead/hepatocyte nuclear factor 3 gene family), factores de transcripción, el primero de los cuales fue descrito en *Drosophila*. Ahora este miembro ha sido identificado desde la levadura hasta el humano y juega un papel esencial en la embriogénesis, diferenciación celular, y tumorigénesis. Los miembros de la familia FKH/HNF3 se caracterizan por conservar un dominio de hélice alada que es esencial para la unión al DNA, pero exhiben una regulación transcripcional divergente basada en sus dominios de transactivación o trasnrepresión (NCBI, 2017; Pisarska, Barlow, Kuo, 2011).

El gen Foxl2 se encuentra en el cromosoma humano 3q22.3 (figura 7) (NCBI, 2017). Foxl2 es un gen de un solo exón que codifica una proteína de 375 aminoácidos en ratón. La proteína contiene un dominio de unión a DNA forkhead y un tracto de polialanina de 14 residuos, la expansión de una región de repetición de polialanina y otras mutaciones en este gen son una causa del síndrome de blefarofimosis y la falla ovárica prematura. Foxl2 está altamente conservado entre los vertebrados y se ha convertido en un factor clave de la biología ovárica (NCBI, 2017; Georges, Auguste, Bessiére, Vanet, Todeschini, Veitia, 2014).

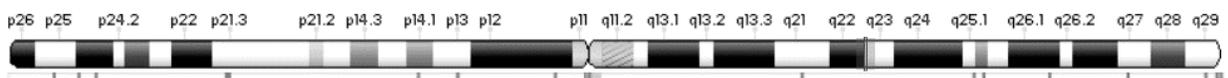


Figura 7. Localización cromosómica del gen forhead box L2 (FOXL2) en humano (NCBI, 2017).

1.6.1 Función de FOXL2

Foxl2 se expresa durante el desarrollo en la cresta genital femenina; también se expresa en los párpados, ovarios en desarrollo y en los folículos ováricos adultos. Foxl2 nunca se expresa en el testículo y se activa específicamente en las células de la granulosa del ovario en el momento de la determinación sexual (Pelosi, Forabosco, Schlessinger, 2015; Georges et al., 2014; Pisarska et al., 2011). Por lo tanto, Foxl2 desempeña un papel importante en el desarrollo ovárico temprano y la determinación sexual, así como un papel posterior en la diferenciación de células de la granulosa con depleción posterior del folículo, así como el crecimiento folicular, la producción de estrógenos y en la ovulación, y las mutaciones de Foxl2 contribuyen a una variedad de afecciones y estados patológicos (Georges et al., 2014; Pisarska et al., 2011).

En los recién nacidos, la expresión de Foxl2 se detecta en las células somáticas del ovario. En la mujer adulta, la expresión de Foxl2 es restringida a las células de la granulosa y en el estroma ovárico temprano, encontrando los niveles más altos en los folículos primarios (Uhlenhaut y Treier, 2006; Pisarska et al., 2011).

Foxl2 es expresado en todos los estados de desarrollo, desde la etapa fetal al ovario juvenil, así como en los ovarios adultos, es expresado en células de la granulosa indiferenciadas, en folículos pequeños y medianos o en las células del cumulus de folículos preovulatorios después de la estimulación de gonadotropinas. La expresión de Foxl2 es baja en las células de la granulosa mural de folículos preovulatorios y células lúteas, ambas bien diferenciadas (Pisarska, Bae, Klein, Hsueh, 2004).

Foxl2 ha emergido como un regulador crítico de la función ovárica y es uno de los primeros marcadores moleculares del desarrollo ovárico y su ablación causa la falla del folículo primordial en la progresión a la etapa primaria e inhibe la diferenciación ovárica de la gónada bipotencial embrionaria, lo que resulta en esterilidad femenina (Pelosi et al., 2015; Fleming, Knower, Lazarus, 2010).

Se han identificado varios genes diana para Foxl2 que incluyen genes implicados en esteroidogénesis (por ejemplo, STAR, CYP11 y aromatasa), inflamación (por ejemplo, NFAT y PTGS2/COX2) y apoptosis o detoxificación (por ejemplo, MNSOD) (Fleming et al., 2010).

1.7 ENZIMA MITOCONDRIAL DE ESCISIÓN DE LA CADENA LATERAL DEL COLESTEROL (CYP11A1/P450SCC)

El gen Cyp11a1 se encuentra localizado en el cromosoma 15q24.1 (Figura 8) en el humano y codifica un miembro de la superfamilia de enzimas del citocromo P450, este gen es el miembro 1 de la familia 11 subfamilia A y codifica una proteína de 521 aminoácidos (Miller y Auchus, 2011). Las proteínas del citocromo P450 son monooxigenasas que catalizan reacciones implicadas en el metabolismo de fármacos y la síntesis de colesterol, esteroides y otros lípidos. Esta proteína recibe el nombre de enzima mitocondrial de escisión de la cadena lateral del colesterol y se encuentra localizada en la membrana interna mitocondrial y se encarga de catalizar la conversión de colesterol a pregnenolona mediante la escisión de la cadena lateral del colesterol, generando así el precursor de la mayoría de las hormonas esteroideas, siendo el primer paso limitante en la síntesis de hormonas esteroideas (NCBI, 2017; UniProt, 2017).

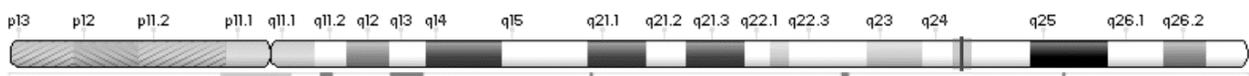


Figura 8. Localización cromosómica del gen CYP11A1 en humano (NCBI, 2017).

1.7.1 Función de Cyp11a1/P450scc

El primer paso de la producción de esteroides es la escisión de la cadena lateral del colesterol por parte de la enzima P450scc (CYP11A1), recibe el acrónimo scc (por sus siglas en inglés, side-chain cleavage) debido a la reacción de escisión que realiza. Esta reacción comprende tres pasos enzimáticos secuenciales: primero se da la hidroxilación del C22 del colesterol, seguido de la hidroxilación del C20 y finalmente la escisión

oxidativa del enlace C20–C22 (figura 10). Cyp11a1 requiere de la acción de la proteína reguladora aguda esteroidogénica (StAR) para la transferencia del colesterol a la membrana mitocondrial interna, siendo un paso limitante de la esteroidogénesis. Una vez realizada la escisión del colesterol, la reacción puede abrir paso a tres posibles vías principales para la formación de todos los esteroides, como los mineralocorticoides, glucocorticoides y esteroides sexuales (Chien, Rosal, Chung, 2016; Miller y Bose, 2011; Miller y Auchus, 2011).

StAR también es un marcador de diferenciación de células de la granulosa y se expresa en células granulosas de grandes folículos preovulatorios, pero no pequeños y medianos folículos inmaduros, a su vez el promotor StAR humano es regulado por Foxl2, ya que Foxl2 se une al promotor y suprime su actividad en folículos inmaduros (Pisarska et al., 2011).

La transcripción del gen CYP11A1 determina la cantidad de síntesis de P450_{scc} y, por lo tanto, la capacidad esteroidogénica de una célula. La transcripción de CYP11A1 está regulada por factores específicos de tejido y hormonales (Miller y Bose, 2011).

1.8 AROMATASA (CYP19A1/P450AROM)

El gen de la aromatasa codifica un miembro de la superfamilia de enzimas del citocromo P450. Esta proteína al igual que Cyp11a1 es una monooxigenasa que cataliza reacciones implicadas en el metabolismo de fármacos y la síntesis de colesterol, esteroides y otros lípidos. Esta proteína se localiza en el retículo endoplásmico y cataliza los últimos pasos de la biosíntesis de estrógenos. Las mutaciones en este gen pueden dar como resultado una actividad de aromatasa aumentada o disminuida. El uso alternativo del promotor y el splicing alternativo dan como resultado, variantes de transcritos múltiples que tienen diferentes especificidades tisulares (NCBI, 2017).

El gen de la aromatasa CYP19A1 en el humano se localiza en el cromosoma 15 (15q 21.2) (Figura 9) y está constituido por 10 exones. En el humano, la aromatasa se purificó

en 1980 a partir de microsomas placentarios. Se expresa en diferentes tejidos, el ovario y la placenta son los órganos con mayor actividad biológica de aromatización en condiciones fisiológicas (NCBI, 2017; Hinojosa-Cruz, Ramos-García, Vital-Reyes, 2010).

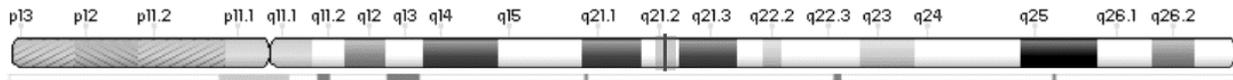


Figura 9. Localización cromosómica del gen CYP19A1 (aromatasa) en humano (NCBI, 2017).

1.8.1 Función de Aromatasa (CYP19A1)

En la mayoría de los mamíferos la aromatasa (Cyp19a1 o P450arom) se expresa solamente en gónadas y el cerebro, mientras que los primates expresan este gen en sitios adicionales extragonadales, como piel, placenta y hueso. El estrógeno es esencial en las mujeres para el desarrollo de los órganos reproductivos, y en ambos sexos para la mineralización ósea y la función gonadal (Bulun, Sebastian, Takayama, Suzuki, Sasano, Shozu, 2003).

El complejo enzimático de la aromatasa pertenece a la superfamilia del citocromo P450, el cual cataliza la conversión de andrógenos, fundamentalmente testosterona y androsterona, en estrógenos, principalmente estradiol y estrona, productos clave de las células granulosa diferenciadas (figura 10) (Pisarska et al; 2011).

En el ovario, el estradiol producido localmente actúa en conjunto con las gonadotropinas secretadas por la pituitaria anterior para proporcionar la foliculogénesis y la producción de esteroides exitosa. Como una hormona secretada, el estradiol modula la estructura y función de los tejidos reproductores femeninos, tal como el útero y el oviducto. El estradiol es también uno de los principales factores determinantes del funcionamiento de las neuronas hipofisarias y es fundamental para permitir que las células exhiban patrones de fluctuación de actividad biosintética y secretora y para generar la oleada preovulatoria de la hormona luteinizante (LH). El estradiol también contribuye a variaciones cíclicas en el comportamiento sexual femenino. Por lo tanto, la expresión coordinada y célula-

específica del gen de la aromatasa (*Cyp19a1*) en el ovario juega un papel clave en la progresión del ciclo menstrual/estral (Stocco, 2008).

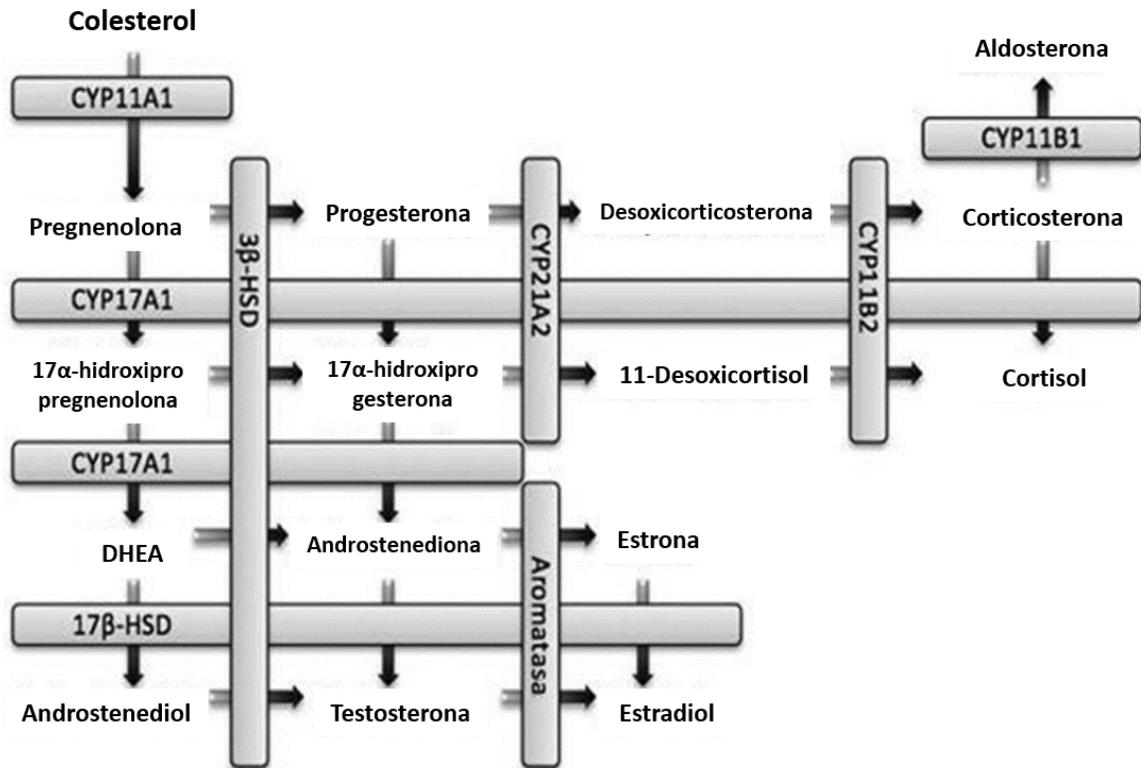


Figura 10. Esquema de la esteroidogénesis en humano. Se muestran las enzimas que metabolizan los esteroides en esta vía. Tomado y modificado de Winther, Nielsen, Hansen, Styrisshave, 2013.

2. ANTECEDENTES

2.1 HORMONA ANTI-MÜLLERIANA (AMH)

2.1.1 El papel de la hormona anti-Mülleriana en el desarrollo folicular

La AMH también conocida como sustancia inhibidora de Müller (MIS, por sus siglas en inglés, Müllerian inhibiting substance) ha sido implicada en el reclutamiento folicular primordial en análisis de ovarios con AMH nula. La examinación de folículos ováricos en ratones hembra deficientes de AMH ha revelado reducción en el número de folículos primordiales y descontrol en el número de folículos en crecimiento comparado con los controles. Estos hallazgos llevaron a la propuesta de que AMH inhibe el reclutamiento de folículos primordiales (Durlinger et al., 2002a).

En el tejido ovárico fetal y neonatal humano, la expresión de AMH no se detecta antes de las 36 semanas de gestación. Durante el desarrollo fetal femenino de ratón y rata, no se puede detectar la actividad de la AMH ovárica, pero su expresión está presente en las células de la granulosa ovárica a una edad temprana de 4 días después del nacimiento, coincidiendo con el inicio del crecimiento folicular primario (Weenen, Laven, Von Berg, Cranfield, Groome, Visser, Kramer, Fauser, Themmen, 2004; Durlinger, 2002a). Después de un ligero aumento inicial en las semanas después del nacimiento, los niveles de AMH aumentan, alcanzando un máximo durante la pubertad y luego muestran un declive progresivo a lo largo de la vida reproductiva a medida que la reserva folicular se agota. Finalmente, los niveles se vuelven indetectables después de la menopausia (La Marca et al., 2009).

Estudios de inmunohistoquímica e hibridación *in situ* en roedores revelaron la expresión específica de AMH en células granulosas de crecimiento temprano, folículos preantrales y folículos antrales pequeños, mientras que la señal se pierde en los folículos antrales grandes no atrésicos y en todos los folículos atrésicos, lo cual también ha sido encontrado en el humano, mediante el estudio en ovarios humanos de mujeres con un ciclo menstrual regular (intervalo de 21 ± 35 días) y de edad <46 años, obtenidos por una ooforectomía unilateral o bilateral. Encontrando en efecto que el nivel más alto de expresión de AMH

está presente en las células de la granulosa de folículos preantrales y antrales pequeños. En los folículos antrales más grandes la expresión de AMH desaparece gradualmente (Weenen et al., 2004). Además, está implicada en la regulación de la foliculogénesis, inhibiendo la transición de la fase primordial a la fase folicular primaria (La Marca et al., 2009). Otro conjunto de datos clínicos ha sustentado que, en efecto, la AMH es preferente y constantemente secretada por folículos antrales pequeños, indicando que la AMH se produce mediante el crecimiento de folículos preantrales y antrales tempranos, siendo AMH un marcador muy temprano del crecimiento folicular ovárico (La Marca et al., 2009; Weenen et al., 2004; Durliger et al., 2002a).

AMH, producido por el grupo de folículos en crecimiento, actúa como una señal de retroalimentación por la inhibición del reclutamiento inicial de folículos primordiales. Tan pronto como los folículos primordiales son reclutados para el crecimiento, la AMH se expresa en las primeras células diferenciadoras de la granulosa, indicadas por un cambio de plano a cuboidal (Weenen et al., 2004).

En el ovario, la AMH es producida por las células de la granulosa de los folículos en desarrollo temprano y está implicada en la regulación de la foliculogénesis, inhibiendo la transición de la fase primordial a la fase folicular primaria (La Marca et al., 2009).

La AMH continúa expresándose en los folículos en crecimiento en el ovario hasta que estos alcanzan el tamaño y estado de diferenciación en el que pueden ser seleccionados para dominancia. La AMH se expresa en los folículos que han sido objeto de reclutamiento de la reserva de folículos primordiales, desempeña un papel importante durante el reclutamiento inicial y cíclico de los folículos ováricos (La Marca et al., 2009; Weenen et al., 2004).

Otro estudio en ovarios de ratón demostró recientemente que la AMH, inhibe la iniciación del crecimiento folicular primordial (La Marca et al., 2009; Durlinger, Gruijters, Kramer, Karels, Kumar, Matzuk, Rose, H. de Jong, Uilenbroek, Grootegoed, Themmen, 2001). Junto con estudios previos sugieren que la AMH inhibe el crecimiento de folículos

estimulados por FSH en ratones, al disminuir la sensibilidad del folículo para la FSH (Pellatt, Rice, Dilaver, Heshri, Galea, Brincat, Brow, Simpson, Mason, 2011), lo cual sugiere que la AMH es uno de los factores que determinan la sensibilidad de los folículos ováricos a la FSH y que la AMH es un regulador más dominante del crecimiento folicular temprano que la FSH (Durlinger et al., 2001).

2.1.2 Expresión de la hormona anti-Mülleriana durante el envejecimiento ovárico.

A través de su efecto inhibitorio sobre el reclutamiento de folículos primordiales, la AMH puede regular la eficacia del uso de la reserva folicular primordial y, por tanto, puede estar implicada en la determinación de la edad a la que se produce la menopausia. El patrón de inmunotinción de AMH como se observó en los estudios de Weenen y colaboradores es de apoyo en la propuesta de un papel inhibitorio de AMH en el reclutamiento de folículos. Otro argumento a favor de este papel inhibitorio de la AMH es la observación de un agotamiento acelerado de los folículos en reposo en mujeres de 35 a 45 años, cuando los niveles de AMH disminuyen rápidamente (Weenen et al., 2004).

En un estudio realizado por Annemarie de Vet y colaboradores (2002) demostraron que hay una correlación entre la disminución de la reserva de folículos primordiales en reposo y la disminución en el número de folículos en crecimiento con respecto a la disminución de la expresión de la AMH debido al avance de la edad, ya que la AMH es producida exclusivamente por folículos pequeños en crecimiento y a su vez es secretada a la circulación, y sus niveles de expresión van disminuyendo conforme al aumento de la edad. Dicho estudio fue realizado mediante las mediciones de niveles séricos de AMH en 41 mujeres normovulatorias jóvenes (20 a 35 años) estudiadas durante 6 años, demostrando así que los niveles de AMH disminuyen significativamente con la edad y por tanto esto indicaría que los niveles de expresión también disminuyen en la reserva folicular (de Vet, Laven, de Jong, Themmen, Fauser, 2002).

A diferencia de otros marcadores asociados con el desarrollo temprano del folículo, los niveles séricos de AMH parecen reflejar solo la actividad ovárica, ya que su expresión en mujeres de diversas especies se ve exclusivamente en células de la granulosa (Lee y Donahoe, 1993; Josso, Cate, Picard, Vigier, di Clemente, Wilson, Imbeaud, Pepinsky, Guerrier, Boussin, Legeai, Carré-Eusébe, 1993).

2.1.3 Receptor de hormona anti-Mülleriana tipo II (AMHR-II)

Se ha reportado que la expresión del receptor de la hormona anti-Mülleriana tipo II (AMHRII) es restringido a las células mesenquimales alrededor de los conductos de Müller durante la embriogénesis, estructuras tubulares y foliculares de las gónadas fetales, células de Sertoli y de Leydig de testículos adultos y células de la granulosa aisladas de diferentes tamaños de folículos de ovarios de ratón y cabra (Poole, Ocón-Grove, Johnson, 2016).

El receptor AMH tipo II (AMHRII), es específico y necesario para la señalización AMH, por tanto se localiza en células de la granulosa de los ovarios de ratón y rata. Además, el receptor AMHRII se expresa en las células de la teca de los folículos preantrales y antrales pequeños en ovarios de rata. El inicio de la expresión de AMHRII se da tan pronto como se reclutan los folículos primordiales para su crecimiento (Durlinger et al., 2002b; Baarends, Uilenbroek, Kramer, Hoogerbrugge, van Leeuwen, Themmen, Grootegoed, 1995).

Durante el desarrollo folicular, la expresión de AMHRII se da principalmente en folículos preantrales y antrales pequeños. Los folículos antrales grandes, así como los cuerpos lúteos no expresan AMHRII. Además, su expresión decrece gradualmente en aquellos folículos atrésicos. La expresión de AMHRII siempre se distribuye uniformemente en la capa de células de la granulosa (Baarends et al., 1995).

En un estudio de hibridación *in situ* y ensayos de protección de RNasa realizado por Baarends y colaboradores (1995), analizaron los patrones de expresión de AMHRII y

AMH en ovarios de ratas en diferentes estados reproductivos, de 5, 10, 15 y 30 días postnatales y ovarios de ratas adultas, encontrando que la expresión de AMHRII es alta en los ovarios fetales. Entre los días 15-30, la expresión de AMHRII se vuelve más restringida a las células de la granulosa. Además, concluyeron que la expresión AMHRII se activa en las células de la granulosa de pequeños folículos preantrales, y aumenta alcanzando niveles máximos en folículos preantrales pequeños y disminuye en folículos antrales grandes. Posteriormente, AMHRII disminuyen a niveles indetectables a medida que los folículos desarrollan su gran cavidad antral y comienzan a experimentar las etapas finales de la maduración folicular (Baarends et al., 1995).

En el caso de los ovarios adultos, la expresión de AMHRII disminuye en las células de la granulosa de folículos antrales pequeños. También se encontró que aproximadamente para el día 15 postnatal en ratas se aprecia un cambio en el patrón de expresión de AMHRII, de un patrón distribuido uniformemente a un patrón más restringido, lo cual no puede explicarse por cambios en los niveles de FSH y / o estrógeno o por cambios conocidos en la sensibilidad de las células ováricas a estas hormonas y es, por lo tanto, muy probablemente causado por otros factores, como la edad (Baarends et al., 1995).

En otro estudio realizado por Ilha y colaboradores (2016) determinaron el perfil de expresión y la regulación de AMH y AMHRII durante la selección de folículos dominantes, y en folículos co-dominantes en respuesta a la suplementación con FSH, usando un modelo que indica los cambios en los niveles de expresión de AMH en función del estado de crecimiento folicular, esto se realizó en ovarios de ganado. En dicho estudio se encontró que la FSH es un factor importante para el mantenimiento de la expresión de AMH y AMHRII durante el crecimiento folicular y en folículos dominantes, pero no regula positivamente la expresión de AMH y AMHRII en células de la granulosa de folículos antrales grandes, y la expresión se pierde en aquellos folículos atresicos (Ilha, Rovani, Gasperin, Ferreira, Macedo, Neto, Duggavathi, Bordignon, Gonçalves, 2016).

2.2 AROMATASA

2.2.1 El papel de la aromatasa en el ovario

La producción de estradiol ovárico es uno de los eventos fisiológicos más importante que subyace al ciclo menstrual. Después del desarrollo folicular ovárico, se secretan cantidades crecientes de estradiol de las células foliculares. Antes de la oleada de la hormona luteinizante (LH), la concentración de estradiol alcanza un valor máximo y a partir de entonces la biosíntesis de estrógenos disminuye. Esto se asocia con el hecho de que los folículos preovulatorios, que son la principal fuente ovárica de estradiol, están experimentando luteinización y se refleja en una creciente biosíntesis de progesterona (Ghersevich, Poutanen, Martikainen, Vihko, 1994).

La capacidad de los folículos para producir estrógenos se manifiesta por primera vez en la etapa preantral tardía. Aunque la actividad de la aromatasa está presente en folículos antrales pequeños, la producción de estrógenos en esta etapa del desarrollo está limitada por la incapacidad de producir sustrato andrógeno para la aromatización de estrógenos. El crecimiento más allá de la etapa antral pequeña se caracteriza, por lo tanto, por una mayor actividad de aromatasa y la síntesis de andrógenos, que culmina en la producción de estrógenos foliculares (Drummond y Findlay, 1999). El folículo preovulatorio tiene los niveles intrafoliculares más altos de estradiol, principalmente debido al tamaño de su población de células de la granulosa y su capacidad para aromatizar andrógenos en base a la expresión de aromatasa (Drummond, 2006).

El estrógeno actúa como un regulador positivo de la acción de FSH durante la diferenciación de las células de la granulosa, incluyendo la inducción de receptores para FSH, LH y prolactina (Drummond, 2006; Otsuka, Moore, Wang, Sharmaato, Miyoshi, Shimasaki, 2005). Los estudios genéticos en humanos y ratones han demostrado que las interacciones funcionales entre los estrógenos y la acción de FSH son necesarias para el establecimiento de folículos dominantes en el ovario y la posterior ovulación en mamíferos; sin embargo, los mecanismos celulares y moleculares de cómo funcionan los

estrógenos para aumentar la acción de FSH siguen siendo desconocidos (Otsuka et al., 2005).

A medida que el folículo dominante crece, las células de la granulosa del cumulus adquieren el potencial de producir grandes cantidades de estradiol. La inducción de aromatasa es mediada por FSH, por vía de señalización cAMP (Fleming et al., 2010) en las células de la granulosa y es causal a la adquisición del potencial de estrógeno del folículo. La aromatasa se detecta cuando un folículo alcanza el diámetro de ~1mm cuando ha llegado a el estado de folículo dominante. La actividad de la aromatasa aumenta progresivamente, alcanzando niveles máximos en las células de la granulosa del folículo preovulatorio en la fase folicular tardía, siendo dichas células de granulosa la principal fuente de producción de estradiol (William, 2012; Edson, Nagaraja, Matzuk, 2009).

2.2.2 Expresión de aromatasa durante el envejecimiento ovárico

A pesar de la evidencia anatómica y fisiológica de la disminución en el número de folículos en las mujeres mayores, existe una sorprendente preservación de la esteroidogénesis ovárica con la edad. El estradiol permanece relativamente estable hasta 2 años antes del último período menstrual. Estudios previos han demostrado que los niveles de estradiol en la fase folicular son más altos o iguales en mujeres mayores de 35 años en comparación con mujeres más jóvenes con ciclos regulares, mientras que otros biomarcadores como la AMH muestran una disminución gradual con respecto al avance de la edad (Shaw, Srouji, Welt, Cox, Fox, Adams, Sluss, Hall, 2015).

En un estudio realizado por Shaw y colaboradores (2015) plantean que la esteroidogénesis se preserva durante el envejecimiento ovárico en mujeres con ciclos regulares, incluso los niveles de aromatasa suelen aumentar con la edad, con lo cual plantearon la hipótesis de que la preservación de la síntesis de estrógenos en mujeres adultas podría deberse al aumento de la actividad de la aromatasa ovárica. Incluso sus resultados demostraron en efecto una mayor expresión de aromatasa en células de la

granulosa aisladas de folículos dominantes en mujeres mayores, apoya dicha hipótesis (Shaw et al., 2015).

Cabe mencionar que la producción de estradiol en el ovario es una función que no solo depende de la actividad enzimática esteroidogénica, sino también de la disponibilidad del sustrato androgénico y del número de folículos y células de la granulosa (Shaw et al., 2015).

En otro estudio de Welt y colaboradores (2006) analizaron la actividad de la aromatasa en mujeres de edad reproductiva, tanto jóvenes (de 21 a 35 años) como en viejas (de 36 a 45 años) con ciclo menstrual regular entre 25 y 35 días, encontrando que la actividad de la aromatasa incrementa en mujeres adultas en la fase folicular temprana en comparación con mujeres jóvenes. También encontraron una correlación entre el aumento de la concentración de FSH que a su vez potencia la actividad de la aromatasa en mujeres mayores, ya que la FSH estimula el crecimiento de folículos y con este crecimiento, la producción de estradiol aumenta el número de receptores de FSH con el potencial de una mayor actividad de aromatasa. Por tanto, la hipótesis de Welt y colaboradores es que el aumento de FSH en la fase folicular en mujeres mayores establece el escenario para el continuo aumento de la actividad de la aromatasa en la fase folicular tardía que observaron en su estudio (Welt, Jimenez, Sluss, Smith, Hall, 2006).

2.2.3 Relación inversa de la hormona anti-Mülleriana con la expresión de aromatasa

Se ha demostrado que la hormona anti-Mülleriana, además de sus efectos sobre la foliculogénesis, también ha demostrado tener un efecto inhibitorio sobre la expresión de la enzima aromatasa y la producción de estradiol de manera que controla el decremento de la reserva folicular en los ovarios fetales de ratas, conejos y vacas (Durlinger et al., 2001; Chang, Klausen, Leung, 2013).

Las teorías actuales sugieren que la AMH participa como un corregulador de la esteroidogénesis en las células de la granulosa, ya que la AMH está relacionada con los niveles de estradiol en el fluido folicular de folículos antrales pequeños. Esto fue confirmado por un estudio reciente que mostró que los polimorfismos en el gen que codifica para AMH o para el receptor AMH tipo II estaban relacionados con los niveles de estradiol, demostrando el papel de la AMH en la esteroidogénesis del ovario humano (Sacchi et al., 2016).

En efecto, varios estudios han mostrado claramente un efecto directo de la AMH en la modulación de la expresión del gen de la aromatasa. En el humano, la AMH disminuye significativamente la expresión de la aromatasa estimulada por FSH en células de la granulosa y también reduce la expresión del RNA mensajero (mRNA, por sus siglas en inglés, messenger ribonucleic acid) del receptor de FSH, mostrando un efecto relevante de la AMH en la modulación de la respuesta folicular ovárica a las gonadotropinas (Sacchi et al., 2016).

La expresión coordinada y célula-específica del gen de la aromatasa (Cyp19a1) en el ovario juega un papel clave en la progresión normal de del ciclo menstrual/estral (Stocco, 2008).

En el ovario, las células de la granulosa constituyen la fuente más rica en aromatasa en la mujer durante la vida reproductiva y, por consiguiente, son el principal origen de los estrógenos. La hormona luteinizante (LH) modula la producción de andrógenos por las células foliculares de la teca, mientras que la hormona folículo estimulante (FSH) regula la aromatización en las células de la granulosa. Ambas hormonas actúan de manera sincrónica, de modo que la teca produce los andrógenos que constituyen el sustrato de la aromatasa, mientras que la granulosa convierte el sustrato en estrógeno. La actividad de ambos tipos celulares incrementa hasta 10 veces la concentración de estradiol circulante justo antes de la ovulación (Hinojosa-Cruz et al, 2010).

El estradiol es sintetizado por las células de la granulosa a través de la acción de la aromatasa, la enzima que convierte los andrógenos procedentes de las células de la teca, en estrógenos. La expresión de la aromatasa aumenta gradualmente en los folículos preantrales y antrales grandes durante la pubertad. Esta expresión incrementa durante el periodo posnatal y es dependiente de gonadotropinas, en particular de FSH. La esteroidogénesis solo puede producirse de manera óptima en el período posterior a la pubertad. A partir de ese momento, la expresión de aromatasa aumenta en folículos antrales y preovulatorios grandes (Dewailly, Robin, Peigne, Decanter, Pigny, Catteau-Jonard, 2016).

En el humano, se ha observado una correlación negativa entre los niveles de AMH y estradiol en el fluido folicular de folículos antrales pequeños, sugiriendo una estrecha interdependencia entre la expresión de AMH y la actividad de aromatasa dentro de cada folículo (Dewailly et al., 2016).

La hormona foliculoestimulante desempeña un papel central en el crecimiento folicular y la diferenciación mediante la regulación de la producción de estradiol. La FSH inicia la proliferación y la diferenciación de células de la granulosa en pequeños folículos antrales, lo que conduce a la inducción de la expresión de aromatasa. Durante esta fase, el aumento de la producción de estradiol es paralelo al crecimiento, desarrollo y maduración del folículo. Se ha informado que, en cultivos de células de la granulosa de rata, la AMH exógena inhibe la síntesis de aromatasa. Grossman y colaboradores investigaron los efectos de la AMH en la expresión de aromatasa estimulada por FSH en cultivos de células de la granulosa humanos, demostrando que la presencia de AMH suprimió significativamente la expresión del gen de la aromatasa estimulada por FSH y la producción de proteínas. La supresión por AMH de la actividad de aromatasa dependiente de FSH puede representar un mecanismo mediante el cual AMH modula la actividad de células de la granulosa y la foliculogénesis influyendo en la síntesis de estradiol de las células de la granulosa, ya que los niveles bajos séricos de estradiol se correlacionan con dificultades para seleccionar un folículo dominante y pueden conducir a anovulación (Grossman, Nakajima, Fallat, Siow, 2008; Chang et al., 2013).

En efecto, estudios in vitro han demostrado que la AMH inhibe la producción de estradiol inducida por FSH y la expresión de aromatasa en células de la granulosa humana, y para confirmar este efecto de la AMH sobre la acumulación de estradiol estimulado por FSH, Chang y colaboradores (2013) cultivaron células de la granulosa-luteína humanas en presencia de FSH, AMH o ambas, con lo cual el tratamiento de las células de la granulosa-luteína humanas con FSH aumento significativamente la acumulación de estradiol. El tratamiento con AMH redujo significativamente la acumulación de estradiol estimulada por FSH, mientras que no tuvo efectos sobre la acumulación basal de estradiol, demostrando que AMH inhibe la expresión de la aromatasa inducida por FSH y la producción de estradiol en células de la granulosa-luteína humanas. Además, los efectos de AMH son dependientes del receptor de AMH tipo II y probablemente actúan a nivel de la activación de adenililciclase y la síntesis de AMP cíclico. Sus estudios también sugieren que además de los efectos de AMH en el reclutamiento folicular y la foliculogénesis de estados tempranos, y la modulación de la síntesis de estradiol en estado folicular tardío, que este efecto podría ser importante para la creación de un microambiente favorable para la implantación del embrión (Chang et al., 2013).

Ahora bien, Pellatt y colaboradores (2011) demostraron por primera vez que la AMH inhibe los factores que promueven la progresión folicular en células de la granulosa humanas a partir de folículos de tamaño en el cual se selecciona un folículo dominante. En cultivos de células de la granulosa humanas la AMH inhibió la expresión y actividad de la aromatasa estimulada por FSH a través de la represión del gen CYP19. Estudios más recientes confirman estos datos y sugieren que la AMH no afecta la expresión basal de la aromatasa, pero atenúa específicamente el efecto estimulante de la FSH, mediante una reducción en la expresión de receptores de FSH, indicando que el mecanismo por el cual AMH disminuye al doble la sensibilidad de los folículos a la estimulación por FSH (Pellatt et al., 2011).

2.3 EXPRESIÓN DE CYP11A1 EN EL OVARIO

Una adecuada maduración de los folículos ováricos requiere de su habilidad para sintetizar estradiol a partir de precursores andrógenos producidos por las células de la teca que forman múltiples capas alrededor de los folículos preantrales y antrales. La expresión de la enzima mitocondrial de escisión de la cadena lateral del colesterol (Cyp11a1/P450_{scc}) es esencial para el desarrollo folicular exitoso, ya que su expresión permite la diferenciación de las células tecales en el ovario en desarrollo (Schwartz y Roy, 2000).

Es importante saber que para que la expresión de Cyp11a1 sea favorable, esta requiere del regulador agudo esteroideogénico (StAR, por sus siglas en inglés, Steroidogenic Acute Regulatory), ya que juntos median el paso inicial y limitante de la velocidad de la esteroideogénesis. StAR se encarga de facilitar el transporte de colesterol a la membrana mitocondrial interna en donde Cyp11a1 se encarga de realizar la reacción de conversión de colesterol a pregnenolona, precursor de andrógenos, estrógenos y progesterona. La acción de Cyp11a1 es restringida a la membrana mitocondrial interna; por ello StAR y Cyp11a1 actúan de manera sinérgica para llevar a cabo una esteroideogénesis exitosa (Terry, McGrath, De Vivo, 2010).

El gen StAR a su vez es regulado por Foxl2; esto ha sido estudiado por Pisarska y colaboradores (2004) quienes demostraron que el promotor de StAR tiene sitios de unión para la proteína Foxl2, un marcador de diferenciación de células granulosas, esto mediante el estudio de la expresión de Foxl2 durante el desarrollo ovárico en ratones, tomando como referencia la presencia de la región represora de transcripción en Foxl2, y la existencia de sitios de unión de ADN en el promotor del gen StAR, probaron que la transcripción del gen StAR es reprimida por Foxl2 demostrando así el papel potencial de Foxl2 en la diferenciación folicular (Pisarska et al., 2004).

Se ha demostrado que una delección espontánea del gen Cyp11a1 en conejos y ratones knockout y aquellos pacientes con mutaciones en Cyp11a1, dan como resultado la

pérdida de toda la esteroidogénesis, lo que indica que esta enzima es esencial para que se lleve a cabo el inicio de la esteroidogénesis. Por lo tanto, la presencia de Cyp11a1 hace que una célula sea esteroidogénica y totalmente capaz de producir estrógenos (Miller y Auchus, 2011).

La enzima Cyp11a1 se encuentra mayormente expresada en las células de la teca interna y el cuerpo lúteo de los ovarios, y en las células de Leydig de los testículos. Se ha encontrado que la primera expresión de Cyp11a1 se da en las células de la teca interna de folículos preantrales que poseen capas de teca bien desarrolladas, y la expresión aumenta con el crecimiento de folículos antrales (Chien et al., 2016; Bao, Garverick, Smith, Smith, Salfen, Youngquist, 1997).

Se cree que la expresión de Cyp11a1 podría estar implicada en el proceso de reclutamiento y selección de folículos dominantes, ya que hay evidencia de que la síntesis de andrógenos por parte de las células de la teca es crítica para el crecimiento continuo de un folículo dominante hasta llegar a ser un folículo preovulatorio. Bao y colaboradores (1997) realizaron un estudio para probar si las enzimas esteroidogénicas está asociado con el desarrollo folicular bovino (reclutamiento, selección, dominancia y atresia), mediante la observación de los cambios en la expresión de Cyp11a1 durante el reclutamiento y selección de folículos ováricos bovinos, encontrando así que el nivel de expresión de Cyp11a1 está asociado con el tiempo y tamaño de los folículos, por lo cual, su expresión puede estar asociado con la preparación de folículos para un crecimiento continuo.

Se ha visto que la expresión de Cyp11a1 alcanza los mayores niveles en células de la teca interna de folículos dominantes durante el mantenimiento de esta dominancia, favoreciendo la diferenciación de folículos dominantes a preovulatorios, sin embargo, en aquellos folículos no seleccionados que sufren de atresia presentan una reducción gradual en la expresión de Cyp11a1 (Bao et al., 1997).

Ahora bien, Chien y colaboradores (2013) demostraron que la sobre expresión de Cyp11a1 puede llevar a un retraso en la diferenciación de células lúteas y una mala regulación de la secreción de esteroides, resultando en defectos en el embarazo (Chien, Cheng, Wu, Jiang, Shen, Chung, 2013).

2.3.1 Cyp11a1 en el envejecimiento ovárico

Es importante destacar que los estrógenos ováricos son esenciales para la foliculogénesis, incluso se ha demostrado que aquellos folículos dominantes poseen una gran capacidad para producir hormonas esteroideas.

En un estudio realizado por Yuan y colaboradores (2008) han indicado que la capacidad esteroidogénica favorece el desarrollo de los ovocitos a medida que el folículo se desarrolla, por lo cual una mayor expresión de esta enzima podría estar involucrada en la selección de folículos dominantes con ovocitos competentes de buena calidad, esto mediante la caracterización de Cyp11a1 por RT-PCR durante el desarrollo folicular de cabras prepúberales. (Yuan, Wang, Lan, Sui, Tan, 2008).

En otro estudio realizado por Havelock y colaboradores (2006) han indicado que el ovario postmenopáusico retiene las enzimas esteroidogénicas necesarias para la producción persistente de andrógenos ováricos, dicho estudio fue el primero en demostrar la presencia de todas las enzimas necesarias para sintetizar andrógenos en los ovarios posmenopáusicos (Havelock, Rainey, Bradshaw, Carr, 2006).

Diversos estudios han sugerido que el ovario postmenopáusico conserva su capacidad de producir andrógenos ováricos y en menor medida, de estrógenos, como otro estudio realizado por Judd y colaboradores (1974), en el cual estudiaron los niveles estrogénicos y androgénicos en suero de 9 mujeres postmenopáusicas, estableciendo que probablemente el ovario postmenopáusico continúa produciendo esteroides, particularmente andrógenos, sin embargo aún no se sabe cuál es el mecanismo por el cual esto es posible (Judd, Judd, Lucas, Yen, 1974).

En otro estudio realizado por Fogle y colaboradores (2007) confirmaron los resultados obtenidos por Judd y colaboradores, confirmando que el ovario postmenopáusico sigue siendo hormonalmente activo, secretando niveles significativos de andrógenos, lo cual contribuye a la preservación de los ovarios, esto mediante un estudio realizado a trece mujeres postmenopáusicas sometidas a histerectomía y salpingooforectomía bilateral, midiendo los niveles de expresión de andrógenos y estrógenos (Fogle, Stanczyk, Zhang, Paulson, 2007).

Los estudios antes mencionados han demostrado la persistencia en la producción de estrógenos ováricos en mujeres postmenopáusicas, sugiriendo que el ovario posmenopáusico podría actuar como una glándula productora de andrógenos (Havelock et al., 2006).

Hoy en día se conoce que la menopausia propicia la pérdida de producción de estrógenos ováricos cíclicos y progesterona. Sin embargo, no se comprende por completo el cómo o por qué la capacidad esteroidogénica se mantiene en el ovario posmenopáusico. Tampoco se han realizado estudios sobre la expresión específica de las enzimas esteroidogénicas en folículos ováricos a través del proceso del envejecimiento ovárico.

2.4 EXPRESIÓN DEL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN FORKHEAD (FOXL2) EN OVARIO

Actualmente se sabe que el factor de transcripción Foxl2 es un marcador del desarrollo ovárico (Loffer et al., 2003) y recientemente ha emergido como un regulador crítico de la función ovárica. Estudios *in vitro* han indicado que Foxl2 puede transactivar el promotor de aromatasa, por tanto, se demuestra que uno de sus blancos directos es la enzima aromatasa (García-Ortiz, Pelosi, Omari, Nedorezov, Piao, Karmazin, Uda, Cao, Cole, Forabosco, Schlessinger, Ottolenghi, 2009; Pannetier, Fabre, Batista, Kocer, Renault, Jolivet, Mandon-Pépin, Cotinot, Veitia, Pailhoux, 2006).

Foxl2 actúa de manera crítica en varios procesos, incluida la determinación del sexo, el desarrollo de los ovarios y el mantenimiento de la fertilidad femenina (Pelosi et al., 2015).

La ablación de Foxl2 causa la falla de folículos primordiales en la progresión a la etapa primaria, lo que resulta en esterilidad femenina. Además, las células de la granulosa en el ovario se someterían a una reversión sexual parcial, caracterizada por la expresión de marcadores específicos de las células testiculares (Pelosi et al., 2015)

En un estudio realizado por Uda y colaboradores (2004) con ratones knockout para Foxl2 las células de la teca y células de la glándula intersticial no son inducidas y por tanto no hay esteroidogénesis (Uda, Ottolenghi, Crisponi, García, Deiana, Kimber, Forabosco, Cao, Schlessiger, Pilia, 2004). Todos los linajes de células ováricas se ven afectados en ratones Foxl2 nulos, en los que la ausencia de fragmentación de cordones sexuales en folículos aislados se acompaña de la incapacidad de las células de la granulosa para crecer y diferenciarse en folículos multicapa, así como una falta de esteroidogénesis y un crecimiento progresivamente desreprimido, es decir, descontrolado y diferenciación de ovocitos (Ottolenghi, Uda, Hamatani, Crisponi, García, Ko, Pilia, Sforza, Schlessinger, Forabosco, 2004).

En ausencia de Foxl2, la diferenciación de células de la granulosa ovárica se bloquea en la transición planas a cuboidales y no se forman folículos secundarios, conduciendo a la detención de la foliculogénesis y la atresia folicular. (Pannetier et al., 2006; Uhlenhaut y Treier, 2006). Además, modelos de ratones knockout han demostrado que la ablación de Foxl2 bloquea la formación de folículos ováricos y conduce a la reversión parcial del sexo de ovarios a testículos en ratones, independientemente de genes implicados en el desarrollo gonadal temprano y la determinación del sexo (Pisarska et al., 2011).

2.4.1 Regulación de aromatasa por Foxl2

Hasta ahora, se han descrito dos genes Foxl2 diana en dos tejidos diferentes, el gen del receptor de hormona liberadora de gonadotropina (GnRHR, por sus siglas en inglés,

gonadotropin releasing hormone receptor) en la pituitaria y el gen esteroideogénico agudo regulador (StAR, por sus siglas en inglés, steroidogenic acute regulatory) en el ovario adulto. Mientras Foxl2 contribuye a una activación transcripcional de GnRHR, a través del elemento secuencia activadora del receptor de GnRH (GRAS, por sus siglas en inglés, GnRH-Receptor Activating Sequence), conduce a una represión transcripcional de StAR (Pannetier et al., 2006). Incluso inicialmente se encontró que Foxl2 funcionaba como un represor transcripcional del gen regulador agudo esteroideogénico (StAR).

StAR es también un marcador de diferenciación de células de la granulosa y es expresado en células de la granulosa de folículos grandes preovulatorios, pero no en folículos pequeños y medianos inmaduros. Foxl2 se une al promotor StAR humano y suprime su actividad, sugiriendo que la represión transcripcional de Foxl2 evita la expresión de StAR en folículos inmaduros (Pisarska et al., 2011).

Ahora bien, curiosamente, en el ovario de pollo en desarrollo y la trucha arcoiris, el perfil de expresión espacio-temporal de Foxl2 está fuertemente correlacionado con los del gen Cyp19 que codifica la aromatasa, la enzima responsable de la conversión de andrógenos en estrógenos. En efecto Foxl2 regula al gen P450 aromatasa (Cyp19), la cual a su vez esta mediada por señales de FSH (Pannetier et al., 2006).

Foxl2 ya ha sido descrito en varias especies como un regulador positivo de la aromatasa. Esto sugiere que Foxl2 puede influir directa o indirectamente en la señalización de estrógenos, esto mediante la regulación de varios genes clave necesarios para la producción de estrógenos; incluso se ha visto que Foxl2 activa la expresión de Cyp19a1 en varios modelos de mamíferos, incluidos los ovarios de cabra y ratón y en cultivos de células humanas (Georges et al., 2014).

Un estudio realizado por Pannetier y colaboradores (2006) ha demostrado un efecto regulador transcripcional directo de Foxl2 sobre el promotor de aromatasa, ya que observaron el aumento en la producción de estrógenos durante los primeros pasos de la diferenciación ovárica inducido por Foxl2, esto mediante experimentos de co-transfección

en cultivos celulares de granulosa primaria de oveja demostrando un efecto directo de Foxl2 sobre el promotor de Cyp19. Además, lograron observar que la expresión de Foxl2 permanece estable, mientras que la expresión de Cyp19 disminuye a los 60 días post-coito (Pannetier et al., 2006).

La expresión de Foxl2 es constante en todas las etapas del crecimiento folicular, desde folículos primordiales hasta el folículo preovulatorio, desde el ovario fetal hasta el juvenil y hasta el adulto, esto fue visto mediante un estudio en ovarios de ratones hembra tanto fetales como neonatales y adultos, aplicando RT-PCR e hibridación *in situ* (Pisarska et al., 2004).

2.4.2 Relación entre Foxl2 y AMH

La existencia de una vía reguladora común que involucra a FOXL2 y AMH ha sido estudiada por Park y colaboradores (2014), quienes han formulado la hipótesis de la existencia de una red regulatoria positiva que involucra a AMH y FOXL2 que controla la reserva folicular. En este sistema, FOXL2 puede ser el activador transcripcional de AMH y podrían limitar y prevenir el reclutamiento folicular temprano (Sacchi, Marinaro, Xella, Marsella, Tagliasacchi, La Marca, 2017; Park, Suh, Lee, Bae, 2014). Esta relación se confirmó en ratones knockout para AMH, donde los ovarios mostraron una disminución en la expresión de Foxl2 y el crecimiento folicular acelerado generado por la ausencia de AMH, lo cual se revirtió mediante inyección intraovárica de vector transfectado con Foxl2 (Sacchi et al., 2017).

Otro estudio realizado por Park y colaboradores (2014) indicaron que Foxl2 es un activador transcripcional crítico de AMH, lo cual en efecto restringe el crecimiento folicular temprano, esto fue posible mediante experimentos *in vivo* en ratones que revelaron que al bloquear la expresión de AMH propicia la aceleración del crecimiento folicular, sin embargo, esta aceleración fue prevenida mediante la expresión ectópica de Foxl2, demostrando así que Foxl2 y AMH colaboran para preservar la reserva folicular. Además, descubrieron una importante relación cruzada positiva entre Foxl2 y AMH en la cual la

AMH regulada por Foxl2 estimula positivamente la transcripción de Foxl2 (Park et al., 2014).

2.4.3 Expresión de FOXL2 durante el envejecimiento ovárico

La expresión Foxl2 es obligatoria durante toda la vida reproductiva, actuando como un supresor de la progresión del folículo ovárico en folículos pequeños y medianos mediante la prevención de la diferenciación y / o proliferación prematura de células de la granulosa, evitando así el agotamiento prematuro de los folículos ováricos (Pelosi et al., 2015; Pisarska et al., 2014). Además de jugar un papel muy conservado en la regulación del desarrollo ovárico temprano y la determinación del sexo femenino en múltiples especies (Pisarska et al., 2011).

En un estudio realizado por Uhlénhaut y colaboradores (2009) demostraron que con la pérdida de Foxl2 en el ovario adulto, dos linajes celulares somáticos femeninos principales cambian su destino celular, dando como resultado un raro ejemplo de reprogramación de linaje adulto real *in vivo*. Mientras que las células de la granulosa, que soportan los ovocitos, se reprograman en células tipo Sertoli que son específicas de testículo. En este estudio se emplearon experimentos de ablación genética de ovocitos, demostrando que la reprogramación es independiente de células y ovocitos. Además, demostraron que Foxl2 reprime el programa de diferenciación testicular principalmente a través de la represión de las secuencias reguladoras de Sox9 que se requieren para su expresión específica en el testículo. Al igual que Yin y Yang, FOXL2 y SOX9 se oponen mutuamente para asegurar juntos el establecimiento y el mantenimiento de los diferentes tipos celulares femeninos y masculinos, respectivamente (Uhlénhaut, Jakob, Anlag, Eisenberger, Sekido, Kress, Treier, Klugmann, Klasen, Holter, Riethmacher, Schütz, Cooney, Lovell-Badge, Treier, 2009).

Los estudios mencionados indican que la expresión de Foxl2 permanece relativamente constante a lo largo de toda la vida reproductiva, no solo como un regulador de la foliculogénesis, sino también como un regulador crítico del mantenimiento de la

diferenciación sexual femenina en los diferentes linajes celulares propios del ovario, sin embargo, el nivel de expresión de Foxl2 a lo largo de la vida reproductiva femenina hoy en día permanece poco entendido, al igual que el estudio de Cyp11a1 y Cyp19 para la formación y el mantenimiento de la reserva folicular.

2.5 ENVEJECIMIENTO OVÁRICO

En 1921, Pearl y Schoppe citaron una doctrina biológica básica indicando que “durante la vida del individuo no existe ni puede haber ningún aumento en el número de ovocitos primarios más allá de los originalmente establecidos cuando se formó el ovario” (Johnson, Canning, Kaneko, Pru, Tilly, 2004).

La vida reproductiva femenina y el proceso de envejecimiento ovárico son determinados por el número de ovocitos preestablecidos al nacer, los cuales disminuyen gradualmente hacia el punto en que se cuenta con escasos ovocitos capaces de desarrollarse después de la menopausia.

El agotamiento del número de ovocitos preestablecido de aproximadamente 7 millones (Baker y Sum, 1976), tiende a disminuir exponencialmente hasta aproximadamente 400,000 al llegar a la pubertad, lo cual puede ser atribuido a varios mecanismos que involucran apoptosis como: células germinales en el área cortical que migran a la superficie del ovario y se incorporan al epitelio superficial o son eliminados en la cavidad peritoneal, regresión durante la meiosis y falla en el encapsulamiento con las células de la granulosa para convertirse en folículos primordiales. El último mecanismo está influenciado por el gen bcl-2 que reprime activamente la muerte de las células germinales (Djahanbakhch y Zosmer, 2007; Johnson et al., 2004; Ratts, Flaws, Kolp, Sorenson, Tilly, 1995).

Una vez que se han establecido todos los folículos primordiales, después del nacimiento inicia una pérdida constante de ovocitos que ocurre a través del proceso fisiológico cíclico mensual de crecimiento, selección o reclutamiento folicular y atresia. Este proceso

continúa durante toda la vida de una mujer, incluso en el embarazo y períodos de anovulación (Djahanbakhch y Zosmer, 2007).

En la mujer humana, el agotamiento de la reserva folicular preestablecida al nacer ocurre aproximadamente a una edad de 50 años, lo cual conduce a la menopausia (Johnson et al., 2004).

Cabe mencionar que el envejecimiento ovárico también es resultado de la disminución adicional en la cantidad y calidad de los ovocitos, ya que esto determina eventos reproductivos como: la disminución de la fertilidad, el aumento de la tasa de aborto, el final de la fertilidad, el comienzo de irregularidades en el ciclo y, finalmente cuando casi no quedan folículos, las menstruaciones se vuelven irregulares e inevitablemente se culmina con la aparición de la menopausia (Velde, Scheffer, Dorland, Broekmans, Fauser, 1998; Faddy, Gosden, Gougeon, Richardson, Nelson, 1992).

Ahora sabemos que el agotamiento de la reserva folicular en reposo concuerda con la disminución de la calidad de los ovocitos (Brook, Gosden, Chandley, 1984; Gauden, 1992; Eichenlaub-Ritter, 1996). La calidad de los ovocitos decrece debido a la acumulación de daños que surgen a medida que una mujer envejece (Gauden, 1992; Eichenlaub-Ritter, 1996).

En general Velde y colaboradores (1998), indican que se cree que actualmente la mayoría de los eventos reproductivos están dictados por la cantidad y la calidad decrecientes del grupo de folículos en reposo (la hipótesis ovárica) (Velde et al., 1998).

Hoy en día, el envejecimiento reproductivo debido al hecho de retrasar el período de la vida para concebir hijos contribuye considerablemente a la creciente proporción de infertilidad (Mosher y Pratt, 1991), por lo que actualmente ha incrementado a su vez la proporción de mujeres que requieren de métodos o técnicas de reproducción asistida.

Los primeros eventos endócrinos que indican el envejecimiento ovárico son los niveles de FSH en mujeres con periodos menstruales normales, los cuales comienzan a aumentar gradualmente entre una edad de 35 a 40 años, sin embargo, no se han caracterizado marcadores moleculares que determinen en qué punto o debido a que sucesos se da el envejecimiento ovárico, por lo cual en el presente estudio analizamos la influencia de ciertos genes que regulan el crecimiento/desarrollo folicular y cómo es que actúan durante el proceso del envejecimiento ovárico.

2.6 CONEJAS CHINCHILLA (*ORYCTOLAGUS CUNICULUS*) COMO BIOMODELO

Después de los ratones y ratas, el conejo es el tercer mamífero más empleado como modelo experimental. El conejo europeo (*Oryctolagus cuniculus*) pertenece taxonómicamente al orden lagomorpha de los mamíferos y, junto con las liebres, a la familia Leporidae. La distancia filogenética del conejo-primate es la misma que la del roedor-primate. Sin embargo, debido a que las secuencias de roedores evolucionaron más rápidamente, las secuencias de genes de conejos son más similares a las secuencias humanas que las de roedores (Fischer, Chavatte-Palmer, Viebahn, Navarrete Santos, Duranthon, 2012).

Los patrones de determinación y diferenciación sexual gonadal, así como la expresión gonadal son semejantes a las del humano (Díaz-Hernández et al., 2008).

Existen claras ventajas en el uso del conejo. El desarrollo embrionario y feto-placentario es similar al humano, por lo que el conejo es un modelo particularmente adecuado para el impacto del embrión y el desarrollo fetal en la descendencia y la salud de los adultos.

El conejo pertenece a las pocas especies en las que la ovulación es inducida por el apareamiento, no por un ciclo hormonal como en los humanos, lo que da como resultado un embarazo exactamente definido y una edad embrionaria (horas o días p.c.). El conejo tiene un ciclo reproductivo corto, ya que son receptivos a aparearse aproximadamente 14 de cada 16 días. El embarazo dura de 31 a 33 días, y se produce la madurez sexual femenina, dependiendo de las cepas, alrededor de los 4-5 meses de edad (Fischer et al., 2012; McClure, 2018).

3. JUSTIFICACIÓN

Actualmente el nivel de educación de la mujer ha incrementado, han llegado a ser más activas en el ámbito profesional y laboral, así como un acceso más fácil a métodos anticonceptivos, por tanto, la necesidad de tener hijos ha sido postergada a edades avanzadas, a más de 35 años (Sükür et al., 2014; Velde y Pearson, 2002).

Parte del patrón de ajuste social ha implicado cambios importantes en el comportamiento reproductivo, tales como la libre elección consciente de una vida sin hijos, aplazamiento de la procreación, una disminución en el número de hijos por pareja y una creciente incidencia de divorcios. Por ello hoy en día ha aumentado la cantidad de parejas que tienen dudas sobre el deseo de tener hijos, esto debido a las dificultades de combinar el deseo de una educación adicional o una profesión con tener hijos, sino también en la amenaza de pérdida de la libertad personal, por lo que cada vez más mujeres deciden tener hijos a una edad más avanzada. Todas estas tendencias demográficas cobraron impulso a finales de la década de 1960. Un suceso esencial para la llamada "segunda transición demográfica" fue la introducción y fácil acceso a métodos anticonceptivos confiables y bien tolerados, que condujeron a un cambio radical en el comportamiento reproductivo. Por primera vez en la historia, el vínculo entre la sexualidad y la reproducción se rompió. Tener hijos ya no era el inevitable destino biológico de una mujer, sino un tema para una cuidadosa consideración, que incluía elecciones de postergaciones planificadas, la decisión de tener una vida sin hijos y, si se deseaba más de un hijo, espaciando su orden de nacimiento. En los Países Bajos, la edad media a la que las mujeres conciben su primer hijo aumentó de 24.6 años en 1970 a 29.1 años en 1999. En la actualidad más mujeres deciden tener hijos a la edad de 30 años o más (Velde y Pearson, 2002).

Como resultado de posponer la edad de maternidad, el número de pacientes que no pueden quedar embarazadas y el diagnóstico de infertilidad femenina han ido incrementando, por lo cual se ven obligadas a recurrir a tecnologías de reproducción artificial (ART, por sus siglas en inglés, Artificial Reproductive Technologies). Entre las

mujeres, el proceso normal de envejecimiento reproductivo varía significativamente, influenciado a su vez por factores genéticos, ambientales, endócrinos, paracrinos y metabólicos, así como el estilo de vida de cada mujer; se piensa que afectan la disminución de la calidad de la reserva folicular y los ovocitos; incluso algunas mujeres continúan siendo altamente fértiles hasta los 40 años, mientras otras pierden la fertilidad a los 30 años. El proceso de envejecimiento reproductivo en la mayoría de las mujeres proviene de cambios en la función ovárica debido al envejecimiento cronológico. Los ovarios son afectados por el envejecimiento natural más que otros tejidos (Sükür et al., 2014).

En el presente estudio se analizaron los niveles de expresión de los genes AMH, AMHRII, Cyp11a1, Cyp19a1 y Foxl2 en ovarios de conejas chinchillas de diferentes edades, con la finalidad de determinar los patrones de expresión de dichos genes a lo largo de la vida reproductiva femenina y plantear un panorama más claro sobre la influencia de ciertos genes en el proceso del envejecimiento ovárico, correlacionando a su vez dichos niveles de expresión génica con los cambios histológicos que se presentan en los ovarios de conejas chinchilla de diferentes edades.

Para el presente estudio se eligió como biomodelo a conejas chinchilla (*Oryctolagus cuniculus*), debido a que la histología ovárica del conejo presenta una estructura similar a la humana, ya que en ambas especies podemos encontrar la corteza ovárica y la médula claramente definidos. Además, los patrones de determinación y diferenciación sexual gonadal en conejos presentan un patrón de expresión en la gónada semejante al humano (Díaz-Hernandez, León del Rio, Zamora, Merchant-Larios, 2008), características que permiten correlacionar la función fisiológica entre ambas especies.

Cabe mencionar que la formación de folículos primordiales y la diferenciación folicular ocurren después del nacimiento, lo cual permite desarrollar estudios sobre los distintos procesos del desarrollo y diferenciación folicular, así como de las características morfológicas y moleculares en cada etapa del proceso de foliculogénesis (Hutt, McLaughlin, Holland, 2006), en este caso para poder apreciar y conocer aquellos cambios que se presentan a lo largo del proceso de envejecimiento ovárico.

4. HIPÓTESIS

Si se caracterizan los cambios histológicos estructurales del ovario, los niveles de expresión de los genes *Foxl2*, *AMH*, *AMHRII*, *CYP11A1* y aromatasa, así como la intensidad de detección de los productos génicos de dichos genes que son claves para el mantenimiento de la función folicular en conejas chinchilla de diferentes edades, entonces se podrá demostrar su influencia en el proceso del envejecimiento ovárico.

5. OBJETIVOS

5.1 OBJETIVO GENERAL

Analizar la histología ovárica empleando la tinción tricrómica de Masson, así como la inmunolocalización e intensidad de *Foxl2*, *AMH*, *AMHRII*, *Cyp11a1* y *Cyp19a1* en muestras de ovarios de conejas chinchilla de 3, 4 y más de 12 meses, y analizar los cambios en los patrones de expresión génica de *Foxl2*, *AMH*, *AMHRII*, *Cyp11a1* y *Cyp19a1* mediante RT-PCR para la caracterización del proceso del envejecimiento ovárico de conejas chinchilla (*Oryctolagus cuniculus*).

5.2 OBJETIVOS PARTICULARES

- Muestrear ovarios de conejas chinchilla de diferentes edades y procesarlos para la obtención de cortes histológicos
- Caracterizar los cambios histológicos que presentan los ovarios de coneja de más de un año de edad.
- Analizar la inmunolocalización e intensidad de *Foxl2*, *AMH*, *AMHRII*, *Cyp11a1* y aromatasa en ovarios de conejas de diferentes edades.
- Realizar el diseño de oligonucleótidos específicos para la amplificación de los genes *Foxl2* y *AMHRII*.

- Determinar los niveles de expresión de Foxl2, AMH, AMHRII, Cyp11a1 y aromatasa en ovarios de conejas chinchillas de diferentes edades, mediante RT-PCR.
- Determinar los cambios en la intensidad de detección de las proteínas Foxl2, AMH, Cyp11a1 y aromatasa en ovarios de conejas chinchillas de diferentes edades, mediante inmunofluorescencia.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 OBTENCIÓN DE MUESTRAS

Para el desarrollo del proyecto experimental se emplearon ovarios de conejas chinchillas de 3, 4 y más de 12 meses de edad, indicados en la siguiente tabla:

Conejas jóvenes	Cantidad
3 meses	3
4 meses	3
Total	6

Conejas añosas	Cantidad
12 meses	1
16 meses	2
18 meses	1
20 meses	1
24 meses	2
28 meses	1
30 meses	3
34 meses	1
Total	12

Las conejas fueron sacrificadas con ketamina (22 mg/Kg) vía intramuscular y posteriormente pentobarbital sódico (40 mg/kg) vía intravenosa. Los procedimientos anestésicos están apegados a la NOM-062-ZOO, referente a al uso y cuidado de los animales de laboratorio. El protocolo se encuentra aprobado por la Comisión de investigación y Ética de la Facultad de Medicina, UNAM.

Posterior al sacrificio, se extrajeron rápidamente ambos ovarios y se colocan en PBS frío. Se procedió a eliminar la grasa y tejido conectivo circundante, uno de los ovarios de cada coneja se fijó con 4% de paraformaldehído en 1X PBS durante 17 horas para ser incluido en parafina y obtener cortes histológicos al micrótopo, el otro ovario de cada coneja se cortó transversalmente y se fijó en solución de Karnovsky para ser incluido en epon y

obtener cortes histológicos de alta resolución. El ovario contralateral se cortó en rebanadas de de aproximadamente 3 mm y se almacenaron en RNAlater® Solution de Ambion the RNA company AM7020 a -20°C para la posterior extracción de RNA total.

6.2 HISTOLOGÍA OVÁRICA

Los ovarios extraídos y fijados en 4% de paraformaldehído/PBS 1x se procesaron para su inclusión en parafina (ver anexo 1) y realizaron cortes histológicos con un micrótopo de la siguiente manera:

Se obtuvieron cortes alternados de 10 µm, con una separación de 150 µm entre cada corte hasta obtener de 15 a 30 laminillas dependiendo del tamaño del ovario, de esta manera se tienen cortes representativos a lo largo del ovario.

Los cortes obtenidos de 10 µm fueron teñidos utilizando el protocolo de la tinción tricrómica de Masson para examinar la morfología básica de los tejidos y folículos ováricos.

6.3 TINCIÓN TRICRÓMICA DE MASSON

Desparafinar cortes en una parrilla precalentada por 5 minutos a 80°C, las laminillas se colocaron aproximadamente 1 min y posteriormente fueron transferidas a xilol por 10 min, con agitación constante, pasado el tiempo los cortes fueron rehidratados mediante series descendentes de etanol: etanol al 100% por 3 min, se trasvasaron de nuevo a etanol 100% por 3 min, enseguida a etanol 96% por 5 min y se realizaron lavados con agua corriente para ser transferidos al fijador de Bouin incubado a 60°C por 1 hr. Se lavaron con agua corriente y se transfirieron a Hematoxilina férrica de Weigert por 10 min, se realizaron lavados con agua corriente y se observaron al microscopio los núcleos en color café, posteriormente se transfirieron a una solución de fucsina escarlata de Biebrich por 15 min, se lavaron con agua corriente y se observó al microscopio el tejido en color rojizo, se transfirieron a una solución de ácido fosfotúngstico – fosfomolibdico por 10 min, se

lavaron con agua corriente y se transfirieron a una solución de azul de anilina 1% por 5 min, se lavaron con agua corriente y se observó al microscopio el tejido conjuntivo en color azul, se lavaron con agua corriente y se colocaron en una solución de ácido acético 1% por 1 min, se lavaron con agua corriente y se procedió a deshidratar mediante series ascendentes de etanol, primero etanol 96% por 1min, posteriormente con etanol 100% por 1 min y se transfirieron a xilol por 5 min, y finalmente se realizó el montaje con cubreobjetos y medio de montaje Sub-x mounting medium (In Vitro Diagnostic, 13519).

6.4 DOBLE INMUNOFLUORESCENCIA

Para llevar a cabo el proceso de inmunofluorescencia se procesaron 4 laminillas de cada muestra.

De las laminillas con cortes alternados se realizaron inmunofluorescencias para detectar las proteínas FoxL2, las enzimas Cyp11a1 y aromatasa y a la hormona antimülleriana, implicadas en la función folicular. Los cortes fueron desparafinados en una parrilla precalentada por 5 minutos a 80°C, se colocaron las laminillas en la parrilla caliente aproximadamente 1 min, y fueron transferidas a xilol e hidratados mediante etanol 100% por 3 min, se trasvasaron de nuevo a etanol 100% por 3 min, enseguida a etanol 96% por 5 min y se realizaron lavados con agua corriente para ser transferidos a PBS 1x por 5 min, cambiar PBS 1x adicionando nuevamente PBS limpio por 5 min.

Se transfirieron las laminillas a un vaso coplig limpio para realizar la exposición de antígenos con el Buffer DIVA Decloaker 1x (Biocare Medical, DV2004MY) preparado a base de citrato de sodio con un pH de 6 y se utilizó una olla de presión Decloaking Chamber de Biocare Medical para inmunohistoquímica, colocando las laminillas a 110°C por 15 min. Una vez transcurrido el tiempo se abre la olla, se retiran las laminillas dentro del vaso coplin y se dejaron enfriar 15 min a temperatura ambiente, posteriormente se cambió gradualmente el Buffer DIVA 1x por PBS 1x.

A continuación, se procedió a montar las laminillas en un sequenza rack (Thermo Fisher Scientific) para inmunohistoquímica, una vez montadas se procedió a permeabilizar cada laminilla con Triton al 0.5%/PBS1x por 15 min, posteriormente se realizó el bloqueo de proteínas adicionando a cada laminilla suero de caballo al 10% / Albúmina al 2% / Triton al 0.5% por 2 hrs y se realizó un lavado con PBS 1x por 4 min.

Se colocó el anticuerpo primario (100uL) comercial generado en cabra anti Foxl2 en una dilución 1:400 (GTX25096; Genetex) durante toda la noche a 4°C. Al día siguiente se realizaron 3 lavados a cada una de las laminillas con PBS 1x por 4 min cada lavado y se colocó a cada laminilla el anticuerpo secundario Alexa fluor 555 anti cabra en una dilución 1:350 durante 20 min a temperatura ambiente, posteriormente se realizaron 3 lavados con PBS 1x por 4 min cada lavado.

Se continuó con una doble inmunofluorescencia para detectar la expresión de hormona anti- Müllariana, Cyp11a1, aromatasa o α -actina cuya expresión es característica de folículos pre-antrales y antrales y aromatasa. Para ello, las laminillas fueron lavadas 3 veces con PBS 1x por 4 min cada lavado y se procedió a permeabilizar cada laminilla con Triton al 0.5%/PBS1x por 15 min, posteriormente se realizó el bloqueo de proteínas adicionando a cada laminilla suero de caballo al 10%/Albúmina al 2%/Triton al 0.5% por 2 hrs y se realizó un lavado con PBS 1x por 4 min.

Se colocó el anticuerpo primario comercial generado en ratón anti-AMH en una dilución 1:25 (GTX42793; Genetex), anti-Cyp11a1 en una dilución 1:50 (sc-18043; Santa Cruz), anti-aromatasa en una dilución 1:25 (GTX42793; Genetex) y α -actina en una dilución 1:25 (sc-58669; Santa Cruz), y se incubaron durante toda la noche a 4°C. Al día siguiente se realizaron 3 lavados a cada una de las laminillas con PBS 1x por 4 min cada lavado y se colocó a cada laminilla el anticuerpo secundario fluorescente Alexa fluor 555 anti mouse en una dilución 1:400 incubándolos durante 20 min a temperatura ambiente, posteriormente se realizaron 3 lavados con PBS 1x por 4 min cada lavado. Los núcleos fueron teñidos con TOTO3-iodide en una dilución 1:750 (T3604; ThermoFisher Scientific). Si los tejidos presentes en las laminillas procesadas presentan auto-fluorescencia que

podiese interferir con el análisis, se procede a adicionar a cada laminilla reactivo TRUE BLACK 20X en una dilución 1:20 con etanol al 75%.

Las laminillas fueron montadas con el medio de montaje Tissue-Tek® O.C.T. Compound (4583; Sakura Finetek) visualizadas y fotografiadas en el microscopio confocal LSM5 Pascal, Zeiss.

6.5 EXTRACCIÓN DE RNA MEDIANTE RNEASY PLUS MINI KIT

Antes de comenzar se preparó el buffer RLT adicionando β -mercaptoetanol a la solución RLT y mezclando.

Todas las centrifugaciones realizadas en cada paso se mantuvieron a temperatura ambiente.

Las muestras de los ovarios extraídos (cortes en rebanadas) se encontraban preservadas en RNAlater® a -20°C , se tomaron los tejidos con pinzas de disección y se depositaron en buffer RLT, se disgregaron y homogenizaron las muestras con un homogenizador plástico manteniendo 15 min el homogenizado a temperatura ambiente, posteriormente se centrifugaron a 13,000 rpm por 10 min, enseguida se pasó el sobrenadante sin llevarse restos celulares (detritus) a un tubo eppendorf nuevo de 1.5 mL, evitando llevarse restos celulares, a continuación se adicionaron 350 μL etanol al 70% mezclando bien por inmersión para precipitar el RNA; enseguida se transfirió toda la muestra a una columna rosa RNeasy spin, manteniendo por 2 min a temperatura ambiente y se centrifugo a 10,000 rpm por 1 min, se desechó el eluido y se limpió brevemente el tubo colector con gasa estéril, continuando el procedimiento con cada muestra procesada, posteriormente se adiciono buffer 700 μL de Buffer RW1 y se centrifugó a 10,000 rpm por 1 min.

6.6 TRATAMIENTO CON DNASA

A continuación se realizó el tratamiento con DNAsa, para lo cual primero se preparó la DNAsa a una concentración de 1U/ μL con de buffer RDD, mezclando por pipeteo,

posteriormente se adicionó la DNAsa previamente preparada, al centro de la membrana de la columna y se incubó por 15 min a temperatura ambiente, enseguida se adicionaron 350 μ L de buffer RW1 y se centrifugó a 10,000 rpm por 1 min, este paso se repitió y se procedió a lavar con 500 μ L de buffer RPE, se centrifugo a 10,000 rpm por 2 min y se repitió este último paso.

A continuación, se cambió la funda de la columna y se centrifugó a 12,000 rpm por 2 min para secar la membrana, se cambió la columna a un tubo eppendorf de 1.5 mL limpio y etiquetado, y finalmente se eluyó el RNA con 10 - 25 μ L de agua pisa libre de RNAsas adicionada directo a la membrana de la columna, se incubó durante 3 min a temperatura ambiente y se centrifugó a 13,000 rpm por 2 min, repitiendo este último paso.

6.7 INTEGRIDAD DEL RNA

Una vez extraído el RNA se revisó la integridad de este mediante electroforesis horizontal en gel de agarosa al 1%.

Se preparó un gel de agarosa al 1% con 0.4 g de agarosa y 40 mL de buffer TAE 1x, calentándolo en un microondas LG por 2 min hasta obtener una mezcla traslucida y homogénea, y se procedió a adicionar 2 μ L de GelRED Biotium, se dejó entibiar a temperatura ambiente y posteriormente se adiciono al molde de la cámara de electroforesis, se colocó el peine y se incubo a 4°C para que se polimerizara, es decir que se solidificara, una vez sólido y frio se retiró el peine y se montó en la cámara de electroforesis con buffer TAE 1x, se prepararon 2 μ L de la muestra más 5 μ L del buffer de carga para cada muestra, posteriormente se cargó un volumen total de 7 μ L en cada pozo del gel, se programó la cámara a 90 volts por aproximadamente 30-40 min y finalmente se fotodocumentó en el transiluminador Alliance® MINI HD6 UVITEC Cambridge.

6.8 CUANTIFICACIÓN DE RNA TOTAL

Una vez comprobada la integridad del RNA y corroborar la ausencia de DNA genómico, se procedió a realizar la cuantificación de RNA total mediante el uso del 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.

6.9 SÍNTESIS DE CDNA

Para la síntesis del cDNA se prepara una mezcla de un volumen calculado para tener 1 µg de RNA extraído más la adición de oligo dT a una concentración de 0.5 µg/ µL, random P a 3 µg/ µL y la cantidad necesaria de agua para completar un volumen final de 13 µL, en un tubo eppendorf de 0.2 mL; se pasaron por el vortex y se bajó la mezcla con el spin, este proceso se lleva a cabo en frío, posteriormente se colocaron los tubos en el termociclador y se programó a 65°C por 10 min e inmediatamente se sacaron los tubos del termociclador y se colocaron en una gradilla congelada a -20°C.

A continuación, se preparó una mezcla maestra o master mix con 4 µL de buffer para síntesis de cDNA, 2 µL de dNTPs 10 mM, 0.5 µL de RNAsa out y 0.5 µL de enzima transcriptasa reversa para cada una de las muestras a procesar, se coloca al vortex y se asienta con spin, posteriormente se adicionaron 7 µL de esta mezcla a cada tubo que anteriormente salió del termociclador, una vez adicionada la mezcla maestra, se colocan los tubos en el termociclador seleccionando el programa cDNA que comprende 34 ciclos de 25°C por 10 min, enseguida asciende a 55°C por 40 min y finalmente asciende a 85°C por 5 min, una vez cumplidos los 34 ciclos se retiraron los tubos del termociclador y se almacenan las muestras a -20°C

6.10 ESTANDARIZACIÓN DE LAS CONDICIONES DE RT-PCR

Las condiciones necesarias para llevar a cabo la RT-PCR fueron determinadas mediante una PCR de gradiente de temperatura de alineamiento de 52° a 60°C, en un equipo de Mastercycle gradient Eppendorf, para cada gen de expresión de FOXL2, AMH y aromatasa.

Para esto se tomaron 6 µL del cDNA (previamente sintetizado de una muestra de coneja de 4 meses), repartidos en 6 tubos eppendorf de 0.2 mL, más la adición de 6 µL Buffer 5x MyTaq, 10pmol/µL de Oligo Sentido, 10pmol/µL Oligo Anti-Sentido, 20.7 µL de agua pisa y 5U/µL de enzima DNA Polimerasa MyTaq™, para cada muestra a trabajar, obteniendo un volumen final de 30 µL para cada una de dichas muestras, es decir 6.

Se establecen 6 muestras ya que se trata de un PCR de gradiente en donde a cada tubo se le aplica una temperatura diferente y de manera creciente, en donde al tubo 1 se le asigna una temperatura de 52°C, al tubo 2 54 °C, al tubo 3 56°C, al tubo 5 58°C y al tubo 5 60°C, más un tubo como control negativo colocado a 52°C.

Para comprobar si se obtuvo la amplificación adecuada se corrobora mediante una electroforesis en gel de agarosa al 1%, preparando las muestras con el volumen total de 30 µL más la adición de 5 µL de buffer de carga.

Se preparó el gel al 1% con 0.4 g de agarosa y 40 mL de buffer TAE 1x, se calienta hasta obtener una mezcla traslúcida y homogénea, y se procedió a adicionar 2 µL de GelRED y se dejó entibiar a temperatura ambiente y posteriormente se adiciono al molde de la cámara de electroforesis, se colocó el peine y se incubo a 4°C para que se polimerizara, es decir que se solidificara, una vez sólido y frio se retiró el peine y se montó en la cámara de electroforesis con buffer TAE 1x y se cargaron 14 µL de la preparación antes mencionada en cada pozo del gel, programando la cámara a 90 volts por aproximadamente 30-40 min y finalmente se fotodocumentó en el transiluminador Alliance® MINI HD6 UVITEC Cambridge.

6.11 PURIFICACIÓN DE AMPLIFICADOS PARA SECUENCIACIÓN

Se realizan 10 reacciones de PCR para cada gen a estudiar, cada uno con sus respectivas condiciones de temperatura y número de ciclos, una vez concluido el proceso de PCR se procedió a juntar las 10 reacciones en una sola, para realizar la electroforesis en gel de agarosa al 1 o 2% dependiendo del gen en cuestión, con la finalidad de generar una banda que contenga una gran concentración de productos amplificados de cada gen, posteriormente se realizó la purificación del gen.

Una vez listo el gel de agarosa, se coloca en el transiluminador y posteriormente se corta la banda del amplificado con un bisturí, procurando retirar el exceso de agarosa y se procede a colocar la banda dentro de un tubo falcon de 15mL previamente pesado y se vuelve a pesar con la banda dentro. Una vez determinado el peso de la banda se procede a la purificación mediante el uso del kit Zymo Research MiniPrep, primero se determinó un volumen del reactivo ADB de tres veces el volumen de la banda (1g equivale a 3mL) y se procedió a disolver la banda a 60°C, una vez disuelto se adicionan de 600µL de la disolución en una columna del kit y se centrifugo a 9,800rpm por 1 minuto, se descarta el eluido, se seca bien la columna con gasa estéril y se procede a centrifugar el resto de la banda disuelta en buffer ADB; una vez centrifugado todo el contenido del tubo falcon se procede a adicionar 300µL de buffer de lavado en la columna y se centrifuga a 9,800rpm por 2 minutos y se repite el lavado; finalmente se procede a eluir el DNA adicionando 15µL agua pisa, se deja reposar por 3 minutos y se procede a centrifugar a 9,800rpm por 2 minutos, una vez eluido el DNA debe ser cuantificado y guardado a -20°C hasta su posterior uso.

6.12 LIGACIÓN USANDO EL VECTOR PGEM-T

Se centrifugas brevemente los tubos del vector pGEM-T y del Control Insert DNA para recolectar el contenido en el fondo de tubos de recolección, posteriormente se realiza la reacción de ligación de acuerdo con la siguiente tabla:

Componentes de reacción	Reacción estándar	Control positivo	Control de fondo
Buffer de ligación 2X, T4 DNA Ligasa	5 μ l	5 μ l	5 μ l
Vector pGEM-T	1 μ l	1 μ l	1 μ l
Productos de PCR	X μ l*	-----	-----
Control Insert DNA	-----	2 μ l	-----
T4 DNA ligasa (3 unidades Weiss/ μ l)	1 μ l	1 μ l	1 μ l
Agua libre de nucleasas para un volumen final de	10 μl	10 μl	10 μl

* Proporción molar de productos de PCR: el vector puede requerir optimización.

Se debe procurar usar tubos de 0.5 ml, ya que tienen baja capacidad de unión al DNA, y vortexear el buffer de ligación rápida 2X vigorosamente antes de cada uso.

El vector se encuentra optimizado para usarse en una proporción molar 1:1 del Control Insert DNA para los vectores. Se recomienda su uso en una proporción de 1:8 o 8:1. En proporciones de 3:1 o 1:3 proporcionan buenos parámetros iniciales.

Se requiere el uso de células competentes de alta eficiencia.

Una vez realizadas las reacciones, estas deben ser mezcladas por pipeteo y posteriormente incubadas por 1 hora a temperatura ambiente. Si se requiere el número máximo de transformantes, se debe incubar la reacción toda la noche a 4°C.

6.13 TRANSFORMACIÓN BACTERIANA

Se realiza la preparación de 2 platos de medio LB/ampicilina/IPTG/X-Gal para cada reacción de ligación previamente realizadas, más 2 platos extra para determinar la eficiencia de la transformación. Equilibrar los platos a temperatura ambiente.

Proceder a centrifugar el contenido de los tubos de reacción de ligación para recolectar el contenido al fondo y adicionar 2 μ l de cada reacción de ligación a tubos estériles o tubos de microcentrifuga de 1.5ml en hielo. Aumentar otro tubo en hielo con 0.1ng del

plásmido sin cortar para la determinación de la eficiencia de transformación de las células competentes.

Proceder a sacar del congelador las células competentes de alta eficiencia y colocarlas en hielo hasta que se descongelen, posteriormente mezclar las células sacudiendo gentilmente los tubos, se debe evitar el pipeteo excesivo, ya que las células son extremadamente frágiles.

Se transfieren cuidadosamente 50 μ l de células dentro de cada tubo preparado anteriormente (usar de 100 a 200 μ l de células para la determinación de la eficiencia de la transformación), posteriormente sacudir suavemente los tubos para mezclarlos y dejar en hielo por 20 min.

Calentar las células por 45 – 50 segundos en baño de agua a 42°C, evitando sacudirlas, inmediatamente regresar los tubos al hielo por 2 minutos y adicionar 950 μ l de medio SOC a temperatura ambiente a los tubos que contienen células transformadas con reacciones de ligación y adicionar 900 μ l al tubo que contienen las células transformadas con el plásmido sin cortar (el medio LB puede ser sustituido, pero el número de colonias puede ser bajo).

Se procede a incubar por 1 hora y media a 37°C con agitación constante (~150rpm), posteriormente se procede a realizar el sembrado, adicionando a cada plato de 100 o 200 μ l de cada cultivo de transformación en placas duplicadas de LB/ampicilina/IPTG/X-Gal. Para el control de transformación, se recomienda una dilución de 1:10 con medio SOC para platear. Si se requiere un alto número de colonias, las células pueden sedimentarse por centrifugación a 1,000 x g por 10 minutos, resuspender en 200 μ l de medio SOC, y platear 100 μ l en cada una de las dos placas.

Finalmente proceder a incubar las placas toda la noche (16 – 24hrs) a 37°C. Si se usan células competentes de ultra alta eficiencia pueden resultar en un alto número de colonias de fondo.

Alargar el periodo de incubación o almacenaje de placas a 4°C (después de 37°C incubadas toda la noche). Pueden ser usadas para facilitar del desarrollo de color azul. Las colonias blancas generalmente contienen inserto; sin embargo, el inserto también puede presentarse en las colonias azules.

6.14 SCREENING (SELECCIÓN) DE TRANSFORMANTES PARA INSERTOS

Al término de la incubación de las placas, se procede a seleccionar aislar 3 a 5 colonias blancas que serán plaqueadas nuevamente en placas de medio LB, con la finalidad de obtener una sola colonia blanca aislada que contengan específicamente los productos de PCR insertados inicialmente, para proceder a cultivar dicha colonia aislada en medio LB líquido, proceder a incubarlo toda la noche a 37°C y así obtener más clonas para la extracción del plásmido.

6.15 PURIFICACIÓN DE DNA PLASMIDICO MEDIANTE QUICK PLASMID MINIPREP

Antes de iniciar se recomienda adicionar RNase A al Buffer de resuspensión (R3) de acuerdo con las instrucciones de la etiqueta, mezclar bien y marcar el bote en la etiqueta después de adicionar la RNase A, guardar el buffer R3 con la RNase A a 4°C y precalentar el Buffer de lisis (L7) brevemente a 37°C para redissolver cualquier materia particular, y adicionar etanol 96 – 100% a los buffers de lavado (W9 y W10) de acuerdo con lo indicado en la etiqueta en cada caso. Mezclar bien. Guardarlos a temperatura ambiente.

Realizar todas las centrifugaciones a temperatura ambiente usando una microcentrifuga.

Primero se procede a realizar la recolección mediante centrifugación de 1 – 5 ml del cultivo de LB de toda la noche hasta remover todo el medio, posteriormente resuspender

mediante la adición de 250µL de Buffer de resuspensión (R3) con RNasa A al pellet celular y resuspender hasta que sea homogéneo.

Proceder al lisado mediante la adición de 250µL Buffer de lisis (L7), mezclarlo gentilmente por inversión hasta que la mezcla sea homogénea, evitando vortexear, en seguida incubar el tubo a temperatura ambiente por 5 min.

Posteriormente se realiza la precipitación mediante la adición de 350µL del Buffer de precipitación (N4), y se mezcla inmediatamente por inversión, o para pellets grandes, agitar vigorosamente, hasta que la mezcla sea homogénea, evitando vortexear y proceder a centrifugar el lisado a >12,000 x g por 10 min.

Continuar con el sobrenadante obtenido después de la precipitación y colocarlo en la columna spin dentro de un tubo de lavado de 2mL y centrifugar la columna a 12,000 x g por 1 min., descartar el filtrado y secar bien el tubo con gasa estéril, regresar columna dentro del tubo.

Proceder a realizar el primer lavado adicionando 500µL de Buffer de lavado (W10) con etanol en la columna e incubarla por 1 min a temperatura ambiente. Centrifugar la columna a 12,000 x g por 1 min., descartar el filtrado y secar bien el tubo con gasa estéril, regresar columna dentro del tubo.

Realizar otro lavado y la remoción de etanol mediante la adición de 700µL de Buffer de lavado (W9) con etanol en la columna y centrifugar la columna a 12,000 x g por 1 min, descartar el filtrado y secar bien el tubo con gasa estéril, regresar columna dentro del tubo y centrifugar la columna de nuevo a 12,000 x g por 1 min., descartar el tubo de lavado con el filtrado.

Se procede a realizar la elución colocando la columna en un tubo nuevo de 1.5 mL y adicionar de 30 – 35µL de agua pisa en el centro de la membrana de la columna e incubar la columna por 2 min a temperatura ambiente.



Finalmente se realiza la recuperación del DNA mediante la centrifugación de la columna a 12,000 x g por 2 min, descartando la columna, posteriormente el DNA plasmidico es guardado a 4°C (a corto plazo) o bien guardar en alícuotas a -20°C (a largo plazo).

6.16 MICROSCOPIA DE ALTA RESOLUCIÓN

6.16.1 Inclusión en epon

Los ovarios fueron fijados en Karnovsky toda la noche, el cual es un fijador hecho a partir de una mezcla de fijadores (glutaraldehído y paraformaldehído) para proporcionar una mejor estructura, estabilidad y dureza al tejido. Se lavaron con un buffer de cacodilatos de sodio al 0.1M durante 2 horas y se procedió a la posfijación con tetróxido de osmio bajo una campana de extracción durante 2 horas; se lavaron con agua destilada. Las muestras fueron deshidratadas en diferentes grados de etanol (70%, 80%, 90%) durante 20 minutos cada uno y se realizaron dos cambios de etanol al 100% por 30 minutos cada uno, enseguida se realizaron dos cambios de acetonitrilo (Baker, cat. 9011-02) de 30 minutos, posteriormente fueron impregnadas con Epon (Embed 812, cat. 14900, Electron microscopy sciences): acetonitrilo en proporción 1:1 por una hora y Epon: acetonitrilo en proporción 2:1 por una hora, finalmente fueron incluidas en Epon puro en moldes adecuados previamente identificados, se incubaron toda la noche a 60°C para su polimerización, y se obtuvieron cortes semifinos en un ultramicroscopio (Power Tome Microtomy XL, RMC).

6.16.2 Obtención de cortes semifinos

De los ovarios incluidos en Epon se procedió a localizar la orientación del ovario con ayuda de un ultramicrotomo (Power Tome Microtomy XL, RMC), cortando con una navaja de metal la superficie de manera uniforme, haciendo la forma de una pirámide una vez localizada la gónada. Se obtuvieron cortes semifinos de 1 µm de grosor con ayuda de navajas de cristal, las cuales fueron fijadas en la base del ultramicrotomo y orientadas correctamente para realizar los cortes de los prismas de Epon, que fueron fijados en el brazo del aparato. Una vez orientados de manera paralela tanto el prisma de Epon como

la navaja de cristal se procedió a acercar con extremo cuidado la navaja con ayuda del objetivo del ultramicrotomo, la base fue fijada y posteriormente se realizaron cortes completos y brillantes, las navajas de cristal fueron llenadas con agua bidestilada y con ayuda de asas se trasladaron al colorante para ser teñidas.

Los cortes fueron teñidos con azul de toluidina 0.5%, el cual fue calentado previamente a temperatura constante a través de una estufa eléctrica (Type 1900, modelo HP-A1915B), posteriormente se retiró el exceso de colorante en una caja de cultivo con agua bidestilada y alcohol 96° para después ser montados en portaobjetos sobre una estufa con ayuda de un asa, y finalmente para su fotodocumentación al microscopio (AxioCam HRc, Zeiss).

6.17 ANÁLISIS ESTADÍSTICO MEDIANTE PRUEBA T DE STUDENT

Se emplearon imágenes de electroforesis en gel de agarosa 1% de las amplificaciones de fragmentos de los genes Foxl2, AMH, AMHRII, Cyp11a1 y aromatasa de muestras de conejas jóvenes y añosas, obtenidas con el equipo Alliance® MINI HD6 UVITEC Cambridge y la densidad de los amplicones obtenidos fueron analizados mediante el programa ImageJ 1.50i.

Mediante la prueba estadística de t de Student se obtuvo un p-valor que permite comparar y comprobar si hay o no diferencias significativas en los niveles de expresión de cada gen entre los grupos de conejas jóvenes y añosas.

Estableciendo un nivel de significancia de 0.01, el cual indica que el valor p menor a dicho nivel de significancia demuestra que si hay cambios estadísticamente significativos, de lo contrario si el valor de p obtenido es mayor a 0.01 indica que no hay cambios estadísticamente significativos.

7. RESULTADOS

7.1 CARACTERIZACIÓN HISTOLÓGICA DEL ENVEJECIMIENTO OVÁRICO

El estudio histológico se realizó en cortes de ovarios de conejas chinchilla de 4 meses (N=4) y conejas de más de 12 meses (N=7), mediante el uso de la tinción tricrómica de Masson, para comparar los cambios estructurales que se presentan a lo largo del proceso del envejecimiento ovárico, y a su vez correlacionar dichos cambios estructurales con los niveles de expresión de los genes *Foxl2*, *AMH*, *AMHRII*, *Cyp11a1* y *Cyp19* con respecto al avance de la edad.

En el ovario de una coneja en etapa reproductora (cuatro meses) se observa el epitelio superficial cúbico simple que recubre el ovario. En la región cortical se observa la túnica albugínea falsa, y a continuación los folículos en diferentes estadios de desarrollo; es clara la presencia de una abundante reserva folicular conformada por folículos primordiales I y folículos primarios II, numerosos folículos secundarios tempranos o preantrales (III), folículos antrales (IV) así como folículos atrésicos (V) (Figura 11 A-D).

En la región medular se encuentra un conjunto de abundantes vasos sanguíneos y linfáticos que penetran al ovario a través del hilum.

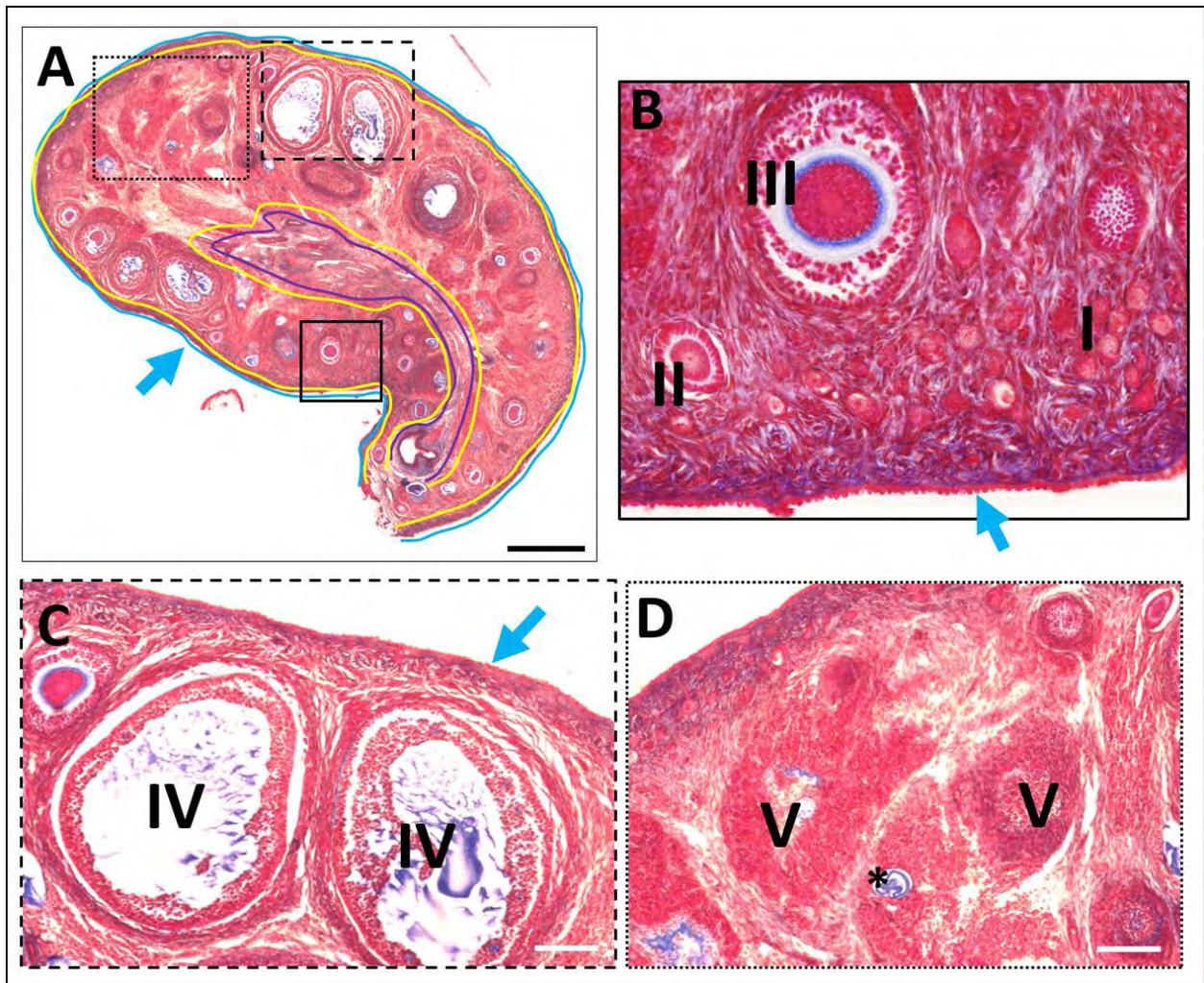


Figura 11. Histología del ovario de coneja de 4 meses (edad reproductora), usando la tinción tricromica de Masson. (A) Corte representativo de un ovario de coneja de 4 meses de edad que muestra la presencia de folículos en diferentes etapas de desarrollo. La línea y flechas azules indican el epitelio superficial de recubrimiento, la línea amarilla indica la región de la corteza ovárica y la línea morada indica la región medular. (B) Se muestra una mayor amplificación de folículos primordiales (I), primarios (II) y secundarios tempranos (II). (C) El área punteada amplificada muestra folículos antrales (IV). (D) muestra la presencia de folículos atrésicos (V) y remanentes de folículos atrésicos (*). Barra de escala A=500 μ m; B, C y D=100 μ m.

En la figura 12, observamos fotomicrografías representativas del ovario de una coneja de 28 y 34 meses. Entre los cambios se observaron, una hiperplasia del epitelio superficial que recubre el ovario. En la figura 12B, se apreció la amplificación de papilas que se forman en la superficie del ovario. Con respecto a la región cortical se observa un decremento de la reserva folicular (folículos primordiales I y primarios II), dicha reserva

se encuentra principalmente en las zonas adyacentes al hilio (Fig. 12A y D). Es evidente la hipertrofia de la glándula intersticial que ocupa gran parte de la corteza, asimismo se observa un abundante número de remanentes foliculares (Fig. 12A, B, D)

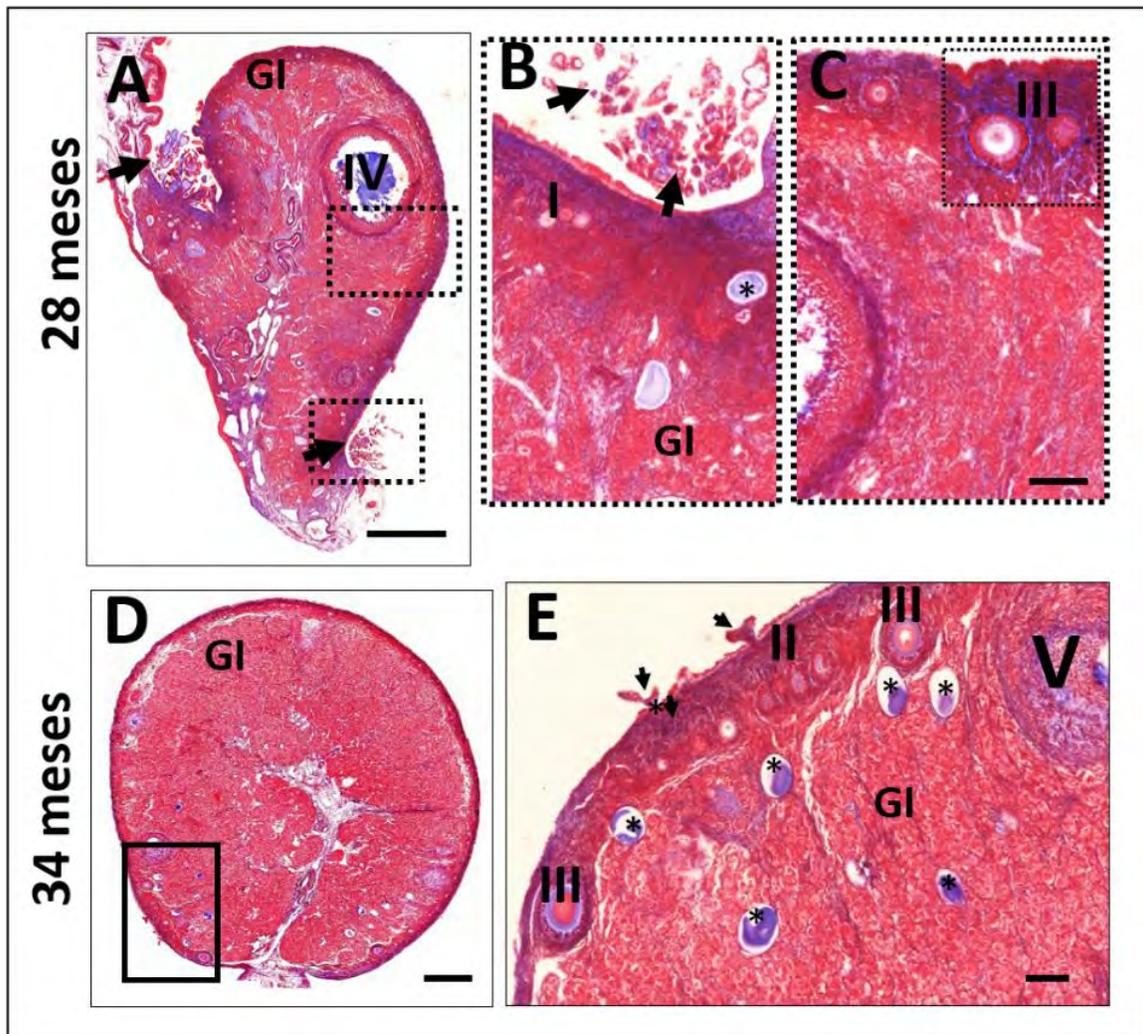


Figura 12. Histología del ovario de conejas maduras, usando tinción Tricromica de Masson. Es visible el incremento en el tamaño de la glándula intersticial y la reducción en el número de folículos. (A) Corte representativo de un ovario de coneja de 28 meses de edad que muestra el crecimiento de la glándula intersticial y algunos folículos en diferentes etapas de desarrollo. (B y C) Muestran una mayor amplificación de las áreas punteadas en la imagen A, y se muestra la presencia de glándula intersticial, además, aun se muestran folículos primordiales (I) y secundarios tempranos (III) y remanentes de folículos atrésicos (*). (B) Muestran la presencia de crecimiento papilar de la superficie del epitelio ovárico (flecha negra). (D) Corte representativo de un ovario de coneja de 34 meses de edad que muestra el crecimiento de la glándula intersticial y algunos folículos en diferentes etapas de desarrollo. (E) Muestra la presencia de escasos folículos primarios (II), secundarios tempranos (III) y atrésicos (V), numerosos remanentes de folículos atrésicos (*) y glándula intersticial (GI). Escala A y D = 500 μ m. B, C y E = 100 μ m.

Para observar con mayor detalle los cambios que se presentan en los ovarios de las conejas de más de 12 meses de edad, se obtuvieron cortes semifinos. La fig.13A muestra una fotomicrografía de la reserva folicular, donde se aprecian folículos primordiales y primarios. Mientras que en los escasos folículos encontrados en la coneja de 24 meses se observa la presencia de vacuolas en los ovocitos de dichos folículos. Con respecto a los folículos antrales de los ovarios de coneja de 4 meses, las células de la teca interna forman una estructura alargada semejante a un epitelio (Fig. 13C) mientras que las células de la teca interna de la coneja de 24 meses de edad han perdido la estructura epitelioide y presentan una forma mesenquimatososa. Además, es posible apreciar la presencia de abundantes vacuolas en las células que conforman a la glándula intersticial (figura 13D).

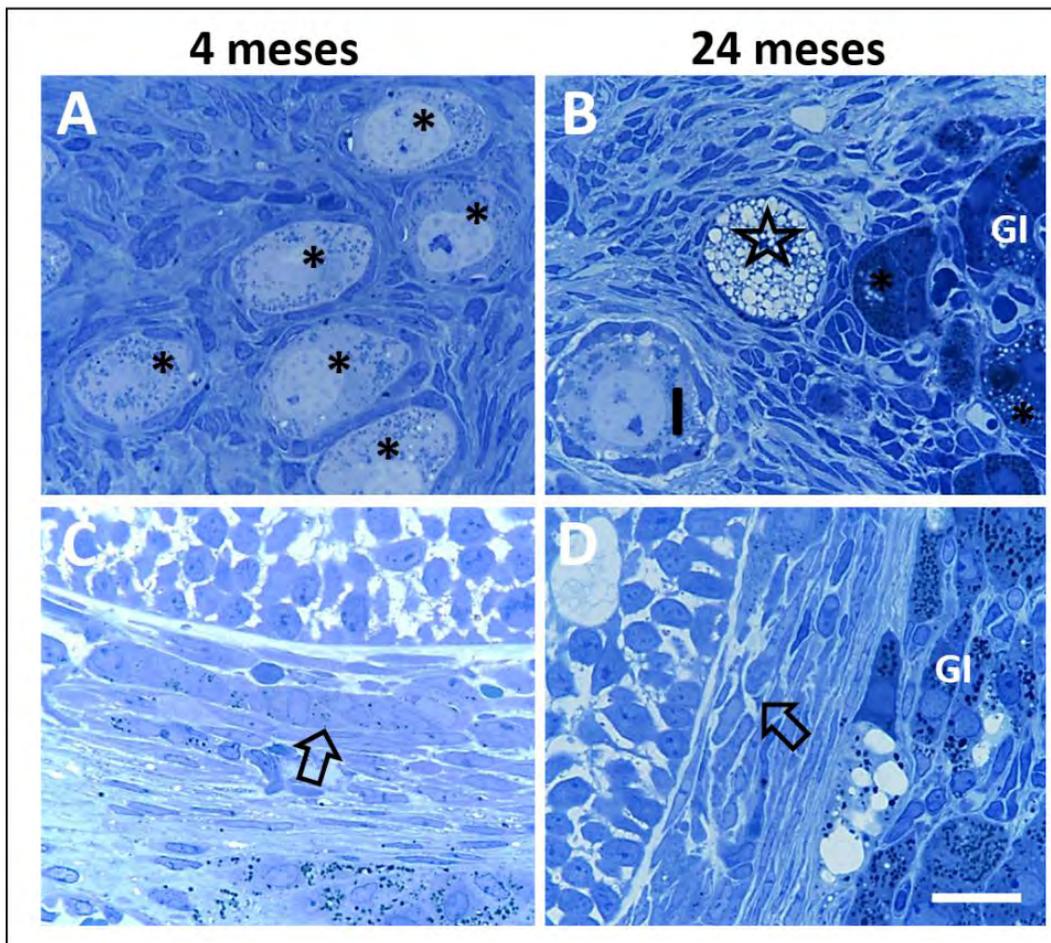


Figura 13. Histología de alta resolución. Cortes semifinos de ovarios de coneja en etapa reproductiva y madura. A) Corte representativo de un ovario de 4 meses que muestra un conjunto de folículos primordiales (*) de conejas de 4 meses de edad. B) Los ovarios maduros muestran folículos primordiales aislados (I), algunos de los cuales tienen abundantes vacuolas como

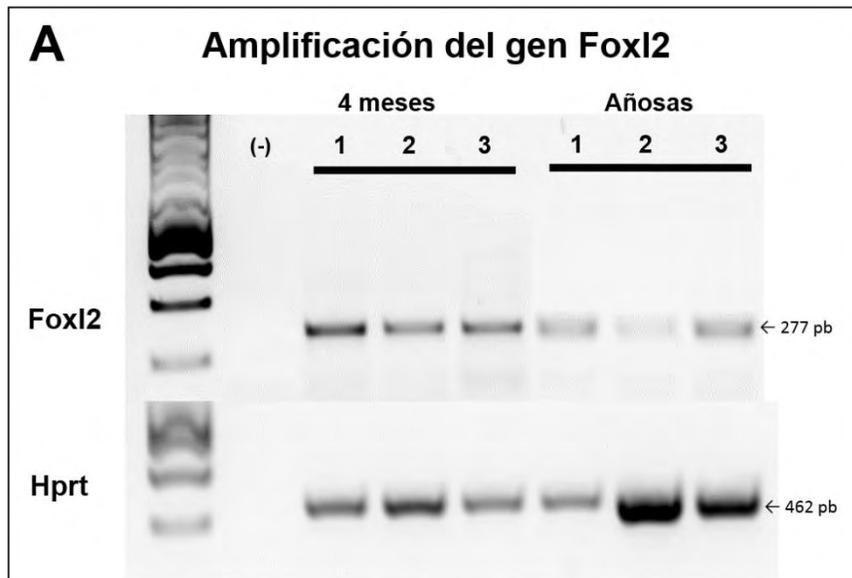
remanentes de ovocitos (estrella). Parte de la glándula intersticial (GI). C y D muestran las células de la teca interna (flecha vacía) de folículos antrales de ovarios reproductivos y maduros respectivamente. GI=glándula intersticial. Escala A-D= 20µm.

7.2 PERFILES DE EXPRESIÓN

En las siguientes figuras se muestra la comparación de los niveles de expresión de Foxl2, AMH, AMHRII, Cyp11a1 y aromatasa de ovarios de conejas de cuatro meses (inicio de etapa reproductora) y conejas de más de doce meses.

7.2.1 Expresión del gen Foxl2:

La comparación en los niveles de expresión de Foxl2 fue realizada en muestras de ovarios de conejas chinchilla de 4 meses y de 12 a 30 meses (añosas) mediante RT-PCR. Los resultados muestran que no existen cambios significativos en los niveles de expresión entre estos grupos ($p=0.21$) (Figura 14A-B).



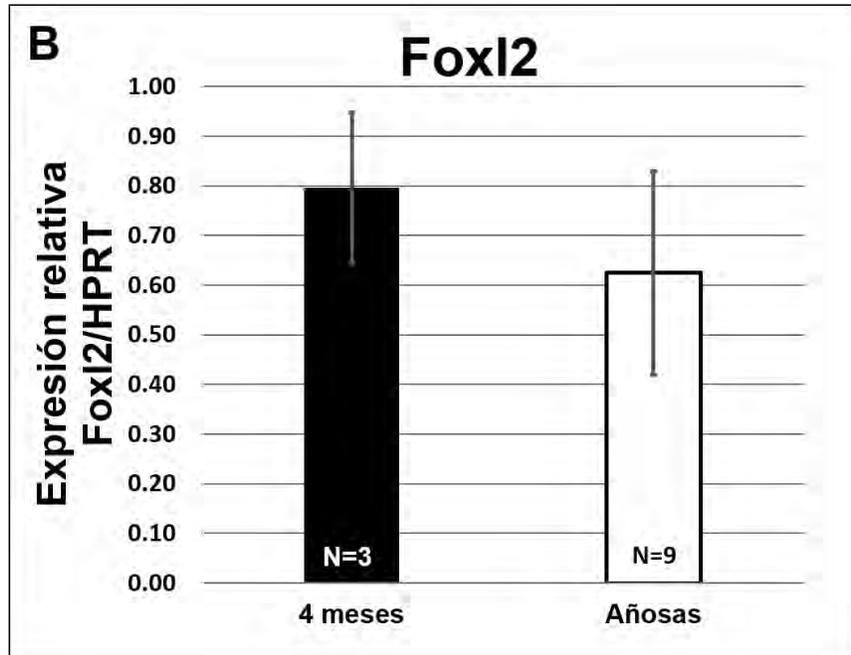
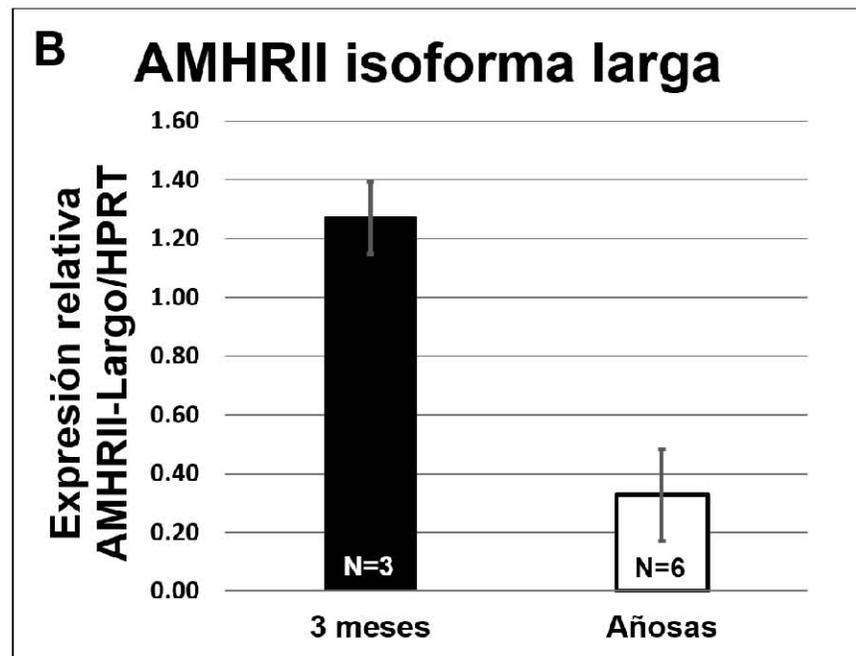
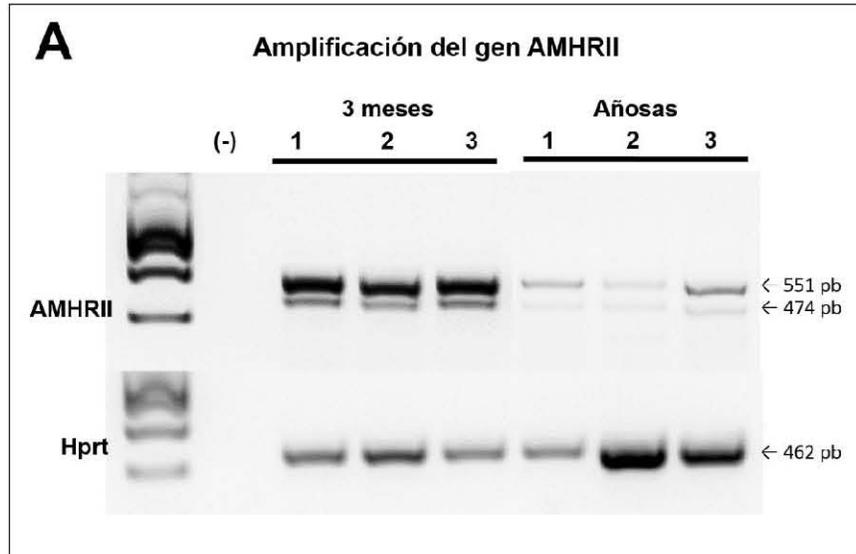


Figura 14. Expresión de Foxl2 en ovarios de conejas en etapa reproductiva y ovarios de conejas de más de 12 meses. A) Fotografía de un gel representativo de la expresión de Foxl2 de ovarios de conejas chinchillas de 4 y de 12 a 30 meses (añosas), se muestran las bandas correspondientes a Foxl2 (277pb) y HPRT (462pb) el cual se utilizó como gen de referencia. B) El análisis densitométrico de la expresión de Foxl2 no muestra cambios estadísticamente significativos ($p=0.21$, prueba t-student) Las barras representan la expresión normalizada de Foxl2 con Hprt. Las barras de error representan la DS.

7.2.2 Expresión de las isoformas larga y corta de AMHRII

La comparación en los niveles de expresión del gen AMHRII igualmente fue analizada en muestras de ovarios de conejas chinchilla de 3 meses y de 12 a 30 meses (añosas), mediante RT-PCR. En este caso, determinamos la expresión de dos isoformas: la isoforma larga y la isoforma corta, la cual carece del segundo exón. Los resultados muestran un decremento en la expresión de ambas isoformas en los ovarios de coneja de 12 a 30 meses ($p < 0.01$) (Figura 15A-B y Figura 15A-B).



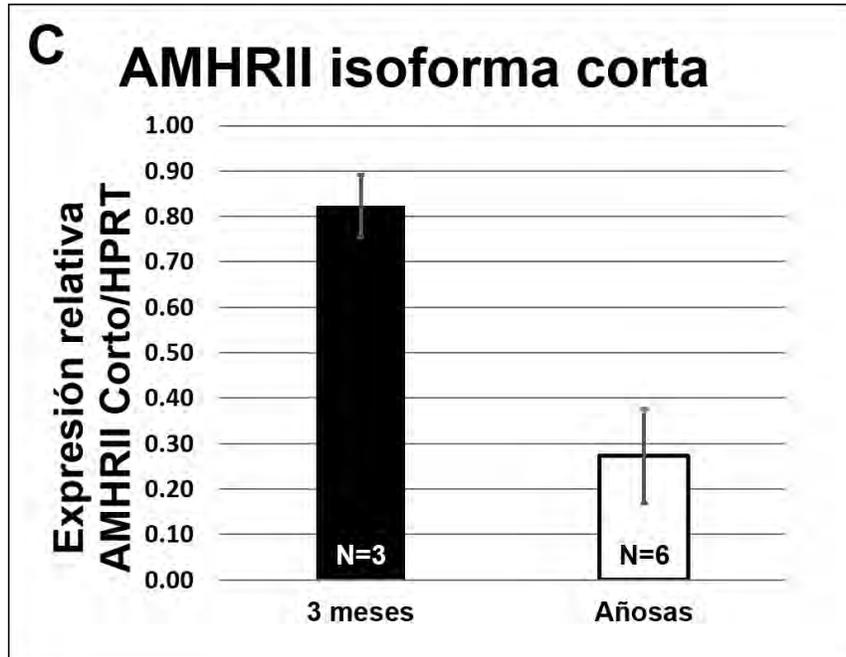


Figura 15. Expresión de AMHRII en ovarios de conejas en etapa reproductiva y ovarios de conejas de más de 12 meses. A) Fotografía de un gel representativo de la expresión las dos isoformas del gen AMHRII de ovarios de conejas chinchillas de 3 y de 12 a 30 meses (añosas), se muestran las bandas correspondientes a las isoformas larga (551pb) y corta (474pb) del gen AMHRII y HPRT (462pb) el cual se utilizó como gen de referencia. B y C) El análisis densitométrico de la expresión del gen AMHRII en sus isoformas larga y corta respectivamente, muestran cambios de expresión estadísticamente significativos ($p < 0.01$, prueba t-student) Las barras representan la expresión normalizada de las isoformas larga (B) y corta (C) respectivamente con Hprt. Las barras de error representan la DS.

7.2.3 Expresión del gen Cyp11a1

Además, determinamos la expresión del gen Cyp11a1 cuyo producto es importante para iniciar la vía de la esteroidogénesis, ya que convierte el colesterol a pregnenolona. En este caso observamos un incremento significativo de su expresión en los ovarios de conejas de más de 12 meses ($p < 0.01$) (Figura 16A-B).

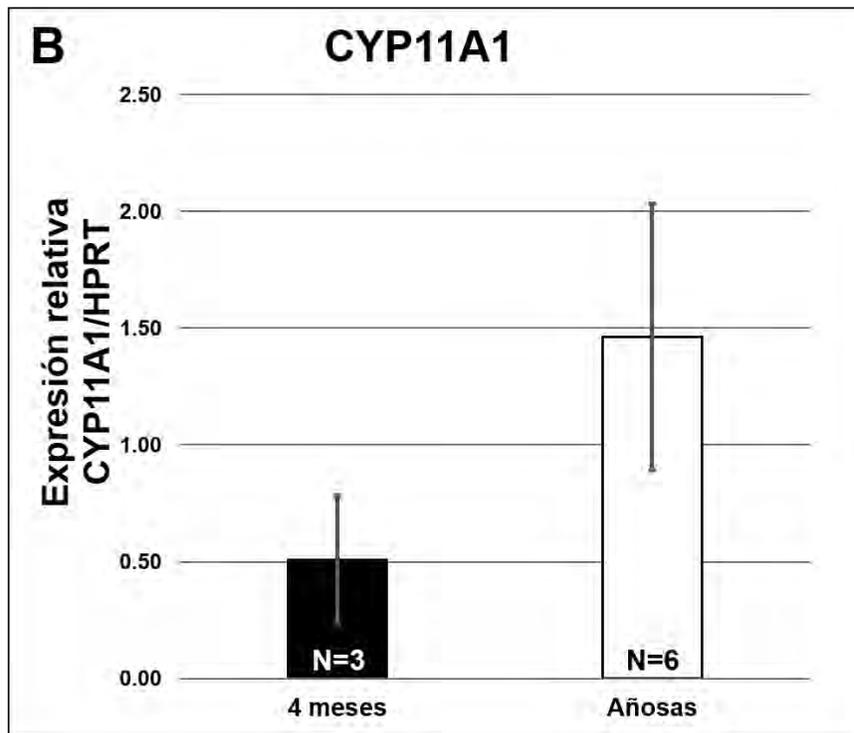
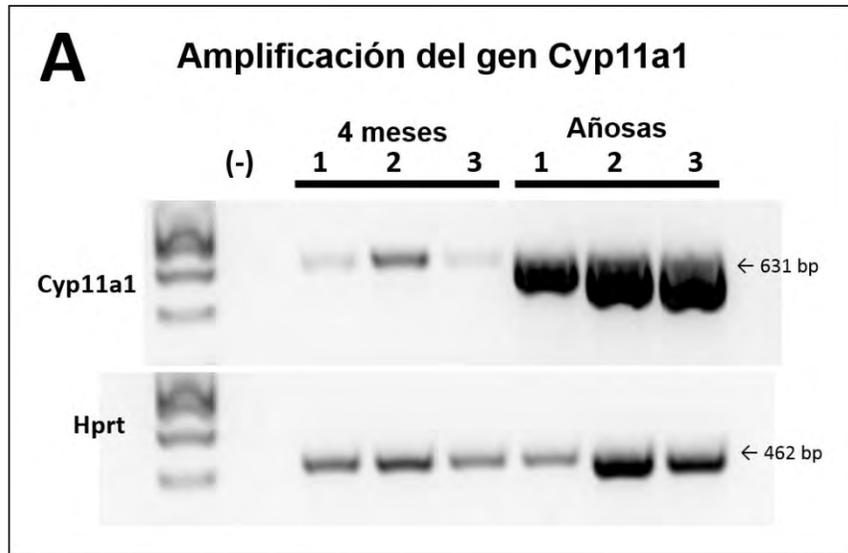


Figura 16. Expresión del gen Cyp11a1 en ovarios de conejas en etapa reproductiva y ovarios de conejas de más de 12 meses. A) Fotografía de un gel representativo de la expresión del gen de la aromatasa de ovarios de conejas chinchillas de 4 y más de 12 a 30 meses (añosas), se muestran las bandas correspondientes a Cyp11a1 (631pb) y HPRT (462pb) el cual se utilizó como gen de referencia. B) El análisis densitométrico de la expresión de Cyp11a1 muestra un incremento de la expresión en los ovarios de conejas de más de 12 meses (añosas), el cual fue estadísticamente significativo ($p < 0.01$, prueba t-student). Las barras representan la expresión normalizada de Cyp11a1 con Hprt. Las barras de error representan la DS.

7.2.4 Expresión del gen de Aromatasa (Cyp19):

Asimismo, determinamos la expresión del gen para aromatasa, esta enzima es crítica para mantener los niveles de estrógenos en el ovario. Los resultados muestran el decremento en la expresión de este gen en ovarios de conejas de más de 12 meses ($p < 0.01$) (Figura 17A-B).

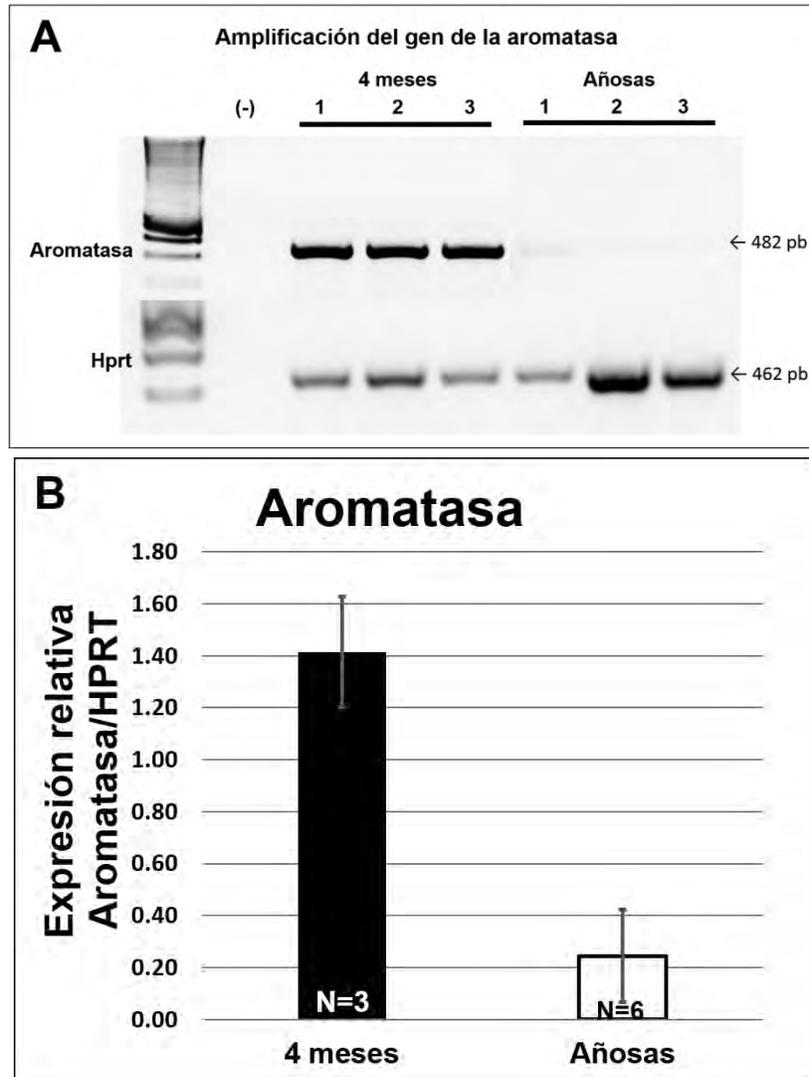


Figura 17. Expresión de aromatasa en ovarios de conejas en etapa reproductiva y ovarios de conejas de más de 12 meses. A) Fotografía de un gel representativo de la expresión de aromatasa de ovarios de conejas chinchillas de 4 y de 12 a 30 meses (añosas), se muestran las bandas correspondientes a aromatasa (482pb) y HPRT (462pb) el cual se utilizó como gen de referencia. B) El análisis densitométrico de la expresión del gen de la aromatasa muestra un decremento de la expresión en los ovarios de conejas de más de 12 meses (añosas), el cual fue estadísticamente significativo ($p < 0.01$, prueba t-student). Las barras representan la expresión normalizada de aromatasa con Hprt. Las barras de error representan la DS.

7.3 CARACTERIZACIÓN DEL ENVEJECIMIENTO OVÁRICO MEDIANTE INMUNOFLUORESCENCIA

Para la caracterización del envejecimiento ovárico mediante inmunofluorescencia se emplearon cortes de ovarios de conejas de 4 (N=4), 18 (N=1), 24 (N=2) y 34 (N=1) meses de edad, para identificar los tipos celulares que expresan a las proteínas Foxl2, AMH, AMHRII, Cyp11a1 y Cyp19.

En esta primera parte comenzaremos con la descripción de los resultados de inmunofluorescencia para Foxl2 y AMH en ovarios de conejas de 4 meses. Para fines demostrativos, la marca de Foxl2 se muestra en verde, la marca de AMH se observa en rojo, mientras que los núcleos de todas las células están marcados en azul. El solapamiento de dichas marcas se encuentra en la columna final del lado derecho.

En la figura 18 se muestra los patrones de localización e intensidad de folículos individuales en diferentes etapas de desarrollo. En la reserva folicular conformada por folículos primordiales y primarios se observa la expresión de Foxl2 en los núcleos de las células de la granulosa, evidenciándose que las células de la granulosa de los folículos primarios presentan una mayor intensidad con respecto a las células de la granulosa planas de los folículos primordiales (figura 18A). Sin embargo, en estas etapas no se observa la presencia de AMH (figura 18B). La expresión de Foxl2 no se restringe a células de la granulosa, ya que es posible observarla en las células del estroma adyacente a la reserva folicular. La expresión de Foxl2 es observada en todas las etapas del desarrollo folicular como lo muestra la figura 18 (E, I y M). La expresión de AMH es muy intensa en el citoplasma de las células de la granulosa de folículos antrales tempranos (figura 18F, J). Sin embargo, su expresión decreciente en folículos antrales avanzados, donde su expresión se restringe principalmente a las células de la granulosa del cumulus que rodean al ovocito, mientras que las células de la granulosa parietal muestran una disminución de la intensidad a dicha marca (figura 19).

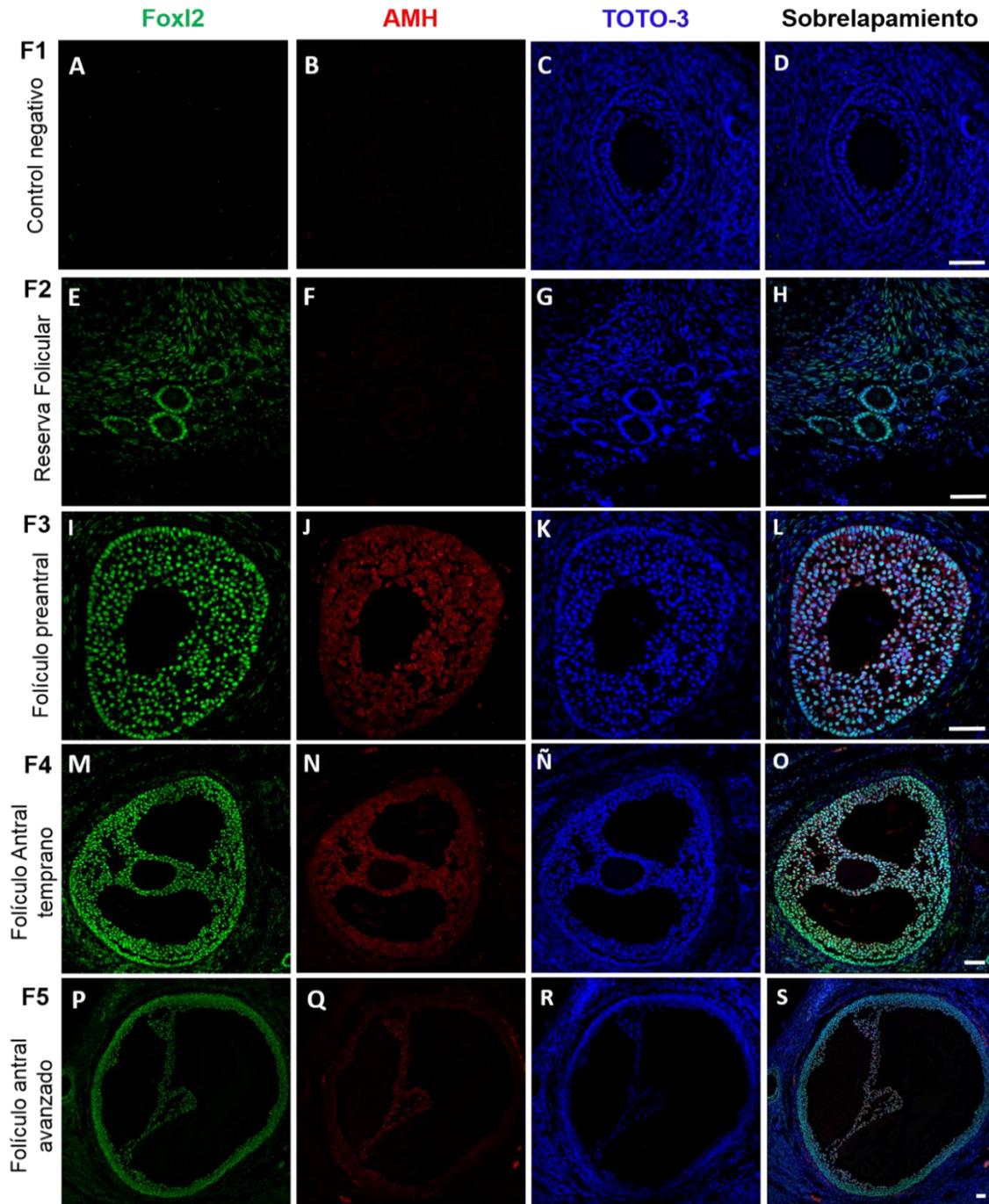


Figura 18. Fotomicrografías representativas de la expresión de Foxl2 (verde) y AMH (rojo) por inmunofluorescencia en folículos de diferentes estados de desarrollo en ovarios de conejas chinchillas de 4 meses de edad. F1 muestran los controles negativos de Foxl2 y AMH. F2 muestra el marcaje para Foxl2 (E) y AMH (F). La expresión de Foxl2 es evidente en la reserva folicular, sin embargo, la presencia de AMH no es evidente. F3 y F4 muestran la expresión de Foxl2 y AMH en un folículo preantral y antral respectivamente. F5 muestra la señal de los marcadores en un folículo antral avanzado. C, G, K, Ñ y R indican los núcleos celulares marcados con yoduro de TOTO-3 (azul). D, H, L, O y S indican el sobrelapamiento de los 3 marcadores. Escala = 50 µm.

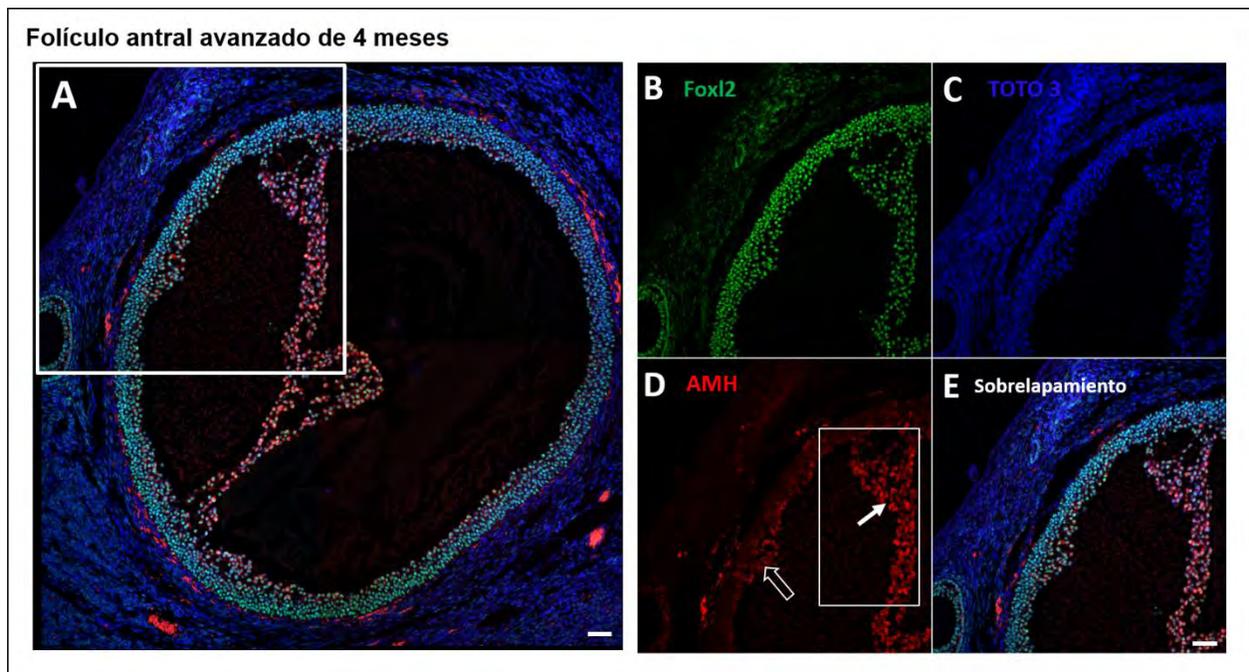


Figura 19. Fotomicrografías representativas de la expresión de AMH (rojo) por inmunofluorescencia. A y E muestran el sobrelapamiento de las marcas de Foxl2 (verde), AMH (rojo) y TOTO-3 (azul) en un folículo antral avanzado de un ovario de 4 meses. B y C indican las marcas de Foxl2 y TOTO-3 respectivamente, en un folículo antral avanzado de un ovario de 4 meses. D muestra el aumento en la intensidad de AMH en células de la granulosa del cumulus marcado en cuadro blanco (flecha blanca), así como el decremento de la intensidad en células de la granulosa parietal (flecha hueca). Escala = 50 μ m.

Así mismo, se realizó la inmunolocalización de aromatasa (color verde), su expresión no se observa en folículos primordiales, primarios y preantrales (figura 20-A y E). La localización de aromatasa fue evidente en folículos antrales tempranos y avanzados (figura 20)

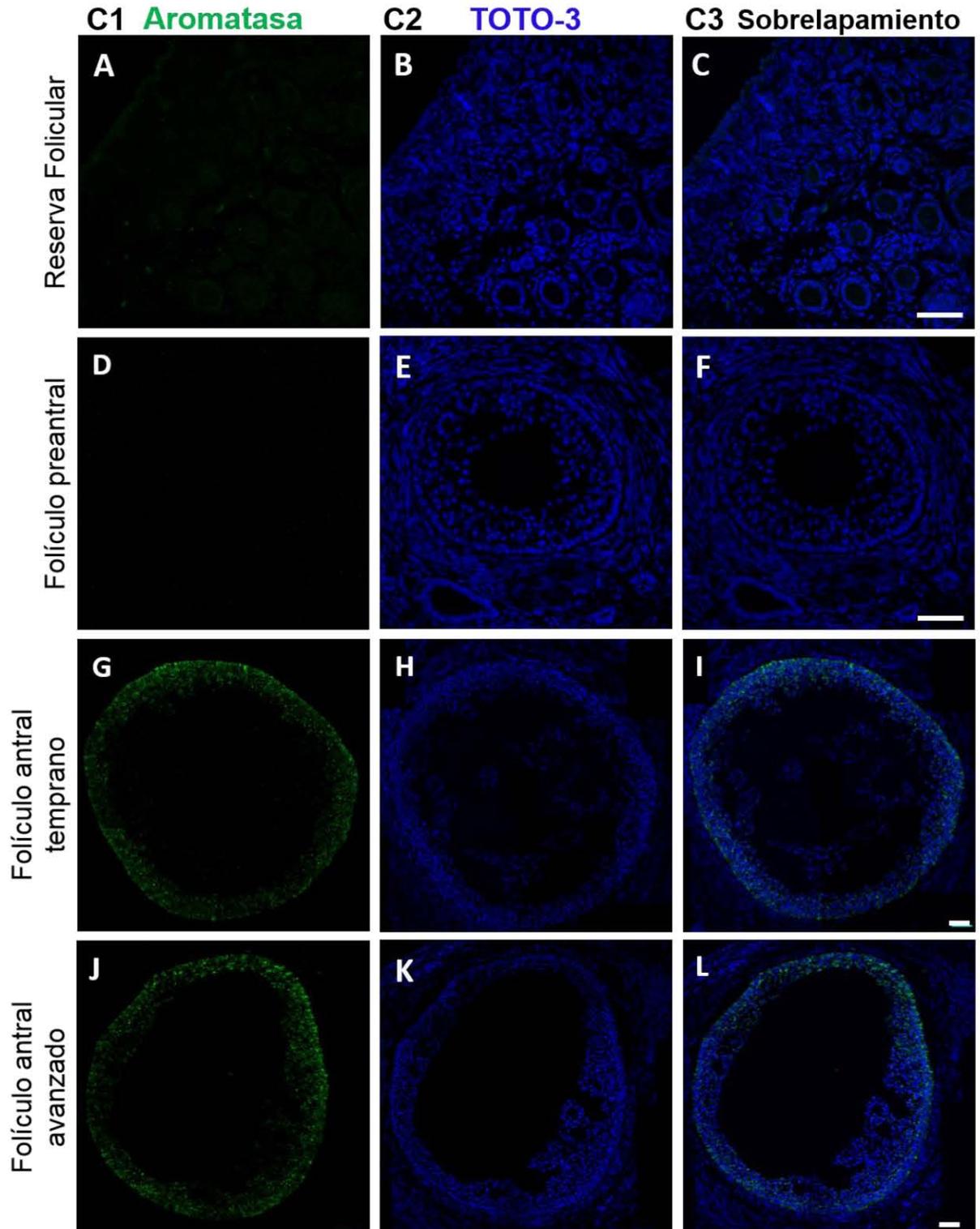


Figura 20. Fotomicrografías representativas de la expresión de Aromatasa (verde) por inmunofluorescencia en folículos en diferentes estados de desarrollo en ovarios de 4 meses. **C1** indica la localización de aromatasa (verde). **C2** muestra la tinción de los núcleos en azul teñidos con TOTO-3 (azul). **C3** muestra el sobrelapamiento de los 2 marcadores. La expresión de aromatasa es evidente en folículos antrales tempranos y avanzados (G y J). Escala = 50 μ m.

A continuación, describimos la inmunolocalización de Cyp11a1 (verde) y alfa actina (rojo) en una muestra de ovario de 4 y 34 meses. La expresión de Cyp11a1 es evidente en las células de la teca interna de folículos antrales (figura 21A, C y D) así como en las células que conforman a la glándula intersticial (figura 21A, B y D, flechas blancas). La localización de alfa actina nos permite evidenciar a las células de la teca externa (figura 21A, C y D, asterisco), así como en el musculo liso de los vasos sanguíneos (figura 21A y B, flechas huecas)

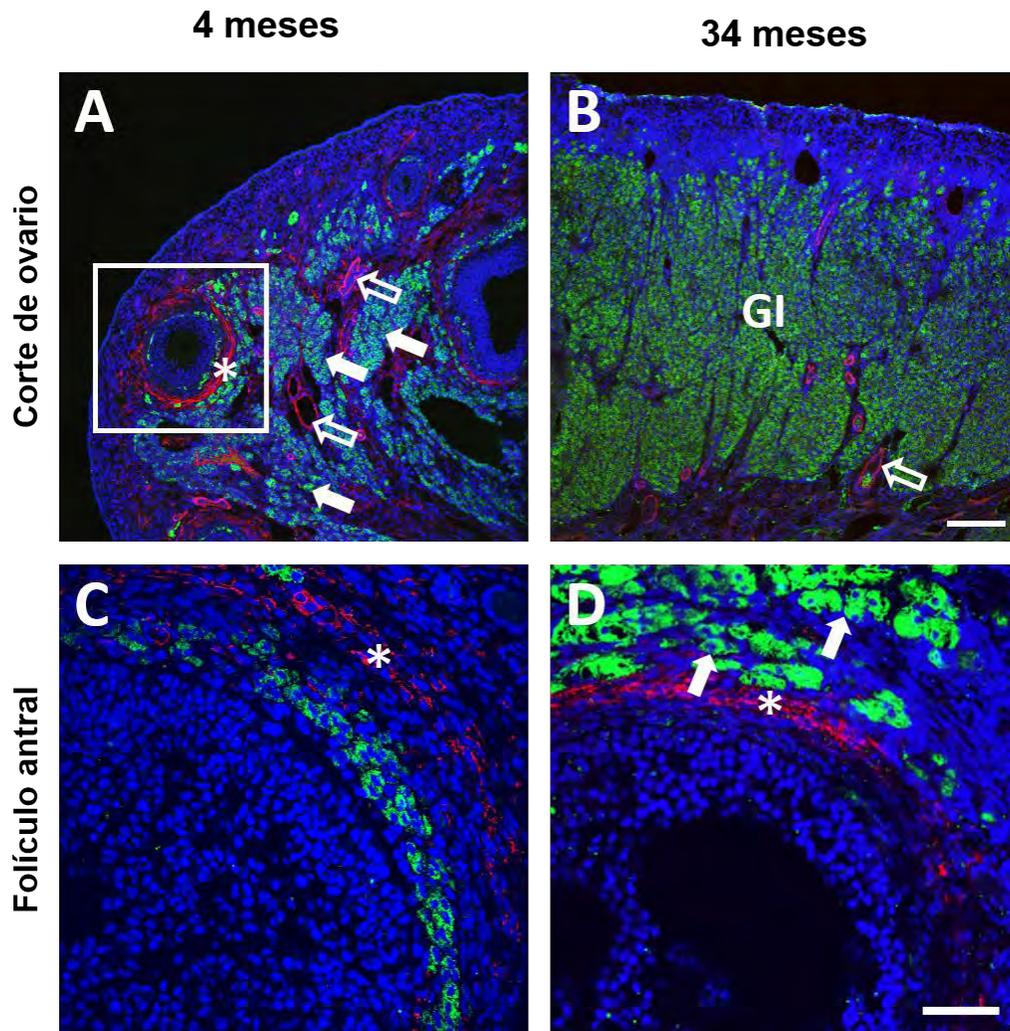


Figura 21. Fotomicrografías representativas de la expresión de Cyp11a1 (verde) y alfa actina (rojo) por inmunofluorescencia en folículos antrales en ovarios de 4 y 34 meses. A, C y D muestran el sobrelapamiento de Cyp11a1 (verde), alfa actina (rojo) y TOTO-3 (azul) en folículos antrales. La expresión de Cyp11 es evidente en células de la teca interna (**A, C y D**) y en células de la glándula intersticial (**A, B y D, flechas blancas**). La expresión de alfa actina se expresa en células de la teca externa de un folículo antral marcado en el recuadro blanco (**A**) y en un folículos antrales (**C y D**) marcados con un asterisco, así como en el musculo liso de los vasos sanguíneos (**A y B, flechas huecas**). Escala = 50 μ m.

A continuación, se presenta la comparación entre la intensidad de las marcas para Foxl2 y AMH en ovarios de 3 y 18 meses. La intensidad de fluorescencia de Foxl2 es mayor en células de la granulosa de folículos primordiales, primarios y preantrales en ovarios de 4 meses con respecto a este mismo tipo de folículos en ovarios de 18 meses (figura 22A-D).

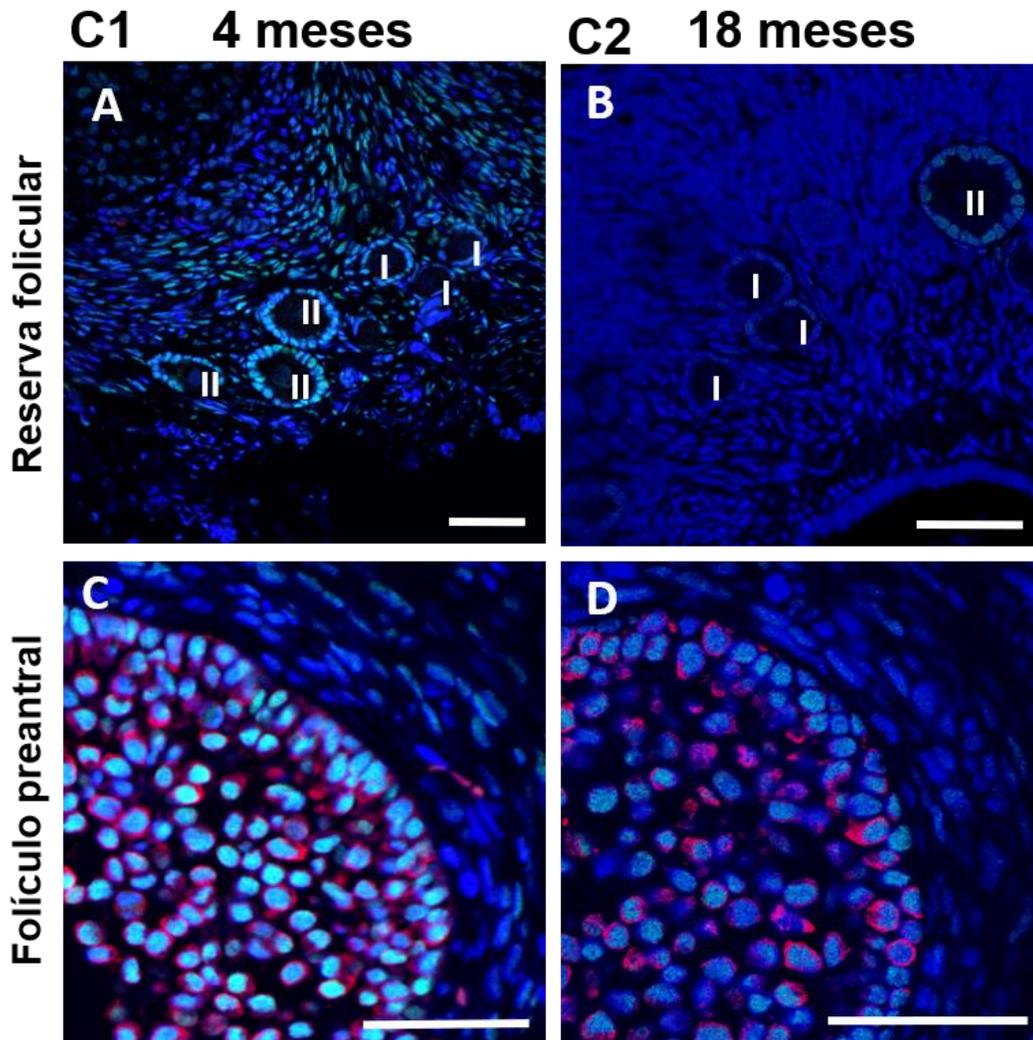


Figura 22. Fotomicrografías representativas de la detección de Foxl2 (verde) y AMH (rojo) por inmunofluorescencia en células de la granulosa de folículos primordiales, primarios y preantrales de conejas de 4 y 18 meses. C1 y C2 muestran el sobrelapamiento de Foxl2 (verde), AMH (rojo) y TOTO-3 (azul) en células de la granulosa de folículos primordiales, primarios y preantrales en ovarios de 4 (**A y C**) y 18 meses (**B y D**). La intensidad de las marcas para Foxl2 y AMH decrecen en células de la granulosa de folículos primordiales, primarios y preantrales en el ovario de 18 meses (**B y D**). Escala = 50 μ m.

A continuación, se describe la comparación de la inmunolocalización de aromatasa (verde) entre ovarios de 4 y 24 meses. Como se describió anteriormente la detección de aromatasa no se observa en folículos primordiales, primarios y preantrales. La presencia de aromatasa comienza a ser evidente en folículos antrales tempranos y avanzados, por lo cual se describe la comparación en la intensidad de marca de aromatasa en dichos folículos entre ovarios de 4 y 24 meses, encontrando que la intensidad de fluorescencia de aromatasa es mayor en células de la granulosa de folículos antrales tempranos y avanzados en ovarios de 4 meses (figura 23 A y C) con respecto a dichos folículos en ovarios de 24 meses (figura 23 B y D).

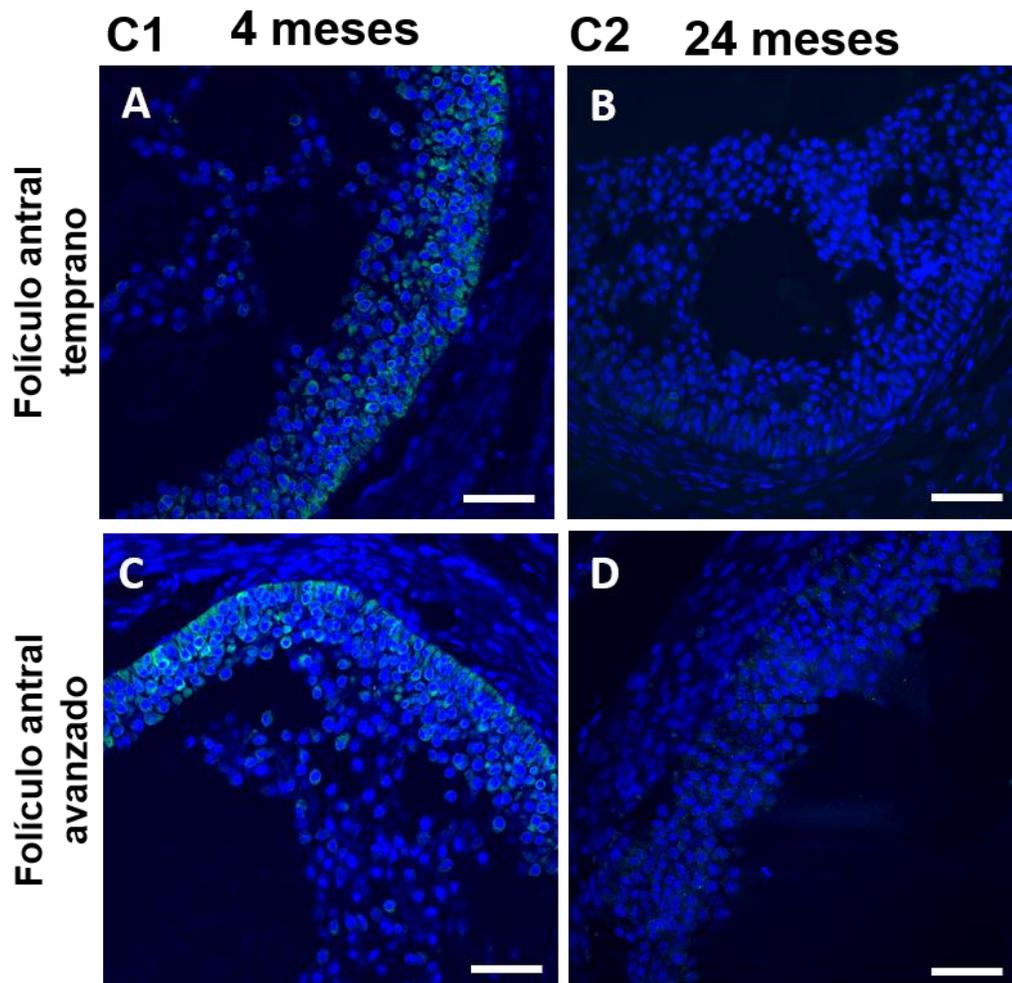


Figura 23. Fotomicrografías representativas de la expresión de Aromatasa (verde) por inmunofluorescencia en células de la granulosa de folículos antrales tempranos y avanzados en conejas de 4 y 24 meses. C1 y C2 muestran el sobrelapamiento de aromatasa (verde) y TOTO-3 (azul) en folículos antrales tempranos y avanzados en ovarios de 4 (**A y C**) y 24 meses (**B y D**). La intensidad de expresión de aromatasa decrece en células de la granulosa de folículos antrales tempranos y avanzados en el ovario de 24 meses (**B y D**). Escala = 50 μ m.

8. DISCUSIÓN

Mediante el estudio histológico realizado en muestras de cortes de ovarios de conejas chinchilla fue posible analizar y apreciar los cambios estructurales que evidencian el proceso del envejecimiento ovárico en esta especie.

Recientemente se ha tratado de contribuir con datos que nos permitan entender como envejece el ovario. El decremento de la fertilidad en las mujeres añosas no sólo está relacionado con la pérdida de folículos en el ovario, sino también a cambios en la función ovárica (Umehara, Richards, Shimada, 2018). La caracterización de la pérdida de la reserva folicular ha sido abordada en varias especies (Atkins, Willson, Silverstein, Jorgensen, Kaplan, Appt, 2014; Vidal, 2017; Wilkosz, Greggains, Tanbo, Fedorcsak, 2014). Sin embargo, poco se ha contribuido con entender la pérdida de la función ovárica relacionada con la edad.

El envejecimiento ovárico dependiente de la pérdida de folículos es el resultado de la atresia que sufren los folículos a lo largo de cada ciclo sexual, ya que la pérdida de ovocitos durante la ovulación es mínima (Şükür et al., 2014).

Los cambios que evidenciamos por incremento de la edad es la presencia y acumulación de células endócrinas en el estroma, las cuales se caracterizan por expresar Cyp11A1, éstas células conforman a la glándula intersticial. Trabajos previos han demostrado que dicha glándula es el producto de la atresia folicular. Algunos autores consideran que el exceso de atresia podría ser análogo a la muerte neuronal en el cerebro que envejece (Faddy et al 1992), y además evidenciamos la presencia e incremento de este tejido esteroideogénico dependiente de la edad. Estos resultados concuerdan con lo reportado en humano, donde la glándula intersticial es considerada el tejido esteroideogénico más abundante en el ovario (Mossman, Koering, Ferry, 1964). De esta manera surgen nuevas interrogantes acerca del papel de está glándula en la pérdida de la capacidad reproductiva o bien, como un tejido que permite el mantenimiento de la esteroideogénesis ovárica a expensas de la fertilidad. Continuando con la expresión de Cyp11a1, mediante

el análisis de RT-PCR evidenciamos un incremento de la expresión en las conejas de 24 meses lo cual correlaciona con el incremento de su expresión en las células de la glándula intersticial. Sin embargo, en el caso de los folículos antrales, la intensidad de detección para Cyp11a1 disminuye conforme la edad, aunado a ello, mediante un análisis histológico de alta resolución en cortes semifinos se hacen evidentes los cambios histológicos a nivel celular. Las células de la teca interna de los folículos de las conejas en edad reproductiva muestran una estructura epitelioide que se pierde en las conejas de 24 meses. Es una realidad que las células de la teca son consideradas por varios autores como las “células olvidadas” del ovario (Young y McNeilly, 2010) y por ende su deterioro funcional de las células de la teca en los mamíferos, incluido el humano, a causa del envejecimiento es por demás ignorado. Otros autores han reportado cambios de expresión génica durante el envejecimiento ovárico en mono Rhesus (Wei, Liu, Yuan, Zhang, Guo, Lui, Zhang, 2015), uno de los genes que demostró un incremento de expresión dependiente de la edad es Cyp11a1 lo cual coincide con nuestros resultados de PCR. Sin embargo, cuando se realizó la localización de esta enzima es sorprendente ver que su expresión disminuye en los folículos antrales, comprometiendo la producción final de estrógenos.

Por lo que consideramos que los estudios moleculares que aborden el envejecimiento ovárico deben estar complementados con estudios de inmunolocalización o hibridación *in situ*, ya que serán de gran relevancia para entender los cambios en la función folicular y su relación con el decremento de la capacidad reproductiva.

Siguiendo en la ruta de la esteroidogénesis, también se analizó la expresión de la enzima aromatasa, quien realiza la conversión de andrógenos en estrógenos, los cual son críticos para la función reproductiva. Los transcritos que codifican para esta enzima fueron analizados por RT-PCR donde observamos una disminución de su expresión dependiente de la edad. El análisis de su localización mediante inmunofluorescencia evidenció que a pesar de que se trataban de folículos antrales, su expresión es prácticamente imperceptible. Se conoce que los ovarios de las mujeres premenopáusica sintetizan altos niveles de estradiol. Sin embargo, al llegar a la menopausia, los ovarios

dejan de producir estrógenos (Simpson, 2003), lo cual correlaciona con la disminución de la expresión de la enzima aromatasa. La expresión de la enzima aromatasa es regulada directamente por la función de FSH, por lo que es de gran interés determinar la funcionalidad de los receptores a FSH en los ovarios de conejas de más de 12 meses. Es necesario el abordaje del crecimiento de folículos dependientes de FSH y su papel en la expresión de aromatasa.

Otro de los genes estudiados en este trabajo fue *Foxl2*, debido a que se trata de un factor crítico de la función y mantenimiento de la identidad ovárica (Pelosi et al., 2015), el cual a su vez regula la expresión de dos las dos enzimas cruciales para la esteroidogénesis que discutimos con anterioridad: *Cyp11a1* y aromatasa.

La importancia de *Foxl2* en el mantenimiento de la función ovárica ha sido estudiada en varias especies de reptiles, aves y mamíferos incluido el humano (Lei y Turk, 2017; Díaz-Hernández, Marmolejo-Valencia, Merchant-Larios, 2015; Duffin, Bayne, Childs, Collins, Anderson, 2009; Ottolenghi, Omari, Garcia-Ortiz, Uda, Crisponi, Forabosco, Pilia, Schlessinger, 2005; Hudson, Smith, Sinclair, 2005; Uda et al., 2004; Govoroun, Pannetier, Pailhoux, Cocquet, Brillard, Couty, Batellier, Cotinot., 2004; Schmidt, Ovitt, Anlag, Fehsenfeld, Gredsted, Treier, Treier, 2004). Sin embargo, a pesar de su importancia, hasta donde se conoce, no se ha analizado su expresión en el proceso de envejecimiento ovárico.

La expresión de *Foxl2* fue evidente principalmente en las células de la granulosa desde los folículos primordiales, pero destaca su incremento de expresión a partir de la diferenciación hacia folículos primarios. Además, las células en el estroma son positivas a su expresión, aunque con menor intensidad, así como células de la glándula intersticial. Cuando se analizó la expresión de los transcritos de *Foxl2* y se comparó entre los ovarios de las conejas en etapa reproductora y las conejas de 2 años, no se detectaron cambios significativos en su expresión. Sin embargo, el estudio detallado en las inmunolocalizaciones, demuestra un decremento de la expresión en los folículos que conforman la reserva folicular, así como de los folículos antrales. Se ha reportado que los

ratones nulos para Foxl2 son infértiles debido a la pérdida de la capacidad de diferenciar folículos primordiales a primarios, a pesar de tener un número completo de reserva folicular (Schmidt et al., 2004). Además, un gran porcentaje de pacientes con falla ovárica prematura, presentan mutaciones en dicho gen (Goswami y Conway, 2005). En este trabajo mostramos por primera vez, un decremento en la intensidad en la marca de Foxl2 en los folículos de todas las etapas de desarrollo y aún permanece la interrogante en el origen de esta alteración, así como de las posibilidades de revertir dicho efecto. Aunado a este evidente decremento también se observó el decremento de la expresión de la hormona anti-Mülleriana, considerada clave en la especificación de la reserva folicular. Los resultados obtenidos coinciden con los de otros autores, donde la expresión es evidente a partir de folículos primarios e incrementando su detección en folículos preantrales (Durlinger et al., 1999; Durlinger et al., 2002b; Weenen et al., 2004; Visser et al., 2006). Los folículos antrales avanzados decrementan su expresión en las células de la granulosa parietal, pero manteniéndose en las células del cúmulo. Esta evidencia nos lleva a pensar que la expresión de AMH en las células del cúmulo está influenciada por el ovocito. Con respecto a los ovarios de las conejas de más de 12 meses es evidente el decremento de los transcritos de AMH, como sucede en los ovarios de otras especies de mamíferos incluyendo al humano (Lee y Donahoe, 1993; Durlinger et al., 1999; Vet et al., 2002; Visser et al., 2006; Kedem, Yung, Yerushalmi, Haas, Maman, Hanochi, Hourvitz, 2014; Kedem-Dickman, Maman, Yung, Yerushalmi, Hemi, Hanochi, Dor, Hourvitz, 2014; Atkins et al., 2014). Cabe destacar que diversos estudios han demostrado que la AMH puede ser un marcador prometedor para analizar el mecanismo del agotamiento de la reserva ovárica, ya que los niveles de expresión de AMH se han correlacionado con el tamaño de dicha reserva (Disseldorp, Faddy, Themmen, Jong, Peeters, Schouw, Broekmans, 2008). Sin embargo, excluye a los folículos primordiales aún presentes.

Al igual que Foxl2, la AMH es un regulador importante del reclutamiento y dosificación de la reserva folicular, ya que está implicada en la inhibición de la transición de folículos primordiales a primarios, ya que una vez seleccionado un conjunto de folículos primordiales estos comienzan a expresar AMH en las primeras células diferenciadas de la granulosa que han pasado de una estructura plana a cuboidal dando origen a los

folículos primarios, a su vez la secreción de AMH actúa como una señal de retroalimentación por la inhibición de otros folículos, mientras aquellos folículos en crecimiento siguen expresando AMH hasta que dichos folículos alcanzan el tamaño y estado de diferenciación en el que pueden ser seleccionados para dominancia.

Los niveles de expresión de AMHRII al igual que los de AMH disminuyen gradualmente con respecto al avance de la edad. En un estudio realizado por Baarends y colaboradores (1995), analizaron los patrones de expresión de AMHRII en ovarios de ratas postnatales y juvenes, demostrando que en efecto los niveles de expresión de AMHRII aumentan gradualmente en la juventud (Baarends et al., 1995), sin embargo, no se ha estudiado su patrón de expresión en relación a un mayor avance de la edad. Cabe mencionar que en el presente estudio se encontró la presencia de una isoforma del gen AMHRII. En otro estudio se han descrito dos isoformas para AMHRII a causa de una mutación por empalme en pacientes masculinos con persistencia de conductos de Müller; una isoforma corta que carece del segundo exón y otra que lleva una inserción de 12 bases entre los exones 2 y 3. El exón 2 es esencial para la unión al ligando, esto se ha demostrado en estudios en conejo, indicando que esta isoforma corta se genera normalmente por corte y empalme alternativo, pero aún no se conoce su función (Clemente, Wilson, Faure, Boussin, Carmillo, Tizard, Picard, Vigier, Josso, Cate, 1994).

En otro estudio realizado por Faure y colaboradores (1996) también encontraron dos isoformas para AMHRII, una forma corta y una larga, confirmando que solo la forma larga es expresada sobre la superficie de las células para lograr su unión con el ligando AMH, mientras que la isoforma corta no puede unirse al ligando (Faure et al., 1996).

El envejecimiento ovárico implica cambios en los mecanismos de comunicación entre el ovocito y las células foliculares, esto mediante interacciones que regulan el desarrollo de folículos primordiales y la selección de un solo folículo para ser ovulado, dicha selección depende de la capacidad del ovocito en desarrollo para completar la meiosis y someterse a una probable fertilización y embriogénesis (Dumesic, Meldrum, Katz-Jaffe, Krisher, Schoolcraft, 2015; Li y Albertini, 2013), a su vez dicho desarrollo depende del

funcionamiento adecuado de las células foliculares que abastecen al ovocito de nutrientes indispensables para su crecimiento, sin embargo, ambas cualidades mencionadas se ven afectadas por el avance de la edad. En este trabajo se evidencian los cambios en la expresión de genes clave en la función folicular lo cual repercute en la capacidad reproductiva de las conejas.

9. CONCLUSIONES

Mediante el presente trabajo de investigación, se logró caracterizar la histología del ovario de coneja chinchilla a lo largo del proceso del envejecimiento ovárico, encontrando cambios estructurales en el ovario, mediante la aplicación de tinción tricrómica de Masson, histología de alta resolución e inmunofluorescencia.

Se logró observar y analizar los cambios en los niveles de expresión de los genes *Foxl2*, *AMH*, *AMRII*, *Cyp11a1* y aromatasa durante el proceso del envejecimiento ovárico, encontrando que:

- ☞ La expresión de *Foxl2* es propia de células de la granulosa y permanece presente a lo largo de la vida de las hembras y durante el proceso de desarrollo folicular, encontrando su máximo nivel de expresión en las células de la granulosa de folículos primarios). La expresión de *Foxl2* tiende a disminuir gradualmente con respecto al avance de la edad.
- ☞ Tanto la expresión de *AMH* como de *AMRII* son propias de células de la granulosa y comienzan en la fase folicular primaria y aumenta gradualmente a medida que se desarrollan los folículos ováricos hasta el folículo preovulatorio, pero los niveles de expresión tienden a disminuir gradualmente a medida que se da el agotamiento de la reserva folicular en relación al avance de la edad.
- ☞ La expresión de *Cyp11a1* es propia de células de la teca interna y comienza a incrementar en folículos preantrales que han sido seleccionados para dominancia y adquieren su propia capacidad esteroideogénica, llegando a sus máximos niveles de expresión en la fase folicular antral avanzada; sus niveles de expresión tiende a disminuir en folículos dominantes al envejecer, sin embargo, a su vez tienden a

incrementarse gradualmente con respecto al avance de la edad, debido al crecimiento de la glándula intersticial.

- ☞ La expresión de aromatasa es propia de las células de la granulosa que adquieren su potencial esteroideogénico aumentando la actividad de la aromatasa progresivamente, alcanzando niveles máximos en las células de la granulosa del folículo preovulatorio. Los niveles de expresión de aromatasa tienden a disminuir gradualmente con respecto al avance de la edad y debido a la disminución en el aporte de sustrato androgénico proporcionado por Cyp11a1.

10. PERSPECTIVAS

Con base al presente trabajo de investigación es posible poder continuar con el estudio de la comunicación celular que se lleva a cabo durante el desarrollo de los folículos ováricos y cómo es que esto influye en el proceso del envejecimiento ovárico, esto mediante el estudio de:

- ☞ La relación entre las variaciones en los niveles de expresión de Foxl2, AMH, AMHRII, Cyp11a1 y Cyp19 y el agotamiento de la reserva folicular a través del proceso del envejecimiento ovárico.
- ☞ Analizar la influencia de los genes Foxl2 y AMH en el control del reclutamiento y dosificación de la reserva folicular.
- ☞ Analizar la comunicación entre las estirpes celulares y el ovocito que constituyen un folículo ovárico durante el proceso del envejecimiento ovárico.
- ☞ Análisis sobre el control hormonal de FSH y LH sobre la expresión de Cyp11a1 y aromatasa en el proceso del envejecimiento ovárico.
- ☞ El estudio de la formación de la glándula intersticial y su influencia sobre el proceso del envejecimiento ovárico.
- ☞ El estudio del mantenimiento e influencia de la expresión de Cyp11a1 por parte de la glándula intersticial.
- ☞ Realizar la secuenciación de la hormona anti-Mülleriana en coneja chinchilla, ya que aún no se encuentra reportada en la base de datos NCBI.
- ☞ El estudio de los mecanismos moleculares que determinan que solo un folículo ovárico alcance su máximo desarrollo y llegar a la ovulación. Estudio de la influencia de Cyp11a1 y Cyp19 sobre la selección de un solo folículo dominante.
- ☞ Realización de estudios moleculares que aborden el envejecimiento ovárico, complementados con estudios de inmunolocalización o hibridación *in situ*, para entender los cambios en la función folicular y su relación con el decremento de la capacidad reproductiva.

11. REFERENCIAS

- Atkins HM, Willson CJ, Silverstein M, Jorgensen M, Floyd E, Kaplan JR, Appt SE. (2014). Characterization of ovarian aging and reproductive senescence in vervet monkeys (*Chlorocebus aethiops sabaues*). *Comparative Medicine*. 64(1): 55-62, doi: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24512962>. Fecha de consulta: 10 de noviembre del 2017.
- Baarends WM, Helmond MJ, Post M, Van der Schoot PJ, Hoogerbrugge JW, de Winter JP, Uilenbroek JT, Karels B, Wilming LG, Meijers JH. (1994). A novel member of the transmembrane serine/threonine kinase receptor family is specifically expressed in the gonads and in mesenchymal cells adjacent to the mullerian duct. *Development*. 120: 189-197, doi: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8119126>. Fecha de consulta: 19 de marzo del 2018.
- Baarends WM, Uilenbroek JT, Kramer P, Hoogerbrugge JW, van Leeuwen EC, Themmen AP, Grootegoed JA. (1995). 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*, 136(11): 4951 – 4962, doi: 10.1210/endo.136.11.7588229. Fecha de consulta: 19 de marzo del 2018.
- Baker TG y Sum W (1976). Development of the ovary and oogenesis. *Clin Obstet Gynaecol*. 3 (1): 3- 26, doi: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1009717>. Fecha de consulta: 2 de septiembre del 2017.
- Bao B., Garverick H., Smith G., Smith M., Salfen B., Youngquist R. (1997). Changes in messenger ribonucleic acid encoding luteinizing hormone receptor, cytochrome P450-side chain cleavage, and aromatase are associated with recruitment and selection of bovine ovarian follicles. *Biology of reproduction*, 56, 1158 – 1168, doi: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9160714>. Fecha de consulta: 16 de marzo del 2018.
- Broekmans FJ, Knauff EA, te Velde ER, Macklon NS, Fauser BC. (2007). Female reproductive ageing: current knowledge and future trends. *Trends Endocrinol Metab* 18, 58-65, doi:10.1016/j.tem.2007.01.004. Fecha de consulta: 11 de noviembre del 2017.
- Brook JD, Gosden RG, Chandley AC. (1984). Maternal aging and aneuploid embryos; evidence from the mouse that biological and not chronological age is the important influence. *Hum. Genet.* 66, 41–45, doi: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6538182>. Fecha de consulta: 10 de abril del 2018.
- Bulun SE, Sebastian S, Takayama K, Suzuki T, Sasano H, Shozu M. (2003). The human CYP19 (aromatase P450) gene: update on physiologic roles and genomic

- organization of promoters. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology*, 86: 219 – 224, doi: 10.1016/S0960-0760(03)00359-5. Fecha de consulta: 12 de febrero del 2018.
- Carlson Bruce M. (2014). Embriología humana y biología del desarrollo: Capitulo 1 Preparación para el embarazo, 5° Edición. Elsevier. Fecha de consulta: 20 de agosto del 2017.
 - Chang HM, Klausen C, Leung PC. (2013). Anti-Müllerian hormone inhibits follicle-stimulating hormone-induced adenylyl cyclase activation, aromatase expression, and estradiol production in human granulosa-lutein cells. *Fertility and Sterility*. 100 (2): 585 – 592, doi: 10.1016/j.fertnstert.2013.04.019. Fecha de consulta: 4 de octubre del 2017.
 - Chien Y, Cheng W, Wu M, Jiang S, Shen C, Chung B. (2013). Misregulated Progesterone Secretion and Impaired Pregnancy in Cyp11a1 Transgenic Mice. *Biology of Reproduction*. 89(4): 1–10, doi: <https://doi.org/10.1095/biolreprod.113.110833>. Fecha de consulta: 15 de marzo del 2018.
 - Chien Y, Rosal K and Chung B. (2016). Function of CYP11A1 in the mitochondria. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 441: 55 – 61, doi: <https://doi.org/10.1016/j.mce.2016.10.030>. Fecha de consulta: 14 de marzo del 2018.
 - Clemente N, Wilson C, Faure E, Boussin L, Carmillo P, Tizard R, Picard JY, Vigier B, Josso N, Cate R. (1994). Cloning, expression, and alternative splicing of the receptor for anti-Müllerian hormone. *Mol Endocrinol*. 8(8): 1006 – 20, doi: 10.1210/mend.8.8.7997230. Fecha de consulta: 21 de febrero del 2018.
 - Cordova A. (2003). Anatomía y fisiología del aparato reproductor masculino y femenino. Editorial Masso. Barcelona. Fecha de consulta: 26 de agosto del 2017.
 - De Vet A, Laven JS, de Jong FH, Themmen AP, Fauser BC. (2002). Antimüllerian hormone serum levels: a putative marker for ovarian aging. *Reproductive Endocrinology*. 77 (2): 357 – 362, doi: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11821097>. Fecha de consulta: 4 de octubre del 2017.
 - Dewailly D, Robin G, Peigne M, Decanter C, Pigny P and Catteau-Jonard S. (2016). Interactions between androgens, FSH, anti-Müllerian hormone and estradiol during folliculogenesis in the human normal and polycystic ovary. *Human Reproduction Update*. 22(6): 709 – 724, doi: 10.1093/humupd/dmw027. Fecha de consulta: 5 de octubre del 2017.
 - Díaz-Hernández V, León del Río A, Zamora M, Merchant-Larios H. (2008). Expression Profiles of SRY and SOX9 in Rabbit Gonads: The Classical Model of Mammalian Sex Differentiation. *Sexual Development*. 2(3):152-66, doi: 10.1159/000143433. Fecha de consulta: 3 de abril del 2018.

- Díaz-Hernández V, Marmolejo-Valencia A, Merchant-Larios H. (2015). Exogenous estradiol alters gonadal growth and timing of temperature sex determination in gonads of sea turtle. *Developmental Dynamics*. 408(1): 79-89. doi: 10.1016/j.ydbio.2015.05.022. Fecha de consulta: 3 de abril del 2018.
- Disseldorp J, Faddy MJ, Themmen AP, Jong FH, Peeters PH, Schouw YT, Broekmans FJ. (2008). Relationship of serum antimüllerian hormone concentration to age at menopause. *J Clin Endocrinol Metab*. 93: 2129–34. doi:10.1210/jc.2007-2093. Fecha de consulta: 3 de octubre del 2017.
- Djahanbakhch O and Zosmer A. (2007). Reproductive ageing in women. *Journal of Pathology*. 211: 219–231, doi: 10.1002/path.2108. Fecha de consulta: 7 de diciembre del 2017.
- Duffin K, Bayne RAL, Childs AJ, Collins C, Anderson RA. (2009). The forkhead transcription factor FOXL2 is expressed in somatic cells of the human ovary prior to follicle formation. *Molecular Human Reproduction*. 15(12): 771–777, Doi:10.1093/molehr/gap065. Fecha de consulta: 12 de marzo del 2018.
- Dumesic DA, Meldrum DR, Katz-Jaffe MG, Krisher RL, Schoolcraft WB. (2015). Oocyte environment: follicular fluid and cumulus cells are critical for oocyte health. *Fertil Steril*. 103(2):303–16, doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fertnstert.2014.11.015>. Fecha de consulta: 22 de agosto del 2017.
- Drummond AE y Findlay JK. (1999). The role of estrogen in folliculogenesis. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 151, 57 – 64, doi: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10411320>. Fecha de consulta: 21 de noviembre del 2017.
- Drummond AE. (2006). The role of steroids in follicular growth. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 4(16), doi: 10.1186/1477-7827-4-16. Fecha de consulta: 19 de noviembre del 2017.
- Durlinger AL, Gruijters MJ, Kramer P, Karels B, Ingraham HA, Nachtigal MW, Uilenbroek JT, Grootegoed JA, Themmen AP. (2002a). Anti-Müllerian hormone inhibits initiation of primordial follicle growth in the mouse ovary. *Endocrinology*. 143(3): 1076 – 1084, doi: 10.1210/endo.143.3.8691. Fecha de consulta: 5 de noviembre del 2017.
- Durlinger AL, Gruijters M, Kramer P, Karels B, Kumar R, Matzuk M, Rose U, H. de Jong F, Uilenbroek J, Grootegoed A, Themmen A. (2001). Anti-Müllerian hormone attenuates the effects of FSH on follicle development in the mouse ovary. *Endocrinology* 142(11): 4891-4899, doi: 10.1210/endo.142.11.8486. Fecha de consulta: 4 de diciembre del 2017.
- Durlinger AL, Kramer P, Karels B, de Jong FH, Uilenbroek JT, Grootegoed JA, Themmen AP. (1999). Control of primordial follicle recruitment by anti-Müllerian hormone in the mouse ovary. *Endocrinology*. 140(12): 5789-96, doi: 10.1210/endo.140.12.7204. Fecha de consulta: 13 de octubre del 2017.

- Durlinger AL, Visser JA, Themmen AP. (2002b). Regulation of ovarian function: the role of anti-Müllerian hormone. *Reproduction*. 124(5): 601 – 609, doi: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12416998>. Fecha de consulta: 21 de diciembre del 2017.
- Edson MA, Nagaraja AK, Matzuk MM. (2009). The Mammalian Ovary from Genesis to Revelation. *Endocrine Reviews*. 30 (6), 624-712, doi:10.1210/er.2009-0012. Fecha de consulta: 3 de abril del 2018. Fecha de consulta: 11 de noviembre del 2017.
- Eichenlaub-Ritter U. (1996). Parental age-related aneuploidy in human germ cells and offspring: a story of past and present. *Environ. Mol. Mutagen*. 28, 211–236. Fecha de consulta: 13 de febrero del 2018.
- Esbenshade K. (2001). Secretos y Ciencia del Ciclo Estrual. *National Hog Farmer*. Publicaciones Profesionales C.A. Av. Bolívar Norte, Centro Comercial y Profesional Avenida Bolívar, Piso 3 Ofic. 323. Fecha de consulta: 16 de mayo del 2018.
- Estrada FE y Uribe AM. (2002). Atlas de Histología de Vertebrados. 1° Edición. Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Ciencias. Fecha de consulta: 16 de mayo del 2018.
- Faddy MJ, Gosden RG, Gougeon A, Richardson SJ, Nelson JF. (1992). Accelerated disappearance of ovarian follicles in mid-life: implications for forecasting menopause. *Human Reproduction*. 7(10): 1342–1346, doi: <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.humrep.a137570>. Fecha de consulta: 14 de enero del 2018.
- Faure E, Gouédard L, Imbeaud S, Cate R, Picard JY, Josso N, di Clemente N. (1996). Mutant isoforms of the anti-Müllerian hormone type II receptor are not expressed at the cell membrane. *The Journal of Biological Chemistry*. 271(48): 30571-5, doi:10.1074/jbc.271.48.30571. Fecha de consulta: 17 de octubre del 2017.
- Fernández-Tresguerres JA, Ariznavarreta RC, Cachofeiro V, Cardinali DP, Escrich E, Gil-Loyzaga PE, Lahera JV, Mora TF, Romano PM, Tamargo MJ. (2010). Fisiología humana, 4° Edición. McGrawHill. Fecha de consulta: 16 de mayo del 2018.
- Fischer B, Chavatte-Palmer P, Viebahn C, Navarrete Santos A, Duranthon V. (2012). Rabbit as a reproductive model for human health. *Reproduction*. 144 (1): 1-10. doi: 10.1530/REP-12-0091. Fecha de consulta: 20 de agosto del 2018.
- Fleming NI, Knowler KC, Lazarus KA. (2010). Aromatase is a direct target of FOXL2: C134W in granulosa cell tumors via a single highly conserved binding site in the ovarian specific promoter. *PLoS ONE*, 5(12): e14389, doi: 10.1371/journal.pone.0014389. Fecha de consulta: 24 de abril del 2018.
- Fogle RH, Stanczyk FZ, Zhang X, Paulson RJ. (2007). Ovarian androgen production in postmenopausal women. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 92(8): 3040 –3043, doi: 10.1210/jc.2007-0581. Fecha de consulta: 7 de febrero del 2018.

- Frugier F y Crespi M.(2006). Immunolocalization. *Medicago truncatula handbook*. pp. 11. ID: <https://www.noble.org/globalassets/docs/medicago-handbook/immunolocalization.pdf>. Fecha de consulta: 16 de mayo del 2018.
- García-Ortiz JE, Pelosi E, Omari S, Nedorezov T, Piao Y, Karmazin J, Uda M, Cao A, Cole S, Forabosco A, Schlessinger D, Ottolenghi C. (2009). Foxl2 functions in sex determination and histogenesis throughout mouse ovary development. *BMC Developmental Biology*. 9(36): 1 – 21, doi: <http://doi.org/10.1186/1471-213X-9-36>. Fecha de consulta: 30 de diciembre del 2017.
- Gauden ME. (1992). Maternal age effect: the enigma of Downs syndrome and other trisomic conditions. *Mutat. Res.* 296: 69–88, doi: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1279409>. Fecha de consulta: 26 de mayo del 2018.
- Georges A, Auguste A, Bessi re L, Vanet A, Todeschini A, Veitia R. (2014). FOXL2: a central transcription factor of the ovary. *Journal of molecular endocrinology*. 52: R77 – R33, doi: 10.1530/JME-13-0159ot. Fecha de consulta: 4 de septiembre del 2017.
- Ghersevich SA, Poutanen MH, Martikainen HK, Vihko RK. (1994). Expression of 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase in human granulosa cells: correlation with follicular size, cytochrome P450 aromatase activity and oestradiol production. *Journal of Endocrinology*. 143(1): 139 – 150, doi: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7525828>. Fecha de consulta: 19 de noviembre del 2017.
- Goswami D y Conway GS. (2005). Premature ovarian failure. *Hum Reprod Update*. 11 (4): 391-410. Doi: 10.1093/humupd/dmi012. Fecha de consulta: 28 de agosto del 2017
- Gougeon Alain. (1996). Regulation of ovarian follicular development in primates: facts and hypotheses. *Endocrine Reviews*. 17(2): 121 – 155, doi: 10.1210/edrv-17-2-121. Fecha de consulta: 13 de abril del 2018.
- Govindaraj V y Rao AJ. (2016). Ovarian Aging: Possible Molecular Mechanisms with Special Emphasis on DNA Repair Gene BRCA1. *Women Heal Int*. 2(1): 112, doi: <http://dx.doi.org/10.19104/whi.2016.112>. Fecha de consulta: 20 de marzo del 2018.
- Govoroun MS, Pannetier M, Pailhoux E, Cocquet J, Brillard JP, Couty I, Batellier F, Cotinot C. (2004). Isolation of chicken homolog of the FOXL2 gene and comparison of its expression patterns with those of aromatase during ovarian development. *Developmental Dynamics*. 231(4): 859-70, doi: 10.1002/dvdy.20189. Fecha de consulta: 4 de septiembre del 2017.
- Grossman MP, Nakajima ST, Fallat ME, Siow Y. (2008). Müllerian- inhibiting substance inhibits cytochrome P450 aromatase activity in human granulosa lutein cell culture. *Fertility and Sterility*. 89(3): 1364 - 1370, doi: 10.1016/j.fertnstert.2007.03.066. Fecha de consulta: 18 de octubre del 2017.

- Grynnerup AG, Lindhard A, Sorensen S. (2012). The role of anti-Müllerian hormone in female fertility and infertility – an overview. *Acta Obstetrica et Gynecologica Scandinavica*. 91(11): 1252 – 1260, doi: 10.1111/j.1600-0412.2012.01471.x. Fecha de consulta: 21 de diciembre del 2017.
- Hansen KR, Knowlton NS, Thyer AC, Charleston JS, Soules MR, Klein NA. (2008). A new model of reproductive aging: the decline in ovarian non-growing follicle number from birth to menopause. *Human Reproduction*. 23(3): 699-708, doi:10.1093/humrep/dem408. Fecha de consulta: 2 de junio del 2018.
- Havelock JC, Rainey WE, Bradshaw KD, Carr BR. (2006). The post-menopausal ovary displays a unique pattern of steroidogenic enzyme expression. *Human Reproduction*. 21(1): 309–317, doi:10.1093/humrep/dei373. Fecha de consulta: 14 de enero del 2018.
- Hawkins SM y Matzuk MM. (2008). Menstrual Cycle: Basic Biology. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1135: 10–18, doi: <http://doi.org/10.1196/annals.1429.018>. Fecha de consulta: 11 de marzo del 2018.
- Hinojosa-Cruz JC, Ramos-García RA, Vital-Reyes VS. (2010). Inhibidores de la aromatasa. Aplicaciones potenciales en medicina de la reproducción. *Revista Mexicana de Medicina de la Reproducción*. 3(2): 63 – 68, medigraphic: literatura biomédica. Fecha de consulta: 23 de mayo del 2018.
- Holesh JE y Lord M. (2017). Physiology, Ovulation. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2017 Jun-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK441996/>. Fecha de consulta: 29 de agosto del 2017.
- Hudson QJ, Smith CA, Sinclair AH. (2005). Aromatase inhibition reduces expression of FOXL2 in the embryonic chicken ovary. *Developmental Dynamics*. 233(3), doi: <https://doi.org/10.1002/dvdy.20388>. Fecha de consulta: 16 de septiembre del 2017.
- Hutt KJ, McLaughlin EA, Holland MK. (2006). Primordial follicle activation and follicular development in the juvenile rabbit ovary. *Cell Tissue Res*. 326(3):809-22, doi: 10.1007/s00441-006-0223-3. Fecha de consulta: 29 de agosto del 2017.
- Ilha GF, Rovani MT, Gasperin BG, Ferreira R, de Macedo MP, Neto OA, Duggavathi R, Bordignon V, Gonçalves PB. (2016). Regulation of anti-Müllerian hormone and its receptor expression around follicle deviation in cattle. *Reproductive Domestic Animal*, 51(2):188 – 194, doi: 10.1111/rda.12662. Fecha de consulta: 14 de octubre del 2017.
- Jiménez CB y Nuño FJ. (2013). Genética: conceptos esenciales. 1ra Edición, pp. 594. Madrid: Panamericana. Fecha de consulta: 4 de junio del 2018.
- Johnson J, Canning J, Kaneko T, Pru JK, Tilly JL. (2004). Germinal stem cells and follicular renewal in the postnatal mammalian ovary. *Nature*; 428:145–150, doi: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC434530/>. Fecha de consulta: 6 de octubre del 2017.

- Josso N, Cate RL, Picard JY, Vigier B, di Clemente N, Wilson C, Imbeaud S, Pepinsky RB, Guerrier D, Boussin L, Legeai L, Carré-Eusébe D. (1993). Anti-Müllerian hormone: the Jost factor. *Recent Prog Horm Res* 1993; 48:1–59, doi: 10.1016/B978-0-12-571148-7.50005-1. Fecha de consulta: 19 de marzo del 2018.
- Judd HL, Judd GE, Lucas WE, Yen SS. (1974). Endocrine Function of the Postmenopausal Ovary: Concentration of Androgens and Estrogens in Ovarian and Peripheral Vein Blood. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. Volume 39, Issue 6, pages 1020–1024, <https://doi.org/10.1210/jcem-39-6-1020>. Fecha de consulta: 19 de junio del 2018.
- Kedem A, Yung Y, Yerushalmi GM, Haas J, Maman E, Hanochi M, Hourvitz A. (2014). Anti Müllerian Hormone (AMH) level and expression in mural and cumulus cells in relation to age. *Journal of Ovarian Research*. 7: 113. doi: 10.1186/s13048-014-0113-3. Fecha de consulta: 4 de enero del 2018.
- Kedem-Dickman A, Maman E, Yung Y, Yerushalmi GM, Hemi R, Hanochi M, Dor J, Hourvitz A. (2012). Anti-Müllerian hormone is highly expressed and secreted from cumulus granulosa cells of stimulated preovulatory immature and atretic oocytes. *Reprod Biomed Online*. 24(5): 540-6. doi: 10.1016/j.rbmo.2012.01.023. Fecha de consulta: 4 de enero del 2018.
- La Marca A, Broekmans FJ, Volpe A, Fauser BC, Macklon NS. (2009). Anti-Müllerian hormone (AMH): what do we still need to know?. *Human Reprod*. 24(9):2264-75, doi: 10.1093/humrep/dep210. Fecha de consulta: 8 de septiembre del 2017.
- Latarjet M y Ruiz LA. (2004). Anatomía humana, 4º Edición. Panamericana. Fecha de consulta: 20 de agosto del 2017.
- Lee MM y Donahoe PK. (1993). Müllerian inhibiting substance: A gonadal hormone with multiple functions. *Endocrine Review*. 14(2): 152 – 164, doi: 10.1210/edrv-14-2-152. Fecha de consulta: 24 de octubre del 2017.
- Lei G y Turk R. (2017). Characterization of the FoxL2 proximal promoter and coding sequence from the common snapping turtle (*Chelydra serpentina*). *Comparative Biochemistry and Physiology*. 212: 45 – 55, doi:10.1016/j.cbpa.2017.07.003. Fecha de consulta: 12 de febrero del 2018.
- Li R y Albertini DF (2013). The road to maturation: somatic cell interaction and self-organization of the mammalian oocyte. *Nat rev Mol Cell Biol*. 14(3): 141-52, doi: 10.1038/nrm3531. Fecha de consulta: 27 de enero del 2018.
- Liu K, Case A, Cheung AP, Sierra S, AlAsiri S, Carranza-Mamane B, Case A, Dwyer C, Graham J, Havelock J, Hemmings R, Lee F, Liu K, Murdock W, Senikas V, Vause TD, Wong BC. (2012). Advanced reproductive age and fertility. *Int J Gynaecol Obstet*. 117(1): 95-102, doi: <https://doi.org/10.1016/j.jogc.2016.12.004>. Fecha de consulta: 4 de abril del 2018.

- McClure D. (2018). Breeding and reproduction of rabbits. *Animal Resource Center Veterinary Services*. ID: <https://www.msdsvetmanual.com/all-other-pets/rabbits/breeding-and-reproduction-of-rabbits>. Fecha de consulta: 24 de agosto del 2018.
- Mehlmann LM. (2005). Stops and starts in mammalian oocytes: recent advances in understanding the regulation of meiotic arrest and oocyte maturation. *Reproduction* 130: 791 – 799, doi: 10.1530/rep.1.00793. Fecha de consulta: 13 de diciembre del 2017.
- Miller WL y Auchus RJ. (2011). The molecular biology, biochemistry, and physiology of human steroidogenesis and its disorders. *Endocrine Reviews*. 32(1): 81 – 151, doi: 10.1210/er.2010-0013. Fecha de consulta: 14 de marzo del 2018.
- Miller WL y Bose HS. (2011). Early steps in steroidogenesis: intracellular cholesterol trafficking. *Thematic Review Series: Genetics of Human Lipid Diseases*. 52(12): 2111-35, doi: 10.1194/jlr.R016675. Fecha de consulta: 14 de marzo del 2018.
- Moor KL, Dailey AF, Agur AMR. (2013). Fundamentos de anatomía: con orientación clínica. 2da Edición. Panamericana. Fecha de consulta: 23 de agosto del 2017.
- Mullen R y Behringer R. (2014). Molecular genetics of Müllerian ducts formation, regression and differentiation. *Sex Development*. 8(5): 281-296, doi: 10.1159/000364935. Fecha de consulta: 24 de octubre del 2017.
- Mosher WD y Pratt WF. (1991). Fecundity and infertility in the United States: incidence and trends. *Fertil. Steril*, 56, 192–193, doi: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2070846>. Fecha de consulta: 2 de julio del 2018.
- Mossman HW, Koering MJ, Ferry D. (1964). Cyclic changes of interstitial gland tissue of the human ovary. *American Journal of Anatomy*. 115(2): 235 – 255, doi: <https://doi.org/10.1002/aja.1001150204>. Fecha de consulta: 10 de abril del 2018.
- Mutsaerts MA, Groen H, Huiting HG, Kuchenbecker WK, Sauer PJ, Land JA, Stolk RP, Hoek A. (2012). The influence of maternal and paternal factors on time to pregnancy--a Dutch population-based birth-cohort study: the GECKO Drenthe study. *Human Reprod*. 27(2): 583-93, doi: 10.1093/humrep/der429. Fecha de consulta: 5 de marzo del 2018.
- National Library of Medicine: Genetics Home Reference. (2017). AMHR2. Recuperado de: <https://ghr.nlm.nih.gov/gene/AMHR2>. Fecha de consulta: 8 de septiembre del 2017.
- NCBI Gene. (2017). AMH Anti-Müllerian hormone [*Homo sapiens* (human)]. Recuperado de: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/268>, ID: 268. Fecha de consulta: 8 de septiembre del 2017.
- NCBI Gene. (2017).AMH Anti-Müllerian hormone receptor type 2 [*Homo sapiens* (human)]. Recuperado de: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/2689>, ID: 269. Fecha de consulta: 8 de septiembre del 2017.

- NCBI Gene. (2017). Cyp11a1 cytochrome P450 family 11 subfamily A member 1 [*Homo sapiens* (human)]. Recuperado de: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/1583>, ID: 1583. Fecha de consulta: 8 de septiembre del 2017.
- NCBI Gene. (2017). CYP19A1 cytochrome P450 family 19 subfamily A member 1 [*Homo sapiens* (human)]. Recuperado de: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/1588>, ID: 1588. Fecha de consulta: 8 de septiembre del 2017.
- NCBI Gene. (2017). FOXL2 forkhead box L2 [*Homo sapiens* (human)]. Recuperado de: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/668>, ID: 668. Fecha de consulta: 8 de septiembre del 2017.
- Nef S y Parada LF. (2000). Hormones in male sexual development. *Genes & Development*. 14: 3075-3086, doi: 10.1101/gad.843800. Fecha de consulta: 13 de octubre del 2017.
- Ottolenghi C, Omari S, Garcia-Ortiz JE, Uda M, Crisponi L, Forabosco A, Pilia G, Schlessinger D. (2005). Foxl2 is required for commitment to ovary differentiation. *Human Molecular Genetics*. 14(14): 2053 – 2062, doi. 10.1093/hmg/ddi210. Fecha de consulta: 5 de agosto del 2018.
- Ottolenghi C, Uda M, Hamatani T, Crisponi L, García J, Ko M, Pilia G, Sforza C, Schlessinger D, Forabosco A. (2004). Aging of oocyte, ovary, and human reproduction. *Annals New York Academy of Sciences*. 1034: 117 – 131, doi: 10.1196/annals.1335.015. Fecha de consulta: 6 de diciembre del 2017.
- Otsuka F, Moore RK, Wang X, Sharma S, Miyoshi T, Shimasaki S. (2005). Essential role of the oocyte in estrogen amplification of follicle-stimulating hormone signaling in granulosa cells. *Endocrinology*. 146(8):3362-7. Doi: 10.1210/en.2005-0349. Fecha de consulta: 19 de noviembre del 2017.
- Pannetier M, Fabre S, Batista F, Kocer A, Renault L, Jolivet G, Mandon-Pépin B, Cotinot C, Veitia R, Pailhoux E. (2006). FOXL2 activates P450 aromatase gene transcription: towards a better characterization of the early steps of mammalian ovarian development. *Journal of Molecular Endocrinology*. 36: 399 – 413, doi: 10.1677/jme.1.01947. Fecha de consulta: 8 de octubre del 2017.
- Park M, Suh DS, Lee K, Bae J. (2014). Positive cross talk between FOXL2 and antimüllerian hormone regulates ovarian reserve. *Fertility and Sterility*. 102(3): 847-855.e1. doi: 10.1016/j.fertnstert.2014.05.031. Fecha de consulta: 16 de febrero del 2017.
- Pellatt L, Rice S, Dilaver N, Heshri A, Galea R, Brincat M, Brow K, Simpson E, Mason H. (2011). Anti-Müllerian hormone reduces follicle sensitivity to follicle-stimulating hormone in human granulosa cells. *Fertility and Sterility*. 96(5): 1246 – 1251, doi: 10.1016/j.fertnstert.2011.08.015. Fecha de consulta: 20 de noviembre del 2017.

- Pelosi E, Forabosco A, Schlessinger D. (2015). Genetics of the ovarian reserve. *Frontiers in Genetics*. 6(308): 1 – 20, doi: 10.3389/fgene.2015. 00308. Fecha de consulta: 12 de septiembre del 2017.
- Pincus G y Enzmann EV. (1935). The comparative behavior of mammalian eggs in vivo and in vitro: I. The activation of ovarian eggs. *The Journal of Experimental Medicine*. 62(5): 665–675, doi: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2133299/>. Fecha de consulta: 14 de junio del 2018.
- Pisarska MD, Bae J, Klein C, Hsueh AJ. (2004). Forkhead I2 is expressed in the ovary and represses the promoter activity of the steroidogenic acute regulatory gene. *Endocrinology*. 145(7): 3424-33, doi: 10.1210/en.2003-1141. Fecha de consulta: 4 de abril del 2018.
- Pisarska MD, Barlow G, Kuo FT. (2011). Minireview: roles of the forkhead transcription factor FOXL2 in granulosa cell biology and pathology. *Endocrinology*. 154(4): 1199 – 1208, doi: 10.1210/en.2010-1041. Fecha de consulta: 4 de abril del 2018.
- Poole DH, Ocón-Grove OM, Johnson AL. (2016). Anti-Müllerian hormone (AMH) receptor type II expression and AMH activity in bovine granulosa cells. *Theriogenology*. 86(5): 1353-60. doi: 10.1016/j.theriogenology.2016.04.078. Fecha de consulta: 19 de marzo del 2018.
- Ratts VS, Flaws JA, Kolp R, Sorenson CM, Tilly JL. (1995). Ablation of bcl-2 gene expression decreases the numbers of oocytes and primordial follicles established in the postnatal female mouse gonad. *Endocrinology*. 136(8): 3665–3668, doi: 10.1210/endo.136.8.7628407. Fecha de consulta: 12 de abril del 2018.
- Reed BG y Carr BR. (2015). The Normal Menstrual Cycle and the Control of Ovulation. *National Institutes of Health*. Doi: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK279054/?report=reader>. Fecha de consulta: 18 de abril del 2018.
- Rimón-Dahari N, Yerushalmi-Heinemann L, Alyagor L, Dekel N. (2016). Ovarian Folliculogenesis. *Molecular Mechanisms of Cell Differentiation in Gonad Development*. 58: 167–190 Doi: 10.1007/978-3-319-31973-5_7. Fecha de consulta: 31 de marzo del 2018.
- Sacchi S, D'Ippolito G, Sena P, Marsella T, Tagliasacchi D, Maggi E, Argento C, Tirelli A, Giulini S, La Marca A. (2016). The anti-Müllerian hormone (AMH) acts as a gatekeeper of ovarian steroidogenesis inhibiting the granulosa cell response to both FSH and LH. *Reproductive physiology and disease*. 33(1): 95 – 100, doi: 10.1007/s10815-015-0615-y. Fecha de consulta: 16 de febrero del 2018.
- Sacchi S, Marinaro F, Xella S, Marsella T, Tagliasacchi D, La Marca A. (2017). The anti-Müllerian hormone (AMH) induces forkhead box L2 (FOXL2) expression in primary culture of human granulosa cells in vitro. *Reproductive Physiology and*

Disease, 34: 1131 – 1136, doi: 10.1007/s10815-017-0980-9. Fecha de consulta: 16 de febrero del 2018.

- Schmidt D, Ovitt CE, Anlag K, Fehsenfeld S, Gredsted L, Treier AC, Treier M. (2004). The murine winged-helix transcription factor Foxl2 is required for granulosa cell differentiation and ovary maintenance. *Development and disease*. 131(4): 933-42, doi: 10.1242/dev.00969. Fecha de consulta: 26 de diciembre del 2017.
- Schwartz JR y Roy SK. (2000). Developmental expression of cytochrome P450 side-chain cleavage and cytochrome P450 17 α -hydroxylase messenger ribonucleic acid and protein in the neonatal hamster ovary. *Biology of Reproduction*. 63(6): 1586 – 1593, doi: <https://doi.org/10.1095/biolreprod63.6.1586>. Fecha de consulta: 14 de marzo del 2018.
- Shaw ND, Srouji SS, Welt CK, Cox KH, Fox JH, Adams JA, Sluss PM, Hall JE. (2015). Compensatory Increase in Ovarian Aromatase in Older Regularly Cycling Women. *J Clin Endocrinol Metab*. 100(9):3539-47. doi: 10.1210/JC.2015-2191. Fecha de consulta: 16 de abril del 2018.
- Silverthorn DU, Ober WC, Gorrison CW, Silverthorn AC, Johnson BR. (2009). Fisiología Humana: Un enfoque integrado. 4ta Edición, pp 980. Buenos Aires: médica Panamericana. Fecha de consulta: 4 de junio del 2018.
- Simpson ER. (2003). Sources of estrogen and their importance. *Journal Steroid Biochemistry & Molecular Biology*. 86(3-5): 225-30, doi: 10.1016/S0960-0760(03)00360-1. Fecha de consulta: 22 de abril del 2018.
- Song JY, Chen KY, Kim SY, Kim MR, Ryu KS, Cha JH, Kang CS, MacLaughlin DT, Kim JH. (2009). The expression of Müllerian inhibiting substance/anti-Müllerian hormone type II receptor protein and mRNA in benign, borderline and malignant ovarian neoplasia. *International Journal of oncology*. 34: 1583 – 1591, doi: 10.3892/ijo_00000288. Fecha de consulta: 24 de octubre del 2017.
- Stocco C. (2008). Aromatase Expression in the ovary: hormonal and molecular regulation. *Steroids*, 73(5): 473 – 487, doi: 10.1016 / j.steroids.2008.01.017. Fecha de consulta: 4 de noviembre del 2017.
- Şükür YE, Kivançlı İB, Özmen B. (2014). Ovarian aging and premature ovarian failure. *Journal of the Turkish German Gynecological Association*. 15(3): 190–196. <http://doi.org/10.5152/jtgga.2014.0022>. Fecha de consulta: 6 de diciembre del 2017.
- Terry K, McGrath M, De Vivo I. (2010). Genetic variation in CYP11A1 and StAR in relation to endometrial cancer risk. *Gynecologic oncology*. 117(2): 255 – 259, doi: 10.1016/j.ygyno.2010.02.002. Fecha de consulta: 5 de noviembre del 2017.
- Treloar AE, Boynton RE, Behn BG, Brown BW. (1967). Variation of the human menstrual cycle through reproductive life. *Int J Fertil*. 12(1 Pt 2): 77-126. Doi: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5419031>. Fecha de consulta: 18 de abril del 2018.

- Uda M, Ottolenghi C, Crisponi L, García JE, Deiana M, Kimber W, Forabosco A, Cao A, Schlessiger D, Pilia G. (2004). *Foxl2* disruption causes mouse ovarian failure by pervasive blockage of follicle development. *Human Molecular Genetics*. 13(11): 1171 – 1181, doi: 10.1093/hmg/ddh124. Fecha de consulta: 6 de diciembre del 2017.
- Uhlenhaut NH y Treier M. (2006). *Foxl2* function in ovarian development. *Molecular Genetics and Metabolism*. 88: 225 – 234. doi: 10.1016/j.ymgme.2006.03.00. Fecha de consulta: 2 de abril del 2018.
- Uhlenhaut NH, Jakob S, Anlag K, Eisenberger T, Sekido R, Kress J, Treier AC, Klugmann C, Klasen C, Holter NI, Riethmacher D, Schütz G, Cooney AJ, Lovell-Badge R, Treier M. (2009). Somatic sex reprogramming of adult ovaries to testes by FOXL2 ablation. *Cell*. 139(6): 1130-42, doi: 10.1016/j.cell.2009.11.021. Fecha de consulta: 18 de abril del 2018.
- Umehara, T, Richards JS, Shimada M. (2018). The stromal fibrosis in aging ovary. *Aging (Albany NY)*. 10(1): 9–10, doi: <http://doi.org/10.18632/aging.101370>. Fecha de consulta: 1 de julio del 2018.
- UniProt. (2017). Q28616 Anti-Muellerian hormone type-2 receptor (AMHR2_RABIT). Recuperado de: <http://www.uniprot.org/uniprot/Q28616>. (2017). Fecha de consulta: 4 de septiembre del 2017.
- UniProtKB. (2017). P05108 Cholesterol side-chain cleavage enzyme, mitochondrial (CYP11A1 *Homo sapiens*). Recuperado de: <https://www.uniprot.org/uniprot/P05108>. Fecha de consulta: 4 de septiembre del 2017.
- Velde ER y Pearson PL. (2002). The variability of female reproductive ageing. *Human Reproduction*. 8(2): 141 – 154, doi: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12099629>. Fecha de consulta: 19 de febrero del 2018.
- Velde ER, Scheffer GJ, Dorland M, Broekmans FJ, Fauser BC. (1998). Developmental and endocrine aspects of normal ovarian aging. *Mol Cell Endocrinol*. 145(1-2): 67-73, doi: [https://doi.org/10.1016/S0303-7207\(98\)00171-3](https://doi.org/10.1016/S0303-7207(98)00171-3). Fecha de consulta: 17 de enero del 2018.
- Vidal JD. (2017). The Impact of Age on the Female Reproductive System. *Toxicologic Pathology*. 45(1): 206 -215, doi: 10.1177/0192623316673754. Fecha de consulta: 10 de enero del 2018.
- Villa BG y Colin A. (2012). Bases biológicas y terapéuticas de la fertilización asistida. Universidad Nacional Autónoma de México. ID: <https://archivos.juridicas.unam.mx/www/bjv/libros/7/3155/3.pdf>. Consultado: 22 de Julio del 2018.
- Visser JA, Jong FH, Laven JS, Themmen APN. (2006). Anti-Müllerian hormone: a new marker for ovarian function. *Society for Reproduction and Fertility*. 131: 1 – 9, doi: 10.1530/rep.1.00529. Fecha de consulta: 24 de septiembre del 2017.
- Weenen C, Laven J, Von Bergh A, Cranfield M, Groome N, Visser J, Kramer P, Fauser B, Themmen A. (2004). Anti-Müllerian hormone expression pattern in the

human ovary: potencial implications for initial and cyclic follicle recruitment. *Molecular Human Reproduction*. 10(2): 77-83, doi: 10.1093/molehr/gah015. Fecha de consulta: 24 de septiembre del 2017.

- Welt CK, Jimenez Y, Sluss PM, Smith PC and Hall JE. (2006). Control of estradiol secretion in reproductive ageing. *Human Reproduction*. 21(8): 2189 – 2193, doi: 10.1093/humrep/del136. Fecha de consulta: 17 de abril del 2018.
- Wei H, Liu X, Yuan J, Li L, Zhang D, Guo X, Lui L, Zhang S. (2015). Age-Specific Gene Expression Profiles of Rhesus Monkey Ovaries Detected by Microarray Analysis. *BioMed Research International*. 2015, Article ID 625192, 15 pages, doi: <https://doi.org/10.1155/2015/625192>. Fecha de consulta: 4 de mayo del 2018.
- Williams JC y Erickson FG. (2012). Morphology and Physiology of the Ovary. *National Institutes of Health*. Doi: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK278951/>. Fecha de consulta: 7 de octubre del 2017.
- Wilkosz P, Greggains GD, Tanbo TG, Fedorcsak P. (2014). Female Reproductive Decline Is Determined by Remaining Ovarian Reserve and Age. *PLOS ONE*. 9(10): e108343, doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0108343>. Fecha de consulta: 4 de mayo del 2018.
- Winther CS, Nielsen FK, Hansen M, Styrishave B. (2013). Corticosteroid Production in H295R Cells During Exposure to 3 Endocrine Disrupters Analyzed With LC-MS/MS. *International Journal of toxicology*. 32(3): 219 – 227. Doi: 10.1177/1091581813484366. Fecha de consulta: 27 de Agosto del 2018.
- Young JM y McNeilly AS. (2010). Theca: the forgotten cell of the ovarian follicle. *Reproduction*. 140(4): 489-504, doi: 10.1530/REP-10-0094. Fecha de consulta: 16 de febrero del 2018.
- Yuan JH, Wang JZ, Lan GC, Sui HS, Yu JN, Tan JH. (2008). Expression of steroidogenic enzymes and synthesis of steroid hormones during development of ovarian follicles in prepubertal goats. *Domest Anim Endocrinol*. 34(4): 451-60, doi: 10.1016/j.domaniend.2008.01.002. Fecha de consulta: 5 de agosto del 2018.

12. APÉNDICE

12.1 ESTANDARIZACIÓN DE LA TÉCNICA DE RT-PCR

12.1.1 Extracción de RNA total

El RNA extraído de conejas de 4 meses de edad se muestra en la figura X, en donde se puede apreciar la presencia de dos bandas que indican las subunidades 28S y 18S del RNA ribosomal, lo cual demuestra que el RNA extraído de los ovarios se encuentra íntegro.

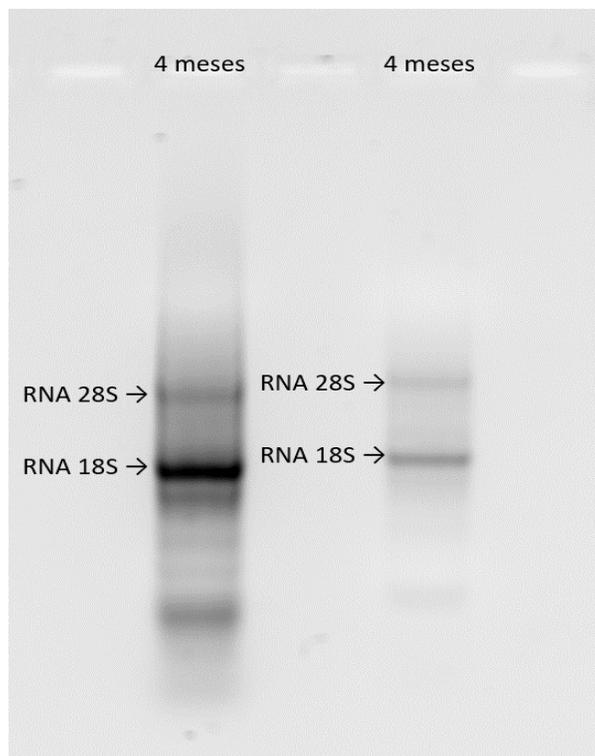


Figura 24. Comprobación de la integridad del RNA total extraído. Electroforesis en gel de agarosa al 1% teñido con GelRed, en donde se pueden apreciar las bandas de las subunidades del RNA ribosomal 28S y 18S.

Una vez extraído el RNA total, se realizó la cuantificación de este, para calcular el volumen necesario para la síntesis de cDNA, ya que se requiere 1µg de RNA para llevar a cabo la reacción de acuerdo con el protocolo establecido.

12.1.2 Diseño de oligonucleótidos

Al llevar a cabo el diseño de los oligonucleótidos para la amplificación de los genes *Foxl2*, *HPRT*, *CYP11A1*, *CYP19A1*, *AMH* y *AMHR II* se empleó el programa Primer-BLAST perteneciente a la página National Center for Biotechnology Information (NCBI). Para lo cual se emplearon secuencias de *Oryctolagus cuniculus* (conejo), *Homo sapiens* (humano), *Mus musculus* (ratón), *Sus scrofa* (cerdo) y *Bos taurus* (vaca), extraídas de la sección de Nucleotide igualmente de la página NCBI.

En el caso del diseño de oligonucleótidos para los genes *Cyp11a1* y *Cyp19a1*, las condiciones de RT-PCR se determinaron mediante el uso de cDNA de ovarios de conejas de 3 meses de edad, realizando un gradiente de temperaturas de 52, 54, 56, 58 y 60°C por 34 ciclos; determinando que los oligonucleótidos para la amplificación de ambos genes hibridan adecuadamente a la cadena de cDNA desde 52°C hasta los 60°C. Una vez evaluadas las temperaturas de alineamiento, se seleccionó una temperatura de 56°C para ambos oligonucleótidos ya que es una temperatura intermedia, mayor a 52°C y no mayor a 60°C, y permite obtener un resultado confiable; las condiciones para el uso de los oligonucleótidos para la amplificación y posterior estudio de la expresión de los genes *Cyp11a1* y *Cyp19a1* fueron determinadas anteriormente por el QFB Ángel Luna Castellanos (2017).

Ahora bien, al establecer la temperatura de alineamiento de 56°C se procedió a realizar una curva de ciclos para ambos genes, determinando así el número de ciclos en los cuales la concentración de los amplicones clonados no sea saturada ni deficiente, encontrando un punto medio en el que la concentración del producto sea confiable para un análisis semicuantitativo con respecto al nivel de expresión de los genes en estudio, para lo cual se probaron 26, 28, 30, 32 y 34 ciclos, de los cuales se determinó que a los 30 ciclos se obtiene una concentración de producto adecuado, como se puede apreciar en la figura 25 y corroborarlo con la figura 25.1 en donde se aprecia el punto medio de la fase exponencial en donde se obtiene una concentración viable para el estudio.

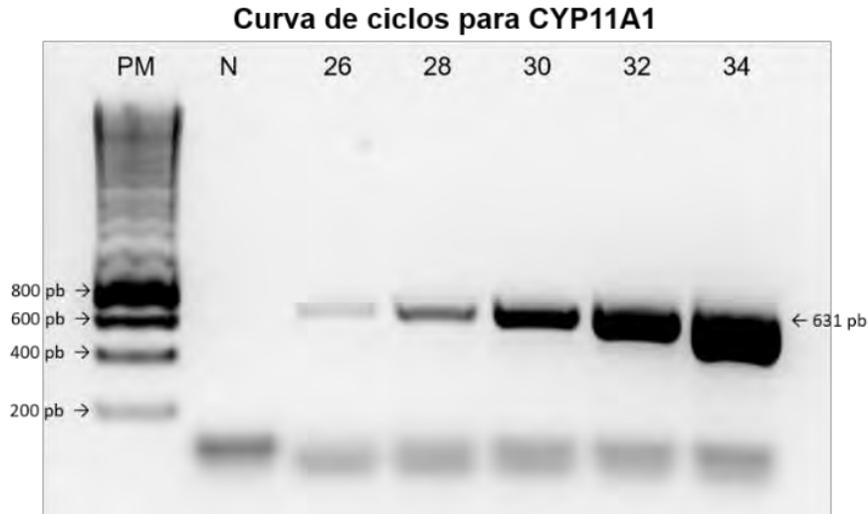


Figura 25. Electroforesis de ciclos para la expresión del gen Cyp11a1 en gel de agarosa al 1% teñido con GelRed®. PM: Escalera de peso molecular; N: control negativo.

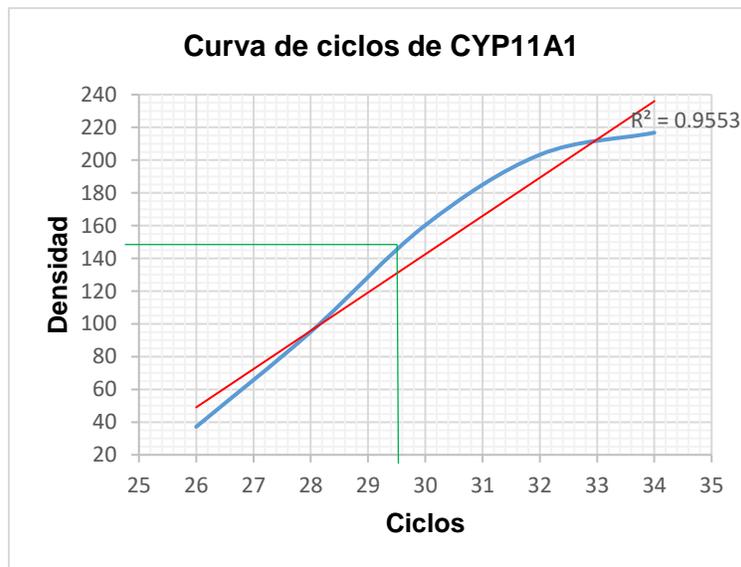


Figura 25.1. Curva sigmoidea de ciclos de los amplificadores del gen Cyp11a1. Las líneas verdes se intersectan indicando el punto medio de la fase exponencial que determina el número de ciclos apropiados para las condiciones de RT-PCR para la amplificación del gen Cyp11a1. La línea roja indica la regresión lineal y su respectivo valor de R^2 .

En el caso de Cyp19a1 igualmente se probaron ciclos de 26, 28, 30 y 32, de los cuales en este caso se determinó que a los 29 ciclos se obtiene una concentración de producto adecuado, como se puede apreciar en la figura 26 y corroborarlo con la figura 26.1 que igualmente indica el punto medio de la fase exponencial en donde se obtiene la concentración viable para el estudio.

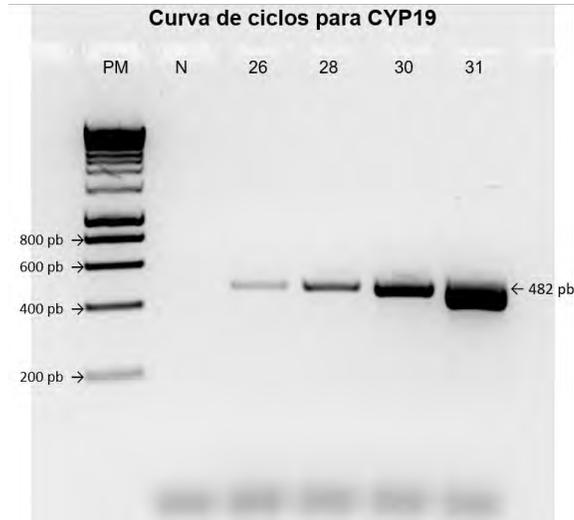


Figura 26. Electroforesis de ciclos para la expresión del gen Cyp19 en gel de agarosa al 1% teñido con GelRed®. PM: Escalera de peso molecular; N: control negativo.

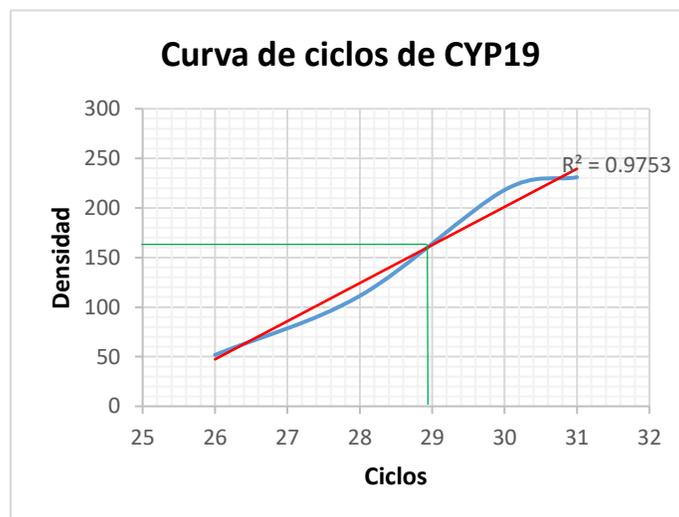


Figura 26.1. Curva sigmoidea de ciclos de los amplificadores del gen Cyp19. Las líneas verdes se intersectan indicando el punto medio de la fase exponencial que determina el número de ciclos apropiados para las condiciones de RT-PCR para la amplificación del gen Cyp19. La línea roja indica la regresión lineal y su respectivo valor de R^2 .

Ahora bien, en el caso de Foxl2 se realizó un alineamiento de 5 secuencias del gen Foxl2 de 5 especies diferentes (humano, ratón, vaca, cerdo y conejo) dicho alineamiento se realizó con el programa Kalign-EBI de la página European Bioinformatics Institute (EMBL-EBI), una vez realizado el alineamiento se seleccionaron las regiones más conservadas entre las 5 especies y se diseñaron los oligonucleótidos sentido y antisentido, lo cual se

puede apreciar en el siguiente alineamiento, en donde los oligonucleótidos sentido son indicados en color amarillo y los oligonucleótidos anti-sentido indicados en color verde; dichos oligonucleótidos se encuentran entre sí a una distancia aproximada de 243 pb y la longitud esperada del amplicon es de 277 pb. Aquellas zonas indicadas con guiones representan secuencias eliminadas en algunas especies y las bases indicadas en rosa son aquellas que difieren en algunas especies.

CLUSTAL multiple sequence alignment by Kalign (2.0)

Foxl2Humano	agggcggcggcgagcgcaagggcaactactggacgctgga	cccggcctgcgaagacatgt	660pb
Foxl2Raton	agggcggcggcgagcgcaagggcaactactggacgctgga	cccggcctgcgaggacatgt	
Foxl2Vaca	agggcggcggcgagcgcaagggcaactactggacgctgga	cccggcctgcgaggacatgt	
Foxl2Cerdo	agggcggcggcgagcgcaagggcaactactggacgctgga	cccggcctgcgaggacatgt	
Foxl2Conejo	agggcggcggcgagcgcaagggcaactactggacgctgga	cccggcctgcgaggacatgt	
Foxl2Humano	cgcacttccagcccggcaaggggctcttcggggccggaggcgccgcaggcgggtgcggcg		780pb
Foxl2Raton	ctcacttccagcccggcaaggggctcttcgggagcggaggagcggcgggtggctgcggcg		
Foxl2Vaca	cgcacttccagcccggcaaggggctcttcggggccggaggcgctgcgggtggctgcggcg		
Foxl2Cerdo	cgcacttccaacccggcaagggactcttcggggccggagggtgccgcggcggcggctgcggcg		
Foxl2Conejo	cgcacttccagcccggcaaggggctcttcggggccggaggcgccgcggcggcggctgcggcg		
Foxl2Humano	gcttcctcaacaactcgtggccgctaccgcagcctccctcacc	catgcctatgcctcct	900pb
Foxl2Raton	ggttcctcaacaactcctggcccctgcgcagcctccctcgcc	catgcctacgcctcct	
Foxl2Vaca	gcttcctcaacaactcgtggccgctaccgcagccgcttcgcc	catgcctacgcctcct	
Foxl2Cerdo	gcttcctcaacaactcgtggccactaccgcagccgcctcacc	catgcctacgcctcct	
Foxl2Conejo	ggttcctcaacaactcgtggccgctgccaagccgcagccgcctcgcc	catgcctacgcctcct	

Una vez obtenidos los oligonucleótidos para Foxl2 se realizó un gradiente de temperatura de 52, 56, 60, 64 y 68°C por 34 ciclos; con lo cual se puede apreciar en la figura 3 que los oligonucleótidos hibridan adecuadamente a 60°C, ya que a partir de los 60°C el producto clonado se aprecia desvanecido, por lo tanto, se seleccionó la temperatura máxima a la cual se obtiene una concentración de producto favorable, la cual fue de 60°C.

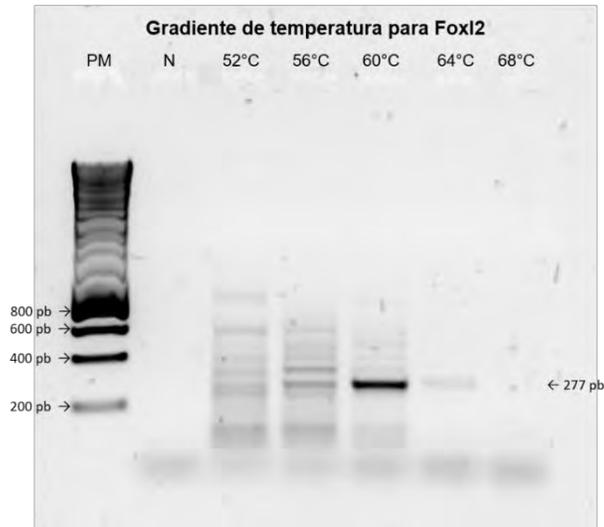


Figura 27. Electroforesis de gradiente de temperatura para la expresión del gen Foxl2 en gel de agarosa al 1% teñido con GelRed®. PM: Escalera de peso molecular; N: control negativo.

Una vez obtenida la temperatura de alineamiento de 60°C se procedió a realizar una curva de 28, 30, 32, 34 y 36 ciclos para determinar el número de ciclos adecuados para la obtención de una concentración de productos para un adecuado análisis semicuantitativo, con lo cual se seleccionaron 36 ciclos, para obtener una concentración de productos adecuada tal como se aprecia en la figura 28, comprobando dicho resultado con la figura 28.1 que indica el punto medio de la fase exponencial en donde se obtiene la concentración viable para el estudio.

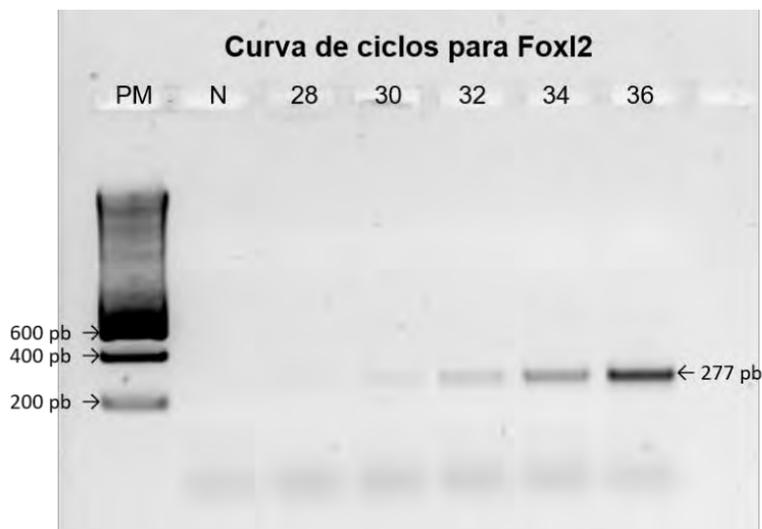


Figura 28. Electroforesis de curva de ciclos para la expresión del gen Foxl2 en gel de agarosa al 1% teñido con GelRed®. PM: Escalera de peso molecular; N: control negativo.



Figura 28.1. Curva sigmoidea de ciclos de los amplificadores del gen Foxl2. Las líneas verdes se intersectan indicando el punto medio de la fase exponencial que determina el número de ciclos apropiados para las condiciones de RT-PCR para la amplificación del gen Foxl2. La línea roja indica la regresión lineal y su respectivo valor de R².

Para el diseño de los oligonucleótidos para AMH igualmente se diseñaron a partir del alineamiento de 4 secuencias del gen AMH de 4 especies diferentes (humano, ratón, cerdo y vaca), en este caso no se empleó al conejo debido a que la secuencia para el gen AMH para dicha especie aún no se encuentra reportada; dichas secuencias se alinearon con el programa Kalign-EBI de la página European Bioinformatics Institute (EMBL-EBI), comprobando que los oligonucleótidos efectivamente hibridan en aquellas zonas conservadas; de las 4 especies, lo cual se presenta a continuación, en donde los oligonucleótidos sentido son indicados en color amarillo y los oligonucleótidos anti-sentido indicados en color verde; dichos oligonucleótidos se encuentran entre sí a una distancia aproximada de 376 pb y la longitud esperada del amplicon es de 410 pb. Aquellas zonas indicadas con guiones representan secuencias eliminadas en algunas especies y las bases indicadas en rosa son aquellas que difieren entre las especies.

CLUSTAL multiple sequence alignment by Kalign (2.0)

AMHHumano	ctgccaag--cc-tccc-gggtctgcc-tccg--gccacagcccc---gctgctggcgcg	1500pb
AMHRaton	ctgca--ggacc-tccc-gggtctgccacccacagct----cccc--cgctgctggcgcg	
AMHCerdo	ctgcaagg--cc-tccccggg-ctgcaagccaccgcca----cccc---gtgctggcag	
AMHVaca	ctgcgt-g--ccctccc-ggggctgcc-tcca--gct---gccccaccgctgctggcgcg	

AMHHumano	cctgctcgcgctctg-ccca--ggtggc-cccggcgg---cctcggcgatccc-ctgcga	1560pb
AMHRaton	cctgctagcgctgtgtcccaacg---actcccg-cag---ctccggga-cccgctgcgc	
AMHCerdo	cctattggcactgtg-ccca--gggga---caga-ggggacccccggcg-cccgctgcgc	
AMHVaca	cctgctggcactgtg-cccg--ggaac-ccagacag---ccccggcgg-cccgctgcgc	
AMHHumano	ccgtggggcgccctgg-cgcgcccaccctgctgctgctgccaccgcctacgcgggc	1680pb
AMHRaton	tcgcggggctgcctgggc-cgectgcctgctgctgctgccactgcctacgcgggc	
AMHCerdo	ccgcgggcgcgccctgg-cccggccgctgctgctgctgccacagcctacgcaggc	
AMHVaca	ccgcgggcgcaccctgg-cgcgcccgcctgctgctgctgccacagcctacaccggc	
AMHHumano	tgctcatcagcctgtcggaggagcgcacagcgcgaccacgtgcccaa-catggtggcc	1740pb
AMHRaton	tgctcatcagcctgtccgaggagcgcacagcgcgaccacgtgcccaa-catggtagcc	
AMHCerdo	tcctcatcagcctgtctgaggagcgcacagtgcccaccacgtgcccaa-catggtggcc	
AMHVaca	tcctcatcagcctgtccgaggagcgcacagtgcgaccacgt-cccaaacatggtggcc	

No fue posible obtener los productos de amplificación para el gen AMH, se diseñaron diferentes oligonucleótidos, sin embargo no se logró amplificarlo correctamente.

Para el gen AMHR II igualmente se diseñaron a partir del alineamiento de 5 secuencias del gen AMHR II de 5 especies diferentes (conejo, humano, ratón, cerdo y vaca); dichas secuencias se alinearon con el programa Kalign-EBI de la página European Bioinformatics Institute (EMBL-EBI), comprobando que los oligonucleótidos efectivamente hibridan en aquellas zonas conservadas; de las 5 especies, lo cual se presenta a continuación, en donde los oligonucleótidos sentido son indicados en color amarillo y los oligonucleótidos anti-sentido indicados en color verde; dichos oligonucleótidos se encuentran entre sí a una distancia aproximada de 529 pb y la longitud esperada del amplicon es de 551 pb. Aquellas zonas indicadas con guiones representan secuencias eliminadas en algunas especies y las bases indicadas en rosa son aquellas que difieren entre las especies.

CLUSTAL multiple sequence alignment by Kalign (2.0)

AMHR IIConejo	ctgcggctgtgcaggcaccoccaaacaggaggacctgtgtgttctttgaggccccctggag	240pb
AMHR I IHumano	ccacagctgtggaagcaccoccaaacaggcgaacctgtgtgttctttgaggccccctggag	
AMHR I IRaton	ctgcggcagcacaagtatccccaaacaggaggacctgtgtgttctttgaggctcctggag	
AMHR I IVaca	ctacagctgtgcaagcaccocccagcaggcggacctgtgtgttctttgaggccccctggag	
AMHR I ICerdo	cagcaacagtgcaagcaccoccaaagcaggcggacctgtgtgttctttgaggccccctggag	
AMHR I IConejo	tgcggggaagcacaagaactgggggagctgctagatgcaggaccaggccccccaggg	300pb
AMHR I IHumano	tgcggggaagcacaagaactggggagctgctagatgcaggaccagagctcccagag	
AMHR I IRaton	tgcggggaagcacaagaactgggggaaatggtagatgcaggaccaggccccccaaagg	
AMHR I IVaca	tgcggggaagcacaagaactggggaaactgctggatgcagggccggccccccaggg	
AMHR I ICerdo	tgcggggaagcacaagaactctggggaactgctagatgcaggaccaggccccccaggg	
AMHR I IConejo	actcaggcagggactgcagtgaggagctgccggagctgccccagctgtgcttctccagg	780pb
AMHR I IHumano	actcaggcagggactggagtgtggagctgcaggagctgctgagctgtgttctccagg	
AMHR I IRaton	gctcaggcggagactgcagtgaggaaactgccagagctggccgagctcgttctccagg	

AMHRIIVaca	attcaggcagggactggagtgctgagctgccggagctgcctgagctgtgcttctcccagg	
AMHRIICerdo	actcaggcaggaactggagtgccgagctgcccgagctgcccgagctctgcttctcccagg	
AMHRIIConejo	tcattcgggaaggaggtcacgcggcagtggtgggctgggcagctgcaaggggagctggtgg	840pb
AMHRIIHumano	taattcgggaaggaggtcatgcagtggtttgggccgggcagctgcaaggaaaactggttg	
AMHRIIRaton	taattcaggaaggaggtcatgcagtcgtctgggccgggaggcttcagggtgagatggtag	
AMHRIIVaca	tcatacgggaaggaggtcacgcagtggtgtgggctgggcagctgcaaggcaagctggtag	
AMHRIICerdo	ttattcgggaaggagatcacacagtggtgtgggctgggcagctgcaaggcaagctggtag	

Una vez diseñados los oligos, se procedió a realizar un gradiente de temperatura de 52, 54, 56, 58 y 60°C por 34 ciclos, obteniendo así el resultado que se puede apreciar en la figura 29, en donde se seleccionó la temperatura de 60°C, que permite apreciar dos bandas bien definidas y con una mayor concentración de productos amplificados.

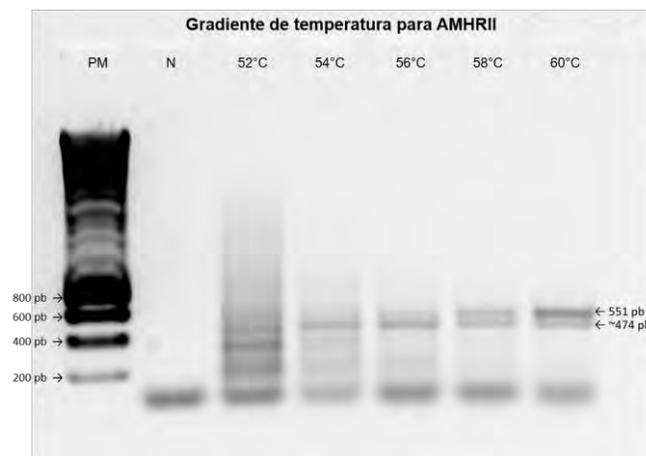


Figura 29. Electroforesis de gradiente de temperatura para la expresión del gen AMHR II en gel de agarosa al 2% teñido con GelRed®. PM: Escalera de peso molecular; N: control negativo.

Con la temperatura de alineamiento de 60°C, se realizó la curva de 30, 31 y 32 ciclos, encontrando que a los 31 ciclos se obtiene la concentración de productos adecuada que se puede apreciar en la figura 30, comprobando dicho resultado con la figura 30.1 que indica el punto medio de la fase exponencial en donde se obtiene la concentración viable para el estudio.

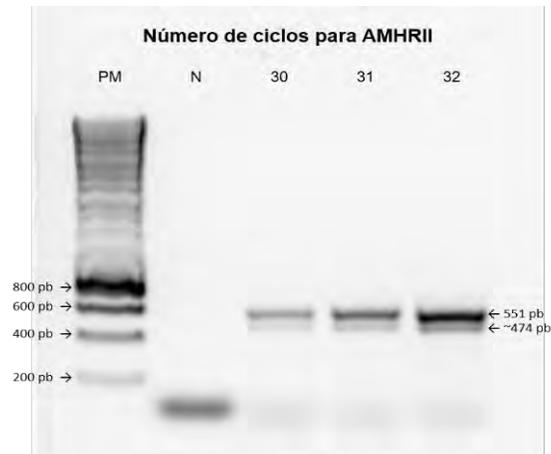


Figura 30. Electroforesis de curva de ciclos para la expresión del gen AMHR II en gel de agarosa al 2% teñido con GelRed®. PM: Escalera de peso molecular; N: control negativo.

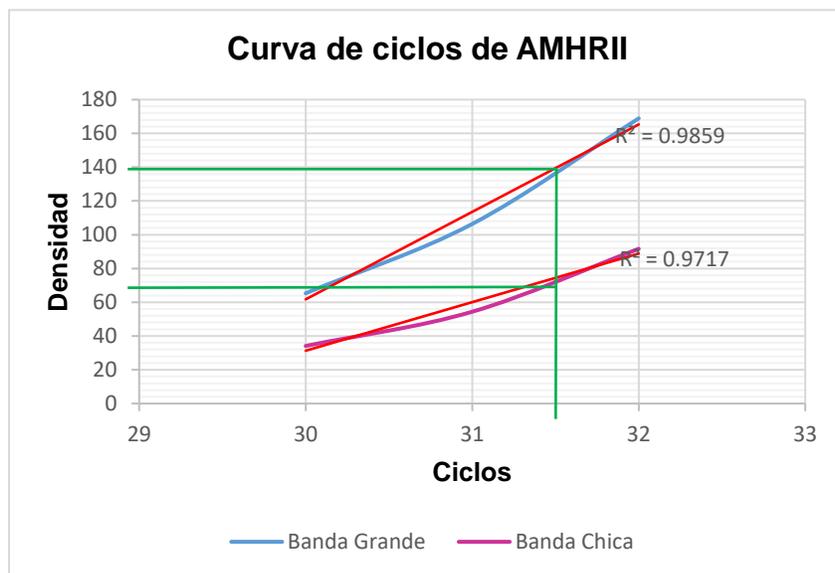


Figura 30.1. Curva sigmoidea de ciclos de los amplificadores del gen AMHR II. Las líneas verdes se intersectan indicando el punto medio de la fase exponencial que determina el número de ciclos apropiados para las condiciones de RT-PCR para la amplificación del gen AMHR II. La línea roja indica la regresión lineal y su respectivo valor de R^2 .

Por último, se empleó como gen endógeno a HPRT, un gen de expresión constante que se emplea como referencia ya que su expresión no varía con respecto al avance de la edad, con la finalidad de apreciar los cambios en los niveles de expresión de los genes AMH, Foxl2, Cyp11a1 y aromatasa con respecto al avance de la edad.

En este caso para HPRT se emplearon oligonucleótidos reportados por Saldaña (2014) y previamente usados por el QFB Ángel Luna Castellanos (2017), los cuales estaban diseñados a una temperatura de 56°C, para la amplificación de un producto de 462pb, sin embargo se realizó la curva de ciclos pertinente de 24 a 32 ciclos para determinar el número de ciclos necesarios para amplificar el gen HPRT, indicando que a los 28 ciclos se obtiene una concentración de producto adecuado, como se puede apreciar en la figura 31 y corroborarlo con la figura 31.1 en donde se indica el punto medio de la fase exponencial en donde se obtiene una concentración viable para el estudio.

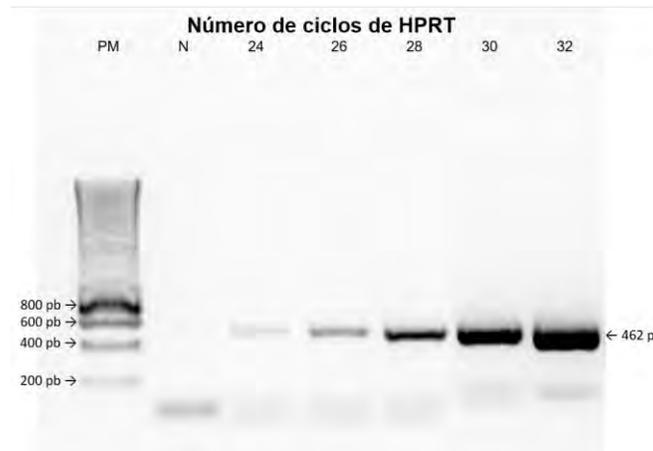


Figura 31. Electroforesis de curva de ciclos para la expresión del gen HPRT en gel de agarosa al 1% teñido con GelRed®. PM: Escalera de peso molecular; N: control negativo.

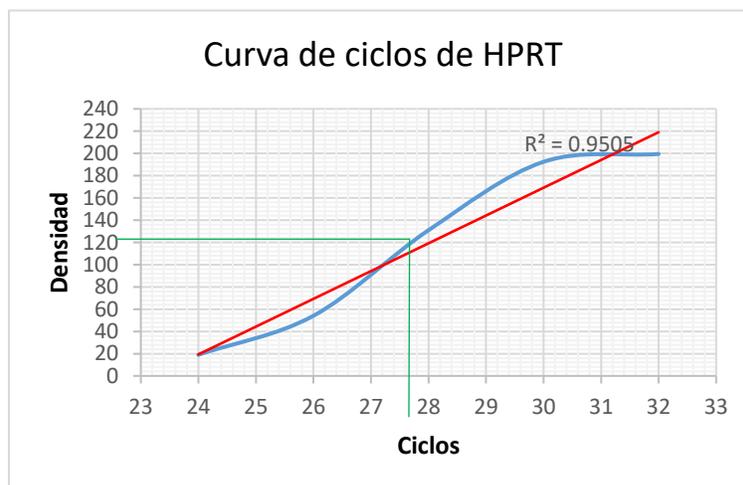


Figura 31.1. Curva sigmoidea de ciclos de los amplificadores del gen HPRT. Las líneas verdes se intersectan indicando el punto medio de la fase exponencial que determina el número de ciclos apropiados para las condiciones de RT-PCR para la amplificación del gen HPRT. La línea roja indica la regresión lineal y su respectivo valor de R^2 .

Los oligonucleótidos diseñados para el estudio de cada gen se indican en la siguiente tabla, así como las condiciones de RT-PCR determinadas para cada gen; el diseño se realizó de tal manera que las temperaturas de alineamiento fueran igual o menores a 60°C, así mismo se procuró que el tamaño de cada amplicon fuese diferente para poder identificar adecuadamente cada uno de los genes en cuestión.

Gen	Oligo sentido	Secuencia de oligo S Dirección 5' → 3'	Oligo anti-sentido	Secuencia del oligo AS Dirección 5' → 3'	Tamaño del amplicon	Tm
CYP11A1	CYP11a1rb Fw	GGG TCC ATT ATC GTC ATG TG	CYP11a1rb Rv	CAG TAG AAG CTC TGG GTG TA	631 pb	56°C
CYP19 (Aromatasa)	CYP19rb Fw	GGC AGT GCC TGC AAC TAT TA	CYP19rb Rv	GGT TTG AGG AGG AGA GCT TG	482 pb	56°C
Hormona Anti-Mülleriana (AMH)	AMHrb Fw(1)	TGC TGG CGC GCC TGC T	AMHrb Rv	CAG GCT GAT GAG CAG CTT	410 pb	64°C
Receptor de AMH tipo II	AMH-Rrb Fw	TGT GTT CTT TGA GGC CCC TG	AMH-Rrb Rv	GGA TGA CCT GGG AGA AGC AC	551 pb	60°C
FOXL2	Foxl2rb Fw	AAC TAC TGG ACG CTG GA	Foxl2rb Rv	AGG AGG CGT AGG GCA TG	277 pb	60°C
HPRT	HPRTrb Fw	GAC TCA TTA TGG ACA GGA C	HPRTrb Rv	CAA GGG CAT ATC CTA CAA C	462 pb	56°C

12.2 Secuenciación e identificación de genes

Una vez preestablecidas las condiciones de RT-PCR para cada gen a estudiar se procedió a comprobar que efectivamente los oligos diseñados amplificaran los genes de interés, aplicando un protocolo de purificación, para lo cual se preparó una única banda de productos de PCR de aproximadamente 300µl, mediante electroforesis en gel de agarosa al 1 o 2% dependiendo del gen en cuestión; posteriormente se extrajo el DNA de la banda obtenida para la secuenciación de los productos amplificados de cada gen.

Mediante la secuenciación de cada gen se obtuvo un electroferograma que muestra la secuencia nucleotídica que conforma cada gen amplificado. Dichas secuencias obtenidas se alinearon mediante el programa de BLAST, comparando las secuencias obtenidas con la base de datos de NCBI, con el fin de encontrar la secuencia más parecida, comprobando así que efectivamente se tratara de los genes de interés.

En el caso del alineamiento de Cyp11a1 y Cyp19 obtenidos experimentalmente se encontró una identidad del 100% con las secuencias de Cyp11a1 y Cyp19 respectivamente, de la especie *Oryctolagus cuniculus*; esto fue previamente estudiado y comprobado por el QFB Ángel Luna Castellanos (2017), cuyos resultados se presentan en la tabla 1, que indica los genes en cuestión, su identidad y número de identificación de NCBI.

Gen	% de identidad	ID de NCBI
CYP11A1	100%	XM_008253734.2
CYP19 (aromatasa)	100%	NM_001170921.2

Tabla 1. Identificación de secuencias de cDNA de Cyp11a1 y Cyp19.

Tanto los electroferogramas como los alineamientos de BLAST de ambos genes pueden ser consultado en la tesis de licenciatura “expresión de la hormona anti-Mülleriana, Cyp11a1 y aromatasa durante el envejecimiento ovárico” del QFB Ángel Luna Castellanos (2017), en la sección de resultados (páginas 33 a 35).

Para el gen Foxl2 igualmente se realizó la purificación de los productos de PCR de dicho gen amplificado de 277pb, para ser secuenciado y comprobar que en efecto se trataba del gen Foxl2; una vez secuenciado, se obtuvo el electroferograma que se muestra en la figura 32.

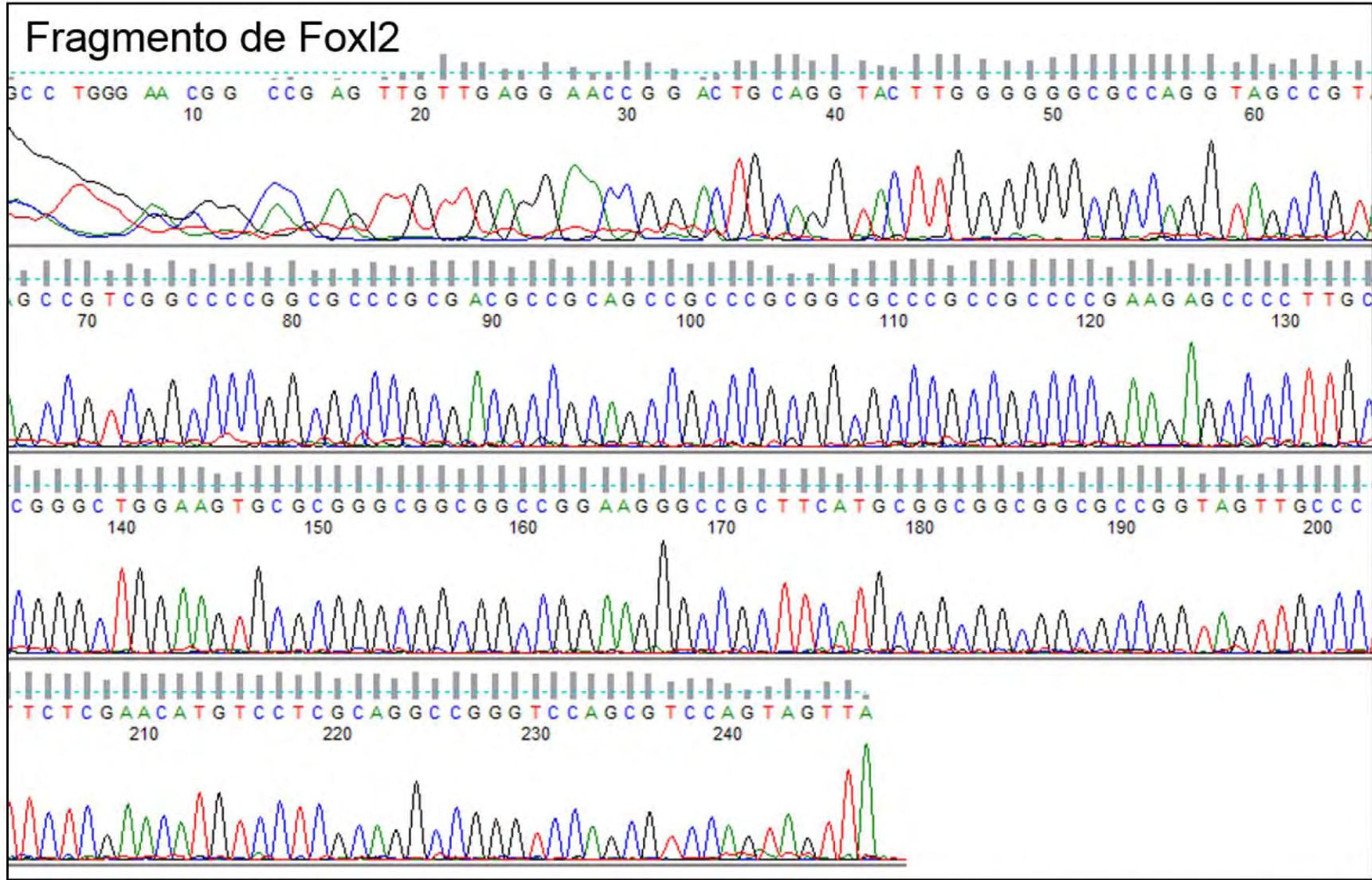


Figura 32. Electroferograma de secuenciación del gen Foxl2. Se muestran los picos correspondientes a los nucleótidos que componen el producto de RT-PCR y la secuencia que conforma el gen amplificado.

Una vez obtenida la secuencia sentido de Foxl2 se procedió a realizar el alineamiento mediante BLAST, comparando las secuencias obtenidas con la base de datos de NCBI, encontrando la secuencia más parecida a los fragmentos sentido y antisentido de Foxl2 obtenido experimentalmente; comprobando así que efectivamente se tratara del gen de interés. Ambos fragmentos alineados indicaron que efectivamente se trataba del gen Foxl2, lo cual se puede apreciar en la figura 33, que indican el alineamiento del fragmento de Foxl2 obtenido experimentalmente con el gen de Foxl2 de la especie *Oryctolagus cuniculus*, mostrando un 99% de identidad para el fragmento obtenido.

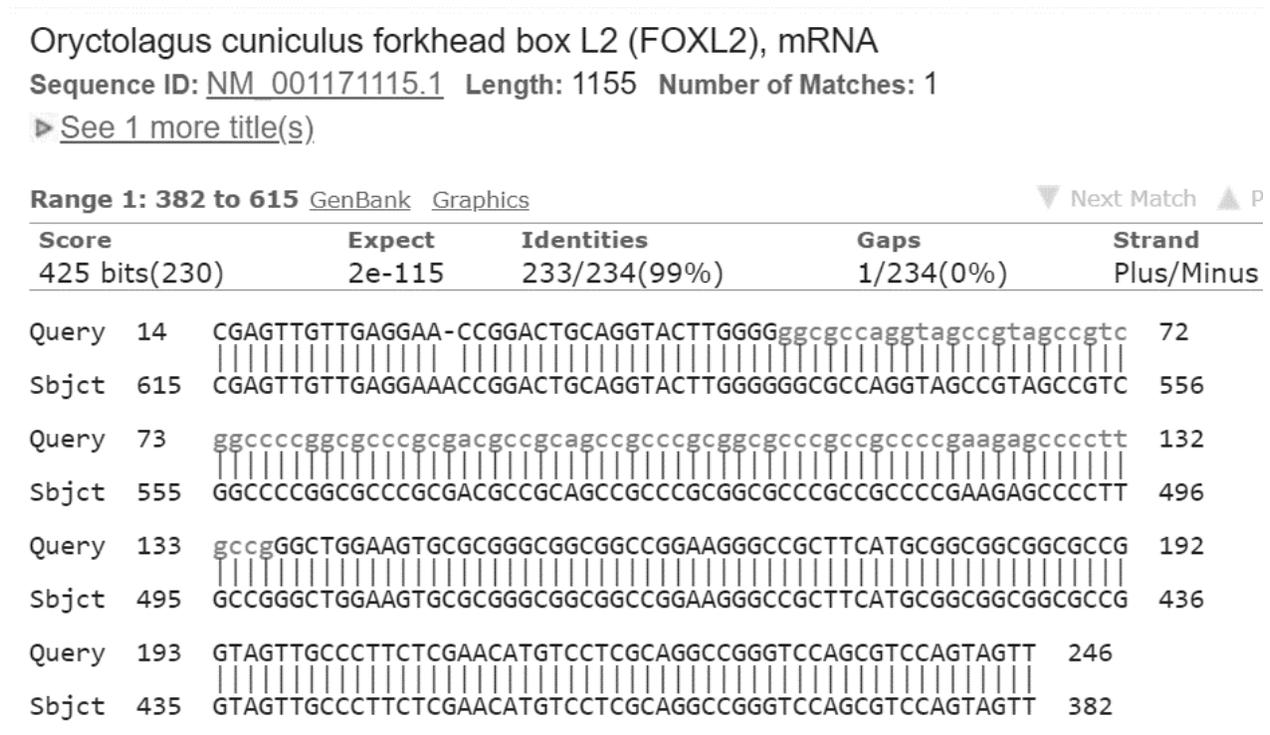


Figura 33. Alineamiento para la identificación de la secuencia del gen Foxl2. Se muestra el alineamiento con BLAST para la identificación del fragmento antisentido del gen Foxl2 obtenido experimentalmente, mostrando una identidad del 99% con el gen de Foxl2 de la especie *Oryctolagus cuniculus*.

12.3 Clonación de fragmentos de PCR

Para el gen de AMHRII también se realizó la purificación de los productos de PCR amplificados de dicho gen, sin embargo en este caso debido a que se apreció la presencia de dos bandas que indican la presencia de una isoforma para AMHRII, se

procedió a realizar la ligación de cada fragmento al vector pGEM®-T (~3,015 pb), para continuar con la transformación bacteriana empleando bacterias EcoRV competentes que permitieron clonar el inserto de los dos fragmentos de AMHRII obtenidos inicialmente ; una vez transformadas las bacterias, estas fueron colocadas en medio LB suplementado con ampicilina para su crecimiento y posteriormente ser sembradas en placas con medio LB suplementado con ampicilina, IPTG y XGal, con el fin de obtener una sola colonia aislada de bacterias transformadas que contuvieran específicamente el vector de clonación de cada banda de AMHRII inicial. Una vez obtenida la colonia aislada requerida, esta fue sembrada en medio de cultivo LB para favorecer su proliferación y posteriormente extraer el DNA plasmídico que permitió secuenciar adecuadamente cada fragmento inicial de PCR amplificado del gen AMHRII.

Una vez obtenidos los electroferogramas (Figura 34 y 35) de la secuenciación de los dos fragmentos de PCR de AMHRII, se procedió a realizar el alineamiento mediante BLAST, comparando las secuencias obtenidas con la base de datos de NCBI, encontrando la secuencia más parecida a cada fragmento de AMHRII obtenido experimentalmente; comprobando así que efectivamente se tratara de los genes de interés. Ambos fragmentos alineados indicaron que efectivamente se trataba del gen AMHRII, lo cual se puede apreciar en las figuras 36 y 37, que indican el alineamiento de los fragmentos de AMHRII experimentales con el gen de AMHRII de la especie *Oryctolagus cuniculus*, mostrando un 99% de identidad.

Cabe mencionar que los fragmentos obtenidos experimentalmente presentan un tamaño de 474 pb para el fragmento corto y de 552 pb para el fragmento grande, cuyo electroferograma se muestra en las figuras 34 y 35 respectivamente.

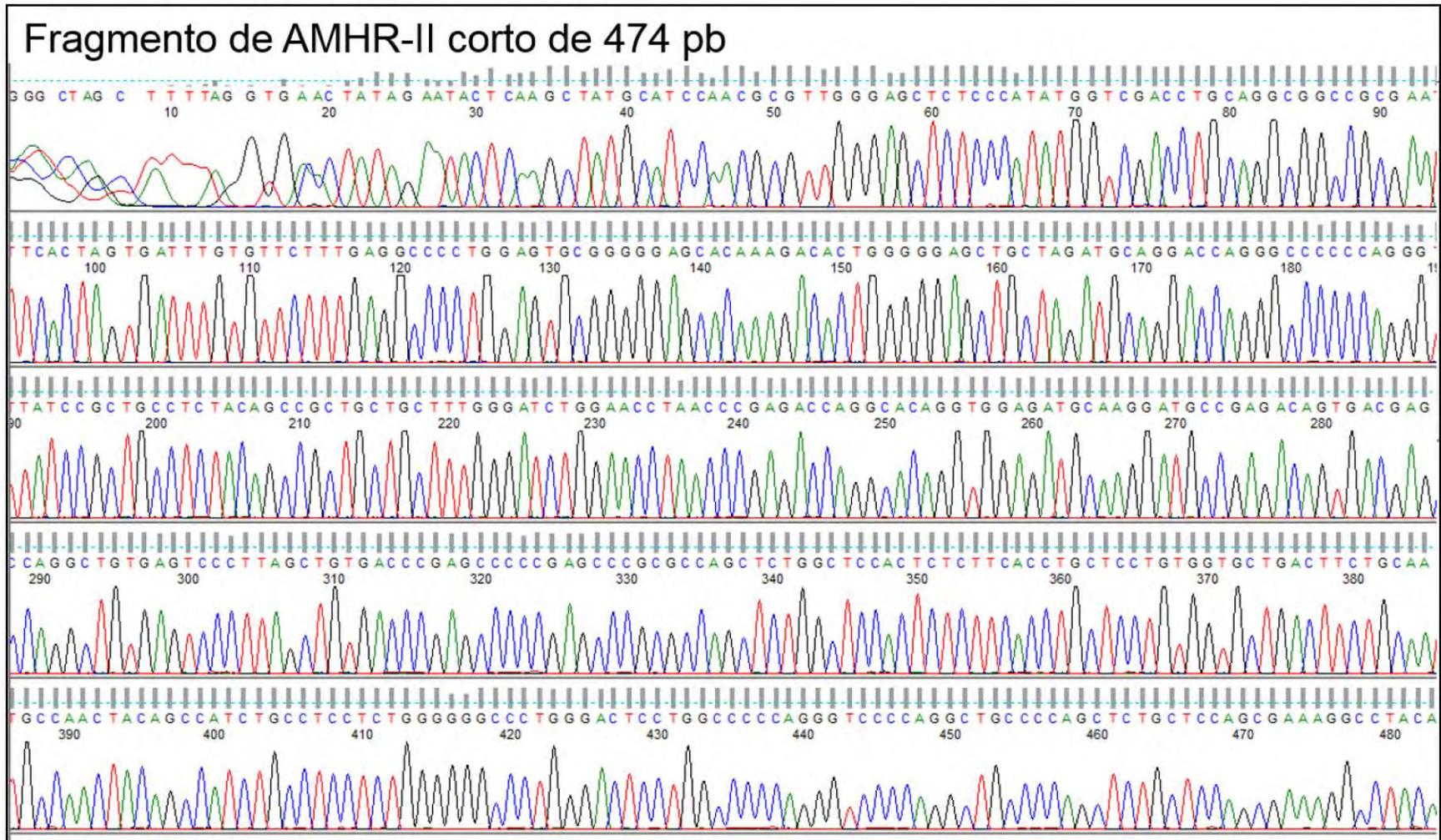


Figura 34. Electroferograma de secuenciación del gen AMHRII fragmento corto de 474 pb. Se muestran los picos correspondientes a los nucleótidos que componen el producto de RT-PCR y la secuencia que conforma el gen amplificado.

Oryctolagus cuniculus anti-Mullerian hormone receptor type 2 (AMHR2), mRNA

Sequence ID: [NM_001082794.1](#) Length: 2408 Number of Matches: 2

▶ [See 1 more title\(s\)](#)

Range 1: 130 to 482 [GenBank](#) [Graphics](#)

▼ Next Match ▲ Pr

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
647 bits(350)	0.0	352/353(99%)	0/353(0%)	Plus/Plus
Query 1	TGTGTTCTTTGAGGCCCTGGAGTGC	GGGGGAGCACAAAGACACTGGGGGAGCTGCTAGA	60	
Sbjct 130	TGTGTTCTTTGAGGCCCTGGAGTGC	GGGGAAGCACAAAGACACTGGGGGAGCTGCTAGA	189	
Query 61	TGCAGGACCAGGGCCCCCAGGGTTATCCGCTGCCTCTACAGCCGCTGCTGCTTTGGGAT	120		
Sbjct 190	TGCAGGACCAGGGCCCCCAGGGTTATCCGCTGCCTCTACAGCCGCTGCTGCTTTGGGAT	249		
Query 121	CTGGAACCTAACCCGAGACCAGGCACAGGTGGAGATGCAAGGATGCCGAGACAGTGACGA	180		
Sbjct 250	CTGGAACCTAACCCGAGACCAGGCACAGGTGGAGATGCAAGGATGCCGAGACAGTGACGA	309		
Query 181	GCCAGGCTGTGAGTCCCTTAGCTGTGACCCGAGCCCCGAGCCCGCGCCAGCTCTGGCTC	240		
Sbjct 310	GCCAGGCTGTGAGTCCCTTAGCTGTGACCCGAGCCCCGAGCCCGCGCCAGCTCTGGCTC	369		
Query 241	CACTCTCTTCACCTGCTCCTGTGGTGCTGACTTCTGCAATGCCAACTACAGCCATCTGCC	300		
Sbjct 370	CACTCTCTTCACCTGCTCCTGTGGTGCTGACTTCTGCAATGCCAACTACAGCCATCTGCC	429		
Query 301	TCCTCTGGGGGGCCCTGGGACTCCTGGCCCCCAGGGTCCCCAGGCTGCCCCAG	353		
Sbjct 430	TCCTCTGGGGGGCCCTGGGACTCCTGGCCCCCAGGGTCCCCAGGCTGCCCCAG	482		

Figura 36. Alineamiento para la identificación de la secuencia del gen AMHR2 del fragmento corto. Se muestra el alineamiento con BLAST para la identificación del fragmento corto del gen AMHR2 obtenido experimentalmente, mostrando una identidad del 99% con el gen de AMHR2 de la especie *Oryctolagus cuniculus*.

Oryctolagus cuniculus anti-Mullerian hormone receptor type 2 (AMHR2), mRNA
 Sequence ID: [NM_001082794.1](#) Length: 2408 Number of Matches: 1

▶ [See 1 more title\(s\)](#)

Range 1: 130 to 680		GenBank	Graphics	▼ Next Match	▲ Pr
Score	Expect	Identities	Gaps	Strand	
1013 bits(548)	0.0	550/551(99%)	0/551(0%)	Plus/Plus	
Query 2	TGTGTTCTTTGAGGCCCTGGAGTGC	GGGAAGCACAAAGACACTGGGGGAGCTGCTAGA	61		
Sbjct 130	TGTGTTCTTTGAGGCCCTGGAGTGC	GGGAAGCACAAAGACACTGGGGGAGCTGCTAGA	189		
Query 62	TGCAGGACCAGGGCCCCCAGGGTTATCCGCTGCCTCTACAGCCGCTGCTGCTTTGGGAT	121			
Sbjct 190	TGCAGGACCAGGGCCCCCAGGGTTATCCGCTGCCTCTACAGCCGCTGCTGCTTTGGGAT	249			
Query 122	CTGGAACCTAACCCGAGACCAGGCACAGGTGGAGATGCAAGGATGCCGAGACAGTGACGA	181			
Sbjct 250	CTGGAACCTAACCCGAGACCAGGCACAGGTGGAGATGCAAGGATGCCGAGACAGTGACGA	309			
Query 182	GCCAGGCTGTGAGTCCCTTAGCTGTGACCCGAGCCCCGAGCCCGCGCCAGCTCTGGCTC	241			
Sbjct 310	GCCAGGCTGTGAGTCCCTTAGCTGTGACCCGAGCCCCGAGCCCGCGCCAGCTCTGGCTC	369			
Query 242	CACTCACTTCACCTGCTCCTGTGGTGCTGACTTCTGCAATGCCAACTACAGCCATCTGCC	301			
Sbjct 370	CACTCTCTTCACCTGCTCCTGTGGTGCTGACTTCTGCAATGCCAACTACAGCCATCTGCC	429			
Query 302	TCCTCTGGGGGGCCCTGGGACTCCTGGCCCCCAGGGTCCCCAGGCTGCCCCAGGTGAGTC	361			
Sbjct 430	TCCTCTGGGGGGCCCTGGGACTCCTGGCCCCCAGGGTCCCCAGGCTGCCCCAGGTGAGTC	489			
Query 362	CCCCTGGATGGCActggcgctgctggggctggtcctgctgctgctgctgctgctgGGCGG	421			
Sbjct 490	CCCCTGGATGGCACTGGCGTGCTGGGGCTGGTCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGGGCGG	549			
Query 422	TATTGTCGTGGCTCTGCTCCAGCGAAAGGCCTACAGGGTGCAGAGTGGGCCAGAGCCAGA	481			
Sbjct 550	TATTGTCGTGGCTCTGCTCCAGCGAAAGGCCTACAGGGTGCAGAGTGGGCCAGAGCCAGA	609			
Query 482	GCCAGACTCAGGCAGGGACTGCAGTGAGGAGCTGCCGGAGCTGCCCCAGCTGTGCTTCTC	541			
Sbjct 610	GCCAGACTCAGGCAGGGACTGCAGTGAGGAGCTGCCGGAGCTGCCCCAGCTGTGCTTCTC	669			
Query 542	CCAGGTCATCC	552			
Sbjct 670	CCAGGTCATCC	680			

Figura 37. Alineamiento para la identificación de la secuencia del gen AMHR2 del fragmento largo. Se muestra el alineamiento con BLAST para la identificación del fragmento grande del gen AMHR2 obtenido experimentalmente, mostrando una identidad del 99% con el gen de AMHR2 de la especie *Oryctolagus cuniculus*.

13. Anexos

13.1 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 1x tres veces.
2. Pasar los tejidos a un tubo de falcon de 15 mL, los cuales deben estar bien rotulados y protegidos con una capa de cinta adhesiva transparente.
3. Deshidratación del tejido:
 - 3.1 Se pasa el tejido por los siguientes alcoholes durante 1 hora (no reutilizar el alcohol).
 - a) Etanol al 30%
 - b) Etanol al 40%
 - c) Etanol al 50%
 - d) Etanol al 75%
 - e) Etanol al 96%
 - f) Etanol al 100% (se realizan 2 lavados de 30 min cada uno)
4. Colocar el tejido en xilol en estufa durante 30 min.
5. Mantener el xilol 30 min a 60°C.
6. Pasar el tejido a parafina 1 hora a 60°C.
7. Incluir el tejido con parafina en moldes.