

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS
DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

DEPARTAMENTO DE TOXICOLOGÍA

**“Análisis de la expresión de marcadores murales en un cultivo
primario de células de la granulosa con función esteroideogénica y el
efecto de la exposición a compuestos reprotóxicos sobre la
producción de progesterona”**

Tesis que presenta:

QFB. Ana Cecilia Palafox Gómez

Directora de Tesis:

Dra. Esther Ivonne López Bayghen Patiño

Comité tutorial

Dra. María Isabel Hernández Ochoa

Departamento de Toxicología, Cinvestav-IPN

Dr. José Efraín Garrido Guerrero

Departamento de Genética y Biología Molecular, Cinvestav-IPN

Dra. Esther Ivonne López-Bayghen Patiño

Departamento de Toxicología, Cinvestav-IPN

Este trabajo fue realizado en el Laboratorio de Investigación y Diagnóstico Molecular del Departamento de Toxicología del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional bajo la dirección de la Dra. Esther Ivonne López-Bayghen Patiño

Este trabajo contó con el apoyo económico del programa PEI-CONACyT, proyecto 231793 otorgado a la Dra. Esther Ivonne López Bayghen Patiño

Agradecimientos

Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional
(CINVESTAV-IPN)
Departamento de Toxicología

Directora de Tesis:

Dra. Esther I. López-Bayghen Patiño

Comité evaluador:

Dra. María Isabel Hernández Ochoa
Departamento de Toxicología

Dr. José Efraín Garrido Guerrero
Departamento de Genética y Biología Molecular

A la asistencia técnica de:

Dra. Leticia Ramírez Martínez, Auxiliar de investigación, Departamento de
Toxicología

IBT Dinorah Hernández Melchor, Departamento de Toxicología

Dra. Griselda Vélez Aguilera, Departamento de Genética y Biología Molecular

M. en C. Iván José Galván Mendoza, Laboratorio Nacional de Servicios
Experimentales (LaNSE)

Q.B.P. Ma. Guadalupe Aguilar González, Unidad de Ácidos Nucleicos del
Departamento de Genética y Biología Molecular

Dr. Francisco García Sierra, Departamento de Biología Celular

Agradecimientos

Un enorme agradecimiento a mis papás, Margarita y Serafín, por todo su amor, por siempre escucharme, aconsejarme y consentirme, ustedes son mi fuerza, mi pilar... Gracias por todo.

A mi directora de tesis, a la Dra. Esther López-Bayghen Patiño, por abrirme las puertas de su laboratorio y brindarme su confianza para llevar a cabo el proyecto, gracias por todo su tiempo, paciencia y apoyo durante este trayecto.

Quiero agradecer al comité evaluador por su dedicación en la revisión de la tesis, por sus observaciones y sugerencias. A la Dra. María Isabel Hernández Ochoa y Dr. José Efraín Garrido Guerrero del Departamento de Genética, por formar parte de esta etapa.

Un agradecimiento especial y con mucho aprecio a la Dra. Leticia Ramírez Martínez, quien me apoyó y enseñó durante mi estancia en el laboratorio, ha sido un gran honor trabajar al lado de tan gran persona, con un enorme corazón y amplitud de conocimientos, toda mi admiración.

Un enorme agradecimiento a Dinorah, Almena y Lucero, por compartir sus conocimientos y apoyarme en cada momento. Le agradezco a cada una de ustedes por su ánimo, consejos y motivación, por el magnífico ambiente de trabajo, realmente fueron días muy divertidos. También quiero agradecer a Ger, por sus consejos y pláticas de cada día, por su compañía.

Y por último, pero no menos importante, a todos mis compañeros de generación Arturo, Nadia, Josefina, Sandra, Jonathan, David, Janisse, Manuel, Jazmín, Esmeralda, Laura, Rosario y Mario (Departamento de Biología Celular), esta pequeña familia que aprecio con todo mi corazón, gracias por cada momento compartido, fue un trayecto no del todo fácil, pero muy divertido, gracias por brindarme su amistad.

"El éxito no es el final, el fracaso no es la ruina,
el coraje de continuar es lo que cuenta"

Winston Churchill

Índice

Índice de Figuras	9
Índice de Tablas	10
Abstract	14
1. Introducción	16
1.1 Óvulo y foliculogénesis	16
1.1.1 Células de la granulosa.....	17
1.1.2 Células murales	18
1.1.3 COC (Complejo Cúmula-Ovocito).....	20
1.2 Infertilidad	21
1.2.1 Infertilidad por causas femeninas	22
1.3 Compuestos reprotóxicos.....	22
1.3.1 Parabenos.....	23
1.4 Antecedentes directos: cultivo primario de células de la granulosa.....	26
2. Justificación	28
3. Hipótesis.....	29
4. Objetivos.....	29
4.1 Objetivo general	29
4.2 Objetivos particulares.....	29
5.1 Estrategia Experimental	30
5.2 Diseño de sondas	32
5.2.1 Principio	32
5.2.2 Procedimiento	32
5.3 Extracción de ARN de las células de la granulosa.....	32
5.3.1 Principio	32
5.3.2 Procedimiento	32
5.4 Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR)	33
5.4.1 Principio	33
5.4.2 Procedimiento	33
5.5 Clonación.....	34
5.5.1 Principio	34
5.5.2 Procedimiento	34
5.6 Transformación bacteriana	34
5.6.1 Principio	34
5.6.2 Procedimiento	35

5.7 PCR de colonia	35
5.7.1 Principio	35
5.7.2 Procedimiento	35
5.8 Extracción de ADN plasmídico	36
5.8.1 Principio	36
5.8.2 Procedimiento	36
5.9 Cuantificación de ácidos nucleicos.....	37
5.9.1 Principio	37
5.9.2 Procedimiento	37
5.10 Identificación de posibles clonas mediante restricción enzimática y separación electroforética en gel de agarosa	38
5.10.1 Principio	38
5.10.2 Procedimiento	38
5.11 Secuenciación	39
5.11.1 Principio	39
5.11.2 Procedimiento	39
5.12 Transcripción <i>in vitro</i> de sondas en sentido y antisentido marcadas con digoxigenina-UTP	40
5.12.1 Principio	40
5.12.2 Procedimiento	40
5.13 Hibridación cromogénica <i>in situ</i>	41
5.13.1 Principio	41
5.13.2 Procedimiento	41
5.14 Inmunofluorescencia.....	42
5.14.1 Principio	42
5.14.2 Procedimiento	43
5.15 Ensayo de MTT	43
5.15.1 Principio	43
5.15.2 Procedimiento	43
5.16 Cuantificación de progesterona.....	44
5.16.1 Principio	44
5.16.2 Procedimiento	44
6. Resultados.....	46
6.1 Diseño y obtención de sondas para hibridación <i>in situ</i>	46
6.1.2 Obtención de los amplicones y caracterización.....	46
6.1.3 Clonación de los amplicones en el vector pJET y caracterización de los plásmidos obtenidos	47
6.1.4 Caracterización de las clonas mediante restricción enzimática	48

6.1.5 Determinación de identidad de cada plásmido mediante secuenciación automatizada	51
6.2 Detección del RNA mensajero de CYP11A1, HSD3B2 y LHCGR mediante hibridación cromogénica <i>in situ</i>	58
6.3 Detección de los marcadores CYP11A1 y LHCGR por inmunofluorescencia indirecta.....	60
6.4 Caracterización de los tiempos de expresión en el cultivo.....	62
6.5 Exposición a los compuestos reprotóxicos.....	65
6.5.1 Determinación de la viabilidad celular del cultivo tras la exposición a compuestos reprotóxicos mediante el ensayo MTT.....	65
6.5.2 Efecto de los compuestos reprotóxicos sobre la producción de progesterona	66
7. Discusión	68
8. Conclusiones	76
9. Perspectivas	76
10. Bibliografía.....	77
11. Anexos.....	81

Índice de Figuras

Figura 1. Etapas de desarrollo del óvulo y el folículo	17
Figura 2. Cascada de señalización intraovárica que media la ovulación	19
Figura 3. Esteroidogénesis ovárica	20
Figura 4. Modelo propuesto de la actividad e interacciones metabólicas de las células de la cúmula y el ovocito.....	21
Figura 5. Estructura química de los parabenos	23
Figura 6. Rutas metabólicas para los parabenos en el hombre.....	25
Figura 7. Representación del diseño experimental de la técnica RNA-CISH.....	30
Figura 8. Representación del diseño experimental de la exposición a los compuestos reprotóxicos.	31
Figura 9. Separación e identificación inicial de amplicones.....	47
Figura 10. Caracterización de clonas candidatas para los marcadores CYP11A1, HSD3B1 y LHCGR.	49
Figura 11. Restricción enzimática para el plásmido ligado al fragmento CYP11A1.....	50
Figura 12. Restricción enzimática para el plásmido ligado al fragmento LHCGR.	50
Figura 13. Restricción enzimática para el plásmido ligado al fragmento HSD3B1.....	51
Figura 14. Secuenciación parcial del fragmento CYP11A1 y comparación con la secuencia teórica.....	52
Figura 15. Secuenciación parcial del fragmento LHCGR y comparación con la secuencia teórica.....	53
Figura 16. Secuenciación parcial del fragmento HSD3B2 y comparación con la secuencia teórica.....	54
Figura 17. Comparación de la secuencia del fragmento clonado de CYP11A1 sentido dentro de la base de datos NCBI.	55
Figura 18. Comparación de la secuencia del fragmento clonado de CYP11A1 antisentido dentro de la base de datos NCBI.	55
Figura 19. Comparación de la secuencia del fragmento clonado de LHCGR sentido dentro de la base de datos NCBI.	56
Figura 20. Comparación de la secuencia del fragmento clonado de LHCGR antisentido dentro de la base de datos NCBI.	56
Figura 21. Comparación de la secuencia del fragmento clonado de HSD3B2 sentido dentro de la base de datos NCBI.	57

Figura 22. Comparación de la secuencia del fragmento clonado de HSD3B2 antisentido dentro de la base de datos NCBI.	57
Figura 23. Hibridación cromogénica <i>in situ</i> (CISH) de actina y los marcadores murales en un cultivo de 48h de células de la granulosa.....	59
Figura 24. Inmunodetección de CYP11A1 en células murales a las 48 h de cultivo.....	61
Figura 25. Inmunodetección de LHCGR en células murales a las 48 h de cultivo.....	62
Figura 26. Inmunodetección de CYP11A1 en células murales a diferentes tiempos de cultivo.	63
Figura 27. Inmunodetección de LHCGR en células murales a diferentes tiempos de cultivo.....	64
Figura 28. Porcentaje de células que expresan el marcador LHCGR y CYP11A1 en células murales a diferentes tiempos de cultivo.	64
Figura 29. Ensayo de MTT en células de la granulosa tratadas desde la siembra con los compuestos reprotóxicos por diferentes tiempos.....	66
Figura 30. Efecto de los compuestos reprotóxicos sobre la producción de progesterona en células de la granulosa.....	67

Índice de Tablas

Tabla 1. Secuencias del par de iniciadores elegidos para cada gen	46
Tabla 2. Datos de la caracterización de los amplicones mediante electroforesis capilar	47
Tabla 3. Plásmidos	58
Tabla 4. Comparación entre estudios <i>in vivo</i>	69

Abreviaturas

RNA-CISH	Hibridación cromogénica <i>in situ</i> para RNA
FSH	Hormona folículo estimulante
LH	Hormona luteinizante
LHR	Receptor de la hormona luteinizante
<i>Lhcgr</i>	mRNA del receptor de la hormona luteinizante
CYP11A1	Polipéptido 1 de la subfamilia 1 de la familia 11 del citocromo P450
HSD3B	3β-hidroxiesteroide deshidrogenasa
CYP19A1	Aromatasa
HSD17B	17β-hidroxiesteroide deshidrogenasa
COC	Complejo Cúmulo-Ovocito
OMS	Organización Mundial de la Salud
Ptgs2	Prostaglandina-endoperóxido sintasa 2
Pfcp	Fosfofructocinasa
DES	Dietilestilbestrol
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa
cDNA	ADN complementario
mARN	ARN mensajero
TBE	Tampón Tris, borato, EDTA
ddNTPs	Nucleótidos dideoxido
DIG	Digoxigenina
HRP	Peroxidasa de rábano
DAB	Diaminobencidina
ABEI	N-(aminobutil)-N-(etiloluminol)
Ab	Anticuerpo
Ag	Antígeno
SDS	Dodecilsulfato sódico
BSA	Albúmina de suero bovino
PBS	Tampón fosfato salino
DEPC	Pirocarbonato de dietilo
NCBI	National Center for Biotechnology Information
G	Guanina
C	Citosina
DAPI	4', 6-diamino-2-fenilindol
MPB	Metilparabeno
BPB	Butilparabeno
BPA	Bisfenol A
MCF-7	Línea celular de cáncer de mama
REα	Receptor de estrógenos alfa
REβ	Receptor de estrógenos beta

Resumen

A nivel mundial, cerca de 50 millones de parejas presentan problemas de infertilidad. Las alteraciones en el desarrollo del ovocito representan casi el 25% de estos casos. La maduración del ovocito depende del microambiente establecido por las células de la granulosa (células de la cúmula y murales) que lo rodean y por los factores que éstas secretan. Las células de la cúmula y las murales presentan un perfil de expresión génica diferencial acorde a su función, además las células murales secretan progesterona.

Recientemente establecimos un cultivo primario de células de la granulosa que permite analizar el proceso de esteroidogénesis. Como último paso de la caracterización de este modelo, decidimos evaluar la expresión de los mensajeros de las enzimas implicadas en la esteroidogénesis CYP11A1, HSD3B1 y LHCGR, mediante la técnica RNA-CISH. Se diseñaron los amplicones para generar las sondas de RNA *in silico*, éstas se produjeron mediante una RT-PCR y se hizo la clonación de éstos en el vector pJET, que tiene disponible al promotor T7 tanto en sentido como en antisentido. De las colonias obtenidas después de la transformación bacteriana, se seleccionaron aquellas que contenían con posibilidad de contener los plásmidos con los fragmentos de interés y se caracterizaron por PCR de colonia, restricción enzimática y secuenciación. Una vez verificadas las clonas, obtuvimos las sondas en sentido y antisentido marcadas con Digoxigenina-UTP mediante transcripción *in vitro*. La hibridación mostró la expresión de los genes homogéneamente en el cultivo de 48h. Debido a la importancia que tiene definir la proporción cúmula/murales en este cultivo primario, CYP11A1 y LHCGR fueron evaluados también mediante inmunodetección indirecta a las 6, 12, 18, 24 y 48 h de cultivo y los resultados indican que a partir de las 24 h se expresa LHCGR y desde las 6 h se expresa CYP11A1. A las 48 h de cultivo, más del 90% de las células expresan ambos marcadores, indicando definitivamente que en el cultivo predominan las células murales.

Este modelo de células de la granulosa ha sido utilizado para analizar la alteración de la esteroidogénesis debido a la exposición a compuestos reprotóxicos. Para extender la evaluación de los efectos de los parabenos, las células de la granulosa fueron expuestas desde la siembra a Metilparabeno (MPB), Butilparabeno (BPB) y Bisfenol A (BPA), a las concentraciones 657 nM, 20 nM y 500 nM, respectivamente. La exposición a los diferentes compuestos no afectó la viabilidad del cultivo ni afectó la producción progresiva de progesterona característica del cultivo.

En conclusión, tenemos un cultivo de células murales que expresan homogéneamente a los marcadores de este tipo celular. La exposición a los compuestos reprotóxicos a partir de la siembra y de manera continua hasta 96 h, no afecta la viabilidad del cultivo ni la producción de progesterona.

Abstract

Data indicate that at least 50 million couples worldwide experience infertility. Almost 25% of these cases are attributed to alterations in the oocyte development. Granulosa cells (cumulus and mural) surround the oocyte and secrete factors to guarantee an adequate microenvironment for the oocyte to mature correctly. Cumulus and mural cells have a differential gene expression profile according to their function, in addition, mural cells secrete progesterone.

We have established a primary culture of human granulosa cells to study steroidogenesis. As a last step to characterize this model, we analyzed messengers encoding for enzymes and/or receptors involved in steroidogenesis, such as CYP11A1, HSD3B2, and LHCGR, using the RNA chromogenic *in situ* hybridization (RNA-CISH) technique. First, we designed primers *in silico* to generate the RNA probes; amplicons were obtained with RT-PCR, and then cloned in the pJET vector that contains a T7 promoter for *in vitro* transcription, both sense and the antisense. Colonies that grew after bacterial transformation were selected, and plasmids containing the fragment were characterized for colony-PCR, enzymatic restriction and sequencing. We obtained the sense and antisense probes labeled with UTP-Digoxigenin using *in vitro* transcription. Hybridization results showed homogeneous gene expression in 48h of culture.

Because of the importance in defining a cumulus/mural ratio in this primary culture, CYP11A1 and LHCGR were also evaluated by immunodetection at 6, 12, 18, 24 and 48h of culture. The results indicated that LHCGR is expressed from 24h of culture, whereas CYP11A1 is expressed from 6 h. At 48 h of culture, more than 90% of cells expressed both markers, demonstrating that the culture is of mural cells.

This model of human granulosa cells has been used to analyze alterations in steroidogenesis caused by exposure to reprotoxic compounds. Next, we evaluated the effects of parabens. Granulosa cells were exposed from the beginning of culture to methylparaben (MPB), butylparaben (BPB) and bisphenol A (BPA), in concentrations

of 657, 20, and 500 nM, respectively. Exposure to the different compounds did not decrease culture viability nor progesterone production.

In conclusion, the mural cell culture expresses the markers of this cellular type. The exposure of reprotoxic compounds continuously from 0 to 96 h of culture did not affect the viability of culture, neither did the production of progesterone.

1. Introducción

1.1 Óvulo y foliculogénesis

Hacia los cinco meses de gestación en la etapa prenatal, los ovarios contienen aproximadamente 6 a 7 millones de ovogonias; la mayor parte que mueren antes del nacimiento a través de un proceso de apoptosis. Las ovogonias restantes comienzan la meiosis hacia el final de la gestación y se denominan ovocitos primarios. La ovogénesis se detiene en la profase I de la primera división meiótica. Los ovarios de una niña recién nacida contienen alrededor de dos millones de ovocitos. Cada uno está contenido dentro de su propia esfera de células huecas, el folículo ovárico. Para el tiempo en que una niña llega a la pubertad, el número de ovocitos se ha reducido a 400 000. Sólo cerca de 400 de estos ovocitos ovularán durante los años de la reproducción de una mujer y los restantes morirán por apoptosis. La ovogénesis cesa del todo en la menopausia (se detiene el tiempo de menstruación).

Los ovocitos primarios que no han sido estimulados para concluir la primera división meiótica están contenidos dentro de pequeñísimos folículos primarios. Los folículos primarios inmaduros constan de sólo una capa de células foliculares. En respuesta a la estimulación con FSH (Hormona Folículo Estimulante), algunos de estos ovocitos y folículos aumentan de tamaño y las células foliculares se dividen para producir múltiples capas de células de la granulosa que rodean al ovocito y llenan el folículo. Algunos folículos primarios son estimulados para crecer aún más y formarán una serie de cavidades llenas de líquido llamadas microvesículas; en esta etapa se denominan folículos secundarios. El crecimiento persistente de uno de estos folículos se acompañará de la fusión de sus microvesículas para formar una sola cavidad llena de líquido llamada antro. En esta etapa se conoce al folículo como folículo maduro o de Graaf.

Al desarrollarse el folículo, el ovocito primario concluye su primera división meiótica; pero no genera dos células completas, pues sólo una célula -el ovocito secundario- adquiere todo el citoplasma. La otra célula formada en esta etapa se convierte en un cuerpo polar pequeño que acaba por fragmentarse y desaparecer. El ovocito

secundario comienza la segunda división meiótica, pero se detiene la meiosis en la metafase II. La segunda división meiótica se termina si al menos un ovocito se ha fecundado (Figura 1) [1].

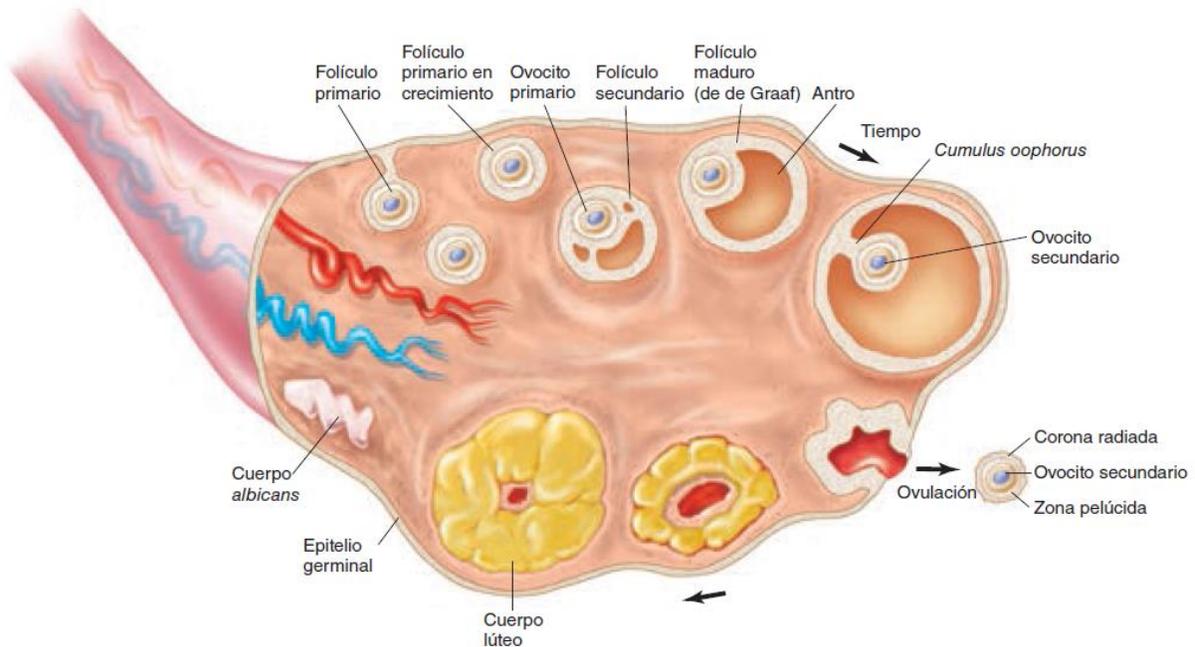


Figura 1. Etapas de desarrollo del óvulo y el folículo
(Tomado de [1])

1.1.1 Células de la granulosa

Las células de la granulosa son el tipo celular primario en el ovario que provee el soporte físico y ambiental requerido para el desarrollo del ovocito. Durante la foliculogénesis se van diferenciando activamente en varias poblaciones distintas, desde un estadio primordial (tipo escamoso) de desarrollo a través de la ovulación (tipo cuboidal) hasta la fase lútea de desarrollo (células hipertrofiadas de luteína) [2]. Las células de la pregranulosa se diferenciarán y proliferarán para dar soporte al ovocito durante su crecimiento temprano y a través de la transición del folículo de la fase primordial a pre-antral [3].

El inicio de la diferenciación de las células de la granulosa ocurre sobre la formación del antro folicular, el cual corresponde aproximadamente al final de la fase de

crecimiento del ovocito. Las células de la granulosa y de la teca se encuentran rodeando a los ovocitos. A medida que crecen los folículos y se forma el antro, las células de la granulosa se separan en dos subtipos de células que son anatómicamente y funcionalmente distintas: las células de la cúmula, que se encuentran rodeando y en íntimo contacto metabólico con el ovocito; y las células murales, que se encuentran recubriendo la pared folicular formando un epitelio estratificado con la lámina basal con un papel primario de esteroidogénesis [4, 5].

1.1.2 Células murales

La progresión a lo largo de las etapas antral y de ovulación ha sido considerada dependiente de las gonadotrofinas secretadas por la pituitaria (Hormona Folículo Estimulante -FSH- y la Hormona Luteinizante -LH-). La FSH induce la producción del mRNA del receptor de LH (*Lhcgr*) en células murales, el cual es requerido para que los folículos respondan a la LH, siendo importante para desencadenar el proceso ovulatorio (Figura 2). La expresión de LHR es esencial para la maduración del folículo antes a la ovulación [6]. La FSH y la LH son cruciales para la síntesis de estrógeno. En el folículo preovulatorio, la vasculatura de las células de la teca está bien desarrollada y la capa mural de las células de la granulosa se encuentra en contacto con las células sanguíneas. Estas células responden a las variaciones hormonales circulantes y realizan la liberación de los estrógenos directamente al efluente venoso de los folículos preovulatorios [7].

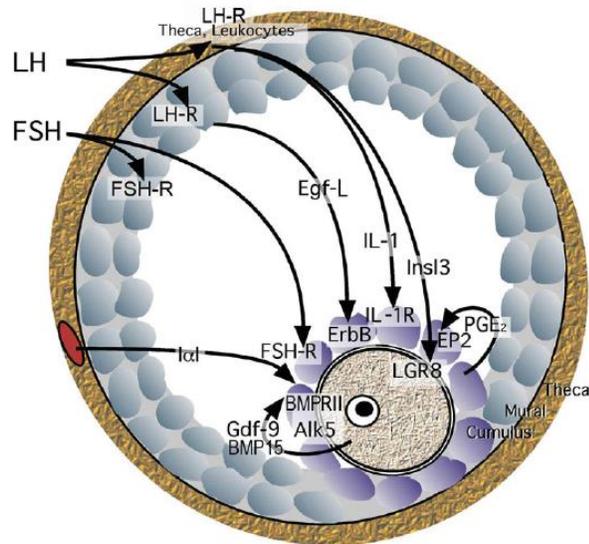


Figura 2. Cascada de señalización intraovárica que media la ovulación en ratón
(Tomado de [8])

La esteroidogénesis ovárica es el término asignado a la función del ovario para producir las hormonas esteroideas sexuales. Este proceso es llevado a cabo principalmente por el folículo antral maduro y el cuerpo lúteo después de la ovulación, involucrando varias reacciones enzimáticas tanto en las células de la teca como en las de la granulosa (Figura 3) [9]. En las células de la granulosa, el colesterol es convertido a pregnolona en la mitocondria a través del citocromo P450 (CYP11A1) al escindir la cadena lateral del colesterol. La pregnolona difunde fuera de la mitocondria y es transportada al retículo endoplásmico liso donde es convertida a progesterona vía 3 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa (HSD3B) [9, 10]. Por otro lado, la androstenediona, un andrógeno débil, puede ser convertida a estrona, un estrógeno débil, por la aromatasa (CYP19A1). Finalmente, la estrona puede ser convertida a estradiol por la 17 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa (HSD17B) [11]. Sin embargo, el estradiol no puede ser sintetizado sin la estricta coordinación de las células de la teca y de la granulosa, además de las hormonas LH y FSH derivadas de la pituitaria. Las células de la teca en folículos antrales tempranos solamente contienen receptores de LH, una vez unido al receptor, LH estimula la transcripción de genes derivados de la teca que codifican a las enzimas que se requieren para la conversión de colesterol a andrógenos. Los andrógenos pueden difundir desde las células de la teca a través de

la membrana basal, hasta las células de la granulosa. Estas células, a diferencia de las células de la teca, en folículos antrales tempranos contienen solamente receptores de FSH, a la respuesta de la unión de FSH al receptor, se estimula la transcripción de genes derivados de la granulosa que codifican a las enzimas necesarias para la conversión de andrógenos a estrógenos [12, 13].

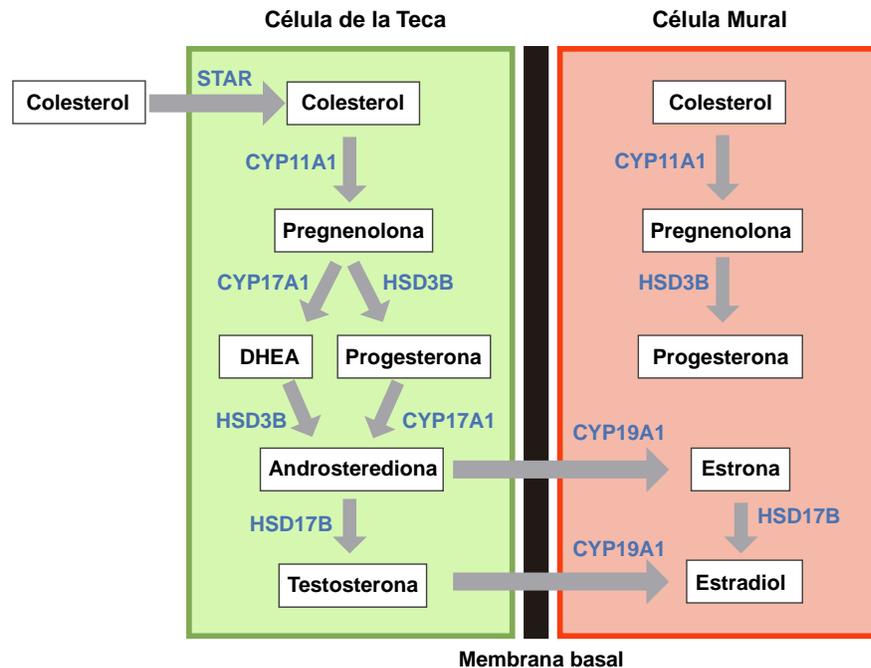


Figura 3. Esteroidogénesis ovárica
(Tomado y modificado de [9])

1.1.3 COC (Complejo Cúmulo-Ovocito)

Las células de la cúmula tienen procesos citoplasmáticos altamente especializados, los cuales penetran a través de la zona pelúcida y alrededor de la membrana del ovocito [4], formando el complejo Cúmulo-Ovocito. Las uniones Gap permiten la transferencia de moléculas con bajo peso molecular entre el ovocito y la célula de la Cúmula y también entre las células de la Cúmula (iones, metabolitos y aminoácidos necesarios para el crecimiento del ovocito). Moléculas más grandes son transportadas por endocitosis mediada por receptor [14].

El COC utiliza glucosa para varios procesos metabólicos esenciales tal como la producción de energía, síntesis de ácidos nucleicos y purinas, mucificación y homeostasis celular. Las células de la cúmula son conocidas por metabolizar la mayor parte de glucosa consumida por las COC, brindando intermediarios metabólicos [15]. La glucosa puede ser utilizada por tres principales vías: 1) oxidación de la glucosa; 2) vía de las pentosa fostato; 3) conversión en intermediarios y utilizarse para la expansión de la matriz extracelular [16].

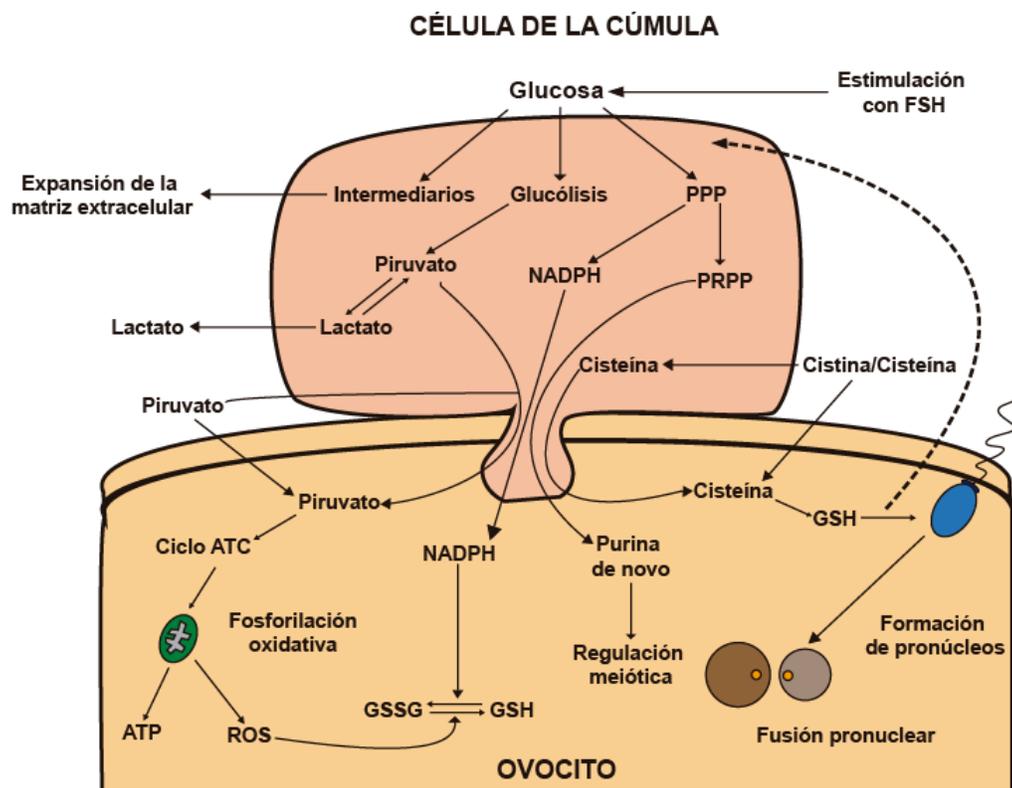


Figura 4. Modelo propuesto de la actividad e interacciones metabólicas de las células de la cúmula y el ovocito
(Tomado y modificado de [16])

1.2 Infertilidad

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS) la infertilidad es “una enfermedad del aparato reproductor definida por la imposibilidad de lograr un embarazo clínico después de 12 meses o más de relaciones sexuales sin protección regular”. A nivel mundial, cerca de 50 millones de parejas sufren de infertilidad: 20 millones sufren de infertilidad primaria (no logran su primer embarazo) y 30 millones

sufren de infertilidad secundaria (no logran más embarazos después del primero) [17]. En México, se calcula que más de 5 millones de parejas sufren de infertilidad [18]; entre el 20 y el 30% de los casos están relacionados con situaciones en los hombres, entre el 20 y el 35% con situaciones en las mujeres, entre el 25 y 40% se deben a un problema conjunto y entre el 10 y 20% de los casos no se identifica la causa específica [19].

La prevalencia de la infertilidad como medida de la morbilidad reproductiva es un indicador útil para el progreso hacia la mejora en la salud reproductiva, definida como “la capacidad para reproducirse y tener la libertad para decidir sí, cuándo y la frecuencia para hacerlo” [20]. De los datos obtenidos en la Encuesta Nacional de Salud Reproductiva del 2003 se encontró una prevalencia de la infertilidad cercana al 4% del total de mujeres, que declararon haber tenido un periodo de infertilidad en algún momento sin haber logrado un embarazo o el término de uno. Lo anterior significa que, en ese momento, alrededor de 750 mil mujeres en México habrían estado sufriendo de infertilidad sin poder encontrar una solución a su problema [21].

La prevalencia de infertilidad tiene consecuencias sociales, las mujeres infértiles comparadas con aquellas que son fértiles, tienen niveles más altos de depresión y ansiedad y más baja autoestima, así como efectos negativos en su vida íntima sexual [22], con desajustes matrimoniales y una menor calidad de vida [23].

1.2.1 Infertilidad por causas femeninas

Más de un problema contribuye a la infertilidad femenina, podemos citar problemas en el ciclo menstrual, enfermedades y trastornos, factores del estilo de vida y factores vinculados con la edad. Dentro de las enfermedades y trastornos resalta la incapacidad del óvulo para madurar correctamente, lo cual impide la fertilización [24].

1.3 Compuestos reprotóxicos

La reproducción femenina se ve afectada primordialmente por la calidad ovular, y resulta ser altamente susceptible a los efectos de la exposición a disruptores endócrinos al ser un proceso regulado por niveles hormonales. Los disruptores

endócrinos son compuestos ubicuos que exhiben propiedades de alteración endócrina en humanos y animales. Las disrupciones por estos compuestos afectan la función reproductiva femenina lo que podría resultar en subfertilidad, infertilidad, incorrecta producción de hormonas, anormalidades en el ciclo estral o menstrual, anovulación y senescencia reproductiva temprana.

Dentro de los disruptores se encuentran los plaguicidas (organoclorados, organofosforados, carbamatos, piretroides y triazonas), metales pesados (arsénico, plomo y mercurio), dietilestilbestrol, plastificantes alternativos (di-(2-etilhexil) ftalato y alternativas al bisfenol A), 2,3,7,8-tetraclorodibenzo -p-dioxina, nonifenol, bifenoles polioroclorados, triclosan y parabenos. Los efectos que ocasionan se han descrito a nivel de hipotálamo y pituitaria que regulan las actividades de las glándulas endocrinas [25].

1.3.1 Parabenos

Los parabenos forman parte del grupo de ésteres de ácido *p*-hidroxibenzoico que incluye a metilparabeno, etilparabeno, propilparabeno, butilparabeno y benzilparabeno (Figura 5) [26]. Los ésteres de parabeno y sus sales se usan ampliamente como conservadores en cosméticos, alimentos, artículos de tocador y productos farmacéuticos. Los parabenos se encuentran frecuentemente usados en combinación, y los reglamentos de la Unión Europea estipulan que las mezclas de parabenos se pueden utilizar en concentraciones de hasta el 0.8% en cosméticos, mientras que solamente un parabeno podría ser usado en concentraciones de hasta el 0.4% [27].

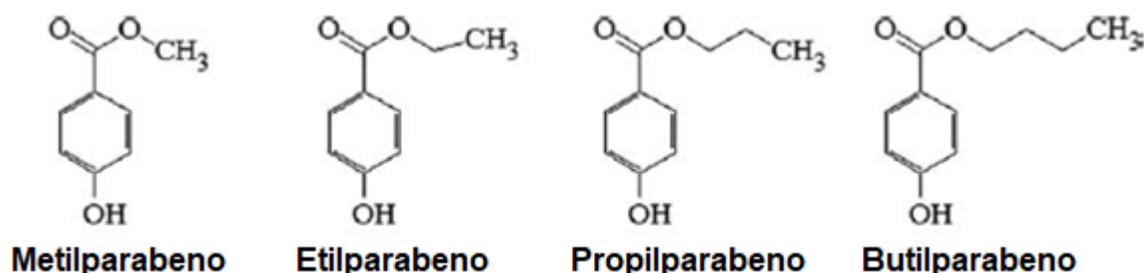


Figura 5. Estructura química de los parabenos
(Tomado y modificado de [26])

1.3.2 Toxicocinética

La medición de parabenos en tejidos humanos plantea la cuestión del origen de los componentes absorbidos y si los parabenos de los productos cosméticos aplicados por vía tópica o dérmica podrían ser una fuente de las cargas corporales encontradas. Los parabenos penetran la epidermis hasta una extensión que es inversamente proporcional a la longitud de la cadena lateral éster (por ejemplo, en orden creciente de penetración, butil>propil>etil>metil) [28]. En general, los parabenos ingeridos son rápidamente absorbidos por el tracto gastrointestinal [29].

Los parabenos son metabolizados en hígado y riñón, principalmente son hidrolizados a ácido 4-hidroxibenzoico en mamíferos, siendo eficientes las esterasas en este paso. Después se conjugan con sulfato, glucurónido o glicina antes de ser excretado por la orina [30], no se acumulan en el cuerpo. En hombres, los parabenos pueden ser excretados también como conjugados de glucurónido o sulfato, utilizando a los glucurónidos como biomarcadores urinarios [31]. Las reacciones de glucuronidación son llevadas a cabo por la familia multigénica de enzimas UDP-glucuronil transferasas que catalizan la unión del ácido glucurónico desde un donador de alta energía [32].

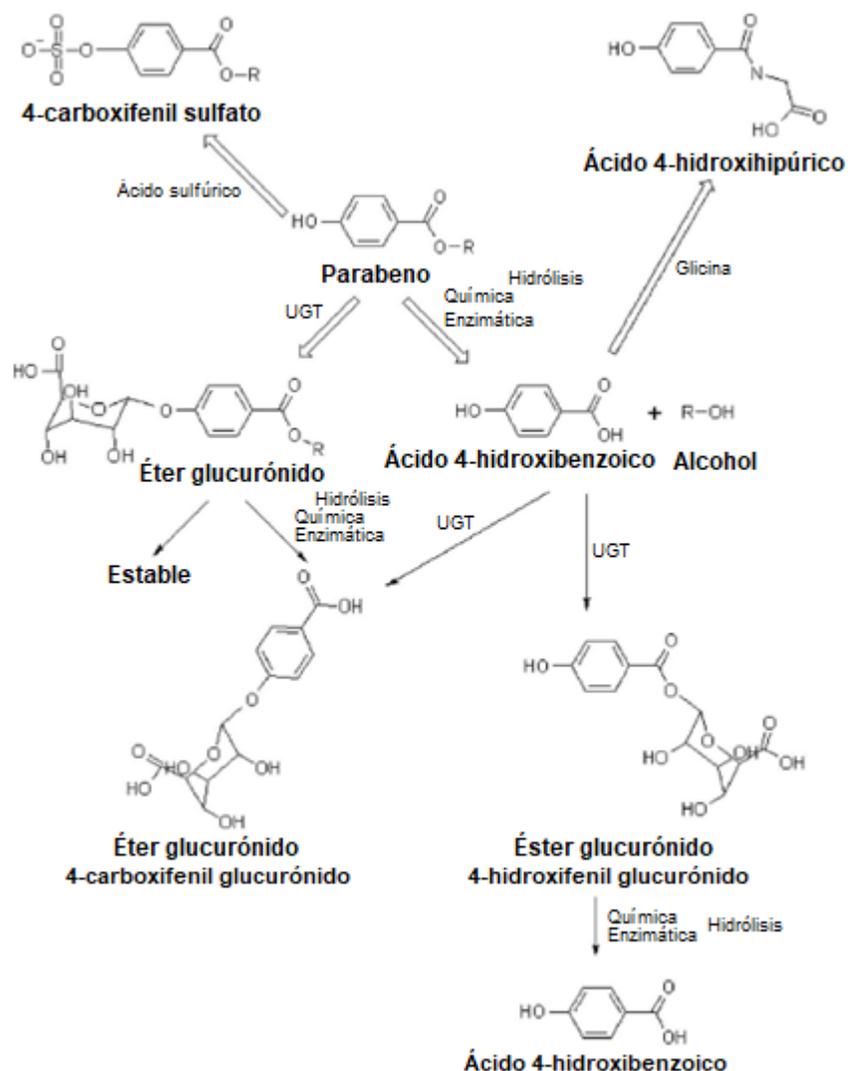


Figura 6. Rutas metabólicas para los parabenos en el hombre
(Tomado y modificado de [33])

1.3.3 Actividad hormonal de los parabenos

En 1998, Routledge y colaboradores mostraron que los parabenos poseen actividad estrogénica *in vitro*: estos ésteres podrían unirse a los receptores de estrógenos uterinos de roedores y aumentar la expresión de genes regulados por estrógenos en células de levadura. El butilparabeno fue el más estrogénico, siendo 10 000 veces menos potente que el 17 β -estradiol. La actividad estrogénica aumenta con el incremento de la longitud de la cadena lateral de alquilo, por tanto, entre los miembros

de esta familia, el metilparabeno es el menos estrógeno y el n-butilparabeno es el más estrogénico. En el ensayo *in vivo* pesaron el útero de la rata, la administración por vía oral de varios parabenos no mostró efecto. Sin embargo, por vía subcutánea y con dosis altas (400 mg/kg de peso corporal) de butilparabeno aumentó el peso del útero, un efecto aproximadamente 100 000 veces menos potente que el 17 β -estradiol [34]. Okubo y colaboradores en el 2001 examinaron las actividades de metil-, etil-, propil-, butil-, isopropil- e isobutilparabeno por ensayos de proliferación dependiente del receptor de estrógenos en las células MCF-7. Todos los parabenos estimularon la proliferación cerca del mismo nivel que el rendimiento celular máximo alcanzado con 3x10⁻¹¹ M 17 β -estradiol, pero a una concentración del orden de 10⁵–10⁷ más alta que el 17 β -estradiol. La unión competitiva *in vitro*, al receptor de estrógeno humano α y β , reveló que los parabenos con la cadena lateral más larga mostraron una mayor afinidad por el receptor de estrógenos, y que tienen una afinidad de unión relativa similar a los valores de los receptores a estrógenos α y β . Los investigadores concluyeron que los parabenos tienen actividades estrogénicas dependientes del receptor de estrógenos, y sus efectos sobre la vía de señalización intracelular podrían ser diferentes del 17 β -estradiol. También reportaron que butil- e isobutil-parabeno incrementan la expresión génica del receptor de progesterona [35].

1.4 Antecedentes directos: cultivo primario de células de la granulosa

Las células de la granulosa son un componente indispensable para la maduración del ovocito, por tanto, tienen un papel muy importante en la fertilidad femenina. El establecimiento de un modelo celular para el estudio de estas células y el efecto de agentes tóxicos sobre su función se ha convertido en nuestro objetivo. En nuestro laboratorio se ha establecido un cultivo primario de células de la granulosa humana obtenidas tras la recuperación de ovocitos de pacientes sometidas a estimulación ovárica como parte del proceso de fertilización *in vitro*.

Hemos establecido el cultivo primario de células de la granulosa humana, y avanzado en su caracterización y en la evaluación de la funcionalidad del cultivo como un modelo *in vitro* para analizar el efecto de disruptores endocrinos. Logramos establecer las condiciones de transporte y cultivo de las células de la granulosa obtenidas a partir de

mujeres donantes y pacientes del Instituto Ingenes. Actualmente, para su caracterización empleamos la expresión de genes característicos de ambas subpoblaciones; para cúmula (Ptgs2, Pfkp) y para murales (Cyp11a1, Lhcgr). Asimismo, se estableció que hay una producción de estradiol estable y que la progesterona aumenta con respecto al tiempo en cultivo. Los perfiles transcripcionales mostraron que este modelo corresponde a células murales luteinizadas, siendo la esteroidogénesis su función más relevante, aunque no sabemos si es un cultivo puro. Este cultivo primario de células murales luteinizadas es sensible al efecto del DES sobre la esteroidogénesis haciendo de este cultivo primario un buen modelo para evaluar la capacidad de un compuesto para alterar el proceso de la esteroidogénesis.

2. Justificación

Tener células de la granulosa poco competentes es una causa reconocida de la subfertilidad asociada con la edad y con otros fallos en las técnicas de reproducción asistida. Estas células proveen el microambiente folicular necesario que modifica la competencia del ovocito y por lo tanto el desarrollo embrionario. Ambos tipos de células de la granulosa actúan coordinadamente para mantener condiciones favorables para el desarrollo y la maduración del ovocito. La exposición a tóxicos, primordialmente aquellos que actúan como disruptores endócrinos, puede alterar las funciones de las células de la granulosa ya que éstas responden a estímulos hormonales. Los parabenos pueden mimetizar a los estrógenos interfiriendo en la función reproductiva y se encuentran ampliamente distribuidos tanto en alimentos como en productos farmacéuticos y cosméticos, resultando en una amplia exposición. Aunque existen algunos estudios en células humanas, éstas son líneas celulares tumorales que pudieran tener un fondo genético que no permita visualizar correctamente el efecto de los parabenos. Por tal motivo, es necesario contar con un modelo humano de células de la granulosa que nos permita tener las herramientas necesarias para comprender los daños causados por tóxicos y xenobióticos sobre estas células. Recientemente hemos establecido y caracterizado un sistema de cultivo de células murales luteinizadas, que corresponde en comportamiento hormonal y expresión génica al esperado para las células murales que pavimentan el interior del folículo y mantienen la producción hormonal necesaria para la maduración ovocitaria. La caracterización completa de este cultivo permitirá utilizarlo ampliamente como modelo para dilucidar mecanismos de toxicidad. Para establecer los patrones espaciotemporales de los cambios en la expresión de los marcadores moleculares en granulosa, se propone el uso de la hibridación *in situ* como una técnica complementaria para definir la proporción cúmula/murales en este cultivo primario de células de la granulosa permitiendo completar su caracterización.

3. Hipótesis

En el cultivo primario de células de la granulosa establecido, existe una distribución no homogénea de marcadores murales y esta distribución se verá afectada por la exposición a compuestos reprotóxicos.

4. Objetivos

4.1 Objetivo general

Analizar los niveles de expresión génica de las enzimas esteroidogénicas CYP11A1, HSD3B1 y LHCGR en cultivo primario de células de la granulosa mediante la técnica RNA-CISH y detectar si hay cambios tras la exposición a compuestos reprotóxicos.

4.2 Objetivos particulares

1. Diseñar, construir y caracterizar un sistema de expresión (fabricación) de sondas de RNA para detectar mensajeros, particularmente los mRNAs de CYP11A1, HSD3B1 y LHCGR (sentido y antisentido).
2. Estandarizar la transcripción *in vitro* mediante el promotor T7 para la producción de sondas para RNA-CISH (sentido y antisentido).
3. Estandarizar la hibridación cromogénica *in situ* en células de cultivo primario de granulosa.
4. Determinar la proporción de las células cúmula/murales por medio de la expresión de las enzimas esteroidogénicas CYP11A1, HSD3B1 y LHCGR usando CISH.
5. Determinar la proporción de las células cúmula/murales por inmunotinción (IF) de las enzimas esteroidogénicas CYP11A1 y LHCGR.
6. Caracterizar los cambios en la producción de progesterona de las células murales tras la exposición continua a compuestos reprotóxicos.

5. Métodos

5.1 Estrategia Experimental

Para dar cumplimiento a los objetivos planteados se propone un diseño experimental basado en dos etapas: la primera consta en la caracterización del cultivo primario de células murales, y la segunda etapa se refiere a estudiar el efecto de los compuestos reprotóxicos sobre el cultivo primario.

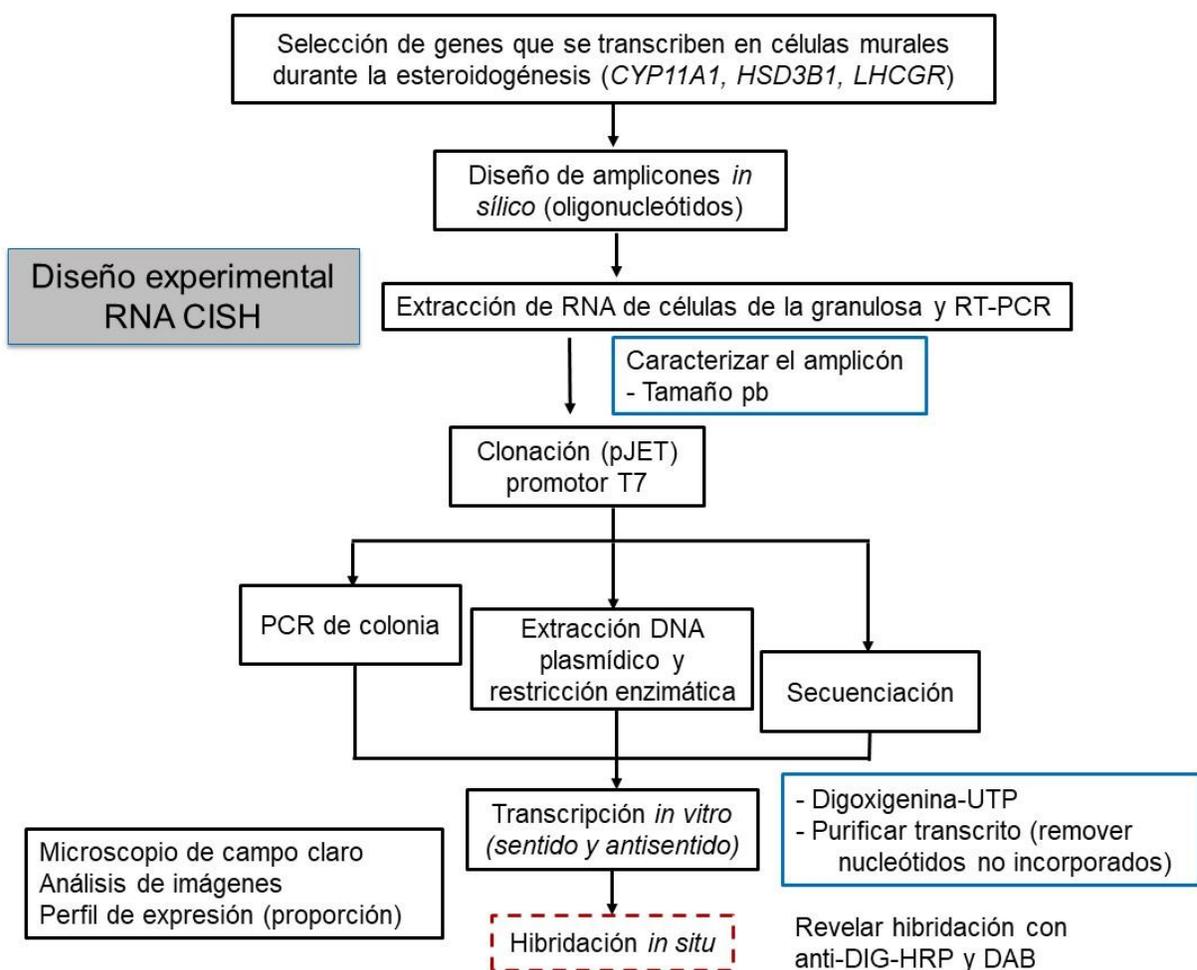


Figura 7. Representación del diseño experimental de la técnica RNA-CISH.

Se muestra el esquema que se siguió para la caracterización del cultivo primario de células murales humanas mediante la técnica de RNA-CISH.

Diseño experimental de la exposición continua a los compuestos reprotóxicos a concentraciones de relevancia ambiental

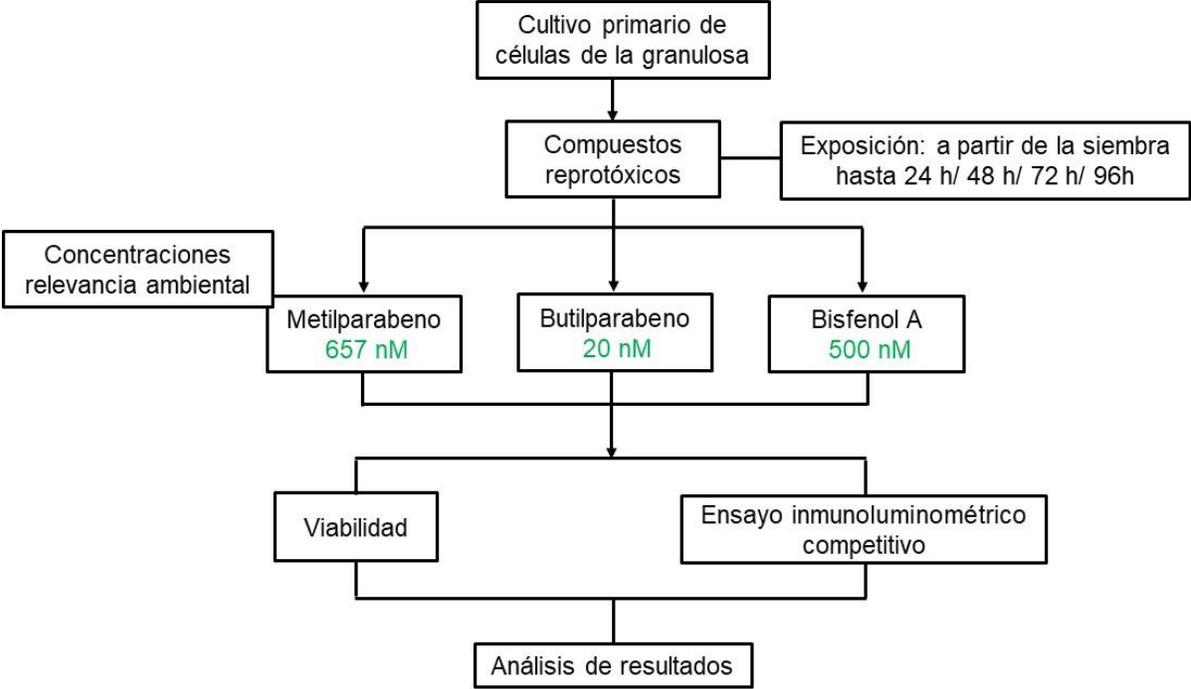


Figura 8. Representación del diseño experimental de la exposición a los compuestos reprotóxicos.

Se muestra el esquema que se siguió para estudiar el efecto sobre la producción de progesterona en células murales humanas al ser expuestas por compuestos reprotóxicos desde la siembra y de manera continua.

5.2 Diseño de sondas

5.2.1 Principio

Las sondas son segmentos de ADN o ARN de cadena sencilla marcados con moléculas que permiten su fácil detección. El diseño de la sonda, es decir, la secuencia nucleotídica, es lo que le permitirá, entre miles de fragmentos del genoma humano, identificar “un solo gen” o “el fragmento de un gen”. La longitud de las sondas consta de 500 a 1000 bases, hasta miles de bases de nucleótidos (Bueno y Vega, 2016). Para ello se hace el diseño de una pareja de iniciadores que permitirán la amplificación específica del gen.

5.2.2 Procedimiento

Para amplificar específicamente el segmento de la región codificante de los genes CYP11A1, HSD3B1 y LHCGR. Se hizo la búsqueda de la secuencia de cada gen desde la base de datos de National Center for Biotechnology Information (NCBI), se analizó la secuencia para su obtención y mediante un programa de diseño de iniciadores (Primer3) se eligió el iniciador *Forward* and *Reverse*.

5.3 Extracción de ARN de las células de la granulosa.

5.3.1 Principio

El Trizol es una solución monofásica de fenol y de isotiocianato de guanidina que permite el aislamiento de ARN, ADN y proteínas. Durante la lisis, el Trizol mantiene la integridad del ARN mientras se disuelven los componentes de la célula. Método de purificación empleado permite el uso de columnas que aseguran la elución de ARN ultra-puro libre de sales e inhibidores.

5.3.2 Procedimiento

El protocolo de extracción de ARN se llevó a cabo bajo lo establecido en el producto Direct-zol™ RNA Microprep de Zymo Research. Dentro del tubo que contiene las células de la granulosa a las 48 h de cultivo y TRI Reagent® se le añadió un

volumen igual de etanol (95-100%). La mezcla se transfiere a una columna Zymo-Spin™ IC Column y un tubo Collection Tube, se centrifugó. Se transfirió la columna a un tubo nuevo de colección y se descartó el líquido. En este paso se recomienda el tratamiento con ADNasa I. Después se le añadió a la columna 400 µl de Direct-zol™ ARN PreWash y se centrifugó. Se descarta el líquido y se repite este paso. Se le colocaron 700 µl de ARN Wash Tampón a la columna y se centrifugó por 2 minutos para asegurar la remoción completa del tampón de lavado. Se transfirió la columna con cuidado a un tubo libre de ARNasa. Para eluir el ARN, se le añadió a la columna 15 µl de agua DNase/RNase-Free y se centrifugó

5.4 Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR)

5.4.1 Principio

La reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR) es usado cuando el material de inicio consiste en ARN. En este método, el ARN se transcribe primero en ADN complementario (cADN) por la transcriptasa inversa a partir de ARN total o ARN mensajero (mARN).

5.4.2 Procedimiento

Mediante esta técnica se permitió la amplificación del fragmento de cada gen. Para la RT-PCR se preparó la mezcla de reacción en un tubo de reacción de 0.5 ml en frío combinando agua libre de nucleasas, el tampón de reacción AMV/*tfl* 5X, mix dNTP, 25 mM de MgSO₄ y los iniciadores río arriba y río abajo, mezclar por pipeteo. Se añadió la transcriptasa inversa AMV y la polimerasa de ADN *Tfl* para la reacción, se mezcló en vortex para mezclar los componentes. Se transfirió en cada tubo de reacción 48 µl de master mix. La reacción fue iniciada al añadir el templete. La reacción se cubrió con aceite mineral libre de nucleasas para evitar la condensación y evaporación. Los tubos se incubaron a 45°C por 45 min. Se procedió directamente al ciclo térmico de reacciones para la síntesis de la segunda cadena ADNc.

5.5 Clonación

5.5.1 Principio

El vector de clonación lineal pJET1.2/blunt, acepta insertos desde 6bp a 10 kb. El extremo 5' del vector contiene grupos fosforilados, por lo que, la fosforilación de los iniciadores de la PCR no es requerido. Los productos de PCR con extremos romos generados por las polimerasas de ADN de corrección pueden ser ligados directamente con el vector. Todas las cepas de *Escherichia coli* comunes en el laboratorio pueden ser directamente transformadas con el producto de ligación.

5.5.2 Procedimiento

El procedimiento se llevó a cabo de acuerdo al protocolo establecido en el estuche Thermo Scientific CloneJET PCR Cloning Kit. Se elaboró la reacción de blunt sobre hielo bajo las siguientes especificaciones: 10 µl de 2X de Reacción de tampón, 1 µl de producto de PCR purificado o no purificado, para 17 µl de agua libre de nucleasas, 1 µl de enzima de ADN blunting, con un volumen total de 18 µl. Se mezcló por vortex brevemente y se centrifugó por 3 a 5 s. La mezcla se incubó a 70°C por 5 minutos. Se enfrió sobre hielo. La reacción de ligación se llevó a cabo en frío. Se añadió a la reacción de mezcla de blunting: 1 µl del vector de clonación pJET1.2/blunt y 1 µl T4 de ADN ligasa, resultando finalmente en un volumen de 20 µl. Se mezcló mediante un vortex brevemente y se centrifugó por 3-5 s. Se incubó la mezcla de ligación a 22°C por 5 min. La mezcla se usó directamente para la transformación en *Escherichia coli* de la cepa dH5α.

5.6 Transformación bacteriana

5.6.1 Principio

Consiste en introducir el ADN de interés mediante el uso de bacterias competentes por choque térmico. Dentro de este proceso, las bacterias son pre-tratadas con agentes que ocasionan el aumento en su permeabilidad membranal. Entre éstos se encuentran una temperatura elevada y el uso de iones que cambian la

carga eléctrica de la membrana al recubrir las cabezas polares de lípidos (por ejemplo: iones de Ca^{2+}), lo que disminuye la repulsión de cargas eléctricas entre los fosfatos de los nucleótidos y la membrana, además de facilitar la entrada del plásmido al interior celular. Una vez que se introduce el material genético a las bacterias competentes, se disminuye la temperatura y se diluye el calcio, restaurando la permeabilidad membranal.

5.6.2 Procedimiento

El procedimiento de la transformación se llevó a cabo en condiciones de esterilidad. Primero se descongelaron las bacterias competentes y se mezclaron con la ligación. Se incubó por 2 min a 4°C y posteriormente se hizo el choque térmico a 42°C por 2 min y en seguida se colocó en hielo por 1 min. Se añadió a cada tubo 500 μl de medio líquido LB sin antibiótico y se incubaron a 37°C por 1 h en agitación. Seguido se centrifugaron a 12000 rpm por 30 s. Se retiró el sobrenadante, dejando solamente 50 μl . Se resuspendieron y se plaquearon en medio LB con ampicilina. Las placas se incubaron por 16 h a 37°C .

5.7 PCR de colonia

5.7.1 Principio

La PCR de colonia es un método que permite determinar la presencia o ausencia del inserto de ADN en construcciones de plásmidos. Las colonias individuales se lisan en una etapa de calentamiento, provocando la liberación del ADN plasmídico de la célula, por lo que puede servir como molde para la reacción de amplificación. Los iniciadores diseñados para el blanco específico del inserto de ADN pueden ser usados para determinar si la construcción contiene el fragmento de ADN de interés.

5.7.2 Procedimiento

La PCR de colonia se llevó a cabo bajo el protocolo establecido en el producto Thermo Scientific CloneJET PCR Cloning Kit. Primero se preparó suficiente Master

Mix de PCR para el número de colonias que se analizaron (Usando 2X PCR Master Mix se requiere colocar 0.4 µl de pJET1.2 Forward Sequencing Primer 10 µM, 0.4 µl de pJET1.2 Reverse Sequencing Primer 10 µM, 9.2 µl de agua libre de nucleasas y 10 µl de PCR Master Mix (2X); con un volumen final de 20 µl para cada reacción) y se mezcló. En tubos de PCR sobre hielo se alicuotaron 20 µl de la mezcla. En cada tubo de colocó una pequeña cantidad de la colonia individual elegida y se resuspendió en agua estéril. La PCR se llevó a cabo bajo las siguientes condiciones: 95°C, 3 min; 94°C, 30 s, 60°C, 30s, 72°C a 1min/kb; 25 ciclos. Finalmente, en gel de agarosa al 1% se analizó la presencia del producto de la PCR.

5.8 Extracción de ADN plasmídico

5.8.1 Principio

La lisis alcalina es el método utilizado para el aislamiento de ADN plasmídico de la bacteria. El tampón de alcalino permite el rompimiento de la bicapa fosfolipídica y desnaturaliza las proteínas involucradas en el mantenimiento de la estructura de la membrana celular. A través de una serie de pasos que implican la agitación, precipitación, centrifugación y la remoción del sobrenadante, eliminando los desechos celulares para la obtención del plásmido purificado.

5.8.2 Procedimiento

La extracción se realizó mediante el protocolo establecido en el estuche *Zyppy™ Plasmid Miniprep Kit*. Se colocaron 600 µl del cultivo de bacterias del medio LB en un tubo de microcentrífuga de 1.5 ml, posteriormente se centrifugó a 1200 rpm por 30 segundos y se desechó el sobrenadante. Este paso se repitió dos veces. El pellet formado se resuspendió completamente con 600 µl de agua, se le agregó 100 µl de Tampón de lisis 7X (azul) y por inversión se mezcló el tubo por 4 a 6 ocasiones. Después de 2 minutos se le añadió 350 µl de Tampón de neutralización frío (amarillo) y se mezcló completamente (la muestra se tornó amarilla y se formó un precipitado). Se centrifugó a 12000 rpm por 8 minutos. El sobrenadante se transfirió a la columna Zymo-Spin™ IIN que provee el kit. La columna se colocó en un tubo de colección y se

centrifugó por 15 segundos. Se desechó el líquido del tubo de colección y se regresó nuevamente la columna al mismo tubo. Se añadieron 200 µl de Tampón de endo-lavado en la columna y se centrifugó por 30 segundos, seguido se le agregaron 400 µl de tampón de lavado Zyppy a la columna y se centrifugó por 1 minuto. La columna se colocó en un tubo de microcentrífuga de 1.5 ml y se le colocaron 30 µl de Tampón de elución Zyppy directamente a la columna matriz y se dejó reposar por 1 minuto a temperatura ambiente. Finalmente se centrifugó por 30 segundos para eluir el ADN plasmídico.

5.9 Cuantificación de ácidos nucleicos

5.9.1 Principio

El equipo empleado permite la cuantificación de ácidos nucleicos mediante espectrofotometría. Combina la tecnología de fibra óptica y las propiedades de la tensión superficial para captar y retener pequeñas cantidades de muestra.

5.9.2 Procedimiento

Después de la extracción de ADN plasmídico se cuantificaron los ácidos nucleicos, mediante el espectrofotómetro de microvolúmenes Nanodrop 2000. Para ello se hizo limpieza de los pedestales colocando 1 µl de agua en el inferior y posteriormente bajando el pedestal superior, secando finalmente con un papel absorbente, este paso se llevó a cabo en dos ocasiones. Posteriormente, se configuró el software del equipo colocando la medición correspondiente a ADN. En el pedestal inferior se colocó 1 µl de agua y seguido de bajar el pedestal superior, desde el software se elige la opción correspondiente para guardar la referencia en blanco. Se limpiaron las superficies de medición con el papel absorbente. Finalmente se continuó el mismo paso para las muestras para permitir su cuantificación. Al término, se limpiaron los pedestales tal como se hizo al inicio.

5.10 Identificación de posibles clonas mediante restricción enzimática y separación electroforética en gel de agarosa

5.10.1 Principio

Las enzimas de restricción son endonucleasas bacterianas que reconocen a una amplia gama de secuencias de ADN. Estas enzimas cortan secuencias específicas del ADN, llamados sitios de restricción. Permiten verificar si el fragmento se ha insertado en sentido o antisentido, mediante la elección de una o dos enzimas que llevarán a cabo el corte. Los resultados de la digestión serán observables al realizar el corrimiento en gel de agarosa. Las moléculas de ácidos nucleicos se separan por tamaño dentro de un campo eléctrico donde las moléculas cargadas negativamente se desplazan hacia el polo del ánodo (positivo). En los geles de agarosa, se le añade bromuro de etidio, una sustancia que se intercala entre las bases de ADN y que es fluorescente al iluminarse con luz ultravioleta permitiendo observar las diferentes bandas de las moléculas.

5.10.2 Procedimiento

Se construyeron mapas de restricción mediante el programa ApE, se analizaron los plásmidos y seleccionaron la o las enzimas de restricción para la digestión. El programa presentó la simulación de los sitios de corte en un gráfico, así como el corrimiento del gel con los fragmentos obtenidos y el tamaño de cada uno. Seguido de este paso se eligió el tampón de reacción apropiado para las enzimas. En un tubo de 1.5 ml se mezcló lo siguiente: ADN, la(s) enzima(s) de restricción, el tampón y agua. La cantidad de enzimas de restricción dependió de la cantidad de ADN que se cortó. El tubo se incubó a la temperatura apropiada (37°C) por el tiempo estimado bajo las instrucciones del fabricante. Se elaboró el gel de agarosa al 1% en TBE 1X y se le agregó el bromuro de etidio, en el gel se cargaron los marcadores de peso molecular, el plásmido con la digestión y su correspondiente plásmido íntegro (se les agregó el tampón de corrimiento).

5.11 Secuenciación

5.11.1 Principio

La secuenciación se basa en el método de Sanger, en el cual se incorporan nucleótidos dideoxido (ddNTPs) marcados con fluorescencia a una nueva cadena de ADN sintetizada por una polimerasa. Estos ddNTPs carecen de uno de los grupos hidroxilo y al producirse dicha incorporación se produce la terminación de la cadena, generando así fragmentos de diferente longitud con el último nucleótido marcado.

5.11.2 Procedimiento

Después de la extracción plasmídica, se realizó la PCR de secuenciación de acuerdo con el protocolo del estuche de BigDye® de Applied Biosystems basado en el método de Sanger. La mezcla de reacción consistió en la solución BigDye, el iniciador *Forward* o *Reverse*, el Templado, Tampón y Agua. La PCR se llevó a cabo bajo las siguientes condiciones: 1 ciclo de 10min a 98°C, 25 ciclos de 30s a 96°C, 15s a 50°C y 4min a 60°C. Una vez finalizada la PCR de secuenciación se realizó la purificación de los productos para eliminar los ddNTPs no incorporados y evitar interferencias durante el análisis, mediante la precipitación con isopropanol el cual consistió en agregar 20 µl de agua y 60 µl de isopropanol absoluto, se mezcló por vórtex ligero y se incubó por 15min a temperatura ambiente, se centrifugó por 20min a 12500 rpm, se retiró el sobrenadante y se lavó la pastilla con 250 µl de isopropanol al 75% dos veces, se centrifugó por 10min a 12500 rpm y se retiró el sobrenadante, se colocó por 5min en baño seco y se guardó a -20°C. Finalmente, el producto obtenido se cargó en un secuenciador automático para separar los fragmentos mediante electroforesis capilar. Este secuenciador produce una inyección electrocinética para que las moléculas puedan entrar en el capilar y así migrar por él hasta llegar al láser que se encarga de excitar el fluorocromo. La cámara capta la señal emitida transformándola en un electroferograma, lo que nos permitió conocer la secuencia de la cadena.

5.12 Transcripción *in vitro* de sondas en sentido y antisentido marcadas con digoxigenina-UTP

5.12.1 Principio

Esta técnica permite la síntesis de ARN a partir del molde de ADN correspondiente a la secuencia de interés. Para la transcripción, el molde de ADN es generalmente linealizado con una enzima de restricción. El ADN molde se transcribe mediante una ARN polimerasa T7 en presencia de trifosfatos de ribonucleósidos (digoxigenina-UTP). La polimerasa pasa por la hebra del molde apareando las bases con el ADN para sintetizar una hebra de RNA complementario (utilizando uracilo en lugar de timina). La ARN polimerasa viaja desde el extremo 3' – 5' de la hebra del molde de ADN, para producir una molécula de ARN en la dirección 5' - 3'.

5.12.2 Procedimiento

2 µg del molde de CYP11A1 y HSD3B2 se linealizaron con la enzima XbaI y LHCGR con NcoI. La enzima se inactivó a 80°C por 10 min. Para dejar los extremos romos, se les dio un tratamiento con la enzima Klenow, para una reacción se colocó 3 µl de Buffer 2 (10x), 3 µl de nNTPs, 20 µl de plásmido (correspondiente a 2 µg), 1 µl de enzima Klenow y 3 µl de agua. Se incubaron por 1 h a temperatura ambiente. Para la inactivación, a cada reacción se agregó proteinasa K obteniendo una concentración final de 200 µg/ml y SDS teniendo una concentración final de 0.5%. Se incubaron por 30 min a 50°C. Se purificaron con el kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System.

La transcripción *in vitro* se llevó a cabo de acuerdo con el protocolo establecido en el estuche MAXIscript® Kit. Se preparó la reacción de transcripción a temperatura ambiente, el cual llevó los siguientes componentes: agua libre de nucleasas cbp 10 µl, 500 ng de template de DNA, 1 µl tampón de transcripción 10X, 0.5 µl de ATP 10 mM, 0.5 µl de CTP 10 mM, 0.5 µl GTP 10 mM, 0.3 µl de UTP 10 mM, 0.2 µl de digoxigenina-UTP y 1 µl de enzima (T7). El tampón de transcripción 10X se añadió en el tubo después del agua y el template de ADN. Se incubó la reacción con el nucleótido limitante durante 1:30 h a 37°C. Se le añadió 0.5 µl de TURBO DNasa (digestión con ADNasa) y se incubó por 15 min a 37°C. La remoción de los nucleótidos no

incorporados se hizo por precipitación con isopropanol. A la reacción de transcripción se le añadió agua para completar a un volumen final de 50 µl, 1 µl de glicógeno (20 µg/µl) y 2.5 volúmenes de isopropanol, se incubó por 16 h a -70°C. Se centrifugó a velocidad máxima por 30 min a 4°C. Se desechó el sobrenadante y se lavó el pellet una vez con etanol frío al 70% y se centrifugó a velocidad máxima por 15 min. Se retiró el etanol y sobre hielo con la tapa abierta se dejó secar por 5 min. El pellet se resuspendió con 10 µl de agua libre de nucleasas.

5.13 Hibridación cromogénica *in situ*

5.13.1 Principio

La hibridación cromogénica *in situ* es una técnica para localizar ácidos nucleicos en tejidos o células fijada mediante el uso de sondas específicas, permitiendo obtener información espacial y temporal acerca de la expresión de genes. Se utilizan sondas específicas para localizar las regiones de interés. La técnica está basada en la hibridación entre una secuencia de DNA o RNA marcado específicamente (sonda) y una secuencia de DNA o RNA presente en la muestra. La sonda se encontrará marcada con digoxigenina-UTP (Lleonart M. *et al.* 1997). Para visualizarse con un microscopio, se utiliza un anticuerpo anti-DIG-HRP de tal forma que una reacción enzimática genera un color.

5.13.2 Procedimiento

El cultivo de las células de la granulosa se fijó con 300 µl de solución de fijación frío (paraformaldehído 4%, ácido acético 5%, cloruro de sodio 0.9%) por 15 min a temperatura ambiente. Se hizo un lavado con 300 µl de PBS por 5 min a temperatura ambiente. Se le colocó 300 µl de proteinasa K (5 µg/ml, diluido en PBS) y se incubó a 37°C por 10 min. Seguido se dieron 3 lavados rápidos con 300 µl de agua DEPC. Se le agregó 300 µl de TritónX-100 0.1%/PBS frío y se incubó por 10 min a temperatura ambiente. Se hizo un lavado con PBS.

Se continuó con la hibridación, el cual consistió en lo siguiente. Se preincubó la muestra con 200 µl de *tampón* de hibridación (8X SSC, 20% Dextrán sulfato, 50%

formamida) por 30 min a 40°C. Se desnaturalizó la sonda (300 ng de sonda en 9 µl de formamida) a 80°C por 2 min y se colocó en hielo inmediatamente. Se le agregó a la sonda 300 µl de *tampón* de hibridación y se incubó en la muestra durante 16 h a 40°C. Concluido el tiempo de incubación se hicieron dos lavados rápidos con 300 µl de solución de lavado a 37°C (4X SSC, 50% formamida). Se hicieron dos lavados con 300 µl de PBS/Tween 0.1% frío. Se bloqueó con PBS/Tween 0.1%/BSA 3% durante 1 h a temperatura ambiente. Se incubó con 25 µl de anticuerpo Anti-Digoxigenina-HRP (dilución 1:10) durante 1 h a temperatura ambiente.

Finalmente se hizo el revelado de la peroxidasa de rábano (HRP) con diaminobencidina (DAB). Después de la incubación con el anticuerpo, se hizo un lavado con PBS. Se incubó con DAB (6 mg de DAB en 10 ml de PBS-DEPC y 30 µl de peróxido de hidrógeno 30%) durante 30 min. Se lavó 2 veces con PBS. Se hizo la contratinción con hematoxilina durante 3 minutos y se lavó con agua destilada. Se hizo un lavado rápido con alcohol ácido (HCl 1%, etanol 70%) y se lavó con agua destilada. Se viró con bicarbonato de sodio al 2%. Se hizo un lavado con agua destilada y posteriormente se hizo el montaje con el medio Immu-Mount.

5.14 Inmunofluorescencia

5.14.1 Principio

Se basa en el uso de anticuerpos conjugados con sustancias fluorescentes con el isotiocianato de fluoresceína (FITC), rodamina y phycoeritrina. La fluorescencia es un tipo de fotoluminiscencia en el cual las moléculas son excitadas por interacción con fotones de radiación electromagnética. Cuando el componente absorbe luz a una longitud de onda apropiada, hay excitación de electrones que oscilan en resonancia. El intervalo de tiempo aproximado entre la absorción de energía y la de emisión de fluorescencia es menos de 10^{-9} s con el uso de los marcadores estándar, como FITC. La luz emitida puede ser observada directamente en el microscopio usando antígenos particulados.

5.14.2 Procedimiento

El cultivo de las células de la granulosa se fijó con paraformaldehído al 4% por 10 minutos. Seguido de un lavado con PBS, se permeabilizó por 10 min con el Tampón de Inmunofluorescencia (0.1% de Tritón, 0.02% de SDS, 10 mg/ml de BSA y PBS). Se lavó una vez con PBS y se incubó con el anticuerpo primario toda la noche a 4 °C en cámara húmeda. La dilución del anticuerpo se hizo en el tampón de inmunofluorescencia, 1:25 para CYP11A1 (Novusbio, NBP1-54758, 0.05 mg/ml, [36]) y 1:50 para LHCGR (Novusbio, NBP2-53276, 0.2 mg/ml, [37]). Se dieron 2 lavados con PBS y se incubaron con el anticuerpo secundario por 1 h a temperatura ambiente en cámara húmeda (la dilución del anticuerpo será de 1:75 y se hará en el tampón de inmunofluorescencia, anti-rabbit para CYP11A1 y anti-mouse para LHCGR). Se le dieron dos lavados con PBS y finalmente se montaron con Vecta/Dapi.

5.15 Ensayo de MTT

5.15.1 Principio

Las células vivas y metabólicamente activas reducen el bromuro de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difeniltetrazolium (MTT) (de color amarillo) a un compuesto coloreado e insoluble en agua llamado formazán (color púrpura). El precipitado de los cristales debe ser disuelto utilizando un solvente. La lectura de se hace a una absorbancia de 570 nm.

5.15.2 Procedimiento

Se preparó una solución de MTT en PBS a una concentración final de 5 mg/ml. A cada pozo de las placas con células se le añadió 20 µl de la solución de MTT preparada, posteriormente se incubó la placa durante 2 h a 37 °C, en atmósfera de CO₂ al 5%. Se retiró el medio y se le agregó 100 µl de isopropanol/HCl 0.4% para disolver los cristales de formazán. La placa se mantuvo en agitación por 2 minutos. Se tomaron 85 µl del formazán disuelto y se pasaron a otros pozos nuevos. Posteriormente, se midieron a una absorbancia de 570 nm mediante el

espectrofotómetro TECAN infinite M200PRO. Los valores de MTT se ajustaron con su respectiva cantidad de proteína. Para determinar el valor de proteína se retiró el medio de cada pozo y se le agregó 50 µl de tampón de lisis 1x y se agitó por 10 min. Se colocó 5 µl del lisado en un pozo nuevo y se le agregó 200 µl de Bradford 1x. Posteriormente, se midieron a una absorbancia de 595 nm mediante el espectrofotómetro TECAN infinite M200PRO.

5.16 Cuantificación de progesterona

5.16.1 Principio

Ensayo inmunoluminométrico competitivo, que se basa en la interacción antígeno-anticuerpo. En un ensayo competitivo, un antígeno libre (Ag) compite con un antígeno marcado (Ag*) por un número fijo y limitado de sitios de unión del anticuerpo. La extensión de la unión anticuerpo (Ab)-Ag* depende de la concentración de Ag libre. A mayor concentración de analito (Ag libre), menos Ag* se une al Ab, permitiendo la cuantificación de la concentración del analito (Ag libre). Utiliza un anticuerpo monoclonal anti-Progesterona para etiquetar N-(aminobutil)-N-(etilisoluminol) (ABEI) y utiliza otro anticuerpo monoclonal para recubrir las microperlas magnéticas.

5.16.2 Procedimiento

Antes de la cuantificación, se diluyeron los medios de cultivo con suero sanguíneo masculino. Para los medios de 24 y 48 h, la dilución fue de 1:200 y para los medios de 72 y 96 h fue de 1:300. El procedimiento se llevó a cabo de acuerdo con el protocolo establecido en el estuche MAGLUMI PRG (CLIA). Usa un anticuerpo monoclonal anti-PRG (progesterona) para marcar con ABEI y un antígeno purificado de PRG para marcar con FITC. El equipo empleado fue el analizador Snibe Diagnostic MAGLUMI 800. Se colocó 40 µl de la muestra/calibrador, 40 µl de la etiqueta ABEI, 40 µl de la etiqueta FITC y 20 µl de microperlas nanomagnéticas. La muestra, el calibrador o el control marcado con ABEI, FITC y las perlas magnéticas recubiertas con anti-FITC se mezclan en el fondo y se incuban a 37°C por 15 min, formando complejos anticuerpo-antígeno; después del sedimento en un campo magnético, se decanta el

sobrenadante y seguido se va un ciclo de lavado por 1 min con 400 μ l. Se le agregan los reactivos y se inicia una reacción quimioluminiscente rápida. La señal de luz es medida por un fotomultiplicador dentro de 3 segundos, siendo proporcional a la concentración de progesterona presente en las muestras.

6. Resultados

6.1 Diseño y obtención de sondas para hibridación *in situ*

Para el diseño de las sondas se inició con la generación y análisis de los iniciadores específicos para los genes CYP11A1, HSD3B1 y LHCGR. Se hizo la búsqueda de la secuencia completa de cada gen en la base de datos National Center for Biotechnology Information (**NCBI**) [38] y mediante el programa Perl Primer3 se eligieron los iniciadores *Forward* y *Reverse* bajo las siguientes condiciones: una T_m (Temperatura de fusión) entre de 60-62 °C, longitud de los iniciadores de 20 a 24 bases, contenido de G:C (Guanina:Citosina) entre 40 y 60%, asimismo los iniciadores no deben favorecer horquillas ni ser complementarios. La Tabla 1 muestra la secuencia de los iniciadores elegidos y tamaño del amplicón para cada gen.

Tabla 1. Secuencias del par de iniciadores elegidos para cada gen

Gen	Iniciador <i>Forward</i>	Iniciador <i>Reverse</i>	Tamaño amplicón
CYP11A1	GGCATCCTCTACAGACTCCT	GAGAACCCATTCAACCTGCTG	803
HSD3B1	GCCAGTCTTCATCTACACCAG	TGACATCTCCTAACAATACCCAC	819
LHCGR	TTACACATAACCACCATACCAG	CCATCCTCCAAGCATAATCAG	999

6.1.2 Obtención de los amplicones y caracterización

Para amplificar los fragmentos correspondientes a los genes CYP11A1, HSD3B1 y LHCGR, se hizo la extracción de RNA total de células de la granulosa a las 48 h de cultivo, cuando se consideran que ya están expresando estos marcadores murales en su máxima capacidad. Se llevó a cabo la amplificación por medio de la técnica RT-PCR. Los productos de PCR obtenidos empleando a los iniciadores de la tabla 1 se analizaron mediante electroforesis capilar. Cada amplicón mostró un tamaño cercano al calculado con los programas disponibles en el sitio web del **NCBI**. La tabla 2 muestra el tamaño de los amplicones, su concentración y pureza, indicando la correcta obtención de los amplicones. La Figura 9 muestra la electroforesis capilar representativa de la separación de los amplicones, donde se muestra la obtención de los amplicones correctos en tamaño para los tres genes.

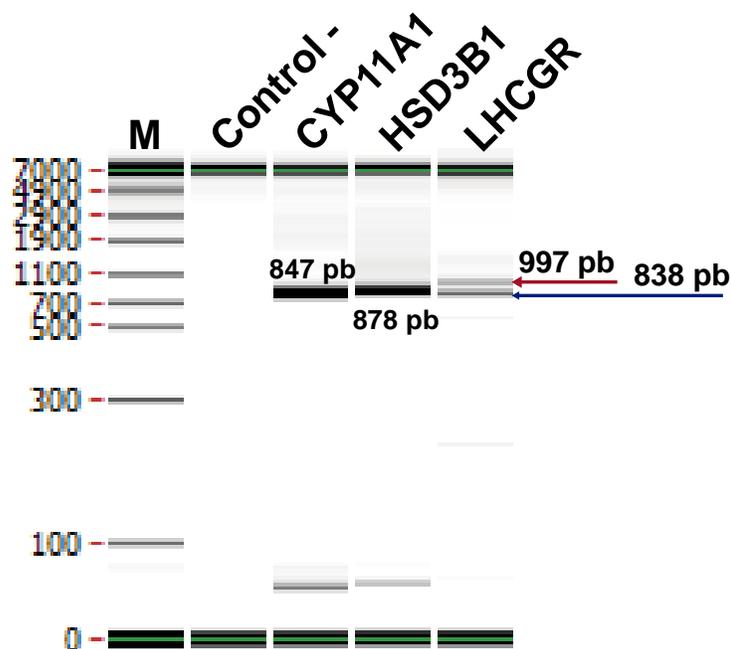


Figura 9. Separación e identificación inicial de amplicones.

Imagen representativa de la separación de los amplicones en electroforesis capilar mediante el equipo LabChip.

Tabla 2. Datos de la caracterización de los amplicones mediante electroforesis capilar

Nombre	Tamaño calculado	Tamaño (pb) EC	Concentración (ng/ul)	Pureza (%)
CYP11A1	803	847	38.55	93.75
HSD3B1	819	878	20.57	87.83
LHCGR	999	838	3.57	41.54
		997	2.35	27.42

6.1.3 Clonación de los amplicones en el vector pJET y caracterización de los plásmidos obtenidos

Una vez obtenidos los amplicones correctos para los genes CYP11A1, HSD3B1 y LHCGR, se llevó a cabo la clonación mediante su incorporación por ligación en el vector de clonación pJET1.2/blunt, que tiene el promotor de la polimerasa T7 para hacer transcripción *in vitro*, y la transformación de las bacterias competentes *Escherichia coli* de la cepa DH5 α . Las clonas positivas se seleccionaron con el

antibiótico Ampicilina (100 µg/ml) y se comprobó la presencia de los amplicones en los plásmidos por PCR de colonia. Mediante un corrimiento electroforético en gel de agarosa al 1%, determinamos la presencia y el tamaño correcto de los amplicones correspondientes. La Figura 10 muestra las imágenes representativas de estos geles. Para CYP11A1 se obtuvieron 7 colonias positivas, para HSD3B1 se obtuvieron 5 colonias positivas y para LHCGR se obtuvieron 3 colonias positivas. Tenemos colonias candidatas con el plásmido ligado con el amplicón que nos permitirá la obtención de los fragmentos en orientación sentido y antisentido en referencia al promotor T7.

6.1.4 Caracterización de las clonas mediante restricción enzimática

Se determinó la orientación del fragmento en cada uno de los plásmidos, para lo cual primero se obtuvo ADN plasmídico para la digestión enzimática. Mediante un análisis *in silico* con la herramienta informática ApE se seleccionaron las enzimas. Para CYP11A1 las enzimas fueron HindIII y Apal, para LHCGR HindIII y Accl y para HSD3B1 fueron NotI y BamHI. Las Figuras 11, 12 y 13, muestran el tamaño de los fragmentos y el corrimiento electroforético para CYP11A1, LHCGR y HSD3B1, respectivamente. Tras la evaluación de estas digestiones podemos afirmar la obtención de una colonia positiva para cada sentido en cada gen.

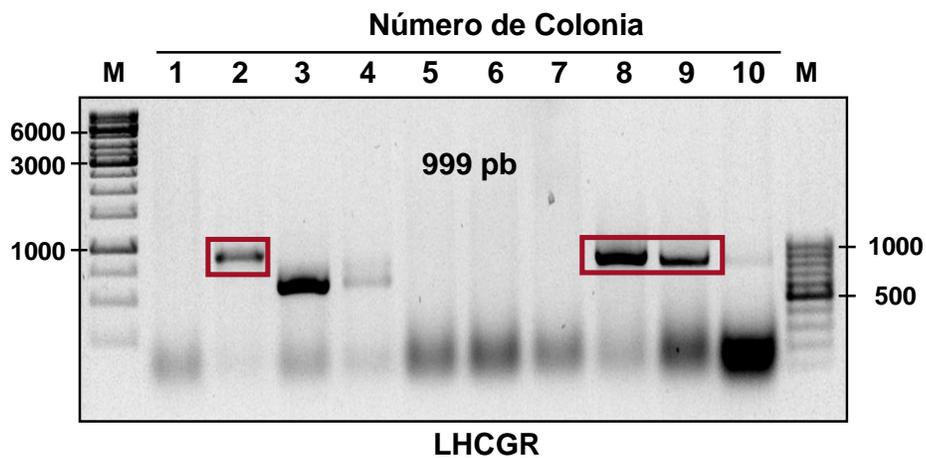
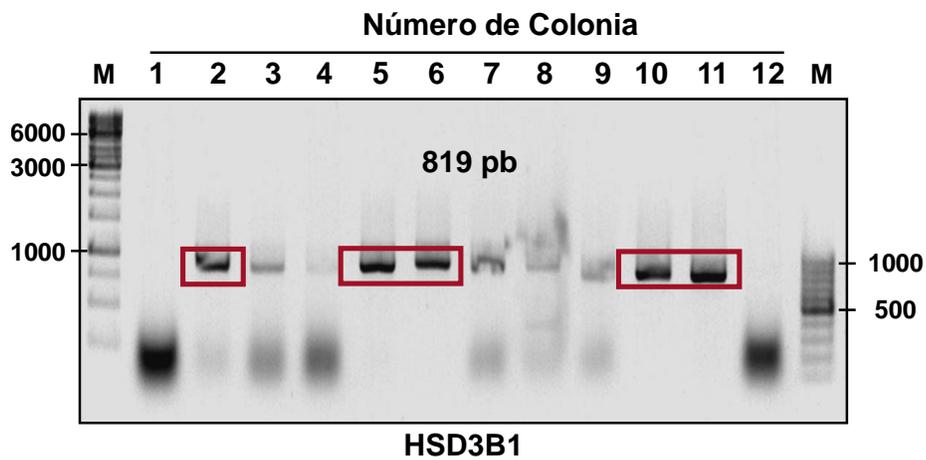
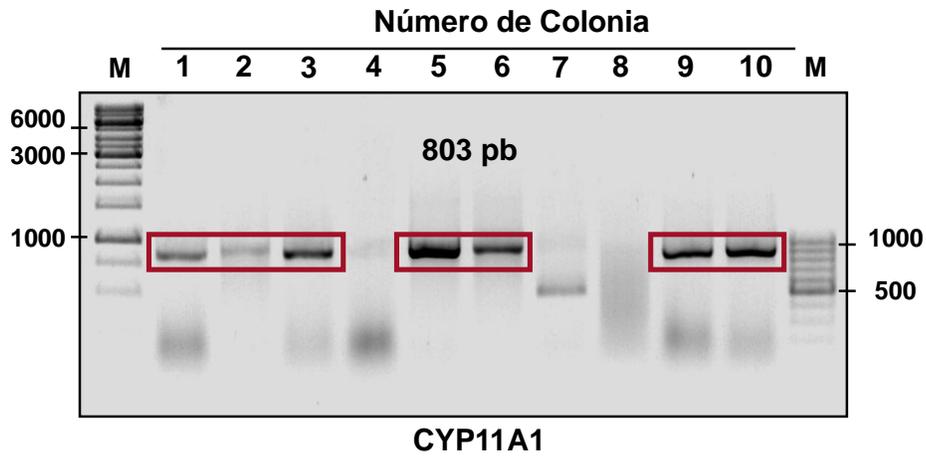


Figura 10. Caracterización de clonas candidatas para los marcadores CYP11A1, HSD3B1 y LHCGR.

Imagen representativa de los productos de PCR de colonia para clonas candidatas de CYP11A1 (superior), HSD3B1 (centro) y LHCGR (abajo). Electroforesis en gel de agarosa al 1%.

CYP11A1 AntiSentido.ape					
Size	site1		site2		Mass %
2804	HindIII	1427	Apal	454	74
973	Apal	454	HindIII	1427	28

CYP11A1 Sentido.ape					
Size	site1		site2		Mass %
3437	HindIII	1427	Apal	1087	91
340	Apal	1087	HindIII	1427	9

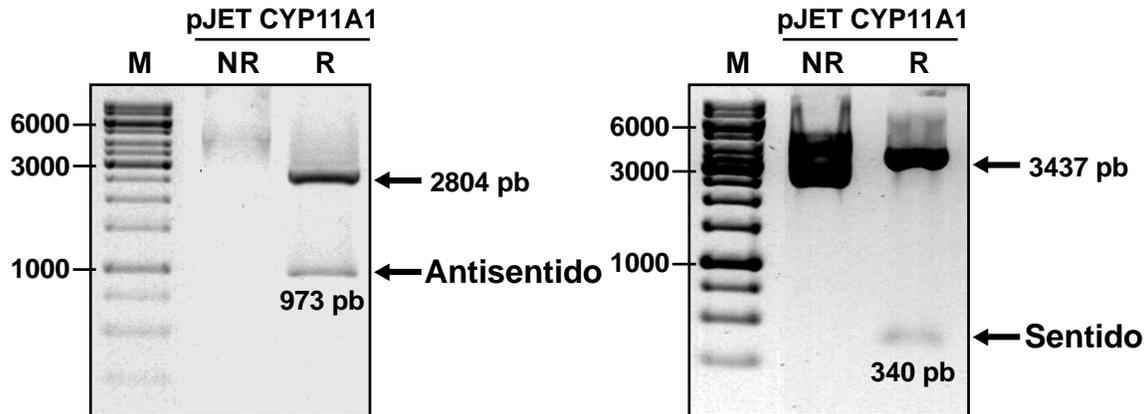


Figura 11. Restricción enzimática para el plásmido ligado al fragmento CYP11A1. Determinación de la orientación del fragmento CYP11A1. Arriba: tamaños esperados de los fragmentos obtenidos por el programa ApE en orientación antisentido (colonia 1) y sentido (colonia 21). Abajo: corrimiento electroforético de la restricción enzimática en gel de agarosa al 1% con orientación antisentido (izquierdo) y sentido (derecho).

LHCGR AntiSentido.ape					
Size	site1		site2		Mass %
2830	HindIII	1623	AclI	480	71
1143	AclI	480	HindIII	1623	29

LHCGR Sentido.ape					
Size	site1		site2		Mass %
3607	HindIII	1623	AclI	1257	91
366	AclI	1257	HindIII	1623	9

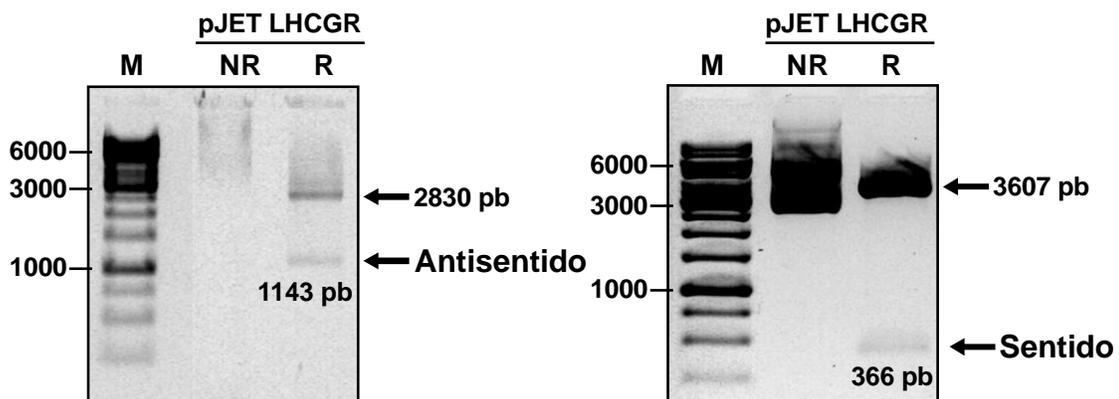


Figura 12. Restricción enzimática para el plásmido ligado al fragmento LHCGR. Detección de la orientación del fragmento LHCGR. Arriba: tamaños esperados de los fragmentos obtenidos por el programa ApE en orientación antisentido (colonia 8) y sentido (colonia 2). Abajo: corrimiento electroforético de la restricción enzimática en gel de agarosa al 1% con orientación antisentido (izquierdo) y sentido (derecho).

HSD3B1 AntiSentido.apc					
Size	site1		site2		Mass %
3420	BamHI	910	NotI	328	85
582	NotI	328	BamHI	910	15

HSD3B1 Sentido.apc					
Size	site1		site2		Mass %
3468	BamHI	862	NotI	328	87
534	NotI	328	BamHI	862	13

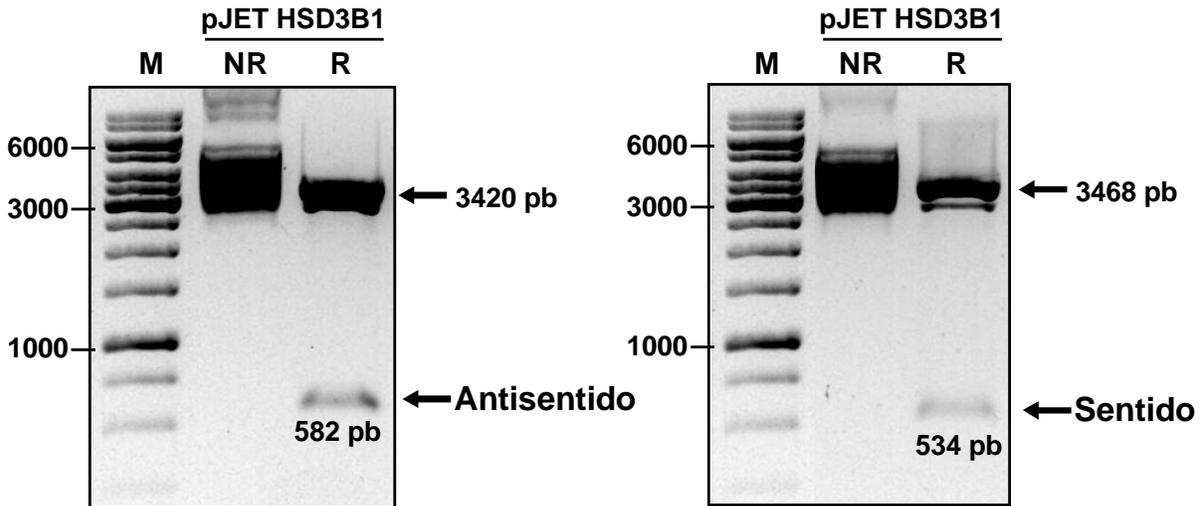


Figura 13. Restricción enzimática para el plásmido ligado al fragmento HSD3B1.

Detección de la orientación del fragmento HSD3B1. Arriba: tamaños esperados de los fragmentos obtenidos por el programa ApE en orientación antisentido (colonia 6) y sentido (colonia 3). Abajo: corrimiento electroforético de la restricción enzimática en gel de agarosa al 1% con orientación antisentido (izquierdo) y sentido (derecho).

6.1.5 Determinación de identidad de cada plásmido mediante secuenciación automatizada

Para confirmar la clonación correcta de los fragmentos que servirán como sondas para cada uno de los genes, se llevó a cabo la secuenciación automatizada de cada plásmido obtenido. El resultado de la secuencia se comparó con la secuencia de la sonda teórica y con la secuencia incorporada en el vector, que se muestra en la Figura 14 para CYP11A, en la Figura 15 para LHCGR y la Figura 16 para HSD3B1. Además, se hizo la comparación dentro de la base de datos del NCBI para conocer el porcentaje de identidad de la secuencia obtenida y la reportada en el NCBI. Las secuencias de CYP11A1 y LHCGR coincidieron en todos los análisis, sin embargo, la secuenciación indicó la clonación de la variante 2 de HSD3B1, resultado que se

corroborar con el análisis en la base de NCBI, tal como se muestra en la Figura 17 y 18 para CYP11A1, la Figura 19 y 20 para LHCGR, y la Figura 21 y 22 para HSD3B2.

		Section 16			
	(541)	541	550	560	576
CYP11A1 Antisentido - Producto Secuenciación	(173)	AGGTGAAGGAGATGGGCITTTTCAGGCATCAGAAATGA			
CYP11A1 Antisentido - Sonda Teórica	(170)	AGGTGAAGGAGATGGGCITTTTCAGGCATCAGAAATGA			
CYP11A1 Antisentido pJET	(541)	AGGTGAAGGAGATGGGCITTTTCAGGCATCAGAAATGA			
Consensus	(541)	AGGTGAAGGAGATGGGCITTTTCAGGCATCAGAAATGA			
		Section 17			
	(577)	577	590	600	612
CYP11A1 Antisentido - Producto Secuenciación	(209)	GGTTGAATGTGGTGCCACATCGCTGAGGTGTTGGA			
CYP11A1 Antisentido - Sonda Teórica	(206)	GGTTGAATGTGGTGCCACATCGCTGAGGTGTTGGA			
CYP11A1 Antisentido pJET	(577)	GGTTGAATGTGGTGCCACATCGCTGAGGTGTTGGA			
Consensus	(577)	GGTTGAATGTGGTGCCACATCGCTGAGGTGTTGGA			
		Section 18			
	(613)	613	620	630	648
CYP11A1 Antisentido - Producto Secuenciación	(245)	TTTCAACTCTGAAGTTCCTCCAGCATATTGATGAGGA			
CYP11A1 Antisentido - Sonda Teórica	(242)	TTTCAACTCTGAAGTTCCTCCAGCATATTGATGAGGA			
CYP11A1 Antisentido pJET	(613)	TTTCAACTCTGAAGTTCCTCCAGCATATTGATGAGGA			
Consensus	(613)	TTTCAACTCTGAAGTTCCTCCAGCATATTGATGAGGA			
		Section 16			
	(571)	571	580	590	608
CYP11A1 Sentido - Producto Secuenciación	(234)	ACATGGCCACGATGCTACAGCTGGTCCCGCTCCTCAAA			
CYP11A1 Sentido - Sonda Teórica	(200)	ACATGGCCACGATGCTACAGCTGGTCCCGCTCCTCAAA			
CYP11A1 Sentido pJET	(571)	ACATGGCCACGATGCTACAGCTGGTCCCGCTCCTCAAA			
Consensus	(571)	ACATGGCCACGATGCTACAGCTGGTCCCGCTCCTCAAA			
		Section 17			
	(609)	609	620	630	646
CYP11A1 Sentido - Producto Secuenciación	(272)	GCCAGCATCAAGGAGACACTAAGACTTCACCCCATCTC			
CYP11A1 Sentido - Sonda Teórica	(238)	GCCAGCATCAAGGAGACACTAAGACTTCACCCCATCTC			
CYP11A1 Sentido pJET	(609)	GCCAGCATCAAGGAGACACTAAGACTTCACCCCATCTC			
Consensus	(609)	GCCAGCATCAAGGAGACACTAAGACTTCACCCCATCTC			
		Section 18			
	(647)	647	660	670	684
CYP11A1 Sentido - Producto Secuenciación	(310)	CGTGACCCTGCAGAGATATCTTGTAAATGACTTGGTTC			
CYP11A1 Sentido - Sonda Teórica	(276)	CGTGACCCTGCAGAGATATCTTGTAAATGACTTGGTTC			
CYP11A1 Sentido pJET	(647)	CGTGACCCTGCAGAGATATCTTGTAAATGACTTGGTTC			
Consensus	(647)	CGTGACCCTGCAGAGATATCTTGTAAATGACTTGGTTC			

Figura 14. Secuenciación parcial del fragmento CYP11A1 y comparación con la secuencia teórica.

Secuencia parcial del fragmento clonado de CYP11A1 antisentido (arriba) y sentido (abajo). Comparación con la secuencia de la sonda teórica y con la secuencia incorporada en el vector.

					Section 15
	(519)	519	530	540	555
LHCGR Antisentido - pJET	(519)	AGCAGTGTGTGCACCCCACTCCCTGTCTGCCAGTCTATG			
LHCGR Antisentido - Producto Secuenciación	(119)	AGCAGTGTGTGCACCCCACTCCCTGTCTGCCAGTCTATG			
LHCGR Antisentido - Sonda Teórica	(148)	AGCAGTGTGTGCACCCCACTCCCTGTCTGCCAGTCTATG			
Consensus	(519)	AGCAGTGTGTGCACCCCACTCCCTGTCTGCCAGTCTATG			
					Section 16
	(556)	556	570	580	592
LHCGR Antisentido - pJET	(556)	GCATGGTTATAGTACTGGCCCTTGGTTTGGGAATCAA			
LHCGR Antisentido - Producto Secuenciación	(156)	GCATGGTTATAGTACTGGCCCTTGGTTTGGGAATCAA			
LHCGR Antisentido - Sonda Teórica	(185)	GCATGGTTATAGTACTGGCCCTTGGTTTGGGAATCAA			
Consensus	(556)	GCATGGTTATAGTACTGGCCCTTGGTTTGGGAATCAA			
					Section 17
	(593)	593	600	610	629
LHCGR Antisentido - pJET	(593)	CTGAGGCTATGAGCAGCAGATAGAGCCCCATGC AAAA			
LHCGR Antisentido - Producto Secuenciación	(193)	CTGAGGCTATGAGCAGCAGATAGAGCCCCATGC AAAA			
LHCGR Antisentido - Sonda Teórica	(222)	CTGAGGCTATGAGCAGCAGATAGAGCCCCATGC AAAA			
Consensus	(593)	CTGAGGCTATGAGCAGCAGATAGAGCCCCATGC AAAA			

					Section 15	
	(547)	547	560	570	585	
LHCGR Sentido - Producto Secuenciación	(189)	CCITCCGTGGGGCCACAGGGCCGAAAACCTTGGATATTT				
LHCGR Sentido - Sonda Teórica	(176)	CCITCCGTGGGGCCACAGGGCCGAAAACCTTGGATATTT				
LHCGR Sentido pJET	(547)	CCITCCGTGGGGCCACAGGGCCGAAAACCTTGGATATTT				
Consensus	(547)	CCITCCGTGGGGCCACAGGGCCGAAAACCTTGGATATTT				
					Section 16	
	(586)	586	600	610	624	
LHCGR Sentido - Producto Secuenciación	(228)	CTTCCACCAAATTGCAGGCCCTGCCGAGCTATGGCCTAG				
LHCGR Sentido - Sonda Teórica	(215)	CTTCCACCAAATTGCAGGCCCTGCCGAGCTATGGCCTAG				
LHCGR Sentido pJET	(586)	CTTCCACCAAATTGCAGGCCCTGCCGAGCTATGGCCTAG				
Consensus	(586)	CTTCCACCAAATTGCAGGCCCTGCCGAGCTATGGCCTAG				
					Section 17	
	(625)	625	630	640	650	663
LHCGR Sentido - Producto Secuenciación	(267)	AGTCCATTCCAGAGGCTAATTGCCACGTCATCCTATTCTC				
LHCGR Sentido - Sonda Teórica	(254)	AGTCCATTCCAGAGGCTAATTGCCACGTCATCCTATTCTC				
LHCGR Sentido pJET	(625)	AGTCCATTCCAGAGGCTAATTGCCACGTCATCCTATTCTC				
Consensus	(625)	AGTCCATTCCAGAGGCTAATTGCCACGTCATCCTATTCTC				

Figura 15. Secuenciación parcial del fragmento LHCGR y comparación con la secuencia teórica.

Secuencia parcial del fragmento clonado de LHCGR antisentido (arriba) y sentido (abajo). Comparación con la secuencia de la sonda teórica y con la secuencia incorporada en el vector.

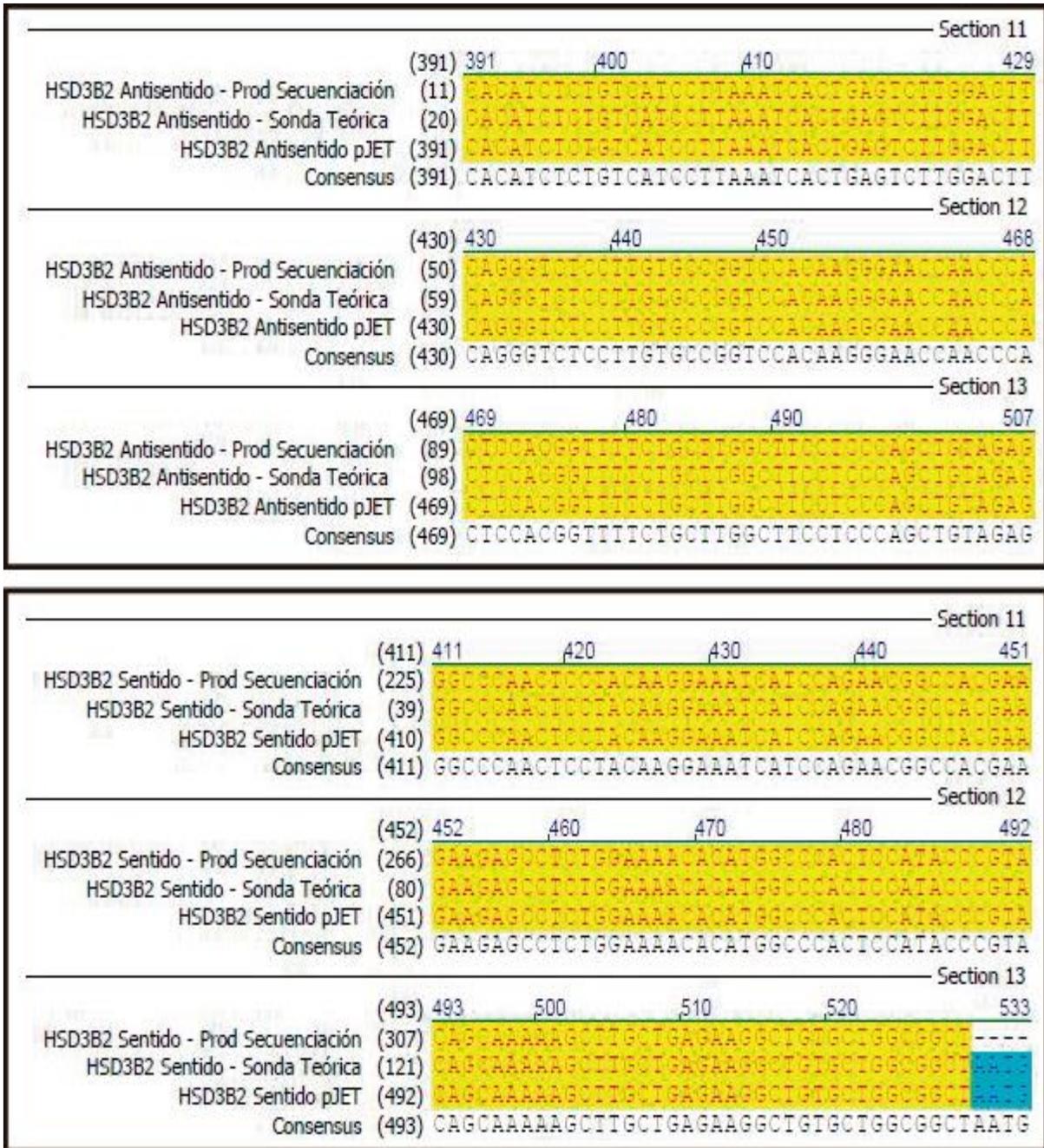


Figura 16. Secuenciación parcial del fragmento HSD3B2 y comparación con la secuencia teórica.

Secuencia parcial del fragmento clonado de HSD3B2 sentido (arriba) y antisentido (abajo). Comparación con la secuencia de la sonda teórica y con la secuencia incorporada en el vector.

Homo sapiens cytochrome P450 family 11 subfamily A member 1 (CYP11A1), transcript variant 2, mRNA
 Sequence ID: [NM_001099773.1](#) Length: 2010 Number of Matches: 1

Range 1: 1127 to 1447 [GenBank](#) [Graphics](#) ▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
593 bits(321)	9e-166	321/321(100%)	0/321(0%)	Plus/Plus
Query 1	GGCATCCTCTACAGACTCCTGGGAGACAGCAAGATGTCCTTCGAGGACATCAAGGCCAAC			60
Sbjct 1127	GGCATCCTCTACAGACTCCTGGGAGACAGCAAGATGTCCTTCGAGGACATCAAGGCCAAC			1186
Query 61	GTCACAGAGATGCTGGCAGGAGGGGTGGACACGACGTCCATGACCCTGCAGTGGCACTTG			120
Sbjct 1187	GTCACAGAGATGCTGGCAGGAGGGGTGGACACGACGTCCATGACCCTGCAGTGGCACTTG			1246
Query 121	TATGAGATGGCACGCAACCTGAAGGTGCAGGATATGCTGCGGGCAGAGGTCTTGGCTGCG			180
Sbjct 1247	TATGAGATGGCACGCAACCTGAAGGTGCAGGATATGCTGCGGGCAGAGGTCTTGGCTGCG			1306
Query 181	CGGCACCAGGCCCAGGGAGACATGGCCACGATGCTACAGCTGGTCCCCCTCCTCAAAGCC			240
Sbjct 1307	CGGCACCAGGCCCAGGGAGACATGGCCACGATGCTACAGCTGGTCCCCCTCCTCAAAGCC			1366
Query 241	AGCATCAAGGAGACACTAAGACTTCACCCCATCTCCGTGACCCTGCAGAGATATCTTGTA			300
Sbjct 1367	AGCATCAAGGAGACACTAAGACTTCACCCCATCTCCGTGACCCTGCAGAGATATCTTGTA			1426
Query 301	AATGACTTGGTTCTTCGAGAT	321		
Sbjct 1427	AATGACTTGGTTCTTCGAGAT	1447		

Figura 17. Comparación de la secuencia del fragmento clonado de CYP11A1 sentido dentro de la base de datos NCBI.

Homo sapiens cytochrome P450 family 11 subfamily A member 1 (CYP11A1), transcript variant 2, mRNA
 Sequence ID: [NM_001099773.1](#) Length: 2010 Number of Matches: 1

Range 1: 1593 to 1912 [GenBank](#) [Graphics](#) ▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
592 bits(320)	3e-165	320/320(100%)	0/320(0%)	Plus/Minus
Query 1	GCTGAGCAGGCTGGGCAGAAAGGAGCAGGACTTGGGACAGACGACTGAAGATGCAGAGAC			60
Sbjct 1912	GCTGAGCAGGCTGGGCAGAAAGGAGCAGGACTTGGGACAGACGACTGAAGATGCAGAGAC			1853
Query 61	CCCATGGGCCCCACCCCTGGGCCTTCTCCCATGTGGCTGCAGGCCATCCTCTCTGATCA			120
Sbjct 1852	CCCATGGGCCCCACCCCTGGGCCTTCTCCCATGTGGCTGCAGGCCATCCTCTCTGATCA			1793
Query 121	CTGCTGGGTTGCTTCTCGTTAAAGGGCCAGAAGGTGAAGGAGATGGGCTTTTCAGGCAT			180
Sbjct 1792	CTGCTGGGTTGCTTCTCGTTAAAGGGCCAGAAGGTGAAGGAGATGGGCTTTTCAGGCAT			1733
Query 181	CAGAATGAGGTTGAATGTGGTGCCACATCGCTGAGGTGTTGGATTTCAACTCTGAAGTT			240
Sbjct 1732	CAGAATGAGGTTGAATGTGGTGCCACATCGCTGAGGTGTTGGATTTCAACTCTGAAGTT			1673
Query 241	CTCCAGCATATTGATGAGGAAGATGGTCATCTCTAGCTCAGCGATCCGCCGTCCCAGACA			300
Sbjct 1672	CTCCAGCATATTGATGAGGAAGATGGTCATCTCTAGCTCAGCGATCCGCCGTCCCAGACA			1613
Query 301	CTGCCGCACACCCAGCCAA	320		
Sbjct 1612	CTGCCGCACACCCAGCCAA	1593		

Figura 18. Comparación de la secuencia del fragmento clonado de CYP11A1 antisentido dentro de la base de datos NCBI.

Homo sapiens luteinizing hormone/choriogonadotropin receptor (LHCGR), mRNA
 Sequence ID: [NM_000233.3](#) Length: 3093 Number of Matches: 1

Range 1: 545 to 886 [GenBank](#) [Graphics](#) ▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
632 bits(342)	2e-177	342/342(100%)	0/342(0%)	Plus/Plus
Query 10	TTACACATAACCACCATACCAGGAAATGCTTTTCAAGGGATGAATAATGAATCTGTAACA	69		
Sbjct 545	TTACACATAACCACCATACCAGGAAATGCTTTTCAAGGGATGAATAATGAATCTGTAACA	604		
Query 70	CTCAAACATATGGAAATGGATTTGAAGAAGTACAAAGTCATGCATTCAATGGGACGACA	129		
Sbjct 605	CTCAAACATATGGAAATGGATTTGAAGAAGTACAAAGTCATGCATTCAATGGGACGACA	664		
Query 130	CTGACTTCACTGGAGCTAAAGGAAAACGTACATCTGGAGAAGATGCACAATGGAGCCTTC	189		
Sbjct 665	CTGACTTCACTGGAGCTAAAGGAAAACGTACATCTGGAGAAGATGCACAATGGAGCCTTC	724		
Query 190	CGTGGGGCCACAGGGCCGAAAACCTTGGATATTTCTCCACCAAATTCAGGGCCCTGCCG	249		
Sbjct 725	CGTGGGGCCACAGGGCCGAAAACCTTGGATATTTCTCCACCAAATTCAGGGCCCTGCCG	784		
Query 250	AGCTATGGCCTAGAGTCCATTAGAGGCTAATTGCCACGTCATCCTATTCTCTaaaaaaaa	309		
Sbjct 785	AGCTATGGCCTAGAGTCCATTAGAGGCTAATTGCCACGTCATCCTATTCTCTAAAAAAAA	844		
Query 310	TTGCCATCAAGAGAAACATTTGTCAATCTCCTGGAGGCCACG	351		
Sbjct 845	TTGCCATCAAGAGAAACATTTGTCAATCTCCTGGAGGCCACG	886		

Figura 19. Comparación de la secuencia del fragmento clonado de LHCGR sentido dentro de la base de datos NCBI.

Homo sapiens luteinizing hormone/choriogonadotropin receptor (LHCGR), mRNA
 Sequence ID: [NM_000233.3](#) Length: 3093 Number of Matches: 1

Range 1: 1174 to 1524 [GenBank](#) [Graphics](#) ▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
649 bits(351)	0.0	351/351(100%)	0/351(0%)	Plus/Minus
Query 1	AGAATGGCATGTCTTAATCGCAGCTTTTGGTCCAGGTGAATAGCATAGGTGATGGTGTGC	60		
Sbjct 1524	AGAATGGCATGTCTTAATCGCAGCTTTTGGTCCAGGTGAATAGCATAGGTGATGGTGTGC	1465		
Query 61	CATCTTTCTAGAGTGATGACGGTGAGGGTGTAGACAGAAAGTTCACCTTGCGAATACAGTG	120		
Sbjct 1464	CATCTTTCTAGAGTGATGACGGTGAGGGTGTAGACAGAAAGTTCACCTTGCGAATACAGTG	1405		
Query 121	AAAAAGCCAGCAGTGCTGCACCCACTCCCTGTCTGCCAGTCTATGGCATGGTTATAGTAC	180		
Sbjct 1404	AAAAAGCCAGCAGTGCTGCACCCACTCCCTGTCTGCCAGTCTATGGCATGGTTATAGTAC	1345		
Query 181	TGGCCCTTGGTTTGGGAATCAACTGAGGCTATGAGCAGCAGATAGAGCCCCATGCAAAAAG	240		
Sbjct 1344	TGGCCCTTGGTTTGGGAATCAACTGAGGCTATGAGCAGCAGATAGAGCCCCATGCAAAAAG	1285		
Query 241	TCTGCAAAGGAGAGATTGCACATGAGAAAACGAGGCACTGTAAGTTTGTAAACGACTTGTC	300		
Sbjct 1284	TCTGCAAAGGAGAGATTGCACATGAGAAAACGAGGCACTGTAAGTTTGTAAACGACTTGTC	1225		
Query 301	AGGAGAACA AAAAGAACAGTCATGTTTCCCATGATGGCTAGAATATTAATC	351		
Sbjct 1224	AGGAGAACA AAAAGAACAGTCATGTTTCCCATGATGGCTAGAATATTAATC	1174		

Figura 20. Comparación de la secuencia del fragmento clonado de LHCGR antisentido dentro de la base de datos NCBI.

Homo sapiens hydroxy-delta-5-steroid dehydrogenase, 3 beta- and steroid delta-isomerase 2 (HSD3B2), transcript variant 2, mRNA
 Sequence ID: [NM_001166120.1](#) Length: 1807 Number of Matches: 1

Range 1: 387 to 777 [GenBank](#) [Graphics](#) ▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
706 bits(382)	0.0	388/391(99%)	0/391(0%)	Plus/Plus
Query 11	TTCTAAACTCCAGAACAGACCAAGCTGACTGTACTTGAAGGAGACATGCTGGATGAGCC	70		
Sbjct 387	TTCTAAGCTCCAGAACAGGACCAAGCTGACTGTACTTGAAGGAGACATTCTGGATGAGCC	446		
Query 71	ATTCCTGAAAAGAGCCTGCCAGGACGTCTCGGTGTCATCCACACCGCCTGTATCATTGA	130		
Sbjct 447	ATTCCTGAAAAGAGCCTGCCAGGACGTCTCGGTGTCATCCACACCGCCTGTATCATTGA	506		
Query 131	TGTCCTTTGGTGTCACTCACAGAGTCCATCATGAATGTCAATGTGAAAGGTACCCAGCT	190		
Sbjct 507	TGTCCTTTGGTGTCACTCACAGAGTCCATCATGAATGTCAATGTGAAAGGTACCCAGCT	566		
Query 191	ACTGTTGGAGGCCGTGTCCAAGCCAGTGTGCCAGTCTTCACTACACCAAGTAGCATAGA	250		
Sbjct 567	ACTGTTGGAGGCCGTGTCCAAGCCAGTGTGCCAGTCTTCACTACACCAAGTAGCATAGA	626		
Query 251	GGTAGCCGGGCCCAACTCCTACAAGGAAATCATCCAGAACGGCCACGAAGAAGAGCCTCT	310		
Sbjct 627	GGTAGCCGGGCCCAACTCCTACAAGGAAATCATCCAGAACGGCCACGAAGAAGAGCCTCT	686		
Query 311	GGAAAAACACATGGCCCACTCCATACCCGTACAGCAAAAAGCTTGTGAGAAGGCTGTGCT	370		
Sbjct 687	GGAAAAACACATGGCCCACTCCATACCCGTACAGCAAAAAGCTTGTGAGAAGGCTGTGCT	746		
Query 371	GGCGGCTAATGGGTGGAATCTAAAAAATGGT	401		
Sbjct 747	GGCGGCTAATGGGTGGAATCTAAAAAATGGT	777		

Figura 21. Comparación de la secuencia del fragmento clonado de HSD3B2 sentido dentro de la base de datos NCBI.

Homo sapiens hydroxy-delta-5-steroid dehydrogenase, 3 beta- and steroid delta-isomerase 2 (HSD3B2), transcript variant 2, mRNA
 Sequence ID: [NM_001166120.1](#) Length: 1807 Number of Matches: 1

Range 1: 1027 to 1415 [GenBank](#) [Graphics](#) ▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
702 bits(380)	0.0	386/389(99%)	0/389(0%)	Plus/Minus
Query 13	TGACATCTCCTAACAAATACCCACATGCACATCTCTGTATCCTTAAATCACTGAGTCTTG	72		
Sbjct 1415	TGACATTTCTAACAAATACCCACATGCACATCTCTGTATCCTTAAATCACTGAGTCTTG	1356		
Query 73	GACTTCAGGGTCTCCTTGTGCCGGTCCACAAGGGAAACCAACCACTCCACGGTTTTCTGC	132		
Sbjct 1355	GACTTCAGGGTCTCCTTGTGCCGGTCCACAAGGGAAACCAACCACTCCACGGTTTTCTGC	1296		
Query 133	TTGGCTTCTCCCAAGCTGTAGAGTAGCTTATACGCCAGATCTCGCTGAGCCTTCTTGTA	192		
Sbjct 1295	TTGGCTTCTCCCAAGCTGTAGAGTAGCTTATACGCCAGATCTCGCTGAGCCTTCTTGTA	1236		
Query 193	GAGAAAGTGAACACACTATTTGATAATGTGACTGTGTGGCGGTGAAGGGGGTTGATAG	252		
Sbjct 1235	GAGAAAGTGAACACACTATTTGATAATGTGACTGTGTGGCGGTGAAGGGGGTTGATAG	1176		
Query 253	GAGTAAATTTGGGCTGAGTAGGAAGCTCACTACTTCCAGCAGGAAGCCAATCCAGTACATC	312		
Sbjct 1175	GAGTAAATTTGGGCTGAGTAGGAAGCTCACTACTTCCAGCAGGAAGCCAATCCAGTACATC	1116		
Query 313	AGGGTTAAAGGAAGGTTCCATCTGGAATCAAGGCGGAGGCCAAAACCTTTTGCTCAGGATG	372		
Sbjct 1115	AGGGTTAAAGGAAGGTTCCATCTGGAATCAAGGCGGAGGCCAAAACCTTTTGCTCAGGATG	1056		
Query 373	TAATTAAGGTTATCATAGCTTTGGTGAGG	401		
Sbjct 1055	TAATTAAGGTTATCATAGCTTTGGTGAGG	1027		

Figura 22. Comparación de la secuencia del fragmento clonado de HSD3B2 antisentido dentro de la base de datos NCBI.

En conjunto, los resultados anteriores muestran que se obtuvieron los 6 vectores para producir las sondas en sentido y antisentido para detectar a CYP11A1, HSD3B2 y LHCGR. Los detalles relevantes de estos plásmidos se resumen en la Tabla 3.

Tabla 3. Plásmidos

Gen	Nombre del plásmido	Dirección con respecto T7	Tamaño real en pb	Resultado de la secuenciación (identidad)	Colonia número
CYP11A1	pCYP11A1jetSent	5' → 3'	803	100 %	21
CYP11A1	pCYP11A1jetAntiS	3' → 5'	803	100 %	1
LHCGR	pLHCGRjetSent	5' → 3'	999	100 %	2
LHCGR	pLHCGRjetAntiS	3' → 5'	999	100 %	8
HSD3B2	pHSD3B1jetSent	5' → 3'	819	99 %	3
HSD3B2	pHSD3B1jetAntiS	3' → 5'	819	99 %	6

6.2 Detección del RNA mensajero de CYP11A1, HSD3B2 y LHCGR mediante hibridación cromogénica *in situ*

Después de producir las sondas marcadas con Digoxigenina-UTP mediante transcripción *in vitro*, continuamos con la hibridación. Mantuvimos a las células en cultivo por 48h (tiempo en que los marcadores CYP11A1 y LHCGR se expresan y las células producen progesterona). En la Figura 23 en el panel A se muestra el control sin sonda ni anticuerpo, seguido del control de anticuerpo y la hibridación con la sonda Actina, y en el panel B se observan las imágenes de la hibridación con cada una de las sondas, tanto en anti sentido como en sentido, se muestra una mayor señal con la hibridación con la sonda de CYP11A1, en comparación con la observada con las sondas HSD3B2 y LHCGR, que es menor.

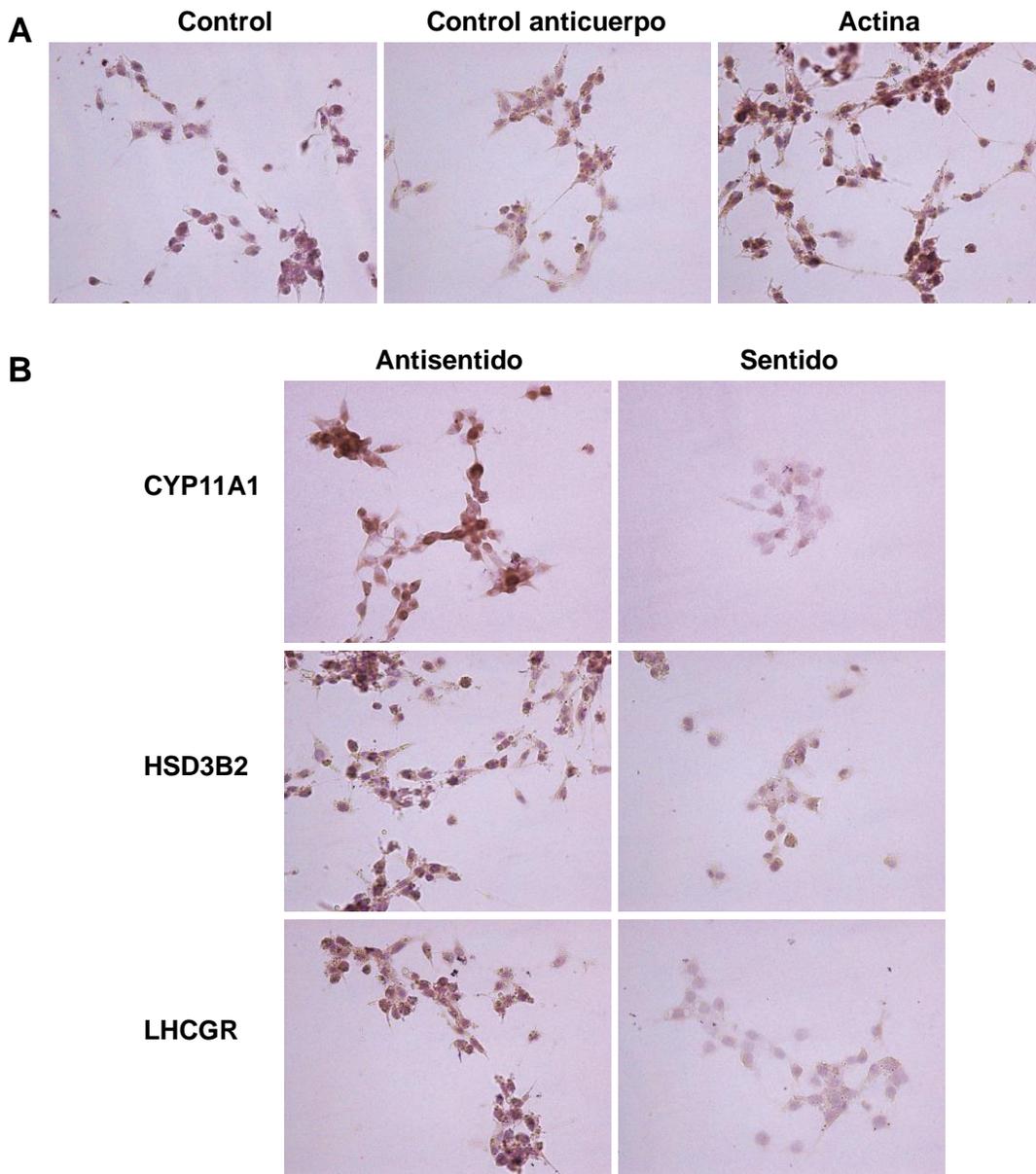


Figura 23. Hibridación cromogénica *in situ* (CISH) de actina y los marcadores murales en un cultivo de 48h de células de la granulosa.

Imágenes representativas del CISH. A) Control sin hibridación con sonda (negativo), control anticuerpo (en medio) e hibridación con la sonda de Actina; B) Hibridación con las sondas en antisentido y sentido para CYP11A1, HSD3B2 y LHCGR. Imágenes obtenidas con el Microscopio de Campo Claro Nikon Eclipse 80i y el programa NIS *Elements Advanced Research*. Objetivo 40x.

6.3 Detección de los marcadores CYP11A1 y LHCGR por inmunofluorescencia indirecta

Tomando en consideración que es de vital importancia para nuestro trabajo determinar cuál es la proporción de células con alta expresión de marcadores murales en las condiciones de cultivo primario de granulosa que hemos establecido, recurrimos al también al inmunomarcaje como segunda alternativa. Las células murales de un cultivo de 48h fueron fijadas con paraformaldehído al 4%. Los pozos de células fijadas se incubaron con el anticuerpo primario, uno correspondiente para CYP11A1 (anticuerpo secundario anti-conejo) y otro para LHCGR (anticuerpo secundario anti-ratón). La fluorescencia se observó en el Microscopio Confocal Leica con el objetivo 40x, obteniendo imágenes de DAPI, FITC y la sobreposición. La Figura 24 muestra las imágenes representativas de la fluorescencia del marcador CYP11A1 y la Figura 25 del marcador LHCGR. Las imágenes muestran que el cultivo de células murales expresa ambos marcadores.

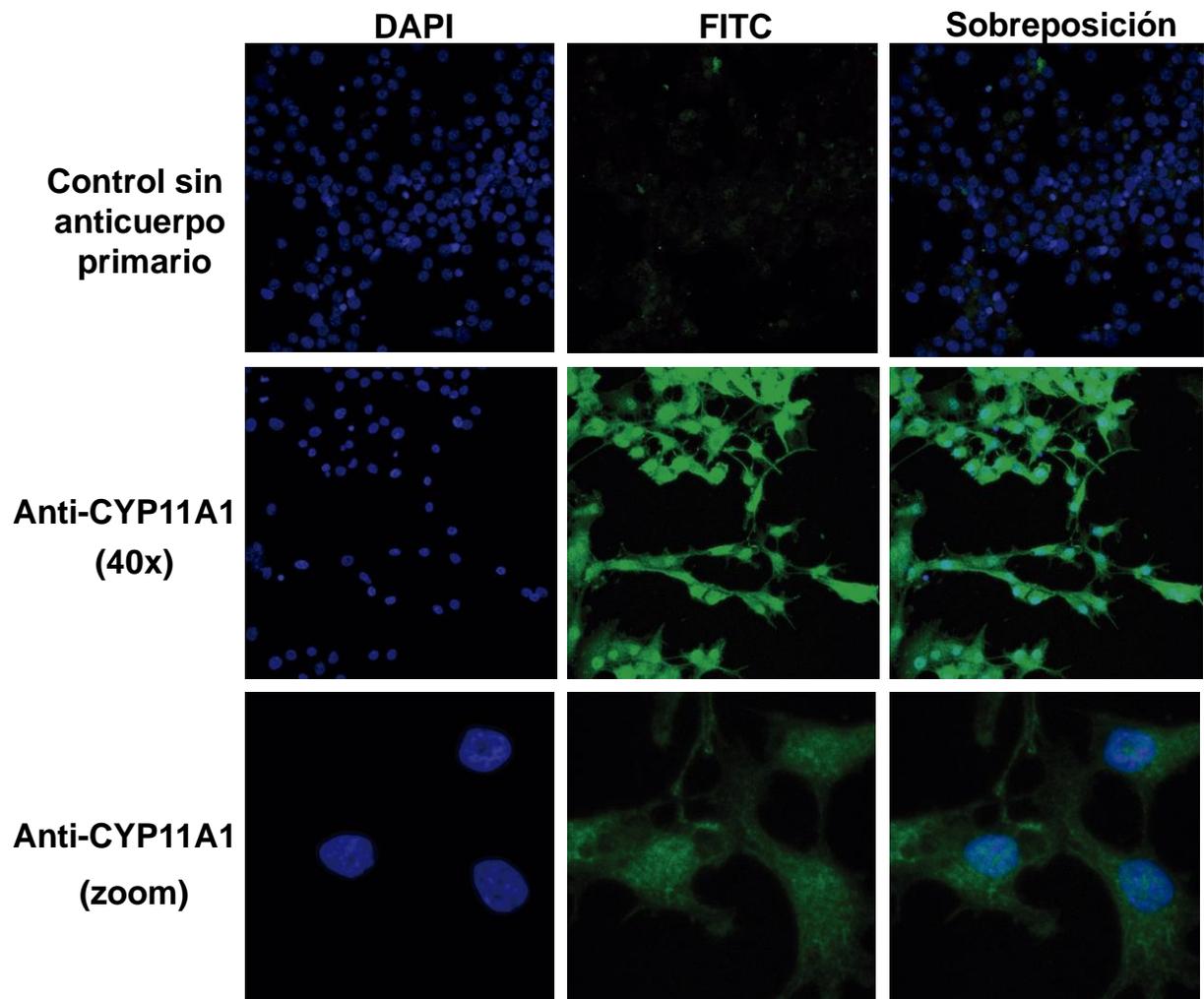


Figura 24. Inmunodetección de CYP11A1 en células murales a las 48 h de cultivo.
 Imágenes representativas de la expresión de CYP11A1 obtenidas con el Microscopio Confocal Leica SP8 y el programa LAS AF. Objetivo 40x y Zoom 2x.

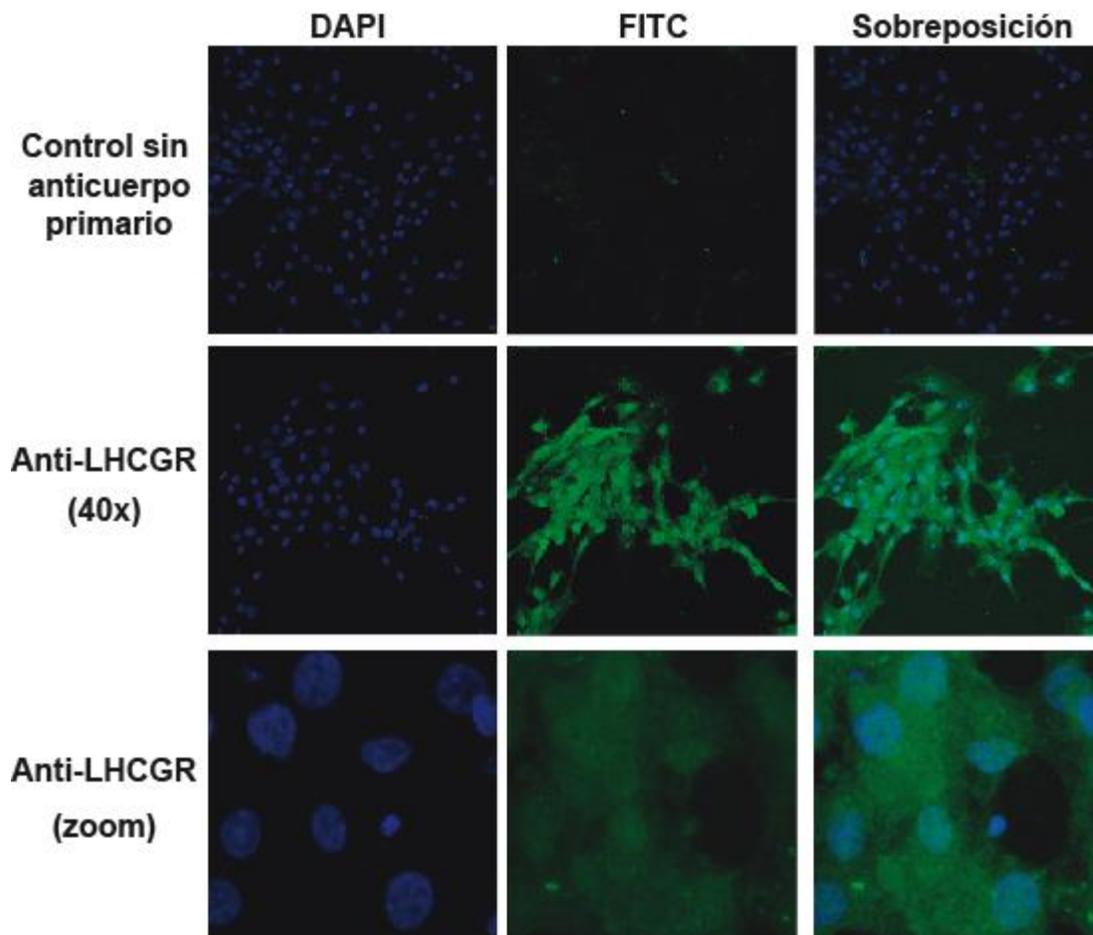


Figura 25. Inmunodetección de LHCGR en células murales a las 48 h de cultivo. Imágenes representativas de la expresión de LHCGR obtenidas con el Microscopio Confocal Leica SP8 y el programa LAS AF. Objetivo 40x y Zoom 2x.

6.4 Caracterización de los tiempos de expresión en el cultivo

El siguiente paso fue determinar el momento en que inicia la expresión de los marcadores y determinar el porcentaje de células que expresan cada marcador, para ello se hizo el inmunomarcaje a las 6, 12, 18, 24 y 48 h de cultivo, se tomaron tres fotos panorámicas de campos diferentes de dos experimentos independientes, para CYP11A1 y LHCGR tal como se muestra en la Figura 26 y 27, respectivamente. De cada foto se contabilizaron las células de las imágenes en DAPI y la sobreposición, finalmente se obtuvo el porcentaje de células que expresan el marcador y se promedió.

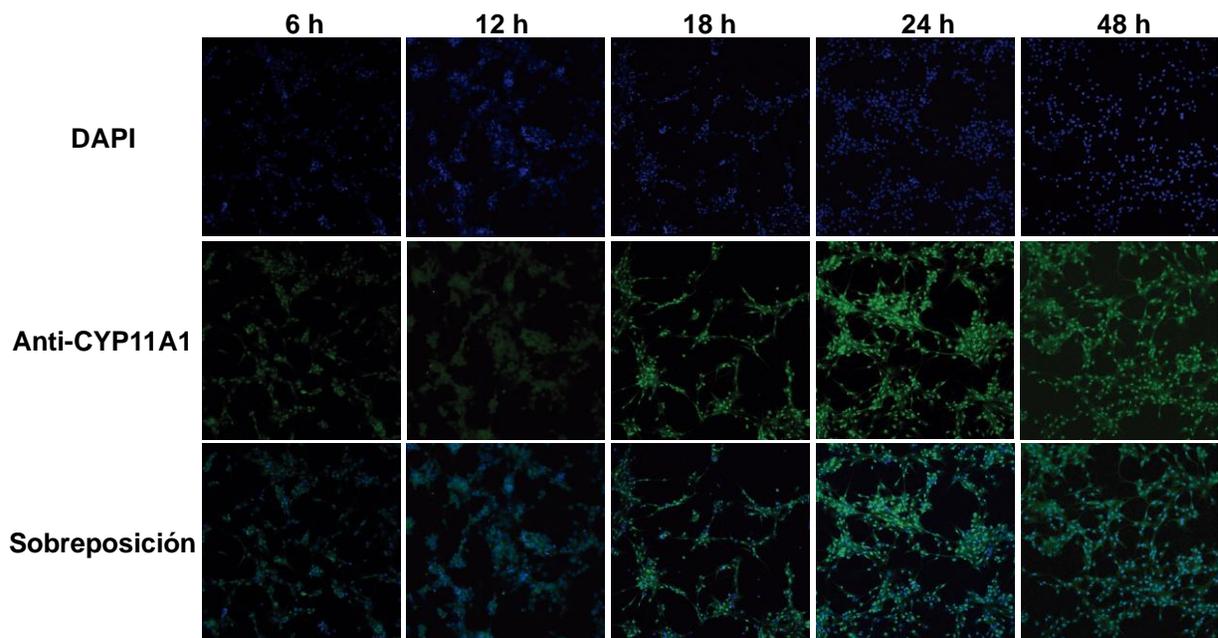


Figura 26. Inmunodetección de CYP11A1 en células murales a diferentes tiempos de cultivo.

Imágenes representativas obtenidas por el Microscopio Confocal Leica SP8. Objetivo 20X. Programa LAS AF.

La Figura 28 muestra el porcentaje de células que expresan a los marcadores CYP11A1 y LHCGR. El cultivo de células de la granulosa expresó al marcador CYP11A1 en un 87.30%, 89.39%, 86.63%, 90.61% y 96.16%, a las 6, 12, 18, 24 y 48 h de cultivo, respectivamente. Por otro lado, el marcador LHCGR se expresó hasta las 24 y 48 h en un 89.07% y 92.84%, respectivamente.

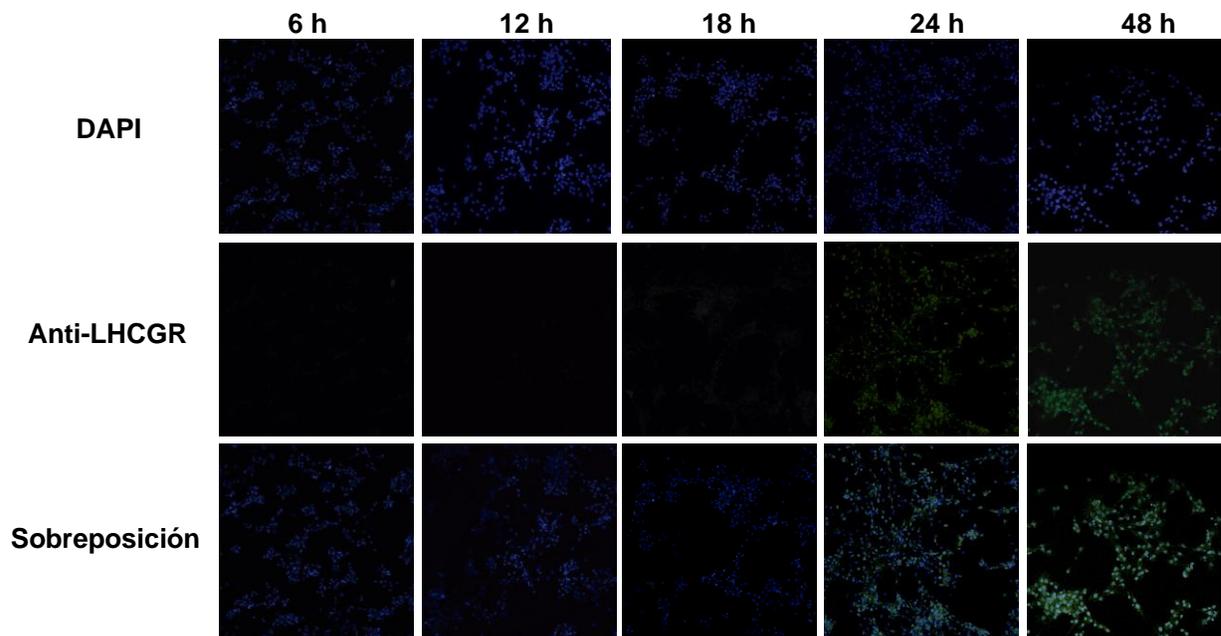


Figura 27. Inmunodetección de LHCGR en células murales a diferentes tiempos de cultivo.

Imágenes obtenidas por el Microscopio Confocal Leica SP8 y con el programa LAS AF. Objetivo 20X.

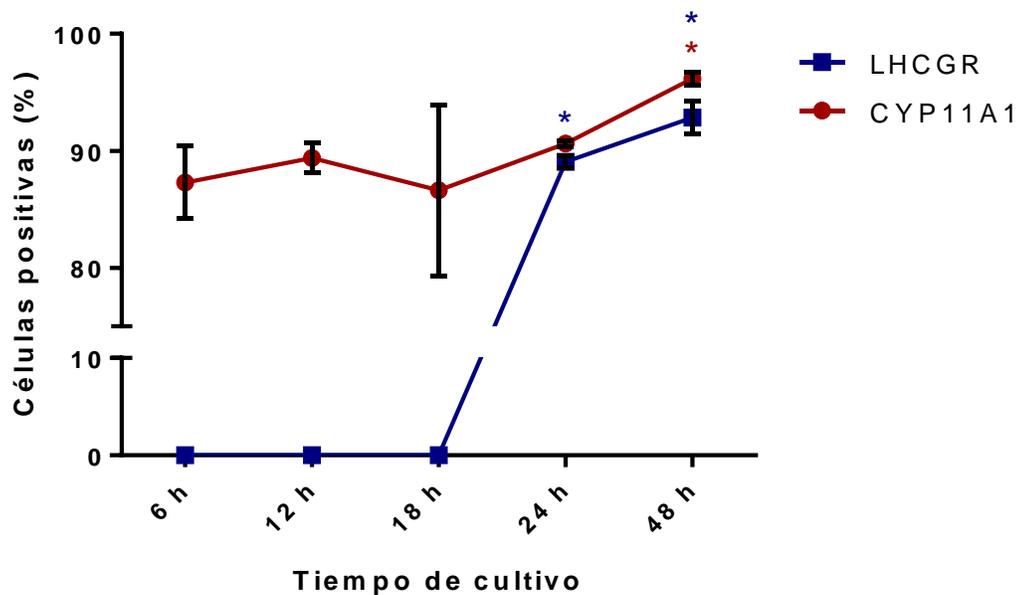


Figura 28. Porcentaje de células que expresan el marcador LHCGR y CYP11A1 en células murales a diferentes tiempos de cultivo.

Cuantificación del número de células tras la inmunodetección de cada marcador en tres campos diferentes y de dos experimentos independientes. Diferencia significativa con respecto al tiempo inicial evaluado (6h): (*) $p < 0.0001$; análisis por ANOVA de dos vías y prueba post hoc Bonferroni. Los resultados están representados como la media \pm la desviación estándar (n=6).

6.5 Exposición a los compuestos reprotóxicos

6.5.1 Determinación de la viabilidad celular del cultivo tras la exposición a compuestos reprotóxicos mediante el ensayo MTT

Para determinar los efectos de la exposición continua a los compuestos reprotóxicos metilparabeno (MPB), butilparabeno (BPB) y bisfenol A (BPA), el cultivo fue expuesto desde el momento de la siembra, utilizando las concentraciones 657 nM, 20 nM y 500 nM. Estas son concentraciones de relevancia ambiental, que fueron seleccionadas arbitrariamente por ser las más altas encontradas en la literatura, mismas que se evaluaron en el trabajo de Herrera-Cogco [39]. Mediante el ensayo de MTT, se determinó la viabilidad del cultivo a las 24 h, 48 h, 72 h y 96 h de exposición. La Figura 29 muestra el porcentaje de viabilidad de cada uno de los tratamientos, normalizando los datos contra el control vehículo (DMSO, 24 h). Se observa que el cultivo se mantuvo estable con el vehículo (DMSO), y de la misma manera, la exposición con los parabenos o con BPA no afectó la viabilidad del cultivo, al ser comparados con el vehículo.

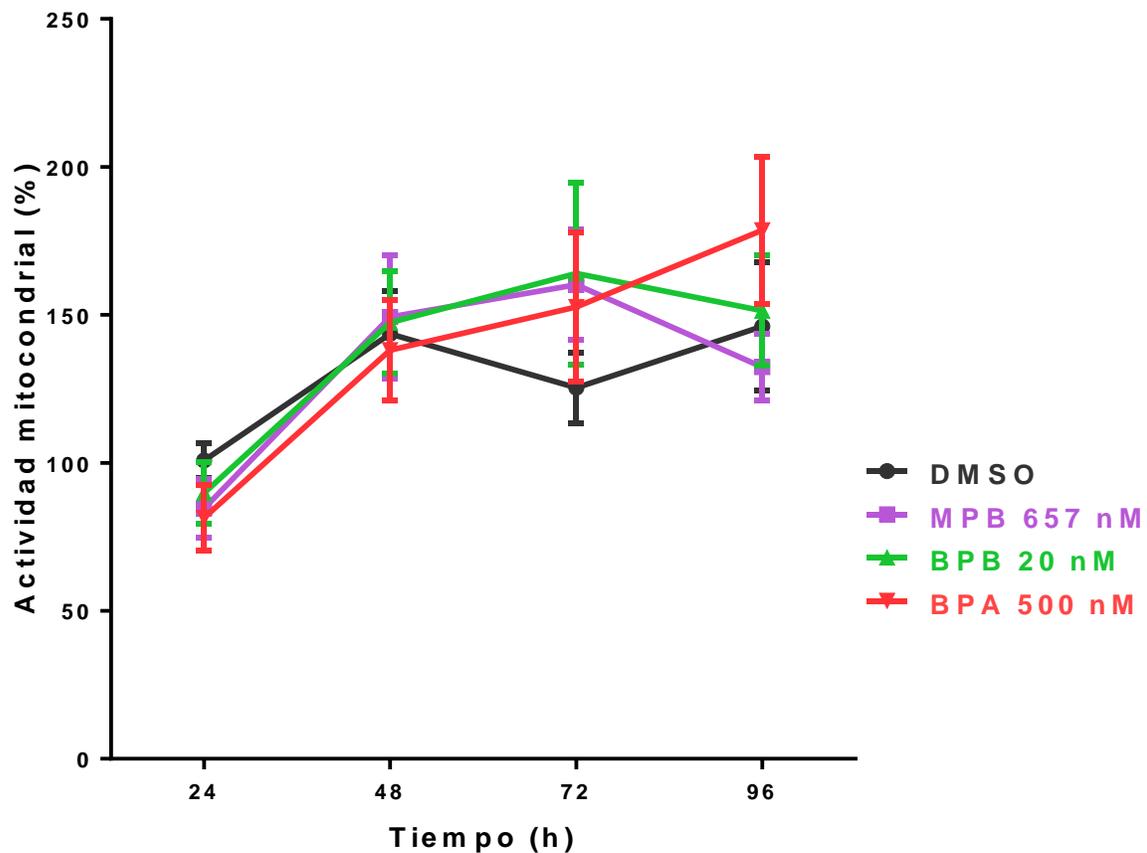


Figura 29. Ensayo de MTT en células de la granulosa tratadas desde la siembra con los compuestos reprotóxicos por diferentes tiempos.

Exposición a metilparabeno (MPB) 657 nM, butilparabeno (BPB) 20 nM y bisfenol A (BPA) 500 nM, a partir de la siembra. Los datos fueron normalizados contra el control vehículo (DMSO, 24h). Análisis por ANOVA de dos vías con comparación múltiple de cada compuesto contra DMSO dentro de cada punto del tiempo, seguido de una prueba post hoc Bonferroni. Los resultados están representados como la media \pm la desviación estándar (n=9).

6.5.2 Efecto de los compuestos reprotóxicos sobre la producción de progesterona

Durante cada tiempo de exposición del cultivo a los compuestos reprotóxicos se colectó el medio de cultivo y se analizó la producción de progesterona. La Figura 30 muestra la progesterona producida por las células de la granulosa expuestas a los diferentes tratamientos; los datos fueron normalizados contra el control que fue tratado solamente con el vehículo (DMSO, 24 h). Se muestra en la figura que la producción de

progesterona aumentó con el tiempo, permaneciendo estacionario de las 72 h a las 96 h, sin mostrar diferencia significativa en entre los compuestos.

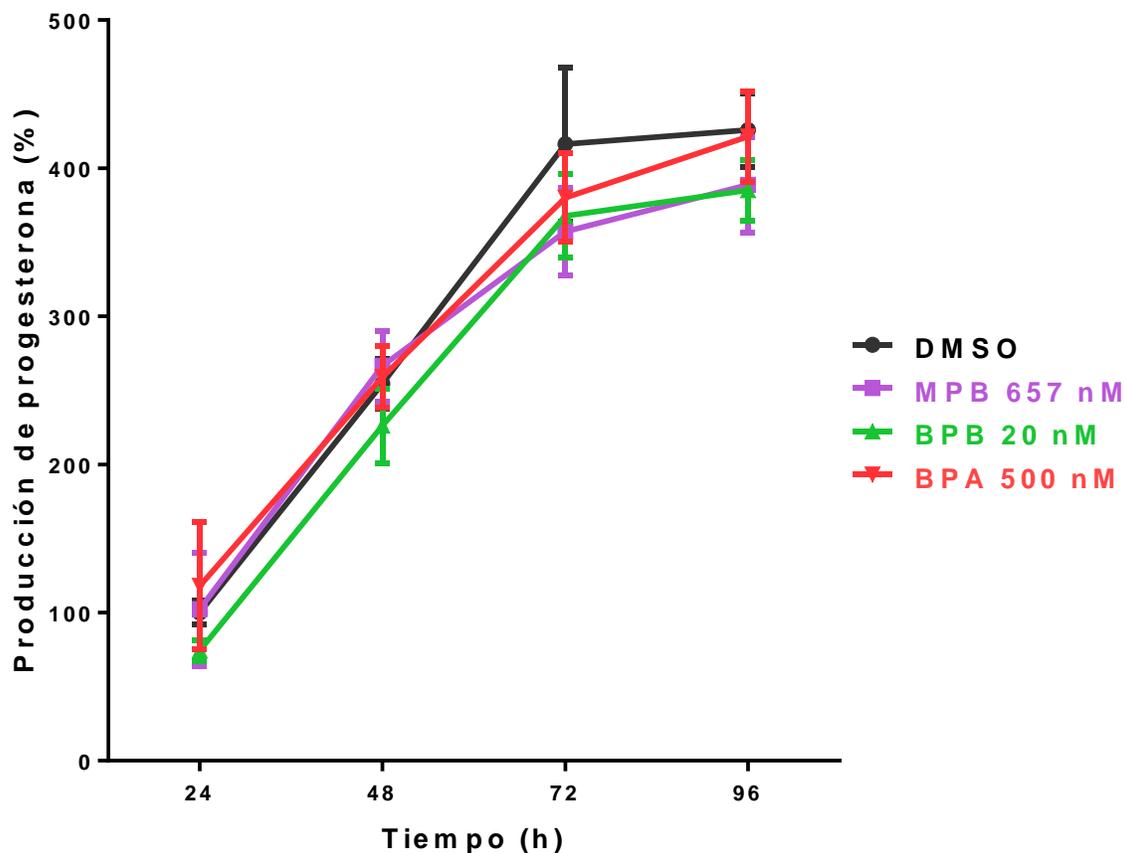


Figura 30. Efecto de los compuestos reprotóxicos sobre la producción de progesterona en células de la granulosa.

Las células de la granulosa fueron tratadas desde la siembra con metilparabeno (MPB) 657 nM, butilparabeno (BPB) 20 nM y bisfenol A (BPA) 500 nM, por diferentes tiempos. Los datos fueron normalizados contra el control vehículo (DMSO, 24h). Análisis por ANOVA de dos vías con comparación múltiple de cada compuesto contra DMSO dentro de cada punto del tiempo, seguido de una prueba post hoc Bonferroni. Los resultados están representados como la media \pm la desviación estándar (n=9).

7. Discusión

Los compuestos tóxicos que son capaces de atravesar la membrana basal pueden tener acceso al ovario mediante la circulación; en estas circunstancias, el ovocito puede ser afectado. Las células de la granulosa participan en la maduración del ovocito y, la sola afectación a las células de la granulosa o de la teca por sustancias tóxicas podría modificar el desarrollo normal del ovocito [40], resultando en problemas de fertilidad.

Los disruptores endócrinos (DEs) pueden interferir en la función esteroidogénica de las células murales afectando al desarrollo del ovocito [41], lo que hace necesario estudiar y caracterizar a detalle los efectos de estas sustancias, ya que la exposición humana a estos compuestos es inevitable por encontrarse ampliamente dispersos en el ambiente [42]. Entre estos compuestos se encuentran los parabenos, considerados como DEs, y usados como conservadores en productos de tocador, farmacéuticos, cosméticos y alimentos.

Los parabenos han sido estudiados tanto en sistemas *in vivo* como *in vitro* para examinar su actividad estrogénica. Los datos de ambos sistemas son valiosos para evaluar el riesgo en humanos. Los datos *in vivo* proveen evidencia de cómo las sustancias activas son influenciadas por la absorción, distribución, metabolismo y excreción en un animal intacto [43]. Los efectos de los parabenos sobre la función interna de los órganos en la mayoría de los estudios se han enfocado en el uso de modelos animales para evaluar los efectos generales de parabenos, pero lo han hecho a dosis muy altas [44]. El Comité Científico sobre Seguridad del Consumidor discute que el uso de las ratas puede ser un modelo pobre para evaluar y extrapolar los posibles efectos nocivos de estos compuestos en humanos, ya que las ratas tienen una tasa metabólica mayor [45]. A continuación, se muestra una tabla que describe las fortalezas y debilidades de cada estudio en que se han empleado los parabenos como disruptores endócrinos en modelo *in vivo*.

Tabla 4. Comparación entre estudios *in vivo*

Autores	Diseño de estudio	Resultado concreto	Fortaleza	Debilidad
Vo, <i>et al.</i> 2010 [46]	Rata Sprague-Dawley hembra en periodo juvenil prepuberal. Metil-, etil-, propil-, isopropil-, butil- e isobutilparabeno. Vía oral. 62.5, 250, 1000 mg/kg peso/día.	Ovarios: adelgazamiento del epitelio folicular. Útero: hipertrofia miometrial. Suero: Disminución de estradiol.	Mostrar la actividad estrogénica de los parabenos sobre el sistema reproductivo del animal en determinada etapa de desarrollo.	Falta la evaluación sistémica de los efectos fisiológicos y patológicos.
Ahn, <i>et al.</i> 2012 [47]	Rata Sprague-Dawley hembra neonatal. Metil-, propil- y butilparabeno. Vía subcutánea. 62.5, 250, 1000 mg/kg peso/día.	Histología: disminuyó el número de folículos primarios tempranos. Ovario: disminuyó el mRNA de STAR. El mRNA de CYP11A1 fue regulado negativamente a altas dosis.	Demstrar la actividad estrogénica de los compuestos.	Carece de la evaluación de enzimas esteroidogénicas en tejido completo.
Boberg, <i>et al.</i> 2016 [48]	Rata Wistar hembra adulta joven. Preñadas. Vía oral. 10, 100, 500 mg/kg peso/día	Descendencia femenina: la distancia anogenital y el peso de ovarios disminuye.	Mostrar el efecto que ejerce como disruptor endócrino en descendencia femenina y masculina.	No evaluaron la expresión de las enzimas esteroidogénicas en hembras.
Pollock, <i>et al.</i> 2017 [49]	Ratones CF-1 hembras y machos. 2.5-4 meses de edad. Dieta: 50 µg/kg de ¹⁴ C-BPA. Propil- y butilparabeno. Vía subcutánea. Hembras:3.4,15.4 mg/kg Machos:2.6, 12.7 mg/kg	Bultiparabeno induce un aumento de ¹⁴ C-BPA en suero y tejido reproductivo en hembras y machos. Propilparabeno: eleva las concentraciones de ¹⁴ C-BPA en útero.	Estudiar la farmacocinética del compuesto.	Falta explorar otras vías de administración. Se usaron dosis mayores que los niveles típicos en el público en general.

Haciendo especial referencia en el impacto sobre el sistema reproductivo femenino, como blanco de acción de los parabenos, Ahn et al. no evaluaron la producción de progesterona, pero sí analizaron la expresión de las enzimas esteroidogénicas. En un modelo de ratas hembras neonatas de la cepa Sprague-Dawley tratadas con MPB, PBP y BPB a diferentes concentraciones vía subcutánea. Mostraron una disminución en el mRNA de StAR y CYP11A1 fue regulado positivamente a bajas dosis pero a altas dosis fue regulado negativamente; el análisis de estos marcadores en el tejido total de ovario, asociando este efecto con modificaciones en el desarrollo de la foliculogénesis [47]. Cabe resaltar que la expresión de los marcadores no estaba delimitada a las células murales, ya que fue en el tejido total de ovario, donde se encuentran las células de la cúmulo, murales y de la teca, teniendo éstas dos últimas la función de la producción de hormonas.

En otro estudio, Vo et al. evaluaron el efecto de diferentes parabenos en ratas de la cepa Sprague-Dawley, administrados por vía oral a 62.5, 250 y 1000 mg/kg, mostrando una disminución en la concentración sérica de estradiol a la dosis más alta de etilparabeno e isopropilparabeno y, evidenciaron cambios histológicos tanto en ovarios como en útero [46]. Sin embargo, no evaluaron la función esteroidogénica específica de las células murales ni la expresión de las enzimas involucradas en la producción de progesterona. Eventualmente, el efecto que observaron en tejido podría tener consecuencias sobre la foliculogénesis, proceso involucrado en el desarrollo de las células de la granulosa y el ovocito.

A diferencia de los trabajos anteriores, Okubo et al. estudiaron el efecto de distintos parabenos en una línea celular de cáncer de mama, las células MCF-7, evidenciando un aumento en la expresión génica del receptor de progesterona y una disminución en la expresión del receptor de estrógenos (RE) α ; también observaron que los parabenos con la cadena lateral más larga tienen mayor afinidad para el receptor de estrógenos con valores de afinidad de unión relativa similares con RE α y RE β [35]. Por otro lado, se ha mostrado que los parabenos tienen mayor preferencia por RE β [50]. Uno de los mecanismos que puede ejercer un disruptor endócrino es actuar como agonista o antagonista al comportarse como ligando y unirse a receptores

nucleares. El estrógeno es el ligando que se une al RE α o β , dimerizándose como receptor-ligando, se transloca al núcleo para ejercer como factor de transcripción, se une al elemento de respuesta a estrógenos (ERE) en el ADN, y actúa como un activador transcripcional que promueve la expresión génica [51]. ER α se expresa principalmente en tejidos reproductivos (útero, ovarios), riñón, hueso, mama, tejido adiposo blanco e hígado, mientras que ER β se encuentra en ovario, sistema nervioso central, sistema cardiovascular, pulmón, próstata, colon, riñón y sistema inmune [52]. En ovario, RE β se expresa predominantemente en células de la granulosa, células de la teca, epitelio superficial y en el cuerpo lúteo [53, 54]. Britt *et. al.* hipotetizan que la unión de estrógeno con el RE α ejerce una acción proliferativa, mientras que la unión con RE β tiene un efecto diferenciador [55]. Al evaluar la expresión de genes involucrados en la diferenciación en un modelo de ratón *knockout* al RE β en ovario, mostraron una disminución en la expresión de la aromatasa, del receptor LH y Ptgs2 [56]. Por el modelo que estamos empleando es posible que los parabenos se estén uniendo al RE β con mayor preferencia, lo que podría resultar en un efecto agonista y con una acción diferenciadora, sin embargo, con ningún parabeno ni con BPA se mostró diferencia significativa en la producción de progesterona (Figura 30).

Todos estos estudios están dirigidos a definir la situación fisiológica normal y anormal de la situación humana, lo que hace relevante tener un modelo de origen humano que nos permita entender la regulación de la esteroidogénesis y la reproducción. Debido a las diferencias específicas de especie en la regulación espacial y temporal de la esteroidogénesis en ovario, es importante conocer los mecanismos en la esteroidogénesis en ovario humano [57]. Pero son pocos los trabajos donde estudian esta función en cultivo de células humanas, uno de ellos es el trabajo de Guerra *et al.*, ellos evaluaron la producción de progesterona al exponer al cultivo con BPB a diferentes concentraciones (10 nM, 100 nM, 1 μ M y 10 μ M) desde 24h a 96h de exposición, al analizar cada tiempo de exposición comparando con el vehículo, no mostraron cambios la producción de la hormona [58].

Hemos desarrollado un cultivo primario de células de la granulosa humana, que eventualmente puede manipularse para tener sólo cúmula (evitando la diferenciación)

o células murales productoras de progesterona. Como parte de la tesis doctoral de Herrera-Cogco se evaluaron marcadores transcripcionales propios de cada uno de los dos posibles tipos celulares que se derivan de la granulosa humana y la función esteroidogénica del cultivo. Se demostró que las células son murales a partir de las 18 h de cultivo al evaluar la expresión del mRNA de LHCGR y CYP11A1 mediante RT-qPCR en el cultivo total y hay producción de progesterona [39]. Para finalizar con la caracterización del cultivo, era fundamental mostrar la proporción de células murales sobre las células de la cúmula. En este sentido, propusimos dos técnicas que nos permitieran detectar la expresión de los marcadores en cada tipo celular, la hibridación cromogénica in situ (RNA-CISH) y la inmunodetección indirecta. El análisis con RNA-CISH provee información de la expresión de genes específicos en tejido y células, y a diferencia de la RT-qPCR, nos muestra la localización subcelular del mRNA. En la técnica de RNA-CISH se emplean sondas específicas de RNA marcadas y tienen la ventaja de su uso universal para casi cualquier gen y en cualquier especie una vez dominada la técnica.

La expresión de la proteína o el mRNA de LHCGR hace la diferencia entre el fenotipo de células murales de células de la cúmula en folículos preovulatorios, considerándolo como un marcador de este fenotipo. Los ovocitos suprimen la expresión de mRNA de LHR inducida por la hormona FSH en células de la granulosa, siendo dependiente de la etapa de desarrollo del ovocito [61]. En este sentido, las células que no están en contacto con el ovocito comienzan a expresar a este marcador. CYP11A1 es la enzima involucrada en el primer paso de la vía esteroidogénica, encargada de convertir el colesterol en pregnolonona localizándose en mitocondria, y finalmente la enzima HSD3B se encuentra río abajo de la vía esteroidogénica, encargada de convertir la pregnolonona a progesterona [62], considerando a ambas enzimas como marcadores murales. Cada uno de ellos participa en la producción de progesterona que, en conjunto nos ayuda a evaluar la vía, pero al estudiar individualmente a cada marcador nos da un acercamiento para proponer el mecanismo que pudiera afectar en cada nivel.

En la hibridación del cultivo de 48h técnica RNA-CISH, observamos un comportamiento similar a los resultados obtenidos en la expresión de los genes

mediante la técnica de RT-qPCR [39], la expresión de CYP11A1 con un color café más intenso en comparación con LHCGR. HSD3B2 fue el gen que agregamos para la hibridación, en las imágenes se mostró en similitud en la intensidad que con LHCGR. De igual manera, la inmunodetección indirecta mostró la expresión de estos marcadores a las 48h de cultivo de células de granulosa indicando que el cultivo es de células murales. De acuerdo con los resultados, a las 24 h las células son murales ya que cerca del 90% de las células expresan a ambos marcadores, aumentando este porcentaje a las 48h. En este punto, añadimos la pieza faltante donde mostramos que arriba del 90% de las células en el cultivo expresan homogéneamente a los marcadores LHCGR y CYP11A1.

Los compuestos reprotóxicos ejercen su toxicidad por interferir con el mecanismo de la homeostasis normal de hormonas esteroideas. La acción clásica con respecto al sistema reproductivo involucra: 1) la interferencia de estos compuestos con la unión de la hormona con el receptor correspondiente, notablemente con el receptor de andrógenos (AR) o con el receptor de estrógenos (ER); 2) la unión al receptor, en este caso el compuesto puede tener dos tipos de respuesta, hormonal o efecto agonista, y bloqueo de la respuesta hormonal, que se denomina efecto antagonista; 3) el actuar sobre las enzimas implicadas en la esteroidogénesis y el metabolismo de las hormonas [42]. Estos compuestos, al tener el potencial para afectar el desarrollo del tracto reproductivo humano dependiente de hormonas esteroideas, pueden cambiar el proceso celular por la unión a receptores nucleares de hormonas esteroideas y activar vías genómicas y no genómicas, activar canales de iones, inducir citocinas y quimiocinas proinflamatorias, promover estrés oxidante, y alterar la proliferación y diferenciación celular. También pueden actuar a través de receptores de hormonas no esteroideas (por ejemplo, receptor de tiroides ThR y GPR30). También hay evidencia que sugiere mecanismos epigenéticos, en donde se incluyen la metilación del ADN, modificaciones de histonas y la expresión de micro-ARN, se encuentran involucradas [59]. Como resultado, se afecta la expresión de genes, y la función celular y tisular. Considerando que los cambios en la metilación/desmetilación que ocurren durante la gametogénesis y embriogénesis [60], el impacto de los DEs puede ser significativo para los sucesos reproductivos a través de las generaciones.

La seguridad que debe tenerse en el uso de los parabenos amerita un análisis detallado de las razones por las que se les considera esteroideogénicos y para ello un modelo celular permite variar parámetros dentro del cultivo de una manera altamente controlada, ofreciendo una evaluación más exhaustiva de los estudios de toxicidad reproductiva a diferencia de los estudios *in vivo*; además, es posible estudiar los mecanismos de acción de los tóxicos y analizar de qué manera contribuyen al daño. Todo lo anterior se logra con eficacia al contar con un modelo celular bien caracterizado, es decir, que mimetice lo más posible la función de las células *in vivo*. Los cultivos celulares son capaces de responder a la acción de factores producidos endógenamente, así como de componentes químicos exógenos y permite dilucidar los mecanismos tóxicos a lo largo de un sistema aislado con pruebas de un amplio rango de dosis o mezclas de DEs [60].

Empleando este cultivo primario se pueden evaluar todos estos aspectos en las células murales; en este trabajo se ha evaluado el efecto de butilparabeno (BPB) a 20 nM, metilparabeno (MPB) a 657 nM y bisfenol A (BPA) a 500 nM (concentraciones de relevancia ambiental y utilizada en varios trabajos). En el trabajo de Herrera-Cogco las células fueron expuestas por 24 h dentro de la ventana entre las 24 a 48h de cultivo y no se registraron cambios en la producción de progesterona ni de la expresión de los genes esteroideogénicos [39]. Considerando que las células ya eran murales durante la exposición a los compuestos, decidimos estudiar el efecto de la exposición a partir de la siembra y determinar si una exposición continua afecta la producción de células murales competentes para hacer esteroideogénesis.

Primero evaluamos la cinética de la viabilidad del cultivo con cada uno de los tratamientos a diferentes tiempos de cultivo. Para ello empleamos el ensayo de MTT, el cual es ampliamente conocido como un método para evaluar la viabilidad celular y toxicidad. Se basa en la conversión de tetrazolio soluble (una sal amarilla) a formazán insoluble (color morado) por la enzima succinato deshidrogenasa de células viables [61]. Los parabenos de cadena corta son menos potentes que los compuestos con cadena larga, mostrando el siguiente patrón de potencia: isobutilparabeno > isopropilparabeno > bencilparabeno > butilparabeno > propilparabeno > etilparabeno

> metilparabeno [43]. En el ensayo de viabilidad del cultivo con los parabenos y BPA, no se mostró afectación con ningún compuesto, aun cuando las células fueron expuestas desde el inicio el cultivo (Figura 29).

Al evaluar el efecto de los compuestos sobre la función esteroidogénica del cultivo, es decir, la cinética de la producción de progesterona, ninguno de los compuestos reprotóxicos afectó la producción de la hormona. Por otro lado, el mantener a las células con el mismo medio puede ser la razón por el cese la producción de progesterona después de las 72 h, es decir, durante el transcurso de este tiempo van disminuyendo los nutrientes requeridos por las células, por lo que la producción de la hormona permanece estacionaria las últimas 24 h de cultivo (96 h). Pocos son los trabajos donde estudian la esteroidogénesis en cultivo de células humanas. En el trabajo de Guerra *et al.*, la producción de progesterona, al exponer al cultivo con BPB a diferentes concentraciones (10 nM, 100 nM, 1 μ M y 10 μ M) desde 24h a 96h de exposición, analizaron cada tiempo de exposición comparando con el vehículo y, formalmente estos autores no reportan cambios la producción de la hormona [58]. En el estudio de Taxvig *et al.*, emplearon células H295R de adenocarcinoma humano para el ensayo de esteroidogénesis, y a las 48h de exponerlas a EPB y BPB mostraron que estos compuestos aumentaron la producción de progesterona [62], sin embargo utilizaron una línea celular distinta. La activación de LHCGR es relevante para la esteroidogénesis, siendo el RE β el que contribuye en su expresión [63] y, a pesar de que los parabenos tienen afinidad por este receptor, en el presente trabajo, los parabenos no afectaron ni la viabilidad ni la función de las células. En este modelo de células murales humanas, se ha hecho una cuidadosa evaluación de estos tres compuestos reprotóxicos ([39] y este trabajo) y no encontramos evidencia de afectación sobre el proceso de esteroidogénesis.

8. Conclusiones

Con respecto a la caracterización del modelo de cultivo de células de la granulosa humana:

- A las 48h de cultivo, las células expresan homogéneamente a los mensajeros de LHCGR, CYP11A1 y HSD3B2, es decir el cultivo es de células murales.
- De las 24h a las 48h de cultivo, la inmunodetección indirecta de CYP11A1 y de LHCGR nos mostró que el 95% de las células son murales.

La exposición a los compuestos reprotóxicos BPB, MPB y BPA, de manera continua (hasta las 96h) y desde el momento de la siembra no afecta la actividad mitocondrial y no hay cambios significativos en la producción de progesterona.

9. Perspectivas

- Usar el modelo de cultivo de células murales caracterizado en este trabajo para evaluar tóxicos que afecten la esteroidogénesis ovular. En las células murales se puede analizar la expresión de otras enzimas involucradas en la esteroidogénesis, como CYP19A1 y HSD17B y del Receptor de Estrógenos β para la producción de estradiol.
- Emplear el cultivo de células de la granulosa que se encuentran como células de la cúmula para evaluar el efecto de los compuestos tóxicos sobre su función (metabolismo, aporte de nutrientes), y analizar el resultado sobre la producción de células murales competentes.
- Estudiar el estado de resistencia a la insulina que contribuyen al ovario poliquístico, que es causa importante de infertilidad.

10. Bibliografía

1. Stuart, I.F., *Fisiología Humana*. 12° ed. 2011.
2. Lintern-Moore, S. and G.P.M. Moore, *The initiation of follicle and oocyte*. Biology of Reproduction, 1979. **20**: p. 773-778.
3. Skinner, M.K., *Regulation of primordial follicle assembly and development*. Hum Reprod Update, 2005. **11**(5): p. 461-71.
4. Albertini, D.F., et al., *Cellular basis for paracrine regulation of ovarian follicle development*. Reproduction, 2001. **121**: p. 647-653.
5. Gilchrist, R.B., M. Lane, and J.G. Thompson, *Oocyte-secreted factors: regulators of cumulus cell function and oocyte quality*. Hum Reprod Update, 2008. **14**(2): p. 159-77.
6. Sanchez, F. and J. Smits, *Molecular control of oogenesis*. Biochim Biophys Acta, 2012. **1822**(12): p. 1896-912.
7. Palermo, R., *Differential actions of FSH and LH during folliculogenesis*. Reproductive BioMedicine 2007. **15**(3): p. 326-337.
8. Russell, D.L. and R.L. Robker, *Molecular mechanisms of ovulation: coordination through the cumulus complex*. Hum Reprod Update, 2007. **13**(3): p. 289-312.
9. Hannon, P.R. and J.A. Flaws, *The effects of phthalates on the ovary*. Front Endocrinol (Lausanne), 2015. **6**: p. 8.
10. Penning, T.M., *Molecular endocrinology of hydroxysteroid dehydrogenases*. Endocrine Reviews, 1997. **18**(3): p. 281-305.
11. Hanukoglu, I., *Steroidogenic enzymes: structure, function, and role in regulation of steroid hormone biosynthesis*. J Steroid Biochem. Molec. Biol., 1992. **43**(8): p. 779-804.
12. Rihards, J.S., *Maturation of ovarian follicles: actions and interactions of pituitary and ovarian hormones on follicular cell differentiation*. Physiological Reviews, 1980. **60**(1): p. 51-89.
13. Falck, B., *Site of production of oestrogen in the ovary of the rat*. Nature, 1959. **184**: p. 1082.
14. Gilchrist, R.B., L.J. Ritter, and D.T. Armstrong, *Oocyte-somatic cell interactions during follicle development in mammals*. Anim Reprod Sci, 2004. **82-83**: p. 431-46.
15. Sutton-McDowall, M.L., R.B. Gilchrist, and J.G. Thompson, *The pivotal role of glucose metabolism in determining oocyte developmental competence*. Reproduction, 2010. **139**(4): p. 685-95.
16. Sutton, M.L., R.B. Gilchrist, and J.G. Thompson, *Effects of in-vivo and in-vitro environments on the metabolism of the cumulus-oocyte complex and its influence on oocyte developmental capacity*. Human Reproduction Update, 2003. **9**(1): p. 35-48.
17. Mascarenhas, M.N., et al., *National, regional, and global trends in infertility prevalence since 1990: a systematic analysis of 277 health surveys*. PLoS Med, 2012. **9**(12): p. e1001356.
18. Villagómez, P. and J.A. Valencia, *Perfiles de Salud Reproductiva*, in Consejo Nacional de Población. 2011.

19. de Mouzon, J., et al., *Assisted reproductive technology in Europe, 2006: results generated from European registers by ESHRE*. Hum Reprod, 2010. **25**(8): p. 1851-62.
20. UNFPA, *Programme of action. Adopted at the International Conference on Population and Development, Cairo, 5-13. September 1994*. United Nations Population Fund, 1994.
21. González-Cervera, A.S., *Subfecundidad e infertilidad en mujeres mexicanas*. Papeles de Población, 2006(50): p. 277-291.
22. Braverman, A.M., *Psychosocial aspects of infertility: sexual dysfunction*. International Congress Series, 2004. **1266**: p. 270-276.
23. Monga, M., et al., *Impact of infertility on quality of life, marital adjustment, and sexual function*. Urology, 2004. **63**(1): p. 126-130.
24. ASRM. *Infertilidad y fertilidad: Generalidades*. 2012; Available from: <https://www.nichd.nih.gov/espanol/salud/temas/infertility/informacion/Pages/trastornos.aspx>.
25. Rattan, S., et al., *Exposure to endocrine disruptors during adulthood: consequences for female fertility*. J Endocrinol, 2017. **233**(3): p. R109-R129.
26. Hu, P., et al., *Effects of parabens on adipocyte differentiation*. Toxicol Sci, 2013. **131**(1): p. 56-70.
27. *Regulation (EC) No 1223/2009 of the European Parliament and of the Council of 30 November 2009*. Official Journal of the European Union, 2009.
28. Andersen, A., *Final amended report on the safety assessment of methylparaben, ethylparaben, propylparaben, isopropylparaben, butylparaben, isobutylparaben, and benzylparaben as used in cosmetic products*. International Journal of Toxicology, 2008. **27**(4): p. 1-82.
29. Soni, M.G., I.G. Carabin, and G.A. Burdock, *Safety assessment of esters of p-hydroxybenzoic acid (parabens)*. Food Chem Toxicol, 2005. **43**(7): p. 985-1015.
30. Jewell, C., et al., *Inter-individual variability in esterases in human liver*. Biochem Pharmacol, 2007. **74**(6): p. 932-9.
31. Calafat, A.M., et al., *Parabens as Urinary Biomarkers of Exposure in Humans*. Environmental Health Perspectives, 2006.
32. Turgeon, D., et al., *Glucuronidation activity of the UGT2B17 enzyme toward xenobiotics*. Drug Metabolism and Disposition, 2003. **31**(5): p. 670-676.
33. Abbas, S., et al., *Metabolism of Parabens (4-Hydroxybenzoic Acid Esters) by Hepatic Esterases and UDP-Glucuronosyltransferases in Man*. Drug Metabolism and Pharmacokinetics, 2010. **25**(6): p. 568-577.
34. Routledge, E.J., et al., *Some alkyl hydroxy benzoate preservatives (Parabens) are estrogenic*. Toxicology and Applied Pharmacology, 1998. **153**: p. 12-19.
35. Okubo, T., et al., *ER-dependent estrogenic activity of parabens assessed by proliferation of human breast cancer MCF-7 cells and expression of ER-alfa and PR*. Food and Chemical Toxicology, 2001. **39**: p. 1225-1232.
36. *Antibody CYP11A1 NBP1-54758*.
37. *Antibody LHCGR NBP2-53276*.
38. National Center for Biotechnology Information, U.S.N.L.o.M.
39. Herrera Cogco, E., *Determinación de parabenos en líquido folicular y sus efectos sobre biomarcadores de calidad ovular en células de la cúmula*, in

- Toxicología*. 2018, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional.
40. Stefansdottir, A., et al., *Use of ovary culture techniques in reproductive toxicology*. *Reprod Toxicol*, 2014. **49**: p. 117-35.
 41. Costa, E.M.F., et al., *Effects of endocrine disruptors in the development of the female reproductive tract*. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia*, 2014. **58**(2): p. 153-161.
 42. Sifakis, S., et al., *Human exposure to endocrine disrupting chemicals: effects on the male and female reproductive systems*. *Environ Toxicol Pharmacol*, 2017. **51**: p. 56-70.
 43. Golden, R., J. Gandy, and G. Vollmer, *A Review of the Endocrine Activity of Parabens and Implications for Potential Risks to Human Health*. *Critical Reviews in Toxicology*, 2005. **35**(5): p. 435-458.
 44. Nowak, K., et al., *Parabens and their effects on the endocrine system*. *Mol Cell Endocrinol*, 2018. **474**: p. 238-251.
 45. Safety, S.C.o.C., *Opinion on Parabens. Update request for a scientific opinion on propyl. and butylparaben*. 2013.
 46. Vo, T.T., et al., *Potential estrogenic effect(s) of parabens at the prepubertal stage of a postnatal female rat model*. *Reprod Toxicol*, 2010. **29**(3): p. 306-16.
 47. Ahn, H.J., et al., *Parabens inhibit the early phase of folliculogenesis and steroidogenesis in the ovaries of neonatal rats*. *Mol Reprod Dev*, 2012. **79**(9): p. 626-36.
 48. Boberg, J., et al., *Multiple Endocrine Disrupting Effects in Rats Perinatally Exposed to Butylparaben*. *Toxicol Sci*, 2016. **152**(1): p. 244-56.
 49. Pollock, T., et al., *Butyl paraben and propyl paraben modulate bisphenol A and estradiol concentrations in female and male mice*. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2017. **325**: p. 18-24.
 50. Watanabe, Y., et al., *Comparative study on transcriptional activity of 17 parabens mediated by estrogen receptor alpha and beta and androgen receptor*. *Food Chem Toxicol*, 2013. **57**: p. 227-34.
 51. Lodish, H., et al., *Molecular cell biology*. 6th ed, ed. W.H.F.a. Company. 2008, New York.
 52. Jia, M., K. Dahlman-Wright, and J.A. Gustafsson, *Estrogen receptor alpha and beta in health and disease*. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*, 2015. **29**(4): p. 557-68.
 53. Hillier, S.G., et al., *Expression of oestrogen receptor alfa and beta in cultured human ovarian surface epithelial cells*. *Molecular Human Reproduction*, 1998. **4**(8): p. 811-815.
 54. Revelli, A., et al., *In situ hybridization study of messenger RNA for estrogen receptor and immunohistochemical detection of estrogen and progesterone receptors in the human ovary*. *Gynecologic Endocrinology*, 1996. **10**: p. 177-186.
 55. Britt, K.L. and J.K. Findlay, *Estrogen actions in the ovary revisited*. *Journal of Endocrinology*, 2002. **175**: p. 269-276.
 56. Emmen, J.M., et al., *In vitro growth and ovulation of follicles from ovaries of estrogen receptor (ER){alpha} and ER{beta} null mice indicate a role for ER{beta} in follicular maturation*. *Endocrinology*, 2005. **146**(6): p. 2817-26.

57. Havelock, J.C., W.E. Rainey, and B.R. Carr, *Ovarian granulosa cell lines*. Mol Cell Endocrinol, 2004. **228**(1-2): p. 67-78.
58. Guerra, M.T., et al., *Effects of in vitro exposure to butylparaben and di-(2 ethylhexyl) phthalate, alone or in combination, on ovarian function*. J Appl Toxicol, 2016. **36**(9): p. 1235-45.
59. Gore, A.C., et al., *EDC-2: The Endocrine Society's Second Scientific Statement on Endocrine-Disrupting Chemicals*. Endocr Rev, 2015. **36**(6): p. E1-E150.
60. Perera, F. and J. Herbstman, *Prenatal environmental exposures, epigenetics, and disease*. Reprod Toxicol, 2011. **31**(3): p. 363-73.
61. Mosmann, T., *Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays*. Journal of Immunological Methods, 1983. **65**: p. 55-63.
62. Taxvig, C., et al., *Do parabens have the ability to interfere with steroidogenesis?* Toxicol Sci, 2008. **106**(1): p. 206-13.
63. Deroo, B.J., et al., *Estrogen receptor beta is required for optimal cAMP production in mouse granulosa cells*. Mol Endocrinol, 2009. **23**(7): p. 955-65.

11. Anexos

Anexo 1

Consentimiento informado para análisis de células de la cúmula y líquido folicular.



Laboratorio de Investigación y Diagnóstico Molecular

CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA ANÁLISIS DE CÉLULAS DE LA CUMULA Y LIQUIDO FOLICULAR

Sr.^a _____

(NOMBRE Y DOS APELLIDOS DE LA PACIENTE) DE _____ AÑOS DE EDAD.

CON DOMICILIO EN _____

Sr. _____

(NOMBRE Y DOS APELLIDOS DEL PACIENTE) DE _____ AÑOS DE EDAD.

CON DOMICILIO EN _____

La infertilidad femenina es un problema que ha ido en aumento, las causas son muy variadas, sin embargo en recientes años ha surgido la preocupación de que diversos químicos presentes en diversos productos de uso personal puedan tener alguna participación en el desarrollo de infertilidad.

Objetivo: Este estudio tiene la finalidad de determinar las alteraciones causadas por la exposición a contaminantes ambientales sobre la expresión de genes de la cumula considerados biomarcadores de calidad ovular, el cual se ve reflejado en un embarazo exitoso. Así como determinar la presencia de contaminantes ambientales en líquido folicular.

¿En qué consiste?

Se emplearan muestras de células de la cumula y líquido folicular. Durante el proceso de retiro de óvulos, el ovocito va rodeado de una capa de células llamadas “células de la cumula”, las cuales durante los procedimientos de fertilización in vitro en el Instituto Ingenes son desechados ya que no son de utilidad. Del mismo, el líquido folicular es recuperado junto con los ovocitos, sin embargo debido a que no es útil también es desechado. Las muestras se manejan en el Laboratorio de Investigación y Diagnóstico Molecular (LIDMOL). El estudio cuenta con la aprobación del Comité de Ética del Instituto.



¿Cuándo se dona la muestra?

Se tomará las muestras de células de la cumula y liquido folicular que normalmente se colectan durante el procedimiento de recuperación de óvulos. Dichas muestras son desechadas.

Procedimiento

No se agrega ningún procedimiento que comprometa al paciente ni al proceso de fertilización *in vitro*. Las muestras para este estudio se transfieren al LIDMOL una vez que se ha finalizado el procedimiento de recuperación de óvulos.

Resultados

Los resultados de este estudio contribuirán al avance de nuestro conocimiento acerca de los factores ambientales que afectan la calidad ovocitaria y contribuir a dar una explicación a problemas de infertilidad inexplicables.

Limitaciones

En el presente no se generará algún resultado directo al paciente.

Información económica

El estudio no tiene costo.

Una vez leído y comprendido lo anterior quedo informado de:

- No representa algún riesgo para la paciente ni para el procedimiento de fertilización
- Que la información de este estudio será confidencial, manejada con folio numérico y solo se utilizará con fines de la investigación.
- La disposición del personal que realiza esta investigación para ampliar cualquier aspecto de la información que no haya quedado suficientemente clara.

Autorización

Autorizo al personal del área médica llevar a cabo el uso de células de la cumula y liquido folicular para este estudio.

En _____ a _____ de _____ de _____

Fdo. El Médico

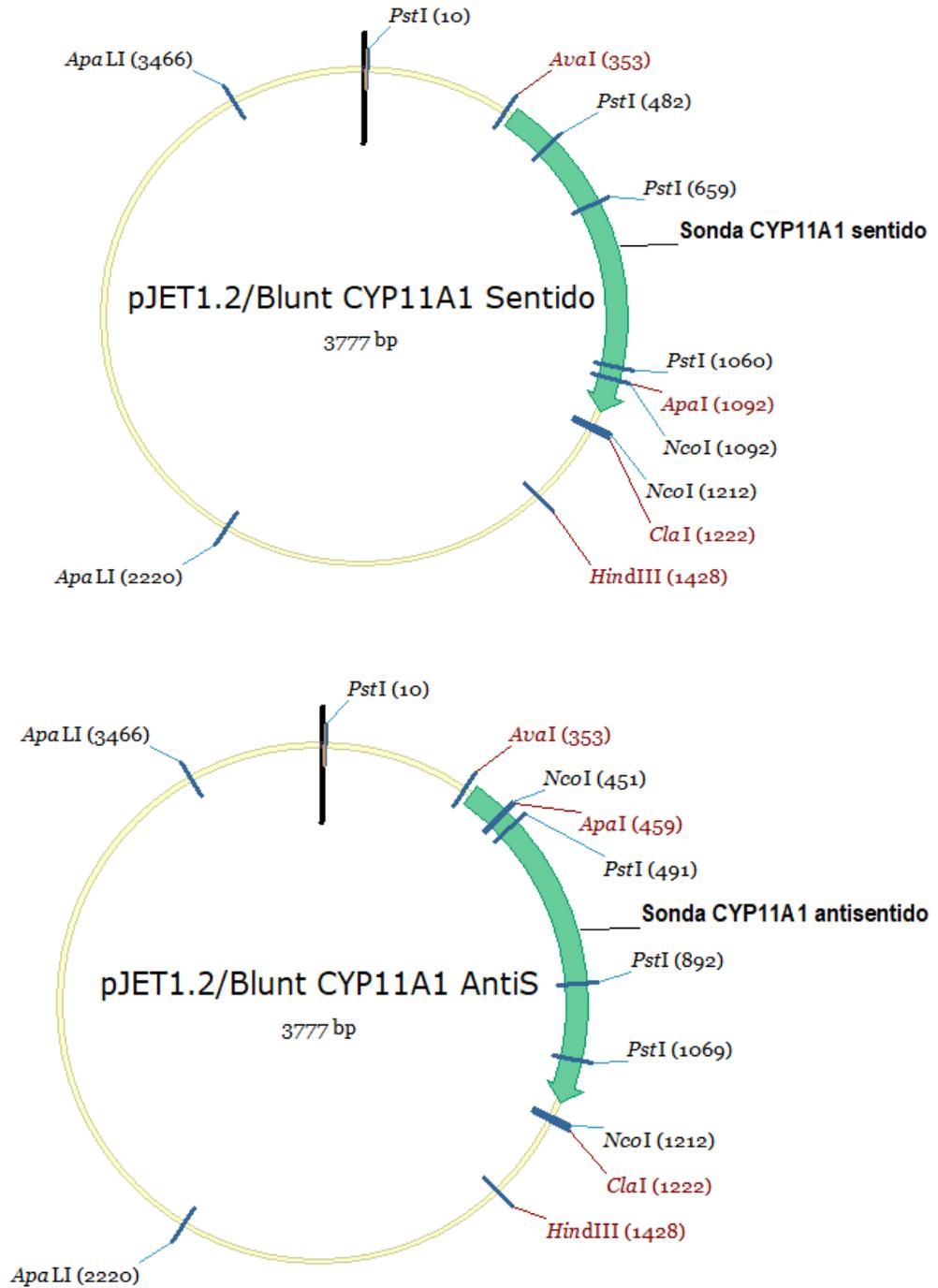
Firma de la paciente

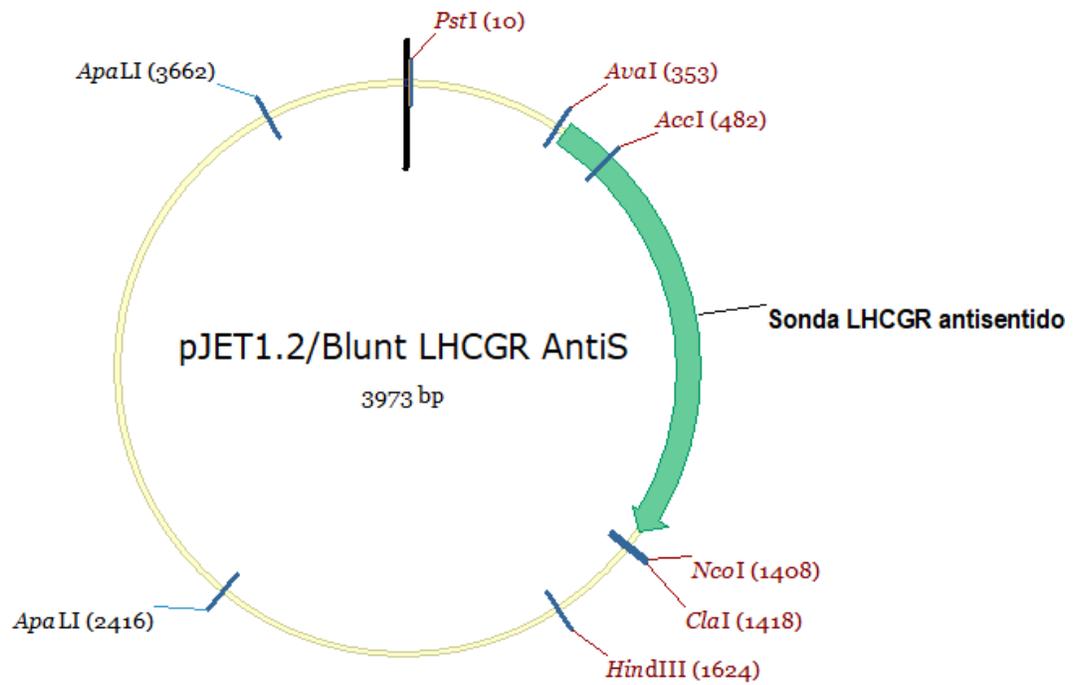
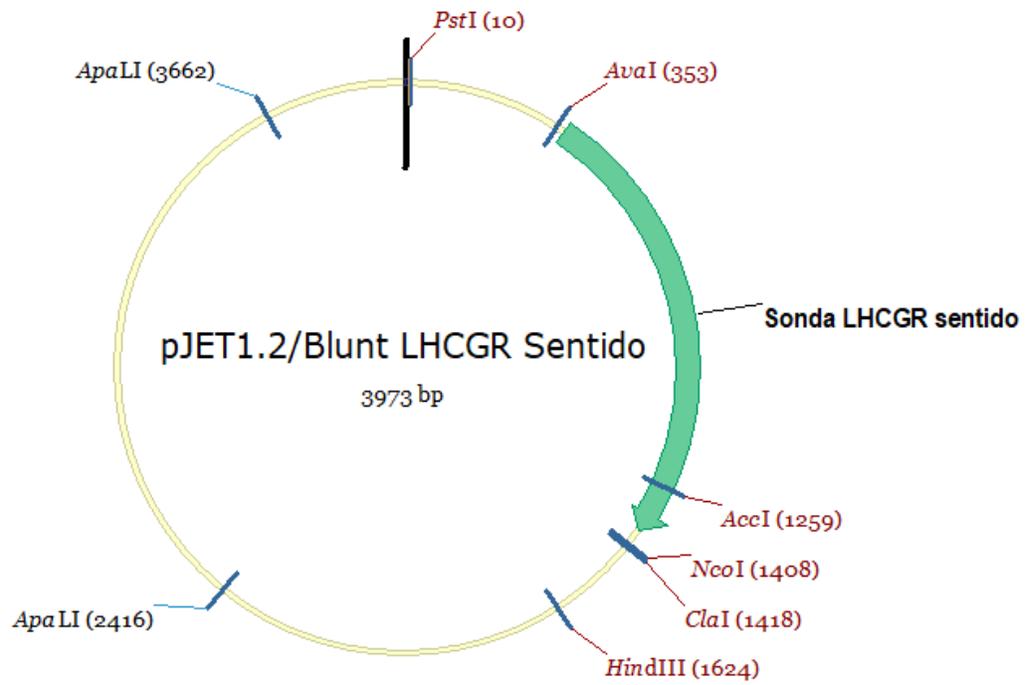
Firma del paciente

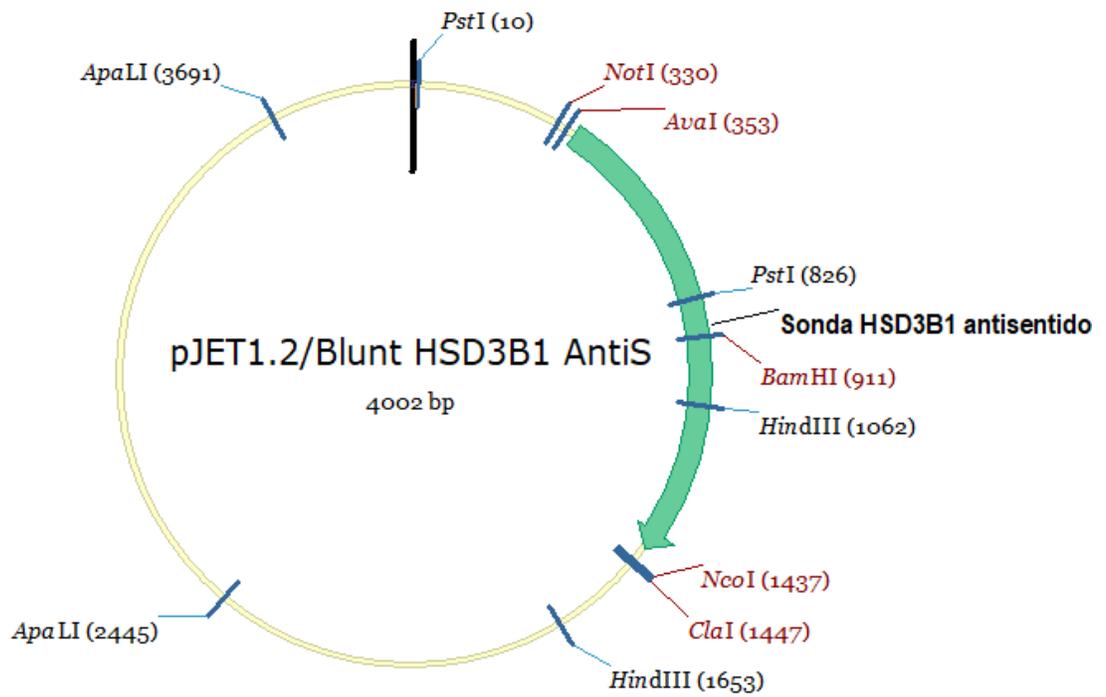
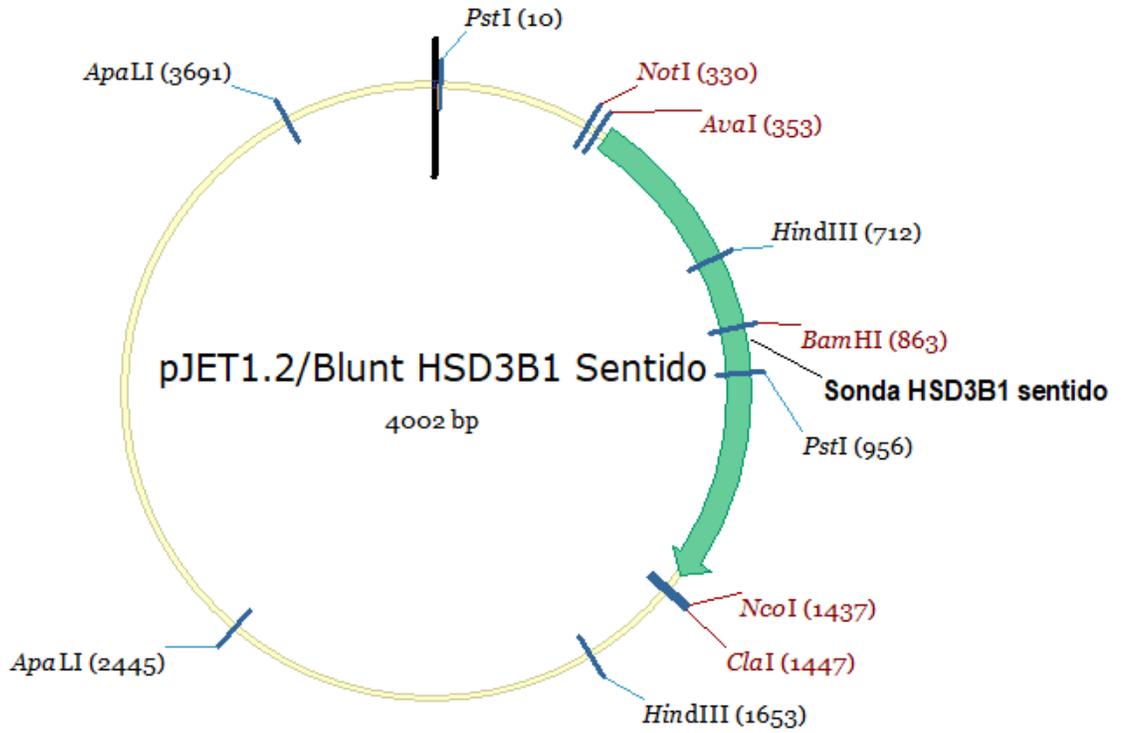
Investigador Responsable

Anexo 2

Mapas de los plásmidos obtenidos mediante un análisis *in silico* por la herramienta Vector NTI







Anexo 3

Parte de este trabajo fue presentado en el Congreso de la American Society of Reproductive Medicine, 2018

E. López-Bayghen, D. Hernández-Melchor, A. Palafox-Gómez, A. López-Luna, E. Herrera-Cogco, L. Ramírez-Martínez, A. Albores. **Effects of Endocrine Disruptors over Progesterone Production in Human Granulosa Cells.**

P-517 Wednesday, October 10, 2018 6:30 AM

EFFECTS OF ENDOCRINE DISRUPTORS OVER PROGESTERONE PRODUCTION IN HUMAN GRANULOSA CELLS.

E. Lopez-Bayghen,^a D. Hernandez-Melchor,^b A. Palafox-Gomez,^b A. Lopez-Luna,^b E. D. Herrera Cogco,^c L. Ramirez-Martinez,^a A. Albores.^b ^aDepartamento de Toxicología, Cinvestav-IPN, Mexico, Mexico; ^bDepartamento de Toxicología, Cinvestav-IPN, Mexico City, Mexico; ^cToxicology, Chemical, Mexico, Mexico.



ASRM 2018
Scientific
Congress,
Denver, Colorado,
October 6-10,
2018.
Fertility and
Sterility, Vol.
110, Issue 4, e314

OBJECTIVE: The full characterization of a primary culture of Human Granulosa Cells (HGCs) and its use as an inquiry model to evaluate the effects of EDs (endocrine disruptors) over CYP11A1, the rate-limiting enzyme for progesterone production, as well as their impact over function and differentiation processes.

DESIGN: Basic research study.

MATERIALS AND METHODS: HGCs were obtained by ovarian puncture at the time of oocyte retrieval from patients undergoing ovarian stimulation, and were mechanically isolated from the oocyte, pooled together and digested with hyaluronidase. Cells were plated in a Chamber Slide™ system for immunofluorescence assays, performed to detect the CYP11A1 protein, as well as downstream genes for progesterone production. To test EDs effects, cells were plated in 96-well plates and treated with either Bisphenol A (BPA, 1 μM), Diethylstilbestrol (DES, 5μM), Methylparaben (MPB, 657 nM) or Butylparaben (BPB, 20 nM) for different times. Cell viability was assessed by MTT and mRNA levels were quantified via RT-qPCR for PTGS2, and CYP11A1 genes using the $\Delta\Delta CT$ method. Mitochondrial DNA (mtDNA) content was determined by comparing the proportion of the amplified mitochondrial gene *d-loop 2* with the nuclear gene *il6*. Data were analyzed by One-way ANOVA followed by a Bonferroni *post-hoc* test.

RESULTS: HGCs provide the appropriate environment for the oocyte to matur, with cumulus cells supporting metabolism and mural cells providing for endocrine needs. First, we established that the primary culture of HGCs has a mural cell phenotype; complete cell lineage characterization indicated a prevalence of mural cells in the culture by immunofluorescence staining with anti-CYP11A1 and anti-LHCG. CYP11A1 protein increased during time course of culture; after 48 h, 96.2 % of cells were CYP11A1-positive. HGCs' functional alterations, due to the exposure to EDs, may contribute to infertility. HGCs were exposed to BPA and DES, and mRNA expression of steroidogenic genes was measured. CYP11A1, CYP19A1, HSD3B1, and HSD17B1 decreased around 80% after 24h exposure. We detected no effects over mitochondrial activity but a consistent and significant decrease in mtDNA content. In HGCs exposed to BPA and DES, mtDNA content decreased around 40% after 24 h of treatment. Parabens endocrine-disruptive effects were evaluated in HGCs exposed to MPB and BPB at concentrations previously reported to be environmentally relevant in biological systems. Parabens did not affect cell viability after 72 h and this exposure did not significantly changed CYP11A1 mRNA expression, when compared to a vehicle control at 24, 48 or 72 h. In contrast, a 50 % decrease in mtDNA content of HGCs was found after 24 h exposure to 20 nM of BPB.

CONCLUSIONS: Primary culture of HGCs showed a prevalence of mural cells with ability to respond to DEs exposure.

Supported by: PEI- Conacyt 231793 and 212650 and 253224.