

Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa
División de Ciencias Biológicas y de la Salud



**Evaluación de la expresión génica de ovarios de
Canis lupus familiaris tratados *in vitro* con Coumestrol**

TESIS

Para obtener el grado de
Maestra en Biología Experimental

Presenta:

Bióloga Experimental Sheila Irais Peña Corona

Comité tutorial:

Director:

Dr. Héctor Fernando Serrano

Asesores:

Dr. Pablo Arturo Salame Méndez

Dr. Mario Pérez Martínez

México, D.F.

Julio, 2014

“El Programa de Maestría en Biología Experimental de la Universidad Autónoma Metropolitana pertenece al Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del CONACYT, registro 001481, en el Nivel Consolidado, y cuenta con apoyo del mismo Consejo, clave DAFCYT-2003IMPTNNN0020”.

Número de registro de la beca otorgada por CONACYT: 284232

Miembros del Jurado

El jurado designado por la Comisión Académica del Posgrado en Biología Experimental de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana aprobó la Tesis titulada: "Evaluación de la expresión génica de ovarios de *Canis familiaris* tratadas *in vitro* con Coumestrol" que presentó la Bióloga Experimental Sheila Irais Peña Corona el día 14 de Julio del año 2014.

Sinodales


Presidente

Dr. Pablo Arturo Salame Méndez

Profesor titular "C"

Departamento de Biología de la Reproducción
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa

Email: asam@xanum.uam.mx



Secretario

Dr. Mario Pérez Martínez

Profesor titular "C"

Departamento de Morfología
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia
Email: perezmtzmario@hotmail.com



Vocal

Dr. José Luis Gómez Olivares

Profesor titular "C"

Departamento de Ciencias de la Salud
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa
Email: gool@xanum.uam.mx




Vocal

Dra. Herlinda Bonilla Jaime

Profesor titular "C"

Departamento de Ciencias de la Salud
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa
Email: bjh@xanum.uam.mx



Comité Tutorial

DIRECTOR

Dr. Héctor Fernando Serrano

Profesor titular

Departamento de Ciencias de la Salud
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa
Email: hser@xanum.uam.mx

ASESOR INTERNO

Dr. Pablo Arturo Salame Méndez

Profesor titular

Departamento de Biología de la Reproducción
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa
Email: asam@xanum.uam.mx

ASESOR EXTERNO

Dr. Mario Pérez Martínez

Profesor Titular

Departamento de Morfología
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia
Universidad Nacional Autónoma de México
Email: perezmtzmario@hotmail.com

Agradecimientos

A mi maestro **Dr. Héctor F. Serrano**, por su paciencia, por guiarme, por creer en mi, y enseñarme la importancia de hacer las cosas bien, desde la primera vez. Gracias.

Dr. **Arturo Salame Méndez**, por su ayuda, jovialidad y por creer en mi. Gracias.

Dr. **Mario Pérez Martínez** por su ayuda, franqueza y apoyo. Gracias.

Al Mro. En Biol. Exp. **Enrique Mendieta Márquez**, por su ayuda, enseñanzas y asesorías en los momentos de dudas existenciales. Gracias.

Dedicatorias

A mis abuelos, que aunque ya no están físicamente conmigo, siempre los llevo en mi corazón, yo sé que serían los mas felices.

A mis padres **Jerónimo Peña Rivas** e **Isabel Leticia Corona Urrea**, por formarme y darme las bases para llegar hasta aquí, el comienzo de mi vida profesional. **Papitos: lo hicieron bien!**

A mis hermanos **Cristina Saharay Peña Corona**, e **Israel David Méndez Corona**, por compartir conmigo momentos importantes en mi vida, ayudarme y aguantarme todos los días. Gracias por crecer conmigo!

Al hombre con quien comparto mi vida y al que amo profundamente **Daniel Velázquez Maldonado**, y a su familia. Gracias por acompañarme y apoyarme en este proceso.

A mis nenes, los que mas me han sufrido, en desveladas y cansancios, **Nieve, Bicha, Luno, L´greñé y Peluchin.**

Biol. Exp. **Pablo León Ortiz**, por su amistad, franqueza, discusiones. Gracias.

A mis amigos: y compañeros **Arely Montiel; Daniel Iván Montero; Biol. Exp. Denise Maldonado; Lic. Miguel Angel Fuentes; Q.F.B. Yadira Velasco; Q.F.B. Stephany Recillas; Biol. Exp. Ana María González; Mtro. Guillermo Mora y Q.F.B. Alejandro Silva.** Sin su apoyo y compañía, este proceso hubiera sido muy complicado y tedioso. Gracias por compartir conmigo aquellos días tan complicados, los quiero.

Indice

1	Resumen	1
2	Abstract	3
3	Introducción	5
3.1	Métodos de control poblacional de hembras canino	6
3.2	Fitoestrógenos	8
3.3	Mecanismo de acción del Coumestrol.....	9
3.4	Efecto del Coumestrol en la fisiología reproductiva de las hembras.....	11
3.5	Ovario de la perra.....	14
3.6	Foliculogénesis.....	15
3.7	Sistemas <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	18
3.8	Métodos para analizar la expresión génica por detección de ARNm.....	20
3.8.1	Northern blot (hibridación entre fragmentos de ADN y ARN).....	20
3.8.2	Amplificación en tiempo real (RT-PCR o qRT-PCR)	20
3.8.3	Hibridación <i>in situ</i>	21
3.8.4	Microarreglos de ADN	22
4	Antecedentes	23
5	Justificación	24
6	Planteamiento del Problema	26
7	Hipótesis	26
8	Objetivo General	26
9	Objetivos Particulares	27
10	Material y Métodos	27
10.1	Obtención de los ovarios.....	27
10.2	Citología Vaginal Exfoliativa	28
10.3	Microencapsulación.....	30
10.4	Análisis histológico, en los fragmentos de ovario.....	31
10.5	Extracción de ARN	32
10.5.1	Integridad y pureza de ARN	33
10.6	Análisis del transcriptoma por microarreglos.....	33
10.6.1	Síntesis <i>in vitro</i> de cADN	33
10.6.2	Hibridación de microarreglos	34
10.6.3	Lectura de microarreglos	35
10.6.4	Cuantificación de microarreglos	35
10.6.5	Corrección de fondo	36
10.6.6	Valores de R e I.....	36
10.6.7	Normalización	36
10.6.8	Filtrado de intensidad	36
10.6.9	Análisis de sistemas de los resultados de microarreglos	36
11	Resultados	37
11.1	Histología y Citología Vaginal.....	37
11.2	Microarreglos.....	44

11.3	Posibles vías metabólicas alteradas	59
12	Discusión.....	60
12.1	Sistema <i>in vitro</i> , el uso de microcápsulas	60
12.2	Citología Vaginal Exfoliativa e Histología	62
12.3	Concentración de Coumestrol	64
12.4	Microarreglos.....	65
13	Conclusiones	68
14	Perspectivas.....	70
15	Referencias	71
16	Anexo.....	81

Indice de Tablas

Tabla 1. Tratamientos hormonales usados como estrategia de control poblacional canino.....	6
Tabla 2. Clasificación y estructura de los Fitoestrógenos.....	13
Tabla 3. Porcentajes celulares encontrados en vagina de perra para cada etapa del ciclo estral	29
Tabla 4. Protocolo de marcado durante la síntesis de cADN	34
Tabla 5. Tipos celulares encontrados en la citología vaginal exfoliativa de las hembras utilizadas en el estudio.....	38
Tabla 6. Concentración y Pureza (Cociente 260/280) de ARN total que se obtuvieron del aislamiento de fragmentos ováricos incluidos en microcapsulas con el método de Trizol®.....	43
Tabla 7. Número de genes alterados con el tratamiento con Coumestrol.....	47
Tabla 8. Genes que se inducen en las interacciones con diferentes concentraciones de Coumestrol.....	50
Tabla 9. Genes que se reprimen en las interacciones con diferentes concentraciones de Coumestrol.....	53
Tabla 10. Posibles vías metabólicas alteradas en ovario de perra microencapsulado con diferentes concentraciones de Coumestrol.....	59
Tabla 11. Morfometría de folículos de fragmentos ováricos incluidos en microcápsulas de alginato de Calcio.....	81
Tabla 12. Genes inducidos en común de todos los tratamientos.....	82
Tabla 13. Genes reprimidos en común de todos los tratamientos.....	83
Tabla 14. Expresión génica diferencial, agrupada por función.....	84

Indice de Figuras

Figura 1. Similitudes estructurales del estradiol y el Coumestrol.....	9
Figura 2. Mecanismos de señalización estradiol.....	11
Figura 3. Aparato genital de la perra.....	15
Figura 4. Cambios en las concentraciones de hormonas reproductivas en el ciclo estral de la perra doméstica.....	17
Figura 5. Tipos celulares encontrados en la vagina de las perras.....	38
Figura 6. Histoarquitectura representativa de ovarios de perra.....	40
Figura 7. Diámetro de folículos encontrados en las preparaciones histológicas de ovarios incluidos en alginato de Calcio con diferentes concentraciones de Coumestrol.....	41
Figura 8. Microcápsula formada con alginato de Sodio y CaCl_2	42
Figura 9. Fraccionamiento electroforético del ARN.....	44
Figura 10. Representación grafica de la intensidad de fluorescencia	46
Figura 11. Expresión diferencial de genes basado en el cociente Z... ..	46
Figura 12. Variaciones en el valor de Z en los genes que responden en todos los tratamientos.....	48
Figura 13. Variaciones en el valor de Z entre cada tratamiento.....	49
Figura 14. Proporción de genes inducidos (A) y reprimidos (B) que se alteran diferencialmente en fragmentos de corteza ovárica tratada con Coumestrol.....	49
Figura 15. Agrupación de genes inducidos por función.....	57
Figura 16. Agrupación de genes reprimidos por función.....	58
Figura 17. Posibles vías metabólicas y cambios inducidos en células ováricas en cultivo <i>in vitro</i> con Coumestrol.....	68
Figura 18. Cambios en el epitelio vaginal y en la citología vaginal en relación a la concentración sérica de estrógenos a lo largo del ciclo estral de la perra.....	80

Abreviaturas

Cou: Coumestrol

ARN: ácido ribonucleico

ddUTP: 2',3'-Dideoxyuridina-5'-Triphosfato

GnRH: Hormona liberadora de gonadotropina

FSH: Hormona folículo estimulante

LH: Hormona luteinizante

MPA: Medroxiprogesterona

ZP: Zona pelúcida

FE: Fitoestrógenos

RE: Receptores de estrógenos

EDC: Disruptores endócrinos

PR: Progesterona

E2: Estradiol

OTX: Oxitocina

SERMs: Moduladores selectivos de receptores estrogénicos

EREs: Elementos de respuesta a estrógenos

1 Resumen

La sobrepoblación canina es un riesgo potencial para la salud humana. Se han utilizado varias estrategias de control reproductivo en perras como la esterilización quirúrgica, tratamiento con hormonas, inmunoccepción y recientemente el uso de compuestos de origen vegetal con estructura parecida al estradiol (fitoestrógenos) que tienen actividad estrogénica y que alteran la fisiología reproductiva. Hasta el momento se desconocen los mecanismos moleculares involucrados en la acción de los fitoestrógenos como el Coumestrol a nivel ovárico. En el presente estudio se utilizaron microarreglos de ADN para identificar las alteraciones en la expresión de potenciales genes blanco con el fin de conocer los posibles mecanismos de acción por los que actúa el Coumestrol.

Los ovarios de cinco perras, se obtuvieron asépticamente y se transportaron al laboratorio. Después de remover la porción medular, fragmentos de 30 mg de la porción cortical se incluyeron en microcapsulas de alginato de Calcio con cuatro concentraciones de Coumestrol (0,1, 2, 4 y 8 ng/ml) y se incubaron a 37°C, 5% CO₂ en aire por 4 h. Se extrajo el ARN por el método de Trizol®, se cuantificó en Nanodrop® y evaluó su integridad por electroforesis en gel reductor de agarosa. Se marcó el cADN por incorporación de ddUTP-Alexa₅₅₅ para el control y ddUTP-Alexa₆₄₇ para las muestras experimentales durante la síntesis de cADN, el cual se utilizó para la hibridación de los microarreglos supervisados (M22K_08_31, al 34). La hibridación se realizó primeramente en el control, se registró la fluorescencia de los 22000 puntos de los que consta el microarreglo para después de remover los oligos unidos, se hibridaron los cADN experimentales y se registró nuevamente la fluorescencia de los puntos del microarreglo. Para el análisis y conversión de pixeles/ μm^2 a intensidad de la señal en cada registro, se utilizó el programa GenArise para los filtrados pertinentes. Después de la normalización y eliminación de señales de fondo, delimitación de la señal bruta y específica, los diferentes genes se agruparon en niveles de expresión en base al índice Z. Aquellos genes que tuvieron variaciones (índice Z) superiores a ± 2 , se sometieron al programa MAGNET para el análisis de sistemas, basado en GEO. A cada una de las perras, a las que se extrajeron los ovarios se les determinó la etapa del ciclo estral, uno de los fragmentos ováricos tratados se tiñó con la técnica tricrómica de Masson, y se evaluó la citología vaginal exfoliativa. Los datos obtenidos de diámetro y porcentaje folicular concuerdan con otros estudios realizados, y no se

encontraron diferencias en la histoarquitectura después de la incubación con Coumestrol con ninguna de las concentraciones utilizadas La determinación del ciclo estral por citología vaginal exfoliativa, nos permitió saber que el 80% de las perras se encontraban en estro, por lo que se debe tomar en cuenta la inducción de genes en la fisiología reproductiva en el momento de la extracción ovárica. Hubo expresión génica diferencial ya que ningún gen inducido se encontró reprimido al mismo tiempo, 38 genes se encontraron inducidos, y 31 genes reprimidos en común a todos tratamientos. En conjunto, estos resultados sugieren que las vías metabólicas inducidas fueron las de mecanotransducción, (ILK, Notch,), síntesis de colesterol, y las vías reprimidas principalmente fueron las vías involucradas con ubiquitacion, regulación del ciclo celular, y de adhesión focal.

Se observó una correlación entre el aumento de la concentración de coumestrol con un aumento en la expresión génica tanto inducida como reprimida proponemos que el coumestrol, induce de novo, la síntesis de colesterol en nuestro modelo experimental

2 Abstract

Canine overpopulation is a potential human health risk. Several reproductive control strategies have been used in female dogs such as surgical sterilization, hormone therapy, immunocontraception and recently, the use of plant-derived compounds with similar structure to estradiol (phytoestrogens) having estrogenic activity with a direct impact on the reproductive physiology. Up to now, no molecular mechanisms involved in the action of phytoestrogens such as coumestrol are to ovarian level are known. In this study, DNA microarrays were used to identify the expression alterations of potential target genes in order to know the possible mechanisms used by coumestrol.

Ovaries from adult female dogs were obtained by surgical dissection and transported to the lab. Cortical 30 mg sections were obtained, embedded in calcium alginate microcapsules with four Coumestrol concentrations (0,1,2,4 and 8 ng/ml) and incubated for a 4 hour period. Total RNA was isolated, quantified and integrity evaluated by alkaline agarose gel electrophoresis. cDNA was labeled with either Alexa₅₅₅- (Control) or Alexa₆₄₇-ddUTP (Coumestrol treated) fluorochromes, and used for sequential hybridization of microarrays (M22K_08_31 to 34). We used GenArise to filtrate, transform and normalize the rough data. Z score representing the change in expression level was used as criteria for transcriptional induction or repression. Data having Z values $> \pm 2$ were used in MAGNET program for system analysis based on GEO. The Masson trichrome staining of treated fragments and exfoliative vaginal cytology (CVE) from every bitch from where the ovaries were extracted were used to determine the stage in the estral cycle of each female donor dog.

Data from follicular diameter and percentage consistent with other studies conducted, and no difference in histoarchitecture after incubation with Coumestrol with any of the concentrations used were found. Determination of estral cycle by vaginal exfoliative cytology let us know that 80% of female dogs were at estrous stage allowing us to evaluate the coumestrol gene expression alteration at the main reproductive event named ovulation. A total of 38 genes were induced and 31 genes were repressed in response to all coumestrol concentrations tested and a lesser proportion responding only to two independent concentrations, confidence was obtained when comparing induced/repressed genes and we found no contradictory information because no induced gene was repressed at same time. We suggest that metabolic pathways such as

mechanical trasduction (ILK, Notch) and colesterol synthesis were induced, while the repressed were mainly those associated to ubiquitination, cell cycle regulation and focal adhesion.

In summary, we found correlation between increased concentration gene expression coumestrol with both the induced and repressed coumestrol propose that induces de novo synthesis of steroids in our experimental model is observed.

3 Introducción

La sobrepoblación de animales de compañía no domiciliados se ha convertido en un riesgo potencial para la salud pública. En particular, la sobrepoblación de perros (*Canis lupus familiaris*) no domiciliados que vagan libremente afecta tanto a las urbes como a las regiones rurales. En un meta-análisis reciente, se calculó que la población canina mundial podría llegar a ser superior a los 700 millones para el año 2014 (Hughes y Macdonald, 2013). De acuerdo a las estadísticas oficiales, en México hay aproximadamente 12 millones de perros, de los cuales el 10% son no domiciliados; en el Distrito Federal (D.F.) y su zona metropolitana se reportan 1.2 millones de perros, de los cuales, 120 mil viven y defecan en la calle (Subsecretaría de Prevención y Promoción de la Salud, 2012) su impacto es múltiple pues un solo perro produce alrededor de 500 ml de orina y 200 g de excretas diarios (Medina, 2006). Se estima que en seis años, una perra y su descendencia tiene el potencial para procrear 67 mil crías, además que potencialmente puede ser portador de enfermedades de tipo zoonótico como brucelosis, leptospirosis, distintas parasitosis y, aunque no es el único, se ha identificado como el vector principal de la rabia (Serrano *et al.*, 2008). Se tiene registrado que en el D.F. anualmente se atienden entre 16 y 18 mil personas por mordeduras de perros, las instituciones de gobierno destinan una importante cantidad de recursos económicos para el control de enfermedades zoonóticas y la reproducción de la fauna nociva.

3.1 Métodos de control poblacional de hembras canino

Hay varias estrategias de control poblacional para hembras canino que han sido empleadas hasta ahora, entre las que se incluyen: la esterilización quirúrgica, tratamientos hormonales (Tabla 1), vacunas, y el sacrificio humanitario por electroinsensibilización. La esterilización quirúrgica es un procedimiento definitivo, requiere de instalaciones, equipo y personal capacitado, para evitar complicaciones secundarias como hemorragias, hematomas, o infecciones por realizar de manera inadecuada el procedimiento quirúrgico (Gualo, 2010)

Tabla 1. Tratamientos hormonales usados como estrategia de control poblacional canino

Tipo de hormona	Modo de acción	Referencia
Progestinas, andrógenos o análogos de la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH)	Regulan la liberación de la hormona folículo estimulante (FSH) y de la hormona luteinizante (LH)	(Kutzler y Wood, 2006)
Agonistas derivados sintéticos de la GnRH	Regulación a la baja de los receptores para GnRH en la hipófisis anterior	(Gobello <i>et al.</i> , 2006)
Antagonistas de GnRH	Bloquean competitivamente los receptores para GnRH en la hipófisis anterior, y con esto se bloquea el eje gonadal	(Valiente <i>et al.</i> , 2007)
Derivados sintéticos de la progesterona (Acetato de megestrol	Supresor del estro. (cuando se emplea por tiempos largos, tiene efectos secundarios como neoplasias en las glándulas mamarias)	(Burke y Reynolds, 1975)
Medroxiprogesterona)	Supresor del celo, (supresión adrenocortical y lesiones uterinas como efectos secundarios)	(Kutzler y Wood, 2006)
Propionato de testosterona	Previene el estro	(Olson, <i>et al.</i> , 2001)

En las últimas décadas, se ha empleado una técnica de inmunocontracepción, en donde se considera a la capa proteica que cubre los óvulos de los mamíferos denominada zona pelúcida (ZP) como un potencial blanco para regular la fertilidad de poblaciones tanto humanas como animales. Cuando el espermatozoide se une a la proteína ZP₃, se lleva a cabo la reacción acrosomal. Los anticuerpos contra ZP se unen a los receptores ZP₃ bloqueando con ello los procesos posteriores a la interacción de gametos necesarios para la fecundación (Dunbar *et al.* 2002). La vacunación contra ZP₃ produce infertilidad en aproximadamente 75% de las hembras vacunadas, sin embargo se observan efectos secundarios pues induce quistes foliculares en el 64% de los animales inmunizados (Kutzler y Wood, 2006). En un estudio realizado por nuestro grupo, al inocular las proteínas de ZP en perras adultas, se observó una disminución en el número de folículos primarios y secundarios así como un aumento en la infiltración de linfocitos a los ovarios de perras tratadas con distintas dosis de proteína (Serrano y Suárez-García, 2009). Esta estrategia de inmunocontracepción se ha utilizado en otras especies animales, que en algunas partes del mundo son consideradas fauna salvaje de libre ambulación como caballos salvajes (*Equus caballus*), venado cola blanca (*Odocoileus virginianus*), ciervo (*Cervus elphus*), elefantes africanos (*Loxodonta africana*). Sin embargo, hasta el momento, se han observado varias limitantes para poder ser usados como un método de anticoncepción viable, tales como la diferencia en cuanto a la eficacia en las diferentes especies, la seguridad de la vacuna, y cambios indeseados en el comportamiento (Kirkpatrick *et al.*, 2011). Es importante tener en cuenta que se requiere más de una aplicación del inmunógeno para observar los

efectos, los cuales son temporales al disminuir los anticuerpos circulantes (Serrano y García-Suárez, 2009).

La mayoría de los métodos que existen hoy en día, son relativamente caros, tanto por el tiempo que se invierte, como por los cuidados especiales para los animales, y el estipendio económico que requieren (Pérez-Rivero, 2009). El uso de fitoestrógenos (FE) en la regulación de la reproducción de fauna nociva es un tema que se ha estado desarrollando en años recientes, ya que se han observado alteraciones en la reproducción bajo exposiciones tanto naturales como experimentales, como se discutirá más adelante.

3.2 Fitoestrógenos

Los FE son compuestos no esteroides derivados del metabolismo de las plantas con estructura conformacional parecida al estradiol (Figura 1, Tabla 2). Por otro lado, los FE también se han descrito como moduladores selectivos de receptores estrogénicos (SERMs) debido a su relativa potencia estrogénica, por lo tanto se ha postulado que los fitoestrógenos producen efectos genómicos a través de la competencia con el estradiol (E₂). Por otro lado presentan actividad agonista, agonista parcial y/o antagónica en los receptores de estrógenos (RE), por lo que pueden interferir en el transporte, síntesis y metabolismo principalmente de los estrógenos (Cederroth *et al.*, 2012; Whitten y Patisaul, 2001) debido a esto se consideran disruptores endócrinos.

Los disruptores endócrinos, (EDC por sus siglas en inglés) son sustancias o agentes exógenos que interfieren con la síntesis, secreción, transporte, metabolismo, o eliminación de las hormonas responsables de la homeostasis, la reproducción, el

desarrollo y el comportamiento (Cederroth *et al.*, 2012). Los FE como disruptores endocrinos pueden también alterar la expresión de receptores para otro tipo de hormonas como progesterona (PR), oxitocina (OTR) y testosterona, además, afectan la biosíntesis de esteroides a través de la regulación de la aromatasa y la actividad de 5 α reductasa, en un ensayo en el cual se cuantificaron las diferencias en el nivel de expresión de ARNm del gen pS2 que se induce en la estereoidogénesis, con varios inhibidores potenciales como genisteina, naringenina, formonentina entre otros; en la mayoría de los casos, se inhibió la transcripción de la aromatasa cuando se utilizaban concentraciones altas del compuesto (Almstrup *et al.*, 2002).

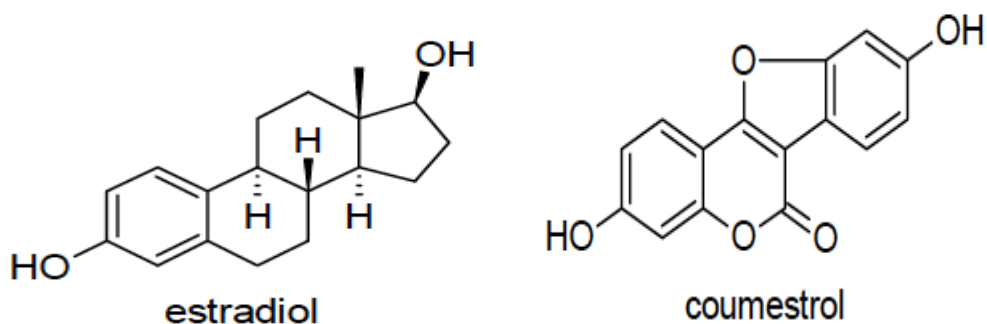


Figura 1. Similitudes estructurales entre el estradiol y el Coumestrol, un fitoestrógeno de la familia de los Coumestanos. Nótese los grupos OH de los anillos extremos de ambos compuestos

3.3 Mecanismo de acción del Coumestrol

Aunque hay trabajos en donde se hace una descripción, acerca del mecanismo de acción de fitoestrógenos en general (WocBawek-Potocka *et al.*, 2013; Zhao *et al.*, 2011), aún no es claro y cierto el mecanismo de acción del Coumestrol en el ovario de la perra, debido a que los efectos dependen tanto de la concentración como de la

disponibilidad de RE en el órgano blanco. Sin embargo, se sabe que los fitoestrógenos imitan la acción de los estrógenos.

Los estrógenos favorecen la diferenciación celular y el crecimiento de las glándulas mamarias, el útero, la vagina, los ovarios, el sistema vascular y el sistema nervioso., además controlan un gran número de funciones corporales, por lo cual, las moléculas que simulen estos efectos como el Coumestrol, pueden llevar a desordenes clínicos o subclínicos (Sanin *et al.*, 2010).

La respuesta estrogénica, principalmente se lleva a cabo a través de RE los cuales se dividen en dos subtipos el ER α , y ER β , con 95% de homología en la región de unión a ADN y 55% de homología en el dominio de unión a estrógenos (Whitten y Patisaul, 2001). Se han descrito dos tipos de respuesta a la estimulación con estrógenos a), La genómica y b) La no genómica (Björnström y Sjöberg, 2005) (Figura 2). En la primera, los efectos biológicos de los estrógenos son mediados a través de RE, miembros de la superfamilia de receptores nucleares. El mecanismo de acción clásico involucra la unión a receptores localizados en el citoplasma, en los cuáles inducen un cambio conformacional que permite cambios para que proteínas coactivadoras se unan, que los receptores formen dímeros y se puedan unir a elementos de respuesta a estrógenos (EREs) localizados en los promotores de genes blanco. Los FE pueden actuar al inicio de la transcripción alterando la interacción de RE nucleares con los EREs, en cualquier tejido que cuente con ellos. También se ha descrito que pueden alterar las marcas epigenéticas mediante la alteración de las actividades de las ADN metiltransferasas y desacetilasas de histonas (Wilson *et al.*, 2008). En la respuesta no genómica, se pueden producir efectos no genómicos mediados por RE asociados a la

membrana celular, que suelen implicar respuestas celulares rápidas que conducen a la liberación de óxido nítrico, flujos de calcio, y/o la activación de diferentes vías de señalización como la que implica la participación de AMPc (Adenosín Monofosfato cíclico) las proteínas cinasas A y C, fosfoinositol 3-cinasa (PI3K) (Ropero *et al.*, 2006), las vías de estrés oxidante, el factor nuclear kappa B, y cinasas reguladas por señales extracelulares (Watson *et al.*, 2007)

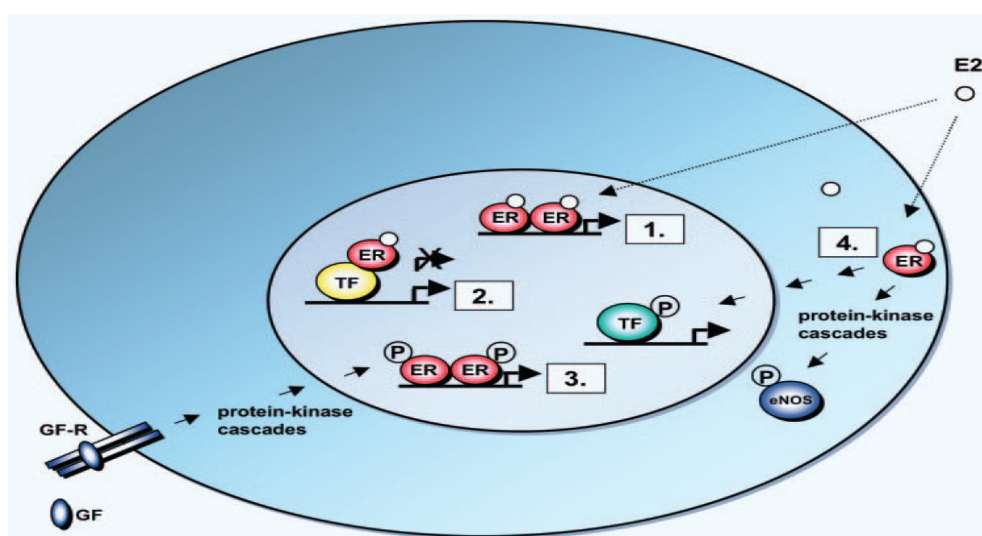


Figura 2. Mecanismos de señalización por RE. 1.Mecanismo clásico de la acción los receptores Estrogénicos se unen directamente a EREs en los promotores de genes diana. **2.** Acción genómica independiente de ERE, en donde los RE actúan a través de interacciones proteína-proteína, forman un complejo de factor de transcripción (TF) que tiene contacto con el promotor del gen blanco. **3.** Acciones genómicas independientes del ligando, por ejemplo: factores de crecimiento (GF) activan cascadas de proteína cinasa que conduce a la fosforilación (P) y la activación de RE y a la unión en los ERE. **4.** Acciones no genómicas en donde complejos membranales activan cascadas de señalización (Björnström y Sjöberg, 2005)

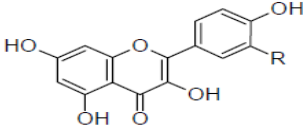
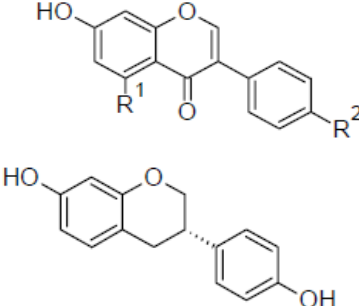
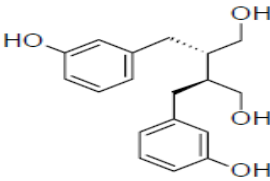
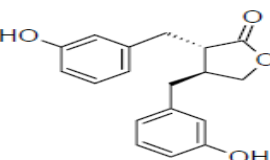
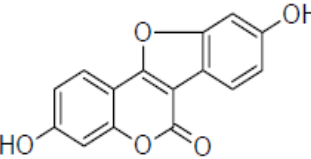
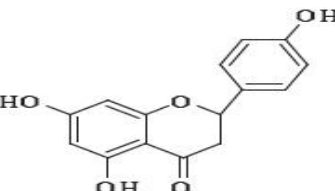
3.4 Efecto del Coumestrol en la fisiología reproductiva de las hembras

Como se indica en la Tabla 2, el Coumestrol es un fitoestrógeno que pertenece a la familia de Coumestanos, se encuentra en la alfalfa, el trébol blanco, germen de soya,

entre otros. Tiene una estrogenicidad de 1/1000 teniendo como referencia la actividad del 17 β -estradiol y es dos veces más afín al ER β que al ER α (Adams *et al.*, 1995).

Adams y colaboradores (1995) mencionan que los primeros efectos del Coumestrol sobre la reproducción se observaron en 1940, cuando se reportó que la fertilidad de ovejas era afectada por defectos estructurales en el tracto reproductivo debido a los altos niveles del fitoestrógeno, formononetina presente en el trébol rojo. En patos hembra, se probaron concentraciones de 10 y 20 μ M de Coumestrol y se observó que no hubo ningún cambio significativo en cuanto al peso del animal, el número y contenido nutricional de huevos puestos. Una concentración de 50 μ M del fitoestrógeno indujo una disminución en el peso y el número de huevos (Zhao *et al.*, 2005). En las hembras el Coumestrol reduce el porcentaje de concepción. En un ensayo con 608 vacas alimentadas con alfalfa contaminada (68.8 mg kg⁻¹ de Coumestrol) con el hongo *Pseudopeziza medicaginitis* se obtuvo menos del 10% de gestaciones a pesar de haber sido inseminadas durante un año (Romero-Ramírez *et al.*, 1997). Los autores incluyeron dentro de estos datos vacas que si presentaron gestación, pero que tuvieron abortos espontáneos o con niveles estrogénicos alterados, lo que se conoce como síndrome estrogénico, esto debido a que, cuando la alfalfa es atacada por hongos patógenos como este, tiende a producir mayor cantidad de Coumestrol (Sanin *et al.*, 2010). En la rata hembra adulta Sprague Dawley, este fitoestrógeno produce anovulación, y supresión de la LH con 100 mg Kg⁻¹ en la dieta (Shaw y McCully, 2002). En ovejas hembras adultas, la administración de 25 mg Kg⁻¹ de Coumestrol produce ovarios quísticos, estros irregulares, crecimiento uterino, metritis y descargas vaginales (Smith *et al.*, 1979).

Tabla 2. Clasificación y estructura de los Fitoestrógenos.

Familia	Ejemplos	Estructura	Referencia
Flavonas	Kaempferol R=H Quercitina R=OH		
Isoflavonas Se encuentran en la soya, la fuente más importante de FE de la dieta para los humanos, el ganado y roedores.	Formononetina R ¹ = H, R ² = OCH ₃ Daidzeina R ¹ = H, R ² = OH Formononetina R ¹ = OH, R ² = OH Equol		Patisaul, 2010
Lignan Se encuentran en alimentos ricos en fibra como las semillas	Enterodiol		Patisaul, 2010
	Enterolactona		
Coumestanos Menos común en la dieta humana. Se pueden obtener de la alfalfa.	Coumestrol		Witthen, 2001 Zierau, 2008
Flavonoides Tiene afinidad por los receptores estrogénicos tipo α, se encuentra algunos árboles africanos como el <i>Monotes engleri</i>	Naringenina		

3.5 Ovario de la perra

La perra es considerada como monoestrica, debido a que en promedio tienen de 1 a 2 ciclos estrales al año dependiendo de la raza (Galina y Valencia, 2009). Los ovarios son órganos esenciales en la reproducción, poseen doble actividad a) Forman óvulos (ovogénesis) y b) Sintetizan hormonas sexuales, estrógenos y progesterona (Urroz, 2007). Anatómicamente se encuentran en la cavidad abdominal detrás de cada riñón, el ovario de las perras consta de tres regiones: una corteza externa que contiene al epitelio germinal que origina a los folículos, el cual está dividido en dos compartimentos; el intersticial, conformado por células del estroma y de la teca externa, y el folicular, que contiene el ovocito, las células de la granulosa y las células de la teca interna, que interaccionan entre sí durante las diversas etapas de la maduración folicular. Una médula central, muy vascularizada, constituida por un estroma de tejido conectivo laxo y fibroso, y un hilum, que se encuentra alrededor de la zona de unión del ovario al mesovario, a través del cual se insertan las fibras nerviosas y los vasos sanguíneos. El útero (Figura 3) es bicorneo, con cuerpo corto, cuernos largos y delgados dispuestos en forma de V, la vagina es larga y termina en su parte más profunda en un fondo de saco (Galina y Valencia, 2009; M. Fanjul y Urdanivia, 2008). Los ovarios entran en actividad en la pubertad, que en la perra se presenta en promedio a los 6 meses, bajo la influencia de las hormonas FSH y LH. Posteriormente, se transforma en el asiento de una gran cantidad de fenómenos cíclicos como la maduración de folículos ováricos lo que repercuten sobre oviductos, útero, y vagina,

estructuras del aparato genital y sobre el organismo en conjunto. Su actividad ocasiona cambios en el comportamiento animal (Fanjul y Urdanivia, 2008).

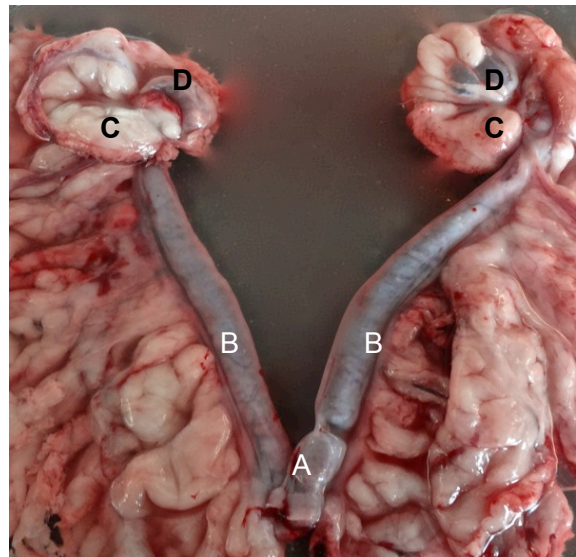


Figura 3. Aparato genital de la perra. A: útero B: cuernos uterinos C: ovarios D: bolsas ováricas E: ligamento ancho.

3.6 Foliculogénesis

Como en la generalidad de los mamíferos, en la perra, las variaciones hormonales definen las diferentes etapas del ciclo estral (Figura 4). De acuerdo a su organización estructural, pueden definirse cuatro fases del desarrollo folicular: folículos primordiales, primarios, secundarios, y terciarios. La perra al nacimiento, posee miles de folículos primordiales en su ovario, que en su mayoría sufrirán atresia, y los que no, se desarrollarán hasta liberar el ovocito que contienen. Un folículo primordial, está constituido por un ovocito primario rodeado por una única capa de células planas originadas a partir de los cordones celulares corticales. En el folículo primario, las

células que rodean al ovocito toman una forma cúbica y comienzan a dividirse, estas células están comunicadas por medio de uniones estrechas y constituyen el soporte nutritivo del ovocito. Sobre ellas aparece la lámina basal, la zona pelúcida y células fusiformes del estroma ovárico (células precursoras de la teca). En las etapas tempranas del proestro, las células de la granulosa, adquieren receptores membranales para FSH (hormona folículo estimulante), y comienzan a dividirse, además de producir estrógenos, un folículo con varias capas de células de granulosa, se denomina folículo secundario. Cuando la FSH, promueve también la producción de líquido por las células foliculares lo que conlleva a la aparición del antro, al mismo tiempo, las células precursoras de la teca se diferencian completamente formando dos capas (teca externa e interna), que producirá andrógenos, los cuales se difunden a través de la membrana basal a células de la granulosa en donde se van a transformar en estrógenos, lo que lleva a un pico estrogénico, y con esto la fragilidad capilar y el aumento en la permeabilidad de los vasos sanguíneos provocando la afluencia de los eritrocitos hacia el lumen uterino, dándole aspecto sanguinolento a las secreciones vaginales, además de incrementarse la producción de fluido folicular, el antro aumenta de tamaño y el ovocito en él, posteriormente las células de la granulosa, empiezan a expresar receptores para LH, lo que conllevará a la ovulación (Concannon *et al.*, 2011; Feldman y Nelson, 2007). Al final del proestro, se aumentan los niveles de progesterona y ocasionan el inicio de la receptividad sexual. En el estro, se da la maduración de los ovocitos en los cuernos uterinos, después de 2 ó 3 días. En esta fase, los niveles estrogénicos disminuyen casi a los niveles basales, y la progesterona empieza a aumentar. El metaestro o diestro, es la etapa de duración más variable pues se

mantiene en un lapso de 80 a 100 días. La secreción de prolactina empieza a elevarse al inicio de esta fase, llegando a su máximo a la mitad del mismo, ya que interviene en el mantenimiento del cuerpo lúteo, por ser esta hormona luteotrópica en la perra. El cuerpo lúteo también produce progesterona que llega a su máximo al inicio de esta fase. Finalmente en el anestro, los niveles hormonales disminuyen a su concentración basal (Concannon *et al.*, 2011; Galina y Valencia, 2009; Post., 1985).

Mucha de esta información se ha podido obtener gracias a trabajos realizados en estudios *in vitro*, por ejemplo Songsasen y colaboradores (2011) observaron que la FSH tiene una influencia positiva en el crecimiento y esteroidogénesis de folículos de perra, utilizando un modelo *in vitro* de microcapsulas de Alginato de Calcio. (Songsasen *et al.*, 2011).

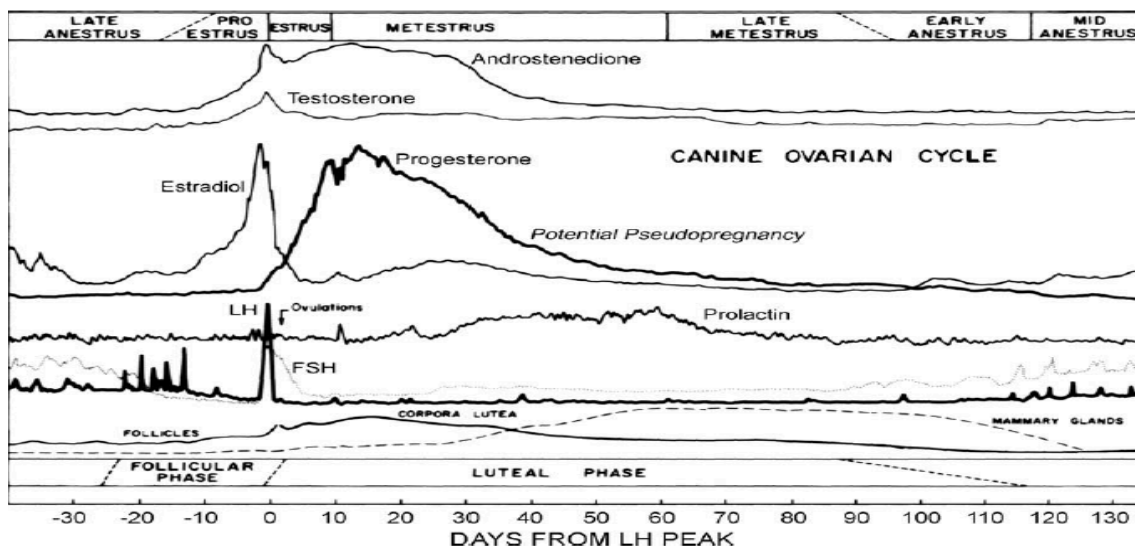


Figura 4. Los cambios en las concentraciones de hormonas reproductivas en el ciclo estral de la perra domestica (Concannon *et al.*, 2011).

3.7 Sistemas *in vitro* e *in vivo*

Hay dos principales sistemas que son utilizados para hacer pruebas experimentales, el sistema *in vivo* y el sistema *in vitro*; la elección de uno u otro radica principalmente en las necesidades de la prueba. Los modelos *in vivo* se utilizan para observar efectos tóxicos de alguna sustancia en particular, o también se generan modelos animales con diferentes enfermedades relacionadas con mutaciones particulares, lo que es interesante para revertir o impedir las complicaciones de enfermedades complejas (Acevedo *et al.*, 2013). Los sistemas *in vitro* comprenden un grupo heterogéneo de técnicas que consisten esencialmente en aislar una porción del objeto a analizar para proporcionar las condiciones físicas y químicas apropiadas y así poder analizar de manera controlada la respuesta fisiológica que surge con el tratamiento de interés, si bien, es cierto que es imprescindible hoy en día el uso de animales para experimentación en el área de ciencias de la salud, hay algunos estudios *in vitro* que pueden sustituir eficientemente los estudios *in vivo*, especialmente si ya se han hecho estudios de correlación entre ellos (Carrión *et al.*, 1999). Entre los modelos de experimentación que se incluyen en los sistemas *in vitro* se encuentran los cultivos celulares (primarios o de líneas), los cocultivos, y/o cultivo de órganos. Las ventajas de trabajar con sistemas *in vitro*, son el mejor control de las condiciones de la prueba, la estabilidad de los sistemas biológicos, además que este tipo de estudios trata de responder a la cuestión fundamental que está en la raíz de todos los efectos biológicos que surgen con la inducción de una respuesta (Cortina y Calderón, 2004). Hay que tener en cuenta que en los sistemas *in vitro*, la mayoría de los compuestos hidrofóbicos

no interactúan directamente con las células y no se puede hacer una distinción clara entre las alteraciones que tiene el vehículo, el compuesto hidrofóbico y la disponibilidad e intercambio de gases de tal suerte que se puede estar midiendo un estrés y no el efecto del compuesto a estudiar. De los sistemas *in vitro* que disminuyen la posibilidad de que el compuesto no se mantenga en contacto con el tejido dado su baja miscibilidad en medio acuoso es la inclusión, tanto del compuesto como del tejido en una matriz insoluble de alginato de calcio, así como una barrera semipermeable porosa que debe permitir el intercambio libre de moléculas necesarias para que los tejidos puedan sobrevivir y funcionar correctamente, se denominan “microcápsulas” (Lupo *et al.*, 2012). Estas microcápsulas se utilizan como sistemas *in vitro* en tercera dimensión (3D), ya que su uso permite garantizar un ambiente adecuado del tejido o células en cuestión. En particular, se ha observado que este es el mejor sistema en el cultivo de folículos ováricos (Xu *et al.*, 2006) Por otro lado, este sistema también, se utiliza, en la evaluación de los fármacos ya que permite la administración, liberación controlada, ayuda a la estabilidad de almacenamiento del fármaco, lo que previene los efectos secundarios de los medicamentos a los tejidos (Moebus *et al.*, 2012). Una de las principales sustancias de las cuales están compuestas las microcápsulas es el alginato de Sodio que tiene propiedades no solo de gelificación, sino también es espesante y es una fuente de fibra, razones por las cuales han sido de gran interés para la industria alimentaria. En éste ámbito, la encapsulación con alginato se utiliza para enmascarar o preservar sabores y aromas (Lupo *et al.*, 2012).

3.8 Métodos para analizar la expresión génica por detección de ARNm

El ADN es la molécula responsable de contener toda la información genética de un ser vivo que pasará a su siguiente generación por medio de genes, su análisis y comprensión es de gran importancia para realizar cualquier tipo de investigación, lo que ha propiciado un aumento exponencial de la información disponible (Savio, 2006).

3.8.1 Northern blot (hibridación entre fragmentos de ADN y ARN)

Esta técnica se utiliza para separar por tamaño y caracterizar ARN y así poder tener información sobre el grado de expresión de un gen específico. Consiste separar el conjunto de ARNm por electroforesis, transferir a una membrana y se le agrega una sonda de ADN marcada con algún nucleótido radiactivo, o fluorescente o ligando de proteínas para detectarla, complementaria a la secuencia del ARNm de interés, que se hibrida por medio de la unión de bases complementarias (Bhardwaj *et al.*, 2012).

3.8.2 Amplificación en tiempo real (RT-PCR o qRTPCR)

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en tiempo real (RT-PCR) es una variación de la PCR estándar utilizada para la cuantificación de ADN o de ARNm, al igual que en su antecesora, la RT-PCR utiliza oligonucleótidos de secuencia específica, pero se requiere además de un sistema que permita detectar las variaciones en la cantidad de copias que se producen ciclo a ciclo. De la misma forma, los aparatos (hardware) se encuentran modificados al acoplársele un sistema de excitación y detección luminosa que permite no solo excitar los electrones de los compuestos fluorescentes, sino también detectar la fluorescencia emitida por éstos, a partir de la

cual es posible determinar el número de copias o la cantidad relativa de una determinada secuencia de ADN o ARN. Dependiendo de las estrategias que impliquen las moléculas de detección, se pueden agrupar como intercalantes (SYBR II), de degradación (sondas Taqman®) o de hibridación (Scorpions® o molecular beacon®). Tanto las sondas de degradación, como de hibridación, contienen dos fluorocromos. A nivel de cuantificación, se puede hacer absoluta si se tiene en cuenta la cantidad asociada a una “curva de cuantificación”. Aunque, lo más común es que se incluya un gen constitutivo, que no se encuentre regulado o cuyas variaciones en la expresión sean mínimas bajo las condiciones experimentales y el tejido seleccionado por lo que se le denomina “cuantificación relativa” debido a que se compara entre diferentes muestras, la relación del ARNm de un gen específico respecto a la cantidad de ARNm del gen que se elija como control endógeno o constitutivo (Eguiarte y Souza, 2007)

3.8.3 Hibridación *in situ*

La hibridación *in situ* es una técnica que detecta secuencias de ácidos nucleicos en células, cromosomas o tejidos preservados en cortes histológicos, provee una visualización directa de la localización espacial de secuencias específicas para dilucidar la organización y función génica, esta técnica tiene varias aplicaciones como el diagnóstico de rearrreglos cromosomales, detección de infecciones virales, análisis de la función génica durante el desarrollo embrionario, entre otros (Ramos *et al.*, 2013).

3.8.4 Microarreglos de ADN

Un microarreglo, es un soporte sólido que está construido por cristal y/o membrana de nylon, el cual tiene “anclados” a el oligonucleótidos de ADN de secuencia conocida en posiciones específicas que corresponden a un gen en particular. El RNA que se extrajo de la muestra, se somete a retrotranscripción y se marca con nucleótidos fluorescentes. Este cADN se coloca sobre la superficie del microarreglo para hacerlos hibridar, y así poder cuantificar la señal que surge a través de captar las imágenes, se restan los valores de fondo y de ruido que pudiera tener, y se mide la señal para cada punto en el microarreglo que corresponde a un gen en particular. Hay varios estudios en el campo de la Biología Reproductiva que han utilizado como herramienta principal a los microarreglos, debido a que es posible analizar simultáneamente el nivel de expresión de miles de genes ante condiciones múltiples (Savio, 2006). Louise y colaboradores (2013), hicieron comparaciones entre el transcriptoma de folículos en reposo, y folículos activos con ovocitos y las células de la granulosa en humanos identificando las vías moleculares asociadas a cada uno, así como un total de 729 genes encendidos en los folículos de los ovocitos y 1456 genes para los ovocitos y las células de la granulosa (Louise *et al.*, 2013). Por otro lado, en un estudio en el que se utilizaron microarreglos para observar el efecto de la genisteína en células LNCaP (cáncer de próstata de humano que responden a andrógenos) a diferentes concentraciones, se propone que la regulación de vías mediadas por receptores de andrógenos (AR) son el potencial mecanismo por el cual actúa el fitoestrógeno, Genisteína (Takahashi *et al.*, 2004)

4 Antecedentes

El uso de fitoestrógenos en la regulación de la reproducción es un tema que se ha estado desarrollando con interés en años recientes debido a que se han observado alteraciones en la fisiología reproductiva en varios modelos animales (Patisaul y Jefferson, 2010; Sanin et al., 2010; Serrano et al., 2007). El tratamiento oral con FE ha sido empleado en el murciélago hematófago (*Desmodus rotundus*) hembra a las cuales se les administró 200 µg de Coumestrol por 30 días, se observó que provoca un aumento en la cantidad de folículos inmaduros en los ovarios (Serrano *et al.*, 2007). Este primer indicio permite proponer el uso de fitoestrógenos, particularmente el coumestrol, en el control de la reproducción de fauna nociva.

En un estudio en perros, utilizando una única dosis oral de Coumestrol de 300 µg/kg, se observó que disminuye la cantidad de espermatozoides eyaculados con un aumento en las formas anormales. En conjunto, la oligospermia y teratospermia inducida permanece por más de un año (Pérez-Rivero et al., 2009). Por otro lado, se observó cual era el efecto del Coumestrol sobre la conducta sexual en perros tratados con una sola dosis de éste fitoestrógeno de 600 µg/kg se observó que no se inducen cambios significativos en el comportamiento sexual, sin embargo se confirmaron cambios en el porcentaje de motilidad y morfología espermática (Gualo, 2010)

5 Justificación

La sobrepoblación canina de libre ambulación es un problema de gran importancia principalmente para los humanos, ya que estamos expuestos a sufrir enfermedades contagiadas por estos y ataques que pueden poner en riesgo la integridad física. La Secretaría de Salud tiene registrado que en el D.F. anualmente se atienden entre 16 y 18 mil personas por mordeduras de perros (Secretaría de Salud, 2013). Las instituciones de gobierno destinan abundantes recursos para el control de enfermedades zoonóticas y el control de la reproducción de la fauna nociva, por ejemplo, en el plan operativo de la Subsecretaría de Prevención y Promoción a la Salud en el 2008, destinó más de 2 millones de pesos para el mantenimiento del 95% de la cobertura de la vacunación antirrábica canina y felina, en todas las entidades federativas de México, promoviendo las Semanas Nacionales de Vacunación, llevando a cabo operativos de control de focos rábicos, y en la participación en estudios sobre la innovación de tecnologías para la vacunación de perros en basureros y ferales. Por otro lado, también ha destinado más de 43 millones de pesos en el mejoramiento de la atención, en personas agredidas por animal sospechoso de rabia en las 32 entidades federativas (Subsecretaría de Prevención y Promoción de la Salud, 2012).

Por todas estas razones, se hace necesario controlar de manera urgente la población de perros. La mayoría de los métodos aplicados hoy en día son caros, tanto por el tiempo que se invierte, los cuidados especiales para los animales, y el costo monetario que se requiere, así como la necesidad de emplear recursos humanos altamente calificados para implementar las diferentes estrategias, principalmente las quirúrgicas.

Las ventajas que presenta esta estrategia es el uso de una sustancia natural que no tiene un impacto en el ambiente pues ni sus metabolitos o sus precursores son ajenos a aquellos que son productos del metabolismo secundario de las plantas y su carencia de impacto negativo en los ecosistemas naturales. Por otro lado y desde el enfoque ecológico, al mantener a los organismos en sus regiones hábitat y no removerlos, permite que el fenómeno conocido como “nicho vacío” no se presente y con ello, se forman barreras que evitan la migración de organismos que potencialmente puedan ser portadores o vectores de enfermedades tanto zoonóticas como virales al humano (Pérez-Rivero et al., 2009).

A pesar de la gran cantidad de estudios relacionados a la fisiología reproductiva y el efecto de diferentes fitoestrógenos sobre el proceso reproductivo, la información sobre los aspectos moleculares fundamentales en el mecanismo de acción de éstos compuestos es superficial. La mayoría de los autores indica que los FE actúan directamente sobre los receptores a estrógenos con una preferencia a uno u otro tipo. Sin embargo, se desconocen los mecanismos moleculares involucrados directamente con el efecto que tiene el Coumestrol sobre el ovario de perro hembra, ni las diferentes vías metabólicas alteradas por el fitoestrógeno, los efectos particulares sobre la expresión de los genes que responden ya sea aumentando o disminuyendo su tasa de transcripción que se reflejan en la respuesta fisiológica total del órgano sobre el cual actúa el FE.

6 Planteamiento del Problema

El Coumestrol induce alteraciones en la fisiología reproductiva como cambios en el ciclo estral, fluctuaciones hormonales, etología del apareamiento, tanto en animales domésticos como silvestres. En el caso de la perra son nulos los trabajos que describan la respuesta a nivel molecular como alteraciones en la transcripción genética, de esta sustancia en los ovarios, lo que finalmente lleva a la respuesta fisiológica que ya está documentada. Se propone el uso de microarreglos combinado con una exposición de tejidos encapsulados que nos permitirán determinar los cambios en la expresión génica global inducidos por el tratamiento con Coumestrol

7 Hipótesis

El tratamiento *in vitro* con Coumestrol en ovarios, producirá alteraciones en la expresión génica en las vías metabólicas reguladas por los receptores estrogénicos.

8 Objetivo General

- Determinar las alteraciones en la expresión génica de los ovarios de *Canis lupus familiaris* tratados *in vitro* con Coumestrol.

9 Objetivos Particulares

- Determinar la etapa del ciclo estral en que se encuentran las perras por medio de citología vaginal exfoliativa.
- Identificar los cambios en la histoarquitectura de ovarios de perra, incluidos en microcapsulas de alginato de Calcio, con diferentes tratamientos de Coumestrol.
- Identificar las variaciones en la expresión génica de ovarios de *Canis lupus familiaris* tratados *in vitro* con Coumestrol.
- Postular las vías metabólicas alteradas por el tratamiento *in vitro* de Coumestrol en ovarios de *Canis lupus familiaris*.

10 Material y Métodos

10.1 Obtención de los ovarios

Se obtuvieron asépticamente los ovarios de 5 perras fértiles de entre 1 y 4 años de edad, por un Médico Veterinario. Los ovarios se transportaron al laboratorio en solución salina con una mezcla de Penicilina/Estreptomicina (100U/100 mg por mL) a temperatura ambiente. La porción cortical ovárica se obtuvo retirando la medula después de un corte horizontal usando fórceps e instrumentos quirúrgicos estériles, esta manipulación se realizó en una campana de flujo laminar, bajo un microscopio de disección y cambiando al menos en tres ocasiones el medio de transporte.

Del tejido cortical, se obtuvieron fragmentos de aproximadamente 30 mg (se descartaron aquellos fragmentos con quistes evidentes o carentes de folículos en

crecimiento), los fragmentos, se conservaron en solución salina para su posterior manipulación.

10.2 Citología Vaginal Exfoliativa

De acuerdo a Galina y colaboradores (2006), la citología vaginal exfoliativa se basa en el hecho de que al aproximarse el celo en la perra hay aumento en el número de capas de epitelio vaginal debido al incremento de las concentraciones séricas de estrógenos circulantes, las células que quedan más expuestas, mueren y se acelera el proceso de descamación de las mismas. Esta metodología es simple, no invasiva, no requiere de muestras y manejo especializado como el que requiere la determinación cuantitativa hormonal (Post, 1985), además, se ha utilizado como una herramienta de determinación estral en cabras, gatas, perras, vacas y ovejas (Pérez-Martínez *et al.*, 1999). Brevemente, se limpió la parte externa de la vagina con una gasa y agua destilada, con los dedos se masajeó un poco, y se abrió para que quedara expuesta la pared vaginal interna, con un portaobjetos limpio y seco, se hizo una impregnación de las células que se encontraron ahí, presionando el portaobjetos contra la pared vaginal. Posteriormente, se agregó, alcohol al 70% para fijar las células, luego se hizo la tinción con colorante Giemsa, el cual se dispersó por todo el portaobjetos con la ayuda de una pipeta Pasteur, se dejó durante 10 minutos, posteriormente se le hizo pasar agua corriente del lado contrario de la tinción con el objetivo de desechar los excesos, se dejó secar y se observaron en el microscopio óptico para hacer la determinación morfológica y el conteo celular. La proporción celular establecida para esto se muestra en la Tabla 3. Se consideraron las células sin núcleo (anucleadas) aquellas con bordes

angulosos e irregulares (predomina en el estro y marca el final del proceso de descamación de la célula parabasal); células superficiales, las que tenían bordes angulosos, con núcleo de menor tamaño que la intermedia y parabasal (predomina en el final del proestro y todo el estro, que es cuando la vagina se encuentra bajo la influencia del pico estrogénico, comunes en la etapa preovulatoria); células intermedias, las que tenían bordes irregulares con mayor cantidad de citoplasma (predomina a la mitad de proestro); células parabasales, de morfología ovalada o redonda con núcleo aparente y pequeña cantidad de citoplasma. Esta célula se desprende de la capa de células germinales cercana a los vasos sanguíneos (Predomina en el anestro y principios del proestro) (Esquivel, 2013). En la tabla 3 se muestran los porcentajes celulares encontrados en vagina de perra para cada etapa del ciclo estral.

Tabla 3. Porcentajes celulares encontrados en vagina de perra para cada etapa del ciclo estral (Esquivel, 2013)

Tipo celular	Proestro	Estro	Diestro	Anestro
Anucleadas	10	90	30	10
Superficiales	30	8	20	10
Intermedias	50	2	20	20
Parabasales	10	0	30	60
Neutrofilos	+-	0	30	60
Eritrocitos	++	+	-	-

10.3 Microencapsulación

Para la realización de este trabajo se optó por un sistema *in vitro* de tres dimensiones el cual permite mantener un microambiente estable en tejido ovárico de perra (Songsasen *et al.*, 2011).

Las fracciones del tejido se incluyeron en microcápsulas de alginato de Sodio, y se depositaron en una solución de CaCl_2 en una punta de micropipeta de 1 mL, se tomaron 100 μl de alginato de sodio al 1.5% conteniendo la concentración de Coumestrol (1,2,4 y 8 ng/mL de Coumestrol disuelto en DMSO como vehículo para el grupo control) y el fragmento de la corteza ovárica, el cual se depositó un pozo que contenía 1mL de CaCl_2 150 mM para conseguir la polimerización de las microcápsulas, el proceso se dejó madurar por 30 segundos. La microcápsula madurada, se depositó en un pozo con 1 mL de medio de cultivo RPMI-1640 libre de rojo fenol (Microlab, México) adicionado con L-glutamina y antibióticos Penicilina/Estreptomicina (100U/100 mg por mL); las microcápsulas con el tejido incluido y en contacto con el fitoestrógeno se mantuvieron en incubación a 37 °C en atmósfera de CO_2 en aire humidificado por 4 horas. Todos los tratamientos se realizaron por triplicado en cajas de 24 pozos, (una repetición de cada tratamiento se utilizó para el análisis histológico). Después del tiempo de incubación, la microcápsula se disgregó mecánicamente, y el tejido se depositó en 1 mL de Trizol® (Ambion, life technologies, USA), para llevar a cabo la extracción de ARN total

10.4 Análisis histológico, en los fragmentos de ovario

Los fragmentos ováricos de 30 mg sometidos al tratamiento con Coumestrol se fijaron en formalina amortiguada (10%, pH 7.0), se deshidrataron antes de ser incluidos en parafina y seccionados a 5 μ m. Las muestras fueron teñidas con la metodología de Tinción Tricrómica de Masson modificada. Brevemente, el tejido fue desparafinado y rehidratado hasta llegar a agua destilada; posteriormente fue teñido con hematoxilina férrica durante 10 minutos y se lavó con agua corriente durante otros 5 min. El tejido fue lavado con agua destilada de dos a tres veces más. Se tiñó con solución de Fucsina ácida escarlata de Biebrich durante 10 minutos y se lavó con agua destilada por dos ocasiones. Se tiñó durante 4 minutos con los ácidos de Masson (fosfotungstico acuoso y fosfomolibdico acuoso) y posteriormente con Azul de Anilina por 10 minutos para retirar el exceso de colorante. Se lavó con agua destilada dos veces, y la diferenciación se llevó a cabo con ácido acético al 1% durante 1 minuto. Por último, la muestra fue deshidratada, y montada en un porta objetos con resina sintética. Las muestras fueron analizadas en microscopio óptico equipado con lentes apoplanacromáticos y cámara digital (Motic, Co.) con el que se capturaron imágenes representativas de cada preparación y se analizaron mediante el programa Motic images plus 2.0. Se identificó el diámetro de los folículos ováricos encontrados en cada preparación. Se consideraron como folículos primordiales aquellos que presentaban un ovocito rodeado de una única capa de células pregranulosa, se tomaron como primarios los que tenían varias capas de células de la granulosa alrededor del ovocito, los secundarios se tomaron como los que tenían además de varias capas de células de

granulosa, una capa de células de la teca (alargadas) y zona pelúcida, finalmente se tomaron como folículos terciarios los que tenían, antro evidente rodeando completamente al ovocito (McGee y Hsueh, 2000).

10.5 Extracción de ARN

Se llevó a cabo por el método de Trizol®. El tejido con 1 mL de este reactivo, se homogenizo con un Politrón Kimble® en hielo seco, el homogenizado se colocó en un tubo Eppendorff de 1.5 ml y se incubó durante 5 min a temperatura ambiente. La separación de la fase acuosa y orgánica se indujo al adicionar 200 µl de cloroformo, se agitó vigorosamente y se dejó a temperatura ambiente durante 2-3 min. La compactación de la separación de las fases se realizó mediante centrifugación a 12,000 X g durante 15 min a 4 °C (MIKRO® 200R). La fase acuosa se transfirió a un tubo Eppendorff de 1.5 ml nuevo. Posteriormente, en este tubo se precipitó el ARN al añadir 500 µl de isopropanol, incubándose las muestras a temperatura ambiente por 10 min y se centrifugó después de la inversión del tubo, a 12000 X g por 10 min a 4 °C. Posteriormente, se removió el sobrenadante por decantación, y se lavó el pellet una vez con etanol al 75% y se homogeneizó nuevamente, después se centrifugó a 7500 X g por 5 minutos, a 4 °C. Al finalizar, se decantó el etanol y se dejó secar en un horno de hibridación por 10 minutos a 50 °C. Finalmente, se disolvió el ARN en 50 µl de agua libre de ARNsas. Todos los materiales utilizados en la extracción de ARN, pasaron por un tratamiento previo con inhibidores de ARNsas y se dejaron en un horno a 180°C por 24 horas.

10.5.1 Integridad y pureza de ARN

Para evaluar la pureza del ARN se utilizaron los coeficientes de 260/280 nm y 230/260 nm obtenidos en el Nanodrop2000®, con este mismo aparato se evaluó a concentración. La evaluación de la integridad de ARN se estimó mediante la realización de un gel de agarosa al 2% resuelta en amortiguador TAE.

10.6 Análisis del transcriptoma por microarreglos

10.6.1 Síntesis *in vitro* de cADN

Se hizo un pool de las muestras por cada tratamiento. Para marcar el ARN se realizó una síntesis *in vitro* de cADN, utilizando el sistema de preparación SesationPlus FFPE amplification and WT labelling kit de Affymetrix (Santa Clara, CA), de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Se utilizó oligodT₂₀ mas 20 nM de cada uno de los desoxinucleótidos A, C, G y T, 2 nM del desoxinucleotido marcado fluorescentemente dUTP-Alexa₅₅₅ para el tratamiento control y dUTP-Alexa₆₄₇ para los diferentes tratamientos con Coumestrol. Cada marcado se realizó en tubos independientes. Se utilizó una mezcla de las transcriptasas reversas AMV y MoMuLV. En cada caso, las reacciones conteniendo dUTP^{Alexa} en el caso de las muestras incubadas con el vehículo se utilizó Alexa₅₅₅ mientras que para las experimentales el fluoroforo utilizado fue Alexa₆₄₇ lo que permitió obtener una señal diferenciable durante la hibridización consecutiva en el chip. El cADN marcado se purificó para eliminar el deoxinucleótido fluorescente no incorporado al cADN. La disposición del marcado de mARN se cada conjunto se muestra en la Tabla 4.

Tabla 4. Protocolo de marcado durante la síntesis de cADN de muestras de ARN obtenido de fragmentos de corteza ovárica tratada con Coumestrol. Los números corresponden a la concentración de Coumestrol (ng/ml) contenida en las microcápsulas de alginato de Calcio.

CHIP	Alexa555	Alexa647
M22K_08_31	0	1
M22K_08_32	0	2
M22K_08_33	0	4
M22K_08_34	0	8

10.6.2 Hibridación de microarreglos

La plataforma que se eligió fue la de Affymetrix que contiene 22,000 genes. Es una plataforma supervisada con genes indicadores en posiciones específicas, posiciones con secuencias totalmente aleatorizadas que no corresponden a ninguna secuencia contenida en el GenBank. Para la hibridación de los microarreglos, se utilizó una estación Affymetrix GeneTitan acoplada a Affymetrix Nymbus preparation system de Affymetrix (Santa Clara, CA) en cuya celda de incubación/hibridación se aplicó una solución de hibridación y las sondas (cADN marcado) sobre los cuatro microarreglos que contenía 22,000 ORFs (Marco Abierto de Lectura) conocidos de ratón (Tabla 4) posteriormente se cubrió con un cubreobjetos para permitir que las soluciones abarcaran toda la superficie. La solución de hibridación se mantuvo durante 16 horas y el exceso de material no hibridizado se retiró con lavados de astringencia media antes de ser evaluadas con un GeneChip Scanner 300-7G de Affymetrix (Santa Clara, CA). Después de retirar con soluciones de alta astringencia y lavado las sondas del lote

control, el chip se neutralizó e hibridizó con las muestras experimentales, de la misma forma que para el control. Los datos de fluorescencia de Alexa₅₅₅ y Alexa₆₄₇, se analizaron posteriormente. Cada par de muestras tratamiento-control se realizó en chips independientes

10.6.3 Lectura de microarreglos

Se excitaron las moléculas fluorescentes unidas al cADN con un láser y se capturó la imagen fluorescente a través del lector de una cámara digital, esto se hizo para cada uno de los fluoróforos obteniéndose dos imágenes, una para el fluoróforo Alexa₅₅₅ (rojo) y una para el fluoróforo Alexa₆₄₇ (azul), para poder obtener estas imágenes, se ajustó la intensidad del láser y la sensibilidad de la cámara, para obtener intensidades semejantes de fluorescencia total. Después de la obtención individual de estas imágenes, se combinaron para obtener un aspecto visual del microarreglo.

10.6.4 Cuantificación de microarreglos

Para obtener los valores cuantitativos a partir de la densidad de fluorescencia (en $\text{píxeles}/\mu\text{m}^2$) obtenida de cada una de las señales de fluorescencia (spot) contenidas en el microarreglo, se utilizó el software geneArise v2.0 (disponible en: <http://www.ifc.unam.mx/genarise/main.html>) escrito en lenguaje R, el cual permite hacer las siguientes consideraciones:

10.6.5 Corrección de fondo

Se restó la intensidad de fondo de Alexa₅₅₅ de la intensidad primer plano, y la intensidad de fondo Alexa₆₄₇ de la intensidad primer plano, para cada spot en el microarreglo.

10.6.6 Valores de R e I

Con la corrección de fondo realizada, la proporción de la expresión diferencial del logaritmo, y la medición de todo el brillo para cada spot se computarizaron, la proporción del logaritmo está representada por $R = \log_2(\text{Alexa}_{555}) - \log_2(\text{Alexa}_{647})$, y la intensidad general por $I = \log_2(\text{Alexa}_{555}) + \log_2(\text{Alexa}_{647})$.

10.6.7 Normalización

Se utilizó un análisis de regresión.

10.6.8 Filtrado de intensidad

Con el propósito de eliminar los puntos en donde la intensidad está cercana a su fondo correspondiente, cada valor de Alexa₅₅₅ en el spot debió ser más grande que dos desviaciones estándar del valor de fondo para el mismo fluorocromo, el mismo criterio se usó para Alexa₆₄₇.

10.6.9 Análisis de sistemas de los resultados de microarreglos

Se obtuvo la media aritmética de los valores de los valores de intensidad, así como la media geométrica y finalmente los valores extremos, se identificaron los genes que fueron expresados diferencialmente mediante el cálculo de un puntaje “Z” dependiendo de la intensidad, que es indicativa del estado de expresión de cada uno de los genes

representados en el microarreglo ordenados por micro- y macrocolumnas con micro- y macrorrenglones. Se usó un algoritmo de ventana para calcular la media y la desviación estándar dentro de la ventana que rodeaba cada punto y se definió el puntaje de Z en donde el número de las desviaciones estándar desde la media $Z_i = (R_i - \text{media}(R)) / \text{sd}(R)$ En donde Z_i es el puntaje para cada elemento, R_i es la proporción del logaritmo; para cada elemento y $\text{sd}(R)$ es la desviación estándar de la proporción del logaritmo, con este criterio los elementos con valor absoluto de puntaje de Z más 2 desviaciones estándar podrían ser los genes expresados significativamente diferentes.

11 Resultados

11.1 Histología y Citología Vaginal

Haciendo una comparación del tipo de células que se encontraron en los frotis vaginales que se realizaron, con los porcentajes planteados por Esquivel (2013) (Tabla 3), se deduce que el 80% (cuatro de cinco) de las perras se encontraban en etapa del estro, y solo una en proestro (Tabla 5). En este estudio, se identificaron los diferentes tipos celulares en las muestras A, C, D, E que caracterizan la etapa de estro, mientras que en la muestra B se pudieron observar un gran número de eritrocitos, con células superficiales, indicativas de una fase de proestro (Figura 5).

Tabla 5. Tipos celulares encontrados en la citología vaginal exfoliativa de las hembras utilizadas en el estudio.

Tipo celular	Individuo				
	A	B	C	D	E
Anucleadas	98	2	80	84	4
Superficiales	2	18	20	6	96
Intermedias	0	0	0	0	0
Parabasales	0	0	0	0	0
Neutrófilos	0	0	0	0	0
Eritrocitos	0	82	0	0	0
Estado del ciclo	Estro	Proestro	Estro	Estro	Estro

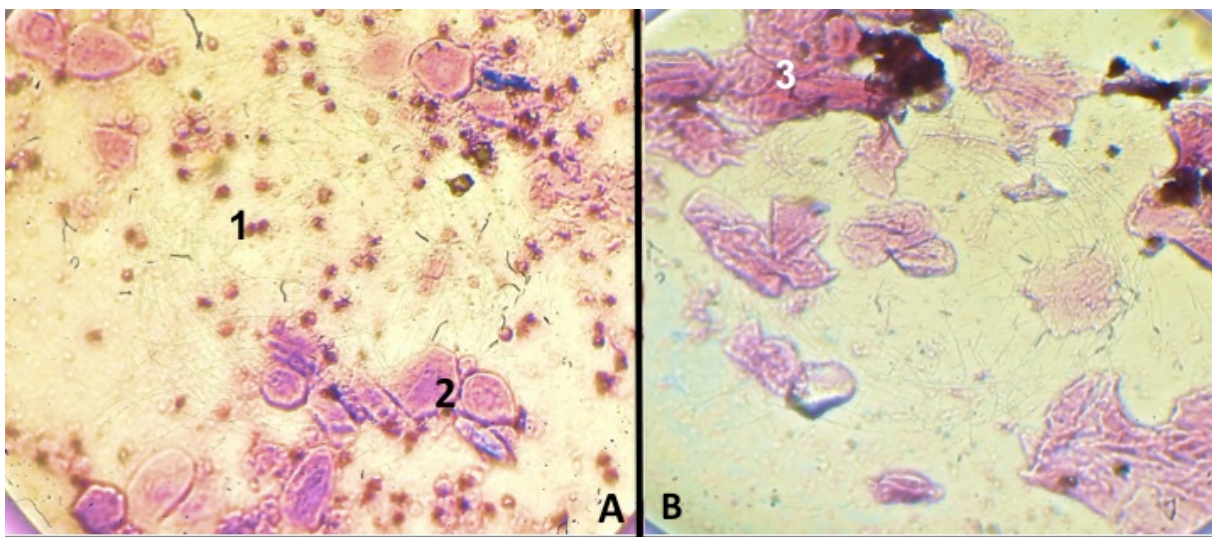


Figura 5. Tipos celulares encontrados en la vagina de las perras. A: frotis típico de perra en proestro, 1. Eritrocitos. 2. Células superficiales. B: frotis típico de perra en estro, 3. Células anucleadas.

La evaluación del estado histológico de los ovarios de las perras del estudio, se realizó mediante la observación de cortes histológicos de fragmentos tratados con diferentes concentraciones de Coumestrol (Figura 6). El diámetro y la proporción folicular en diferentes estadios de cada porción ovárica tratada, se muestra en la Tabla 11 (Anexo). En la muestra A expuesta con 1ng/mL de Coumestrol (A1) el número de folículos primordiales fue el mayor de todos los demás tipos de folículos encontrados en esa muestra con un 48%, lo mismo ocurrió en los tratamientos con 2, 4 y 8 ng/mL, en donde el porcentaje de folículos primordiales fue de 66%, 81% y 64% respectivamente. En todos los casos, como se puede ver en la Figura 7, hubo una disminución progresiva del número de folículos conforme se va realizando la progresión folicular, en la Figura 6 se muestra una imagen representativa de los folículos encontrados en las preparaciones histológicas. En la muestra B sin tratamiento (B0) se observaron solo dos tipos de folículos, el 80% corresponde a folículos primordiales y el 20% a folículos secundarios, en esta misma muestra pero con 1 ng/ml se contaron en su mayoría folículos primordiales (33%), en el caso del tratamiento con 2, 4 y 8 ng/ml también se encontró una mayor cantidad de folículos primordiales 80%, 55% y 60% respectivamente, a diferencia de la muestra C sin tratamiento (C0). En las concentraciones restantes de esta muestra, se observó nuevamente una cantidad mayor de folículos primordiales, para el caso del tratamiento con 1 ng/ml de Coumestrol, se contó 68%, con los tratamientos 2, 4 8 ng/ml se observó un 61%, 34.7% y 81.2% respectivamente, aunque en la ultima concentración no se hizo el conteo de folículos secundarios y terciarios debido a que no se encontraron.

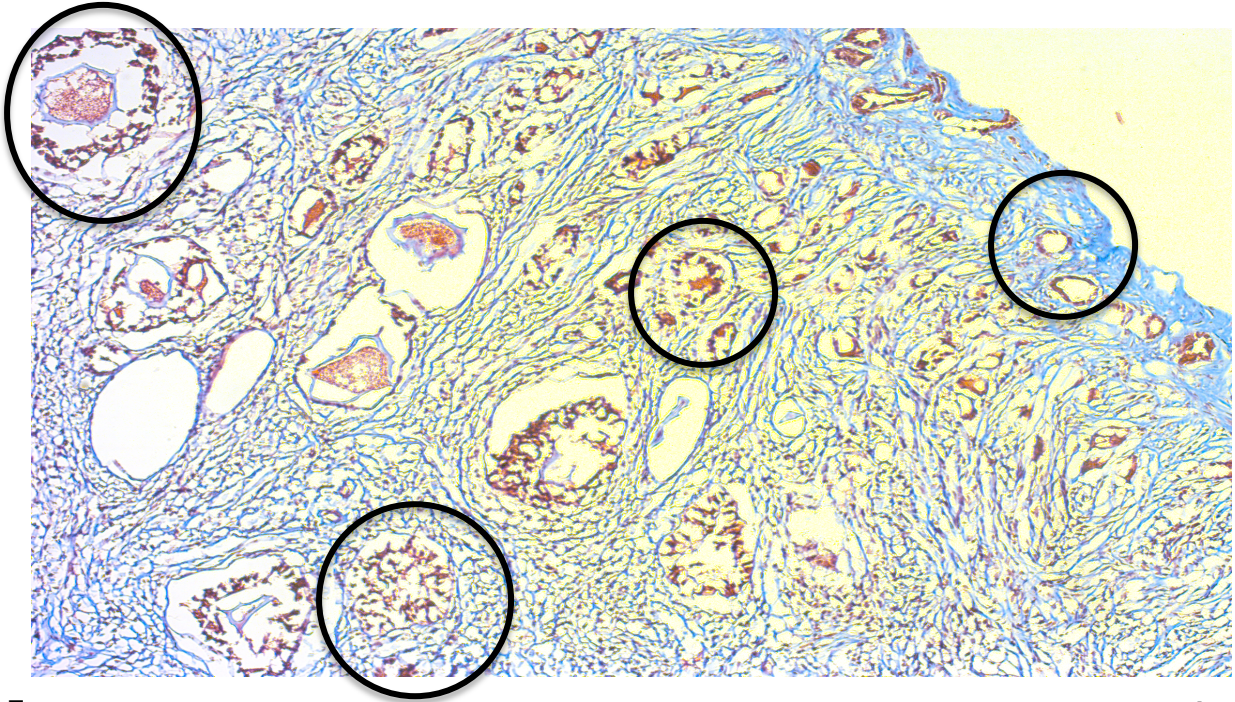


Figura 6. Histoarquitectura representativa de ovarios de perra (10X). Fragmentos de tejido ovárico fueron incluidos en microcápsulas de alginato de Calcio conteniendo 1, 2, 4 u 8 ng/ml de Coumestrol con el vehículo, de izquierda a derecha; un folículo terciario, con ovocito, antro y zona pelúcida evidente; se muestra un folículo secundario, con varias capas células de granulosa; un folículo primario con el ovocito y epitelio folicular y finalmente un folículo primordial, con una sola capa de células planas.

En las concentraciones restantes de esta muestra, se observó nuevamente una cantidad mayor de folículos primordiales, para el caso del tratamiento con 1 ng/ml de Coumestrol, se contó 68%, con los tratamientos 2, 4 8 ng/ml se observó un 61%, 34.7% y 81.2% respectivamente, aunque en la última concentración no se hizo el conteo de folículos secundarios y terciarios debido a que no se encontraron.

Diámetro folicular

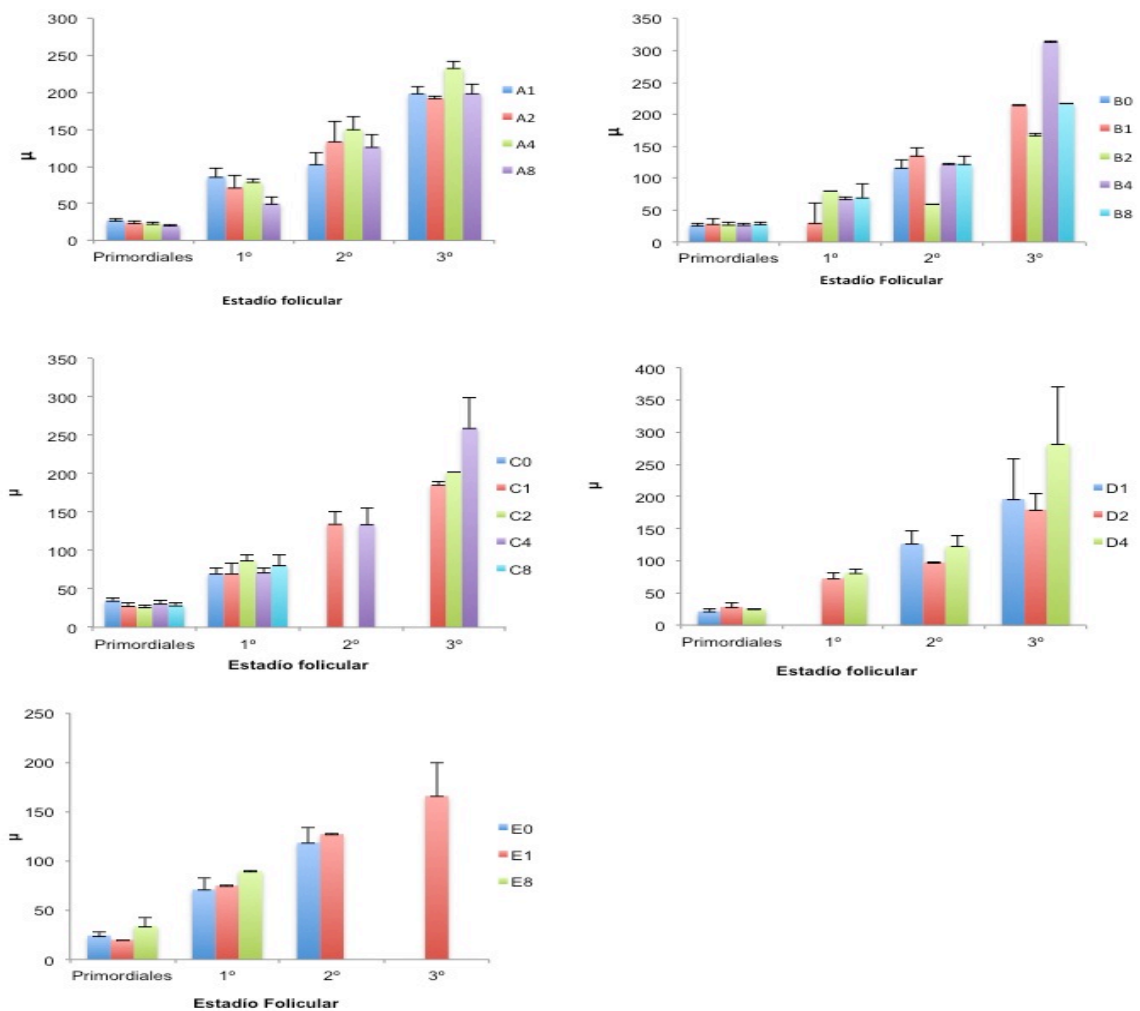


Figura 7. Diámetro de folículos identificados en cortes histológicos de ovarios de 5 perras incluidos en alginato de Calcio con diferentes concentraciones de Coumestrol. Se muestran gráficas para cada uno de los tratamientos, cada color en las barras corresponde a un tratamiento diferente, se puede observar que no hay diferencias entre los tratamientos, ya que las micras (μ) entre los estadios determinados como primordiales, primarios (1°), secundarios (2°) y terciarios (3°) son homogéneos entre los ovarios.

En la muestra D con 1, 2 y 4 ng/mL en donde se obtuvieron porcentajes de folículos primordiales de 36.3%, 34.3% y 65%, en esta muestra con concentración de 1 ng/mL no se observaron folículos primarios, en la muestra E sin tratamiento (E0) también se

encontró un mayor porcentaje de 61% para folículos primordiales, y no se encontraron folículos terciarios, algo parecido ocurrió con la concentración más alta en donde no se encontraron folículos secundarios ni terciarios y la mayor cantidad de folículos encontrados fueron los primordiales con 75%, finalmente en esta misma muestra pero con 1 ng/mL, se encontró un porcentaje de 66% para los mismos folículos y una disminución de 8.3% para folículos primarios y secundarios. En cuanto al diámetro folicular, se puede observar un patrón de crecimiento dependiendo de la etapa de crecimiento en que se encontraban los folículos. Como puede verse, la distribución, abundancia y tamaño de los folículos son similares en la mayoría de las muestras utilizadas.

Las microcápsulas utilizadas en el estudio fueron estables química y mecánicamente, manteniendo un ambiente adecuado al tejido (Figura 8)

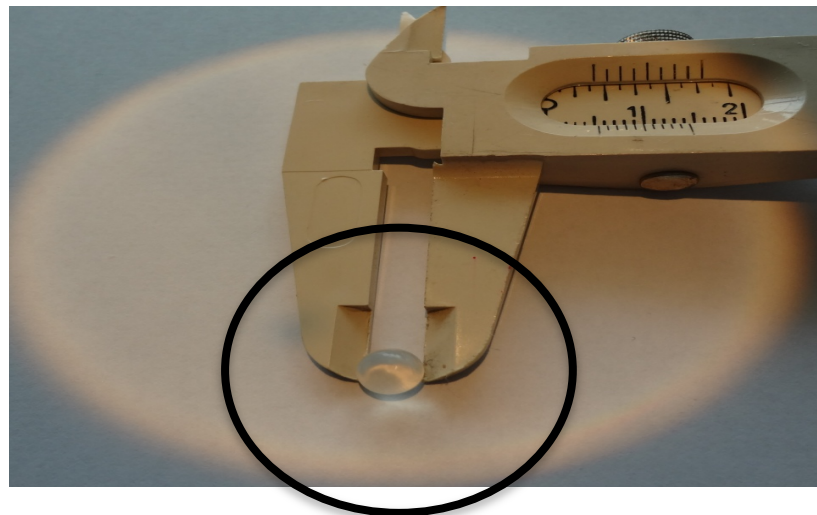


Figura 8. Microcápsula formada con Alginato de Sodio y CaCl_2 . Las microcápsulas maduras son estables químicamente y resistentes a la desecación y manipulación mecánica.

Después de la incubación, las microcápsulas se eliminaron mecánicamente y el tejido tratado se sumergió en solución de Trizol®. Después de la homogenización y aislamiento del ARN, se determinó la concentración y pureza en el Nanodrop®. Como puede observarse en la Tabla 6, la cantidad de ARN total que se obtuvo de los diferentes fragmentos es relativamente constante, así como también en el caso de la pureza. Por otro lado, la cantidad de contaminantes encontrados, no son importantes como para que pudiesen interferir en las metodologías subsecuentes.

De la misma forma, al evaluar en las muestras la integridad de la muestra de ARN mediante electroforesis reductora de agarosa presentó las características adecuadas para poder ser utilizado (Figura 9). La presencia de las banda de rARN 18S y 23S en la intensidad relativa indican la presencia de una muestra de ARN de integridad adecuada para poder ser analizada mediante microarreglos de alta densidad.

Tabla 6. Concentración y Pureza (Cociente 260/280) de ARN total que se obtuvieron del aislamiento de fragmentos ováricos incluidos en microcapsulas con el método de Trizol

I)	[Cou (ng/m					Concentración de RNA (ng/μl)				
	A	B	Pureza (A_{260}/A_{280})			A	B	C	D	E
0	1.82	1.72	1.76	2.13	2.1	974.9	922.4	482.9	294.7	208.1
0	2.06	2.03	1.98	2.07	2.05	458.4	531.5	321.8	516.7	262.6
1	2.13	1.86	2.09	2.11	2.02	1006.1	5095.5	369.1	491.2	371.1
1	2.14	2.14	2.12	2.04	2.1	908.2	606	321.3	370.9	426.3
2	1.89	1.99	1.83	1.83	2.09	473	5001.9	291.9	216	447.4
2	2.1	1.84	1.82	2.11	-	338.5	1913	614.3	452	-
4	2.1	2.1	2.1	2.12	1.98	827.5	702.7	439.3	366.3	267.9
4	2.08	2.16	2.06	2.13	1.93	578.3	358.9	395.7	313.4	1197
8	1.96	1.92	2	2.07	1.77	690.6	642.5	292	254.7	920.5
8	1.95	2.13	2.05	2.13	1.49	4339.7	502.2	614.8	457.1	810.6

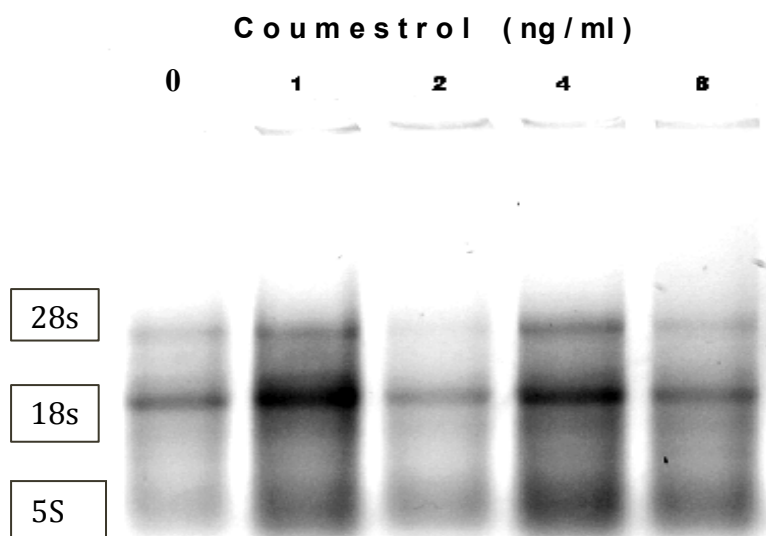


Figura 9. Separación electroforética de RNA aislado de fragmentos de corteza ovárica incluida en microcápsulas con diferentes concentraciones de Coumestrol.

11.2 Microarreglos

El análisis de los microarreglos se realizó mediante el software GeneArise que toma la densidad de las imágenes en $\text{píxeles}/\mu\text{m}^2$ y permite hacer las consideraciones pertinentes, como se describió en materiales y métodos utilizando los parámetros de Intensidad (I) y correlación (R). Una ventaja de este software es que permite hacer una representación gráfica de cada etapa de corrección. La plataforma que se utilizó es la de un microarreglo supervisado que implica tener un grupo de posiciones (spot) en las cuales se encuentran secuencias totalmente aleatorizadas que se utilizan para evaluar la unión inespecífica del cADN marcado con los fluoróforos (Figura 10a, 10b); igualmente, tienen oligonucleótidos que hibridizan con genes constitutivos en más de un sitio tanto dentro de las macro- y microcolumnas como de los macro- y micro-renglones, los cuales son procesados de manera que se eliminan los valores extremos permitiendo entonces tomarlos como un solo gen (Figura 10c) y finalmente, normalizar

todos los datos (Figura 10d). Utilizando este mismo programa, se pueden agrupar los datos de acuerdo al puntaje de Z (Z score), que es una representación estadística de la diferencia entre cada uno de los genes del microarreglo respecto de la propia intensidad en el grupo control y, por consiguiente evalúa la diferencia relativa en la expresión de ese gen en particular. La representación gráfica de todos los genes (Figura 11a), es fraccionada de acuerdo a este valor de Z. Los genes que no varían su representación entre el grupo control y experimental se distribuyen entre los valores 0, +1 y -1 (Figura 11b), aquellos cuya expresión es muy pequeña respecto de los valores obtenidos por la muestra control lo hacen con valores de Z entre +1 a +1.5 y -1 a -1.5 (Figura 11c); el valor de Z entre +1.5 a +2 corresponde a genes cuya inducción es muy baja, mientras que una ligera disminución en la síntesis de ARN está representada por los genes con valores de Z -1.5 a -2 (Figura 11d). Solamente aquellos genes que están siendo inducidos (Z mayor de +2) o reprimidos (Z mayor a -2) serían los que estarían siendo afectados por el tratamiento con el fitoestrógeno (Figura 11e). Utilizando este criterio, las alteraciones en el nivel transcripcional se definieron como mínimo, medio, marginal y extremo. La Tabla 7 muestra los resultados de esta clasificación. Los valores negativos se tomaron como disminución de la cantidad de ARN para ese grupo de genes mientras que los valores positivos se tomaron como un aumento en la cantidad de ARN para ese grupo de genes. Es de llamar la atención que en el caso de la disminución denominada “extremo” los valores de Z se hacen menos negativos de manera proporcional al aumento en la concentración de Coumestrol. Esto puede indicar un aumento relativo en la cantidad de ARN para estos genes.

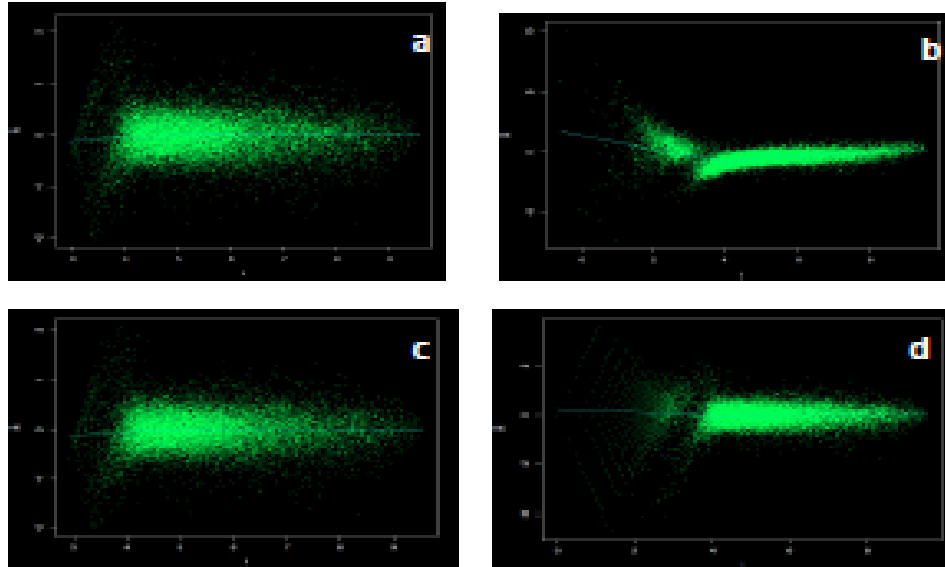


Figura 10. Representación grafica del filtrado (a), corrección (b), eliminación de duplicados (c) y normalización (d) de la intensidad de fluorescencia obtenidas al restar las correspondientes al control, los duplicados de las ORF del microarreglo, unión específica y distribución de la sonda hibridizada en cada microarreglo utilizado

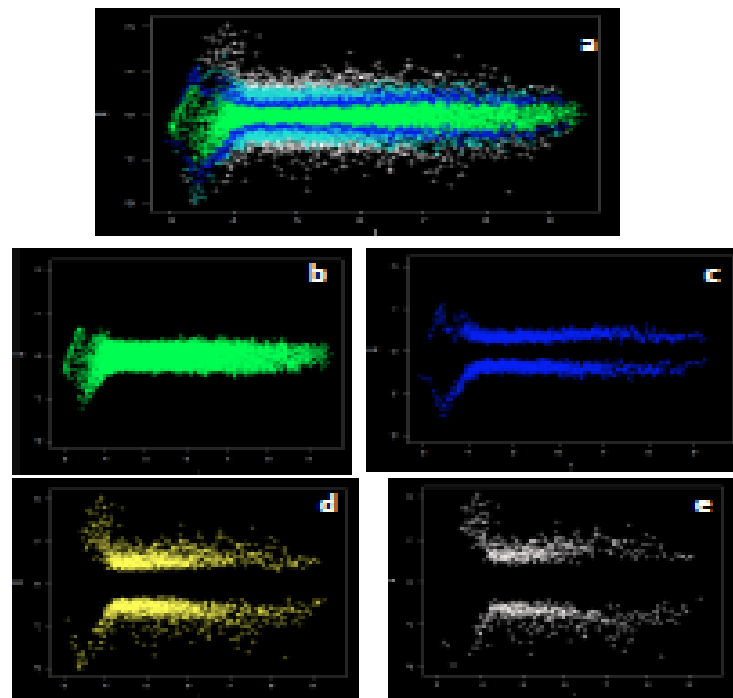


Figura 11. Expresión diferencial de genes basado en el cociente Z. Expresión global (a), genes con valor de Z entre 0, +1 y -1 (b) +1 a +1.5 y -1 a -1.5 (c). Z -1.5 a -2 (d). Genes con $Z > 2$ se consideran como inducidos y aquellos con $Z < -2$ como reprimidos (e)

Tabla 7. Número de genes alterados con el tratamiento con Coumestrol.								
Clasificación arbitraria (Valor de Z)	Aumento				Disminución			
	1ug	2ug	4ug	8ug	1ug	2ug	4ug	8ug
Mínimo (0 a +1., 0 a -1)	1778	1813	1753	1583	1828	1734	1778	1705
Medio (+1 a +1.5, -1 a -1.5)	670	546	675	567	676	675	765	567
Marginal (+1.5 a +2, -1.5 a -2)	654	876	765	767	734	498	876	788
Extremo (+2,-2)	487	423	498	528	452	522	437	453

Dado que el aumento en la cantidad de ARN para un gen podría indicar su síntesis, es decir la inducción de la transcripción, los valores de Z positivos se tomaron como una inducción. De manera análoga, la disminución en la cantidad de ARN se tomó como represión.

Se analizan las cantidades relativas de genes inducidos por tratamiento. En términos generales, la inducción de genes es similar en cada dosis de Coumestrol. En cada uno de estas divisiones se encuentran genes diferentes. De hecho, en cada dosis se presenta un aumento en los valores de Z. Esto es más evidente cuando se toma en cuenta únicamente los genes que responden en todos los tratamientos (Figura 12 y 13). En estos, aún los datos de Z con valor negativo decrece de tal suerte que pueden indicarse como “reprimidos”. En la Figura 12A, se puede observar con mas detalle como es directamente proporcional el aumento de la concentración de Coumestrol con el valor de Z, también se observa cómo la concentración de 1ng/mL el valor de Z es

mayor, lo que nos dice que con esta concentración, se reprimen más genes (Figura 12B). Es necesario recordar que en todos los casos los valores tienen un ajuste respecto de las cantidades que se presentan en los ARN aislados de fragmentos tratados solamente con el vehículo.

No todos los genes tuvieron la misma respuesta. En la Figura 14, se muestra la proporción de este tipo de respuesta tanto para los genes inducidos como reprimidos.

Si bien como se muestra en la Figura 14, la proporción de genes inducidos y reprimidos son similares, aunque no se traten de los mismos, en la Tabla 8 se pueden observar los genes que encontramos como inducidos en común a todos los tratamientos, y en interacción con cada concentración utilizada, en la tabla 9 se observan genes que encontramos reprimidos en común a todas las concentraciones, y también en cada una de las interacciones, todos los genes son diferentes esto nos indica que en efecto hay una respuesta diferencial en nuestro sistema con el Coumestrol.

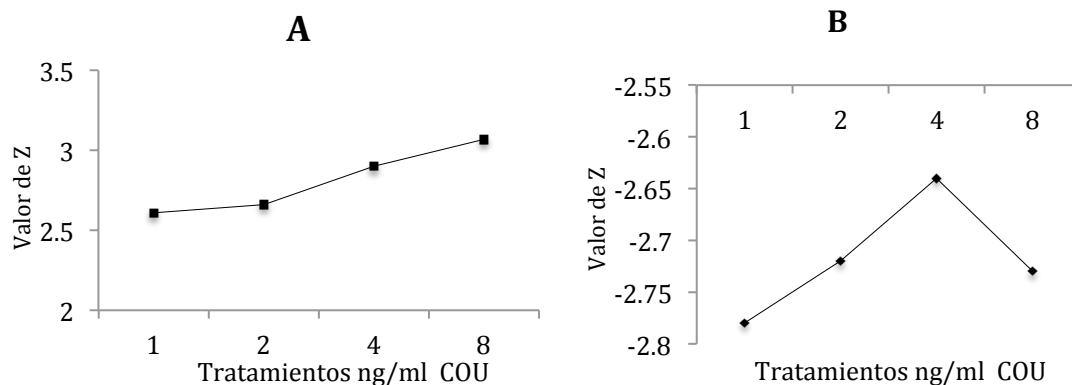


Figura 12. Las variaciones en el valor de Z en los genes que responden en todos los tratamientos. Se presentan los genes considerados como “inducidos” (a) o “reprimidos” (b).

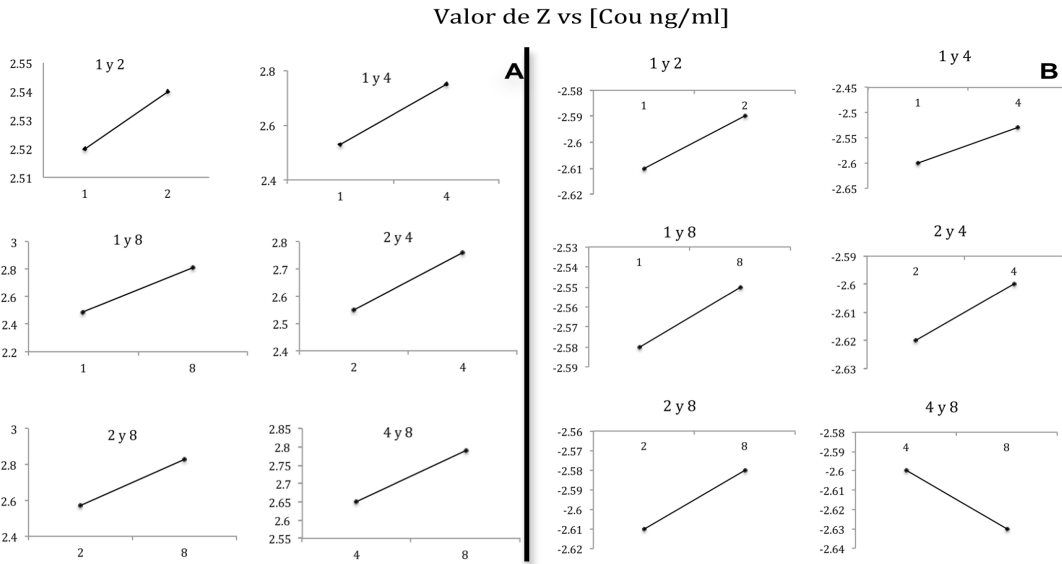


Figura 13. Las variaciones en el valor de Z entre cada tratamiento A. Se muestran los genes inducidos, y se puede observar que a mayor concentración de Cou, el valor de Z es mayor. B. El valor de Z de los genes reprimidos es mayor, a menor concentración, aunque cuando se utilizan 8ng, el valor de Z es mayor que cuando se utiliza 1ng/ml.

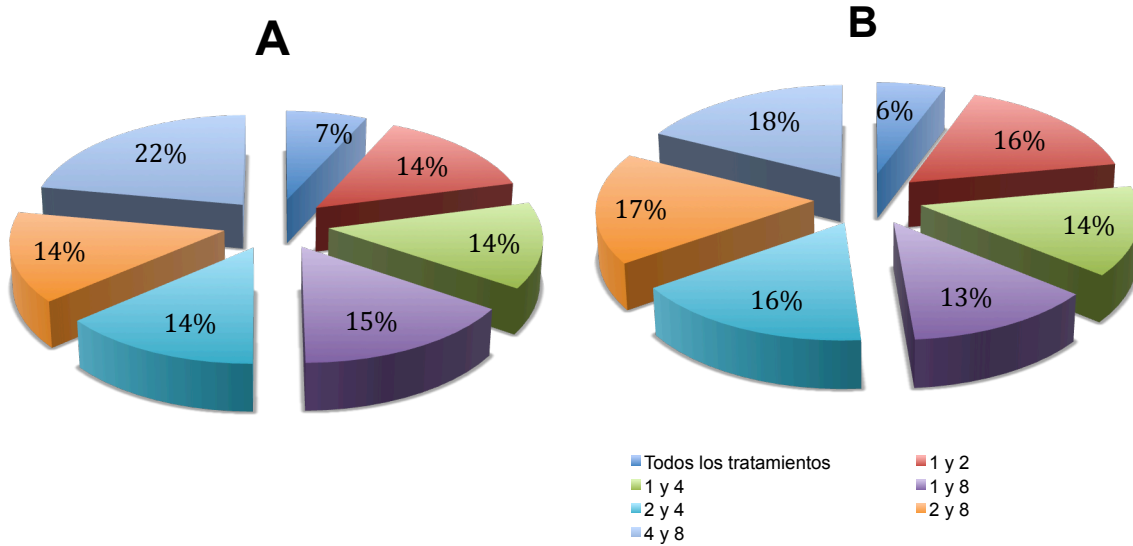


Figura 14. Proporción de genes inducidos (A) y reprimidos (B) que se alteran diferencialmente en fragmentos de corteza ovárica tratada con Coumestrol

Tabla 8. Genes que se inducen en las interacciones con diferentes concentraciones de Coumestrol

Todos	1 vs 2	1 vs 4	1 vs 8	2 vs 4	2 vs 8	4 vs 8	4 vs 8 (Cont)
Zfp287	Zfp52	Zfp287	Zfp52	Zfp287	Pcdha5	Zfp287	Tal1
Rest	Zfp287	Rest	Zfp287	Rest	Zfp52	Rest	Stk22s1
Ms4a10	Rest	Ms4a10	Rest	Ms4a10	Zfp287	Ms4a10	Psmc13
Rabac1	Ms4a10	Col15a1	Ms4a10	Zic5	Rest	Zic5	Sgcg
Brd3	EG666856	E2f3	EG666856	Vmn2r88	Ms4a10	Vmn2r88	Hsf4
1190017O12Rik	Scmh1	Rabac1	Scmh1	Rabac1	EG666856	Pax4	Cnbp
Samm50	D4Wsu53e	Brd3	D4Wsu53e	Brd3	Scmh1	Taf1	Mbd1
Taok2	Inpp1	Kcnq1	Mrfap1	1190017O12Rik	D4Wsu53e	Gpr45	X99384
1700003E16Rik	Zfp87	Chrm1	2010204K13Rik	Anxa9	Zic5	Adam28	Prok2
Rexo1	Rabac1	1190017O12Rik	Olf48	B3gat1	Vmn2r88	Rabac1	Sall2
1700023C21Rik	Brd3	1810035L17Rik	Plekho1	Samm50	Timm17a	Brd3	Pnpla6
1700065D16Rik	Gpnmb	Olfml2b	Abcc8	Taok2	Olfr804	Tnfsf13	Gne
1810065E05Rik	1190017O12Rik	Samm50	Rabac1	1500001A10Rik	4733401H18Rik	Olfr402	Nes
2010007H12Rik	Samm50	Taok2	Brd3	Uqcrq	Rabac1	Snora23	Mcrs1
Fntb	Taok2	Uqcrq	Kcnq1	1700003E16Rik	Brd3	Kcnq1	Scn1a
Afap1	Cd99	1700003E16Rik	Cryba1	Rexo1	Gpnmb	Scn4a	Npff
2610019E17Rik	Gpr126	Rexo1	Gpnmb	1700023C21Rik	1190017O12Rik	1190017O12Rik	Syt7
2900084C01Rik	Uqcrq	1700023C21Rik	1190017O12Rik	1700047F07Rik	Anxa9	1810035L17Rik	Olfr155
Golga7b	1700003E16Rik	1700065D16Rik	1810035L17Rik	1700065D16Rik	B3gat1	Anxa9	Pixnb3
4933424G05Rik	Rexo1	1700069L16Rik	Ryr1	1700069L16Rik	Samm50	B3gat1	Kcnj15
5730448F11Rik	1700023C21Rik	Cby3	Samm50	Arid2	Taok2	Rab1b	Tagln3
Extl3	Etd	1810065E05Rik	Taok2	1810065E05Rik	Gpr126	Samm50	Rpl36a
Tial1	1700065D16Rik	2010007H12Rik	Gpr126	2010007H12Rik	1500001A10Rik	Taok2	Pik3cg
Sult1c2	1700069L16Rik	Fntb	1700003E16Rik	Fntb	1700003E16Rik	Ostm1	Insm2
Cdca7l	1810065E05Rik	2210409D07Rik	Rexo1	Tmem158	1700016F12Rik	1500001A10Rik	Dnajc4
Mcts1	2010007H12Rik	Tmem110	1700023C21Rik	Afap1	Rexo1	1700003E16Rik	Gabarapl1
Jarid1a	Fntb	Sap30l	1700065D16Rik	2610019E17Rik	1700023C21Rik	Rexo1	D930014E17Rik
Pank4	Ppm1j	Rpusd4	ENSMUSG0000	2810405F15Rik	1700047F07Rik	1700023C21Rik	Elp2
Mesp1	Endod1	Afap1	Cby3	Gtf2h5	1700065D16Rik	Gpr160	Mknk1
Tuba4a	2410004P22Rik	2610019E17Rik	1810065E05Rik	Ssbp1	1810065E05Rik	1700047F07Rik	Rnf130
Gcap14	Afap1	Qrs1	2010007H12Rik	2900084C01Rik	2010007H12Rik	1700065D16Rik	Arpp19
Rnu5g	2610019E17Rik	Gtf2h5	4933421E11Rik	2610110G12Rik	Fntb	Cby3	Gng11
Mup3	2810001A02Rik	2900046L07Rik	Fntb	4930404A05Rik	2410004P22Rik	Fam154b	1190002H23Rik
Gli3	Gtf2h5	2900084C01Rik	2210409D07Rik	Tmem65	Afap1	1810030O07Rik	Ndufc1
Smcp	2810488G03Rik	2310047B19Rik	2300004M11Rik	Golga7b	2610019E17Rik	Bola1	Fam107b
Pitx3	Rnf165	Safb	Tmem110	4933424G05Rik	2810001A02Rik	1810065E05Rik	ltpa
Bex1	2900084C01Rik	4921513108Rik	2310039L15Rik	4933439N06Rik	2810405F15Rik	4933421E11Rik	1110008F13Rik
Rfng	Tmem65	Tmem65	2410004P22Rik	5730448F11Rik	Ssbp1	Fntb	Cycl1
Stmn3	4930447F24Rik	Vps37a	Afap1	Slc24a2	2810488G03Rik	2210409D07Rik	Isoc2b
Wnt11	Golga7b	4933400F03Rik	2610019E17Rik	Ccdc56	2900084C01Rik	Tmem110	Slc25a30
Col10a1	4933424G05Rik	Golga7b	Qrs1	1810073J14Rik	2610110G12Rik	Luc7l	Slc25a39
Hyal2	4933435G04Rik	4933424G05Rik	2810001A02Rik	Extl3	4930404A05Rik	Atg16l2	Psmc8
Sspn	4933439N06Rik	4933439N06Rik	2810488G03Rik	Tial1	4930447F24Rik	Afap1	Ms4a6c
Purb	5730448F11Rik	5730448F11Rik	2610019E17Rik	Sec24a	Golga7b	2610019E17Rik	Pi4k2b

Sgcg	Ccdc90a	Slc24a2	2900084C01Rik	Sult1c2	4933424G05Rik	Rnf219	Klc4
X99384	Khsrp	B230217C12Rik	2310047B19Rik	Igk	Col14a1	Qrs1	4930542N07Rik
Pnpla6	Slc24a2	Wfdc15a	Safb	Hsbp1	5730448F11Rik	2810405F15Rik	Myef2
Npff	Extl3	Extl3	4930447F24Rik	Higd1b	Ccdc90a	Ssbp1	Mdfic
Syt7	6720454L20Rik	MlIt3	4932433N03Rik	Dbr1	Extl3	2900084C01Rik	Rny3
Kcnj15	Tial1	4930517L18Rik	Golga7b	Cdca7l	Tial1	2900092C05Rik	Rny1
D930014E17Rik	Sult1c2	6230427J02Rik	4933424G05Rik	Pigc	Sult1c2	2310047B19Rik	Gnb2
Mknk1	Hsbp1	Tial1	5730448F11Rik	Mcts1	Igk	Safb	Slc7a2
1190002H23Rik	Dbr1	Sult1c2	B230217C12Rik	Jarid1a	Higd1b	3110082D06Rik	Cbs
1110008F13Rik	Cdca7l	Hsbp1	1700062A02Rik	Acaa1a	Slc38a10	4631405K08Rik	Tead4
Rny1	Pigc	Nol11	Wfdc15a	Pank4	Cdca7l	4921528I07Rik	Tiparp
Slc7a2	Mcts1	Dbr1	Ccdc90a	Mrpl23	Pigc	4930404A05Rik	Hist2h2ab
Hist2h2ab	Jarid1a	Cdca7l	Fam98b	Mesp1	Mcts1	4930465K10Rik	Lama4
Lama4	Acaa1a	Pigc	Extl3	Tuba4a	Jarid1a	Atf7ip2	Bbs9
Fblim1	Pank4	Mcts1	MlIt3	Gcap14	Pank4	Golga7b	Eef2
Foxa1	Msra	Jarid1a	Sympk	Lhx3	Mrpl23	4933424G05Rik	Fblim1
Hira	Mesp1	Acaa1a	4921522H14Rik	Rnu5g	Araf	5730448F11Rik	Otx1
	Tuba4a	Pank4	4930517L18Rik	Mup3	Mesp1	Ccdc125	Foxa1
	Gcap14	Mesp1	4930522O17Rik	Adam8	Tuba4a	B230217C12Rik	Hira
	Lhx3	Tuba4a	6230427J02Rik	Cd1d2	Gcap14	Wfdc15a	Chic1
	Rnu5g	Gcap14	Tial1	Gli3	Rnu5g	Extl3	Mast4
	Mup3	Lhx3	Sult1c2	Foxa1	Mup3	MlIt3	
	P42pop	Rnu5g	BC003885	Smcp	Cd1d2	4930517L18Rik	
	Cav3	Mup3	Nol11	Mras	Gli3	4930528J18Rik	
	P42pop	Col1a2	Cdca7l	Pik3cd	Foxa1	4930535L15Rik	
	Gli3	Cox7c	Pigc	Pitx3	Epcam	6230427J02Rik	
	Hoxd11	Ein	Mcts1	Ret	Smcp	Tial1	
	Ltc4s	Gli3	Jarid1a	Bex1	Mras	A930037H05Rik	
	Epcam	Ifna7	Scand1	Rfng	Pik3cd	Msl2	
	Smcp	Smcp	Pank4	Stmn3	Pitx3	E130201H02Rik	
	Pitx3	Pitx3	Mesp1	Sox4	Bex1	Sult1c2	
	Bex1	Bex1	Tuba4a	Tacr1	Rfng	Igk	
	Rfng	Rfng	Gcap14	Wnt11	Stmn3	Nol11	
	Prrx2	Stmn3	Rnu5g	Col10a1	Sema5a	Higd1b	
	Stmn3	Wnt11	Mup3	Hyal2	Soat1	Arhgef10	
	Sema5a	Col10a1	PlIp	Sspn	Sprr1b	Cdca7l	
	Soat1	Dlx2	Cox7c	Prodh	Wnt11	Pigc	
	Wnt11	Gtf2h4	Csf1	Purb	Col10a1	Mcts1	
	Zbtb7b	Hyal2	Gli3	Sgcg	Gdnf	Jarid1a	
	Col10a1	Sspn	Lrrfip1	Hsf4	Hyal2	Pank4	
	Hyal2	Mycs	Epcam	Mbd1	Sspn	Opn1sw	
	Jun	Nppc	Smcp	X99384	Nhlh1	Mrpl23	
	Sspn	Purb	Pitx3	Sall2	Pitx3	Mesp1	
	Nhlh1	Nhp211	Bex1	Pnpla6	Prodh	Tuba4a	
	Purb	Sgcg	Rfng	Scn1a	Purb	Gcap14	
	Sgcg	Pde6g	Stmn3	Npff	Sgcg	Sar1a	
	Spo11	X99384	Gtf2h4	Syt7	Hsf4	Cyp4f15	
	X99384	Prok2	Sema5a	Plxnb3	Mbd1	Rnu5g	
	Sepx1	Pnpla6	Soat1	Kcnj15	X99384	Mup3	
	Gcat	Nes	Wnt11	Pik3cg	Sall2	9130020O15Rik	

Pnpla6	Npff	Adra2b	Gabarapl1	Pnpla6	Il2ra
Npff	Syt7	Cct4	D930014E17Rik	Scn1a	Cd1d2
Syt7	Kcnj15	Col10a1	Elp2	Npff	Cox7c
Elovl2	Rpl36a	Hyal2	Mknk1	Syt7	Csrp2
Olf70	Insm2	Sspn	Arpp19	Plxnb3	Cyp2f2
Kcnj15	D930014E17Rik	Nhlh1	Gng11	Kcnj15	Gdf5
0610031J06Rik	Lipa	Nppc	1190002H23Rik	Pik3cg	Gli3
Mknk1	Mknk1	Purb	Ndufc1	Gabarapl1	Bscl2
D930014E17Rik	Wdr8	Rbmy1a1	Fam107b	D930014E17Rik	Hbb-bh1
Myl7	1190002H23Rik	Nhp211	1110008F13Rik	Elp2	Hmx3
1190002H23Rik	1110008F13Rik	Sgcg	Cylc1	Mknk1	Foxa1
1110008F13Rik	Isoc2b	X99384	Slc25a30	Arpp19	Hoxd13
Ttyh2	Ppa1	Prok2	Klc4	Gng11	Irf1
Rny1	Pi4k2b	Magi2	Rny1	1190002H23Rik	Smcp
Slc7a2	Bmpr1a	Nes	Gnb2	Ndufc1	Mras
Dpf1	Mdfic	Dfna5	Slc7a2	Fam107b	Nsd1
Hist2h2ab	Rny1	Npff	Dpf1	3110001D03Rik	Olf15
Lama4	Slc7a2	Syt7	Hist2h2ab	1110008F13Rik	Enpp1
Fblim1	Cbs	Kcnj15	Lama4	Cylc1	Pik3cd
Foxa1	Dpf1	Rpl36a	Pstpip1	Slc25a30	Pitx3
Nfx1	Hist2h2ab	Insm2	Fblim1	Art4	Plau
Hira	Lama4	D930014E17Rik	Foxa1	Klc4	Bex1
	Bbs9	Mknk1	Olf18	Smarca4	Rfng
	Xlr	Myl7	Hira	Zfp85-rs1	Stmn3
	Tcp10c	1190002H23Rik	Chic1	Rny1	Tshb
	Fblim1	Thoc7	Pros1	Gnb2	Tst
	Foxa1	Ube2g1		Slc7a2	Vav2
	Hira	1110008F13Rik		Hist2h2ab	Wnt11
		Isoc2b		Lama4	Cnih2
		Ppa1		Fblim1	Col10a1
		Pi4k2b		Foxa1	Gpd1
		Mdfic		Nfx1	Gtf2h4
		Rny1		Hira	Hyal2
		Uck2		Chic1	Sspn
		Slc7a2			Mxd1
		Cbs			Cd46
		Hist2h2ab			Neurod2
		Lama4			Nppc
		Rnf213			Ppara
		Bbs9			Prodh
		Fblim1			Purb
		Foxa1			Sipa1
		Nfx1			Nhp211
		Col11a1			Znrf4
		Hira			Stxbp2

Tabla 9. Genes que se reprimen en las interacciones con diferentes concentraciones de Coumestrol

Todos	1 vs 2	1 vs 4	1 vs 8	2 vs 4	2 vs 8	4 vs 8
Rad1	Ncf1	Cenpe	Anp32b	Ncf1	Dtx2	Dtx2
Hmg20b	Anp32b	Ncf1	Ap3b2	Zfp420	Anp32b	Anp32b
Smoc2	Ap3b2	ENSMUSG00000074840	Runx1	Dtx2	Ap3b2	9030425E11Rik
Kdelc1	Ptges	Syt13	Rad1	9030425E11Rik	9030425E11Rik	Muc2
Asb1	Runx1	Npnt	Hmg20b	Npnt	Ssna1	Eif4e2
1700104A03Rik	Npnt	Rad1	V1rc3	Muc2	Runx1	Rad1
1700127G19Rik	Rad1	Hmg20b	Luc7l2	Rad1	Muc2	Hmg20b
Anapc13	Hmg20b	Asb1	Smoc2	Hmg20b	Rad1	Gfer
Mrpl44	Asb1	Slc30a9	Tnip2	Gfer	Hmg20b	Slc4a7
2010015P12Rik	Stard7	Hnmt	Kdelc1	Asb1	Gfer	Hspb8
Asl	Slc30a9	Slc25a2	Dmkn	Slc30a9	Arid5b	Olfr971
2610028A01Rik	V1rc3	Smoc2	1700019F05Rik	Hspb8	Hspb8	V1rc1
Bcas3	Luc7l2	Rtp4	1700022K14Rik	Olfr971	Olfr971	Il1fb
2810404F17Rik	Slc25a2	Kdelc1	1700023E05Rik	Slc25a2	V1rc3	Smoc2
2900057B20Rik	Smoc2	0610033M10Rik	Speer6-ps1	Smoc2	Luc7l2	Kdelc1
4930478L05Rik	Tnip2	Sgol2	Asb1	Kdelc1	Smoc2	Grm3
Zfp509	Kdelc1	Dmkn	1700064H15Rik	Poldip3	Cars	Poldip3
4930551O13Rik	Ggnbp1	1700022K14Rik	1700081D17Rik	1110059M19Rik	Tnip2	Dmkn
4930578C19Rik	Duxbl	1700023E05Rik	1700104A03Rik	Wdr40a	Kdelc1	1110059M19Rik
Tmem222	1700011L22Rik	1700042O05Rik	1700127G19Rik	Cnn3	0610040F04Rik	Tardbp
Cnot10	1700019F05Rik	Asb1	Anapc13	1700010L04Rik	Clip1	Cnn3
A730035I17Rik	1700022C07Rik	1700104A03Rik	1810009O10Rik	1700016B01Rik	Poldip3	1700016B01Rik
Mmab	Speer6-ps1	1700127G19Rik	1810012K08Rik	Asb1	1110059M19Rik	1700022K14Rik
9430076G02Rik	Asb1	Anapc13	Mrpl44	1700083H02Rik	Cnn3	1700023E05Rik
C030037D09Rik	1700061A03Rik	1810009O10Rik	2010015P12Rik	1700104A03Rik	1700010K24Rik	Asb1
C430049A07Rik	1700064H15Rik	Mrpl44	2310061G22Rik	1700127G19Rik	1700016B01Rik	1700104A03Rik
Ifih1	1700081D17Rik	2010015P12Rik	Asl	Anapc13	1700019F05Rik	1700127G19Rik
Ppa2	1700104A03Rik	2010315B03Rik	Ube2cbp	Mrpl44	Ccdc46	Anapc13
Ptprd	1700127G19Rik	Ski	2610028A01Rik	Ndufaf2	Speer6-ps1	1810009O10Rik
Irg1	Anapc13	2310061G22Rik	Bcas3	Lrrc39	Asb1	Mrpl44
Cfl2	Mrpl44	Slc10a7	2700049A03Rik	2010015P12Rik	1700064H15Rik	2010015P12Rik
Evl	2010015P12Rik	Asl	2810404F17Rik	Ski	1700080F18Rik	Ncrna00117
Flt4	Ski	Ube2cbp	Rnf113a1	Asl	1700104A03Rik	Setd2
Hoxb13	Trdn	2610028A01Rik	Cyld	2610028A01Rik	1700106O07Rik	2310061G22Rik
Cldn11	Zfp428	Bcas3	2900057B20Rik	Bcas3	1700127G19Rik	Asl
Snta1	Cabp4	2610030H06Rik	4930444A02Rik	2610035D17Rik	Anapc13	Mrps30
Spt2	Asl	Mnd1	4930478L05Rik	2610037P13Rik	Mrpl44	2610020C07Rik
Hmga2	2610028A01Rik	2810404F17Rik	Zfp509	2810404F17Rik	2010015P12Rik	2610028A01Rik
Dpm2	Bcas3	Nat13	4930551O13Rik	2900021C02Rik	Fam108c	Bcas3
Melk	Tbc1d9b	2900021C02Rik	4930578C19Rik	Tppp	Setd6	Tbx18
Ptpla	2700049A03Rik	Tppp	4930578C19Rik	Spag17	Asl	2810404F17Rik
Nop58	2810404F17Rik	1700025G04Rik	4933406B17Rik	2900057B20Rik	2610028A01Rik	2900057B20Rik
Gabbr1	2900021C02Rik	2900057B20Rik	Pip5k3	Pigk	Bcas3	Cadm2
Smr2	Tppp	Depdc6	Tmem222	Rnf168	2610034E01Rik	Pigk
Gtf2a11	1700025G04Rik	4930478L05Rik	Lca5	Usp42	2610044O15Rik	Usp42
Tsen34	2900057B20Rik	Zfp509	Filip1	Ogn	2610304O13Rik	Ogn
Rnf151	Depdc6	4930551O13Rik	1700043A12Rik	Caskin1	2700049A03Rik	Caskin1

D2ErtD750e	4930444A02Rik	4930578C19Rik	Cnot10	Depdc6	2810404F17Rik	Actr2
BC004004	4930478L05Rik	sep-12	4632411P08Rik	4921507H08Rik	Hcfc1r1	Spata16
Saa4	Zfp509	Tmem222	A730035117Rik	Spata16	Macrod2	4930478L05Rik
Spi15	4930551O13Rik	Lca5	Supt7l	4930444E06Rik	2900057B20Rik	4930507D10Rik
Dnm3os	4930578C19Rik	Filip1	Mmab	4930478L05Rik	Pigk	Zfp509
	Spag17	Smc2	9430076G02Rik	4930507D10Rik	Usp42	4930540A11Rik
	4933434I06Rik	Cnot10	9530002O20Rik	Zfp509	Chodl	4930551O13Rik
	4933435F18Rik	5830424K16Rik	Jrkl	4930551O13Rik	Ogn	4930578C19Rik
	5133401H06Rik	A730035117Rik	C030037D09Rik	4930556C24Rik	Caskin1	4933406P04Rik
	Tmem222	Mmab	C430049A07Rik	4930578C19Rik	Spata16	5430402M21Rik
	Lca5	9430076G02Rik	Ifih1	4933406P04Rik	4921515L22Rik	Mpp7
	Smc2	9430091E24Rik	Qrich1	Tmem222	Larp7	Tmem222
	5830424K16Rik	9530002O20Rik	Ppa2	Filip1	4930429E23Rik	Lca5
	Tradd	Jrkl	Ptprd	Smc2	4930431P03Rik	Filip1
	1700043A12Rik	C030037D09Rik	Irg1	5830405M20Rik	4930444A02Rik	Ddx50
	1700096C16Rik	C330001P17Rik	App	5830424K16Rik	4930478L05Rik	Cnot10
	Cnot10	C430049A07Rik	Cfl2	Ddx50	4930507D10Rik	Asb15
	A730035117Rik	Ifih1	Evl	Abi2	Zfp509	A730035117Rik
	4930594C11Rik	Svil	Fcna	9030425L15Rik	4930551O13Rik	Trappc6b
	5330433J24Rik	Tex10	Flt4	Cnot10	4930578C19Rik	8030479D07Rik
	Supt7l	Setd7	Hoxb13	Asb15	Spag17	9030204H09Rik
	Mmab	Tceal1	Kcnk1	A730035117Rik	4933406P04Rik	9130219B18Rik
	9430076G02Rik	Ppa2	Mtap2	Trappc6b	Tmem222	Mmab
	9430091E24Rik	Spryd4	Cldn11	8030479D07Rik	Filip1	9230110F15Rik
	Prepl	Ptprd	Snta1	9030204H09Rik	Ube2i	9430076G02Rik
	C030037D09Rik	Apba2	Spt2	9130219B18Rik	Ddx50	9530002K18Rik
	C330001P17Rik	Irg1	Syt2	Mmab	mt-Nd1	9530002O20Rik
	C430049A07Rik	Aqp7	Tbx15	9430076G02Rik	1700043A12Rik	9630003H22Rik
	E130112M24Rik	Cbl	Tfdp1	9430091E24Rik	Cnot10	Jrkl
	Slc6a11	Cfl2	Nkx2-1	9530002K18Rik	Asb15	C030037D09Rik
	C430049A07Rik	Ctsk	Akap2	9630003H22Rik	A730035117Rik	C430049A07Rik
	Ifih1	Evl	Aplp2	C030037D09Rik	Trappc6b	Ifih1
	2810055F11Rik	Flt4	Brs3	C330001P17Rik	Supt7l	Cpsf4l
	ENSMUSG000000	Hoxb13	Dpm2	C430049A07Rik	8030479D07Rik	BC005512
	68503	Ifit1	Ext1	Ifih1	9030204H09Rik	Ppa2
	Tex10	Kcnk1	Ext2	Ccpg1	9130219B18Rik	Gckr
	Setd7	Mtap2	Gja10	Tex10	Mmab	Ptprd
	Scrn2	Cldn11	Hmga2	Setd7	9430076G02Rik	Ptprj
	Tceal1	Snta1	Itln1	Tceal1	9530002K18Rik	Map2k3
	Ppa2	Spt2	Melk	Ppa2	9630003H22Rik	Irg1
	Ptprd	Tbx15	Mlf1	Kdelr3	C030037D09Rik	Tcfcp2
	Lrrn3	Nkx2-1	Osmr	Ptprd	C430048L16Rik	ltpr3
	Apba2	Zfy1	Cnot7	Ptprj	C430049A07Rik	Acan
	Irg1	Aplp2	Rabggtb	Map2k3	Ttc5	Apoc1
	Trf	Ctsc	Banf1	Apba2	Ifih1	Cfl2
	Ager	Dpm2	Sh2d1b1	Irg1	mt-Cytb	Ctf1
	Ang	Fkbp5	Mapk8ip3	Tcfcp2	BC005512	Ear1
	Cfl2	Fmo1	Ptpla	Cbl	Ppa2	Evl
	Cbl	Fut9	Nop58	Ms4a1	Ptprd	Flt4
	Dhx15	Hmga2	Gabbr1	Cfl2	Ptprj	Hoxb13

Evl	Melk	Bace2	Ctf1	Lrp8	Hsd11b1
Fcna	Rabggtb	Kcnd3	Evl	Map2k3	Il12rb2
Flt4	Sfrs2	Smr2	Flt4	Irg1	Il13ra2
Gnal1	Wiz	Rilp1	B4galnt2	Mup5	Kcnk1
Hoxb13	Banf1	Gtf2a1l	Hoxb13	Tcfc2	Kera
Cldn11	Hs2st1	Mccc1	Hsd11b1	Cfl2	Ltf
Snta1	Abcd2	Tsen34	Cldn11	Col4a3	Mtap2
Spt2	Sh2d1b1	Myg1	Snta1	Ctf1	Muc10
Tfdp1	Ptpla	Grtp1	Spt2	Evl	Cldn11
Brs3	Nop58	Rnf151	Ahrr	Fcna	Snta1
Ccr3	Gabbr1	D2Erd750e	Ctsc	Flt4	Spt2
Ctsc	Bace2	Zmym1	Dpm2	Hdglf1	Tbx15
Dpm2	Htra2	BC004004	Fkbp5	Hoxb13	Nkx2-1
Dub2	Amotl2	Creb1	Hif1a	Hsd11b1	Aplp2
Fkbp5	Kcnd3	Saa4	Hmga2	Hspa4	Cyp21a1
Gja10	Smr2	Gnl2	Ilk	Cldn11	Dpm2
Hmga2	Ppp1r1a	Lilrb3	Invs	Snta1	Hmga2
Melk	Gtf2a1l	Spi15	Melk	Spt2	Lig1
Mlf1	Tsen34	H2-Q2	Mmp7	Tfdp1	Melk
Osmr	Eif1ay	Dnm3os	Rbmx	Brs3	Prkcd
Siglec1	Grtp1		Tank	Dpm2	Rabggtb
Hs2st1	M6prbp1		Hs2st1	Gja10	Rbmx
Gpr175	Rnf151		Abcd2	ENSMUSG00000075	Sprr3
Abcd2	Ift74		Ptpla	Hmga2	Tank
Gtse1	D2Erd750e		Cfhr1	Melk	Tcte3
Mapk8ip3	Zmym1		Caprin1	Mlf1	Usp4
Ptpla	Dhrs2		Hnrmpa2b1	Osmr	Banf1
Nop58	BC004004		Gas8	Rbmx	Sh2d1b1
Gabbr1	Mageb2		Nop58	Tank	Sp100
Amotl2	Gngt1		Gabbr1	Nlrp5	Pdk4
Smr2	Atp5k-ps1		Amotl2	Bcar3	Ptpla
Ppp1r1a	Saa4		Smr2	Mapk8ip3	Cfhr1
Nuf2	Spi15		Ppp1r1a	Ptpla	Aip
Gtf2a1l	H2-Q2		Wsb2	Cfhr1	Caprin1
Mccc1	Dnm3os		Gtf2a1l	Caprin1	Dlg3
Tsen34			Tsen34	Gas8	Slc4a4
Tbcb			Cyp4f16	Nop58	Gas8
M6prbp1			4933415F23Rik	Gabbr1	Nop58
Tmed11			M6prbp1	Slc2a5	Gabbr1
Rnf151			2610209A20Rik	Smr2	Bace2
Mrpl49			3110070M22Rik	Dnaja4	Pkp1
Ift74			Rnf151	Gtf2a1l	Kcnd3
D2Erd750e			Ift74	Mccc1	Papalb
BC004004			D2Erd750e	Tsen34	Smr2
Tex15			Tpbpb	Cyp4f16	Gtf2a1l
Csprs				2610209A20Rik	Tsen34
Gngt1			Pfdn5	3110070M22Rik	Cyp4f16
Creb1			BC004004	Sf3a1	Grtp1
Atp5k-ps1			Gm1420	Rnf151	Ddx18
Psmc2			Gngt1	D2Erd750e	2610209A20Rik
			Bcl6		

Saa4	Atp5k-ps1	Tpbpb	3110070M22Rik
Gnl2	Saa4	Ctsq	Rnf151
Spi15	Spi15	BC004004	D2Erd750e
Dnm3os	Trp73	Bcl6	Tpbpb
	Dnm3os	Creb1	Zmym1
		Saa4	BC004004
		Gnl2	Jdp2
		Spi15	Atp5f1
		Phka1	Bcl6
		Trp73	Saa4
		Dnm3os	Tcra-V8
		Dync1h1	Rps11
			Spi15
			H2-Q2
			Trp73
			Dnm3os

Debido a que el objetivo de este estudio fue obtener una expresión genómica global, se tomaron en cuenta los genes en común para todas las concentraciones, tanto positivos como negativos, en la Tabla 10 y 11 se muestra la función específica de cada gen.

Posteriormente se hizo la agrupación por función (Anexo, Tabla 10 y 11), en donde puede verse que hay genes diferentes que realizan funciones similares tanto en represión como en inducción, en la figura 15 y 16, se puede observar el número de genes involucrados en una función específica, estos datos fueron obtenidos en línea en “Mouse Genomic Informatics” disponible en: <http://www.informatics.jax.org>, los genes que se encuentran en cada agrupación se muestran en el anexo en la Tabla 13 y 14.

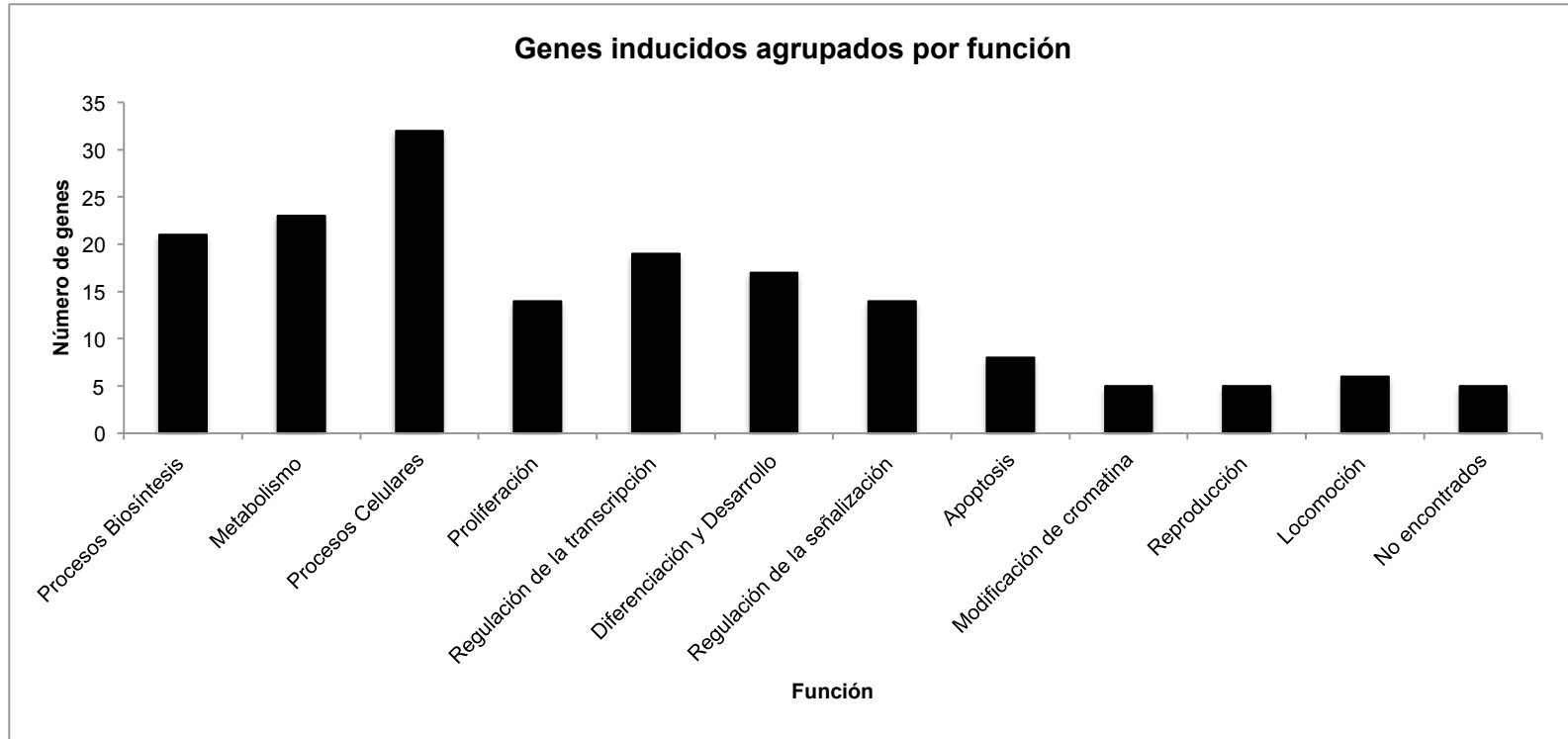


Figura 15. Agrupación de genes inducidos por función. Se muestra el numero de genes vs la función, un gen puede estar agrupado 2 o mas veces en diferente barra, debido a la naturaleza multiple de su función.

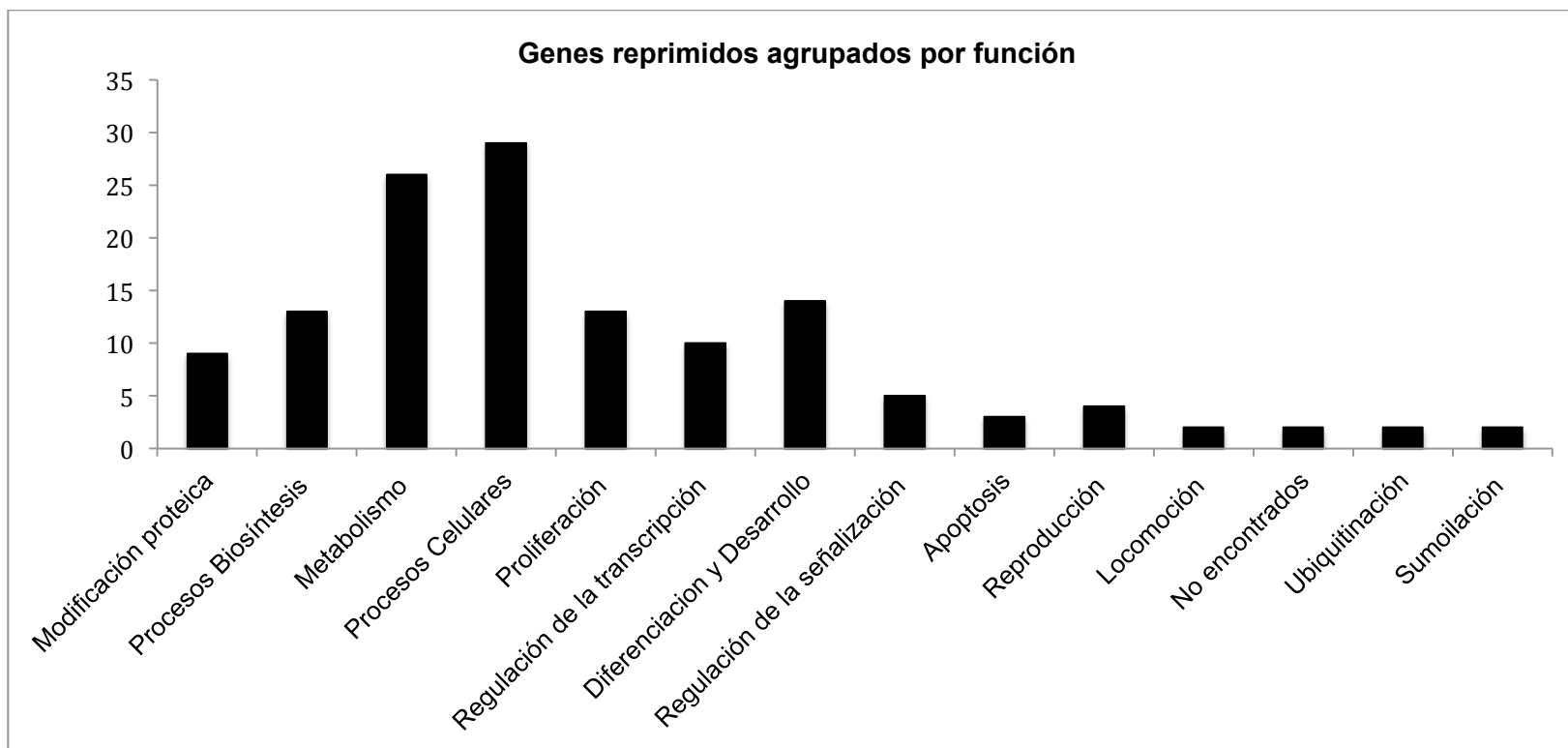


Figura 16. Agrupación de genes reprimidos por función. Se muestra el número de genes vs la función, un gen puede estar agrupado 2 o más veces en diferente barra, debido a la naturaleza múltiple de su función.

11.3 Posibles vías metabólicas alteradas

Tabla 10. Posibles vías metabólicas alteradas en ovario de perra microencapsulado con diferentes concentraciones de Coumestrol.

Regulación Positiva		
Gen	Vía de Señalización	Referencia
Fblim 1 Lama 4 Col 10A1 Hyal2	Señalización mediada por integrinas (ILK) Esta vía esta ligada a proliferación, movilidad, y supervivencia celular.	(Richards, <i>et. al.</i> , 1997),
Taok2 MKNK1	Proteinas Cinasas Activadoras de Mitógenos (MAPK) Esta via está involucrada con la respuesta al estrés y el daño al DNA	(Robinson y Cobb, 1997)
Wnt11 Rest Cdca7l, Mcts1	Wnt vía involucrada en diferenciación, desarrollo y regeneración del tejido	(Tevosian, 2013)
Pank4 Fntb	Biosíntesis Esteroides	(Rehm <i>et. al.</i> , 2007)
Regulación Negativa		
Rad 1 ANAPC13	Regulación del ciclo celular	(Tevosian, 2013)
Asb1 Kdelk1 Cnot10 Rnf151 Melk	Ubiquitinación, Procesos tipo ubiquitinación	(Lydeard <i>et. al.</i> , 2013)
Flt4 Enah CFL2 Clndn 11	Adhesión Focal y Uniones celulares	(Robinson y Cobb, 1997)

Hay genes que no están directamente involucrados con una vía metabólica específica, por lo que para considerar que se alteran, se tomaron en cuenta las vías

en donde al menos dos genes que codifican para proteínas o enzimas importantes en las vías estuvieran presentes.

12 Discusión

12.1 Sistema *in vitro*, el uso de microcápsulas

Existe controversia en cuanto la validéz de los resultados obtenidos en modelos *in vitro*, debido a que se considera conllevan a conclusiones erróneas, especialmente por que se sabe que la fisiología de las células no es igual cuando se les aísla de su ambiente fisiológico y que ninguna condición *in vitro*, puede sustituir las complejas interacciones entre las células (Cortina y Calderón, 2004). Al respecto, se ha reportado que las células de la granulosa en sistemas de cultivo en segunda dimensión (2D) migran con la consecuente interrupción de la comunicación con otro ovocito (Oktem *et al.*, 2007). El tipo de microcapsulas utilizadas en el presente estudio, también se han utilizado en estudios que abarcan diversas etapas del proceso reproductivo en diferentes modelos animales como primates (Smitz *et al.*, 2010), ratón (Eppig *et al.*, 1996) vaca (Gutierrez *et al.*, 2000), y cabra (Figueiredo *et al.*, 2011), entre otros, en donde se han observado resultados satisfactorios en cuanto al mantenimiento de la histoarquitectura, y al desarrollo folicular, especialmente en aquellos que son utilizados para la reproducción *in vitro*

En estos sistemas de cultivo, la concentración del alginato es importante para asegurar la estabilidad de las microcápsulas y del propio tejido. Para el ratón se determinó la concentración de alginato adecuada es de 0.25%, para primates no

humanos fue de 0.5%. A partir de esta información se sugiere que la concentración de alginato es dependiente de especie, ya que a menor concentración de alginato, tiene menor rigidez y es más elástico. En un estudio realizado en el 2011, se probaron varias concentraciones de alginato para evaluar cual es la mejor concentración de alginato para cultivar folículos de perra. La concentración al 0.5% permitió un más rápido crecimiento de los folículos que a la de un 1.5%. Aunque en ambos casos la producción y la conversión de progesterona a andrógenos y después a E2 no se alteró (Songsasen *et al.*, 2011). Una diferencia respecto a nuestro estudio es que en nuestro caso se incluyeron fragmentos corticales de ovario, en el estudio de Songsasen y colaboradores (2011), solo se incluyeron folículos independientes. De acuerdo a nuestras observaciones, este sistema de inclusión permite mantener las características funcionales, estructurales y anatómicas del tejido incluido. En nuestro caso, era importante conservar no solo la integridad de los folículos maduros, sino incluir en ellos otras etapas de desarrollo. Así pues, este sistema nos permitió evaluar la expresión génica de todos los tipos de folículos desde el primordial, hasta aquellos cuya estimulación fisiológica permitiera su ovulación. El uso de alginato de Calcio al 1.5% por 4 hrs bajo nuestras condiciones permitió conservar la estructura característica del tejido cortical ovárico y al mismo tiempo, mantener en contacto con el tejido cantidades del orden de las nanomolas de coumestrol.

La interpretación de resultados de modelos *in vivo*, aunque compleja, resulta mucho menos cuestionable que en modelos *in vitro*. Sin embargo, son sistemas simples que no requieren gran mantenimiento liberando de esta forma características que en los sistemas *in vivo*, aparte de las implicaciones de logística y económicas, se deben

tomar en cuenta como la bioética, legislación nacional e internacional para el uso de animales en laboratorios (Cortina y Calderón, 2004). En este caso, hay que adicionar otros factores como que el ovario tiene una bolsa ovárica y que es difícil llegar hasta ese punto, si se quisiera hacer un estudio *in situ* (Schneider *et al.*, 2008).

12.2 Citología Vaginal Exfoliativa e Histología

El desarrollo y progresión de los diferentes tipos celulares y las variaciones hormonales del ciclo estral de la perra han sido descritos con sus particularidades. Feldman y Nelson (2004) ilustran muy adecuadamente las diferentes etapas remarcando la duración de la etapa de diestro y anestro que en conjunto abarcan casi todo un semestre o un año, dependiendo de la raza, tamaño, entre otros aspectos. Es impresionante que en tan solo 20 días, se concreten tantas variaciones como las que se requieren para hacer la proliferación, remodelación y preparación para la fertilización e implantación en la perra. En nuestro caso, el haber empleado organismos preparados naturalmente para la ovulación, permite evaluar de manera óptima las alteraciones que induce el Coumestrol. Si se hubiesen utilizado hembras en la etapa de anestro, la preparación natural del organismo estaría alejada de las etapa reproductiva de tal suerte que en la mayoría de los fenómenos fisiológicos asociados a la reproducción no podrían ser evaluados.

Se ha reportado que el Coumestrol tiene efecto en ovarios debido a la presencia de ER β en este tejido (Vasconcellos *et al.*, 2014). Para observar si el Coumestrol tuvo efecto a nivel histológico dentro de las 4 horas de incubación con las microcapsulas con alginato de Calcio, se hicieron cortes histológicos seguido de una evaluación del

número (densidad) y tipificación de folículos mediante el conteo de folículos. Como se pudo observar, la mayoría de los tratamientos tienden a contener mayor cantidad de folículos primordiales y una menor cantidad de folículos terciarios, lo que concuerda con revisiones que describen la progresión folicular en perras (Esquivel, 2013), por lo que, no se puede decir que haya alguna diferencia entre los tratamientos.

Hubo preparaciones que contenían una mayor cantidad de folículos primarios que primordiales (Tabla 11) esto puede deberse a que la porción del corte correspondía a un fragmento ovárico en donde ya había selección y crecimiento folicular. A este respecto, ya que se sabe que una vez que los folículos inician su crecimiento, hay una porción de folículos dominantes que lo hacen a una velocidad mayor, permitiendo que se expresen y que se sinteticen mas receptores para FSH, que es la hormona involucrada directamente con el crecimiento folicular (McGee *et al.*, 2000). En un estudio morfométrico en donde se siguieron 250 folículos y sus respectivos ovocitos, durante la foliculogénesis en la perra, se observó que el diámetro promedio de los folículos primordiales primordiales de perra es de 10 a 62 μm , el de los primarios oscila entre 60 y 110 μm , los secundarios entre 90 y 150 μm , y el de los folículos con antro entre los 160 y 650 μm , a los que nosotros llamamos terciarios (Reynaud *et al.*, 2010). Estos datos concuerdan con nuestros resultados, en donde para todos los casos el diámetro de los folículos primordiales osciló entre 20 y 50 μm ; la mayoría de las mediciones de los folículos primarios estuvieron dentro del rango propuesto, excepto la muestra B con el tratamiento 1 ng/mL con una media de 30 μm ; en cuanto a los folículos secundarios, nuevamente solo la muestra B con 2

ng/mL no está dentro de los límites planteados en el estudio mencionado, con una media de 60 μ m. Finalmente, todos los folículos terciarios se encontraron dentro del rango reportado en la literatura. La diferencia de los dos tratamientos que no se encontraron en los rangos determinados, pudo haber sido debido a que no se están tomando en cuenta los diferentes etapas de maduración dentro de la clasificación folicular, ya que en los primarios se pueden encontrar en la transición entre primordial-primario y probablemente esta muestra contenía en su mayoría folículos de ese tipo, lo mismo sucede con los folículos secundarios, además cabe mencionar que el diámetro de los folículos así como el número de folículos en crecimiento está positivamente relacionado con el tamaño corporal de la perra (Reynaud, 2010). A pesar de nuestros esfuerzos por hacer una selección homogénea de nuestra muestra, la disponibilidad de datos reales de edad y peso no es infalible. La perra a la que pertenecen estas muestras fue la de menor talla, el rango de peso de las perras para este estudio se encontró entre 2 y 10 kg, lo que correspondería a talla chica.

12.3 Concentración de Coumestrol

Las concentraciones hormonales tienen un papel fundamental en la regulación de ciclos estrales, por lo tanto cualquier fluctuación hormonal que se provoque a través de sustancias exógenas como el Coumestrol, modificaría en gran medida la fisiología reproductiva del modelo biológico en cuestión (Patisaul *et al.*, 2010). Existe mucha controversia en cuanto a la concentración del Coumestrol con la cual se observa algún efecto. Sin embargo si se puede inferir que éste va a depender del modelo, el

tejido estudiado y el receptor que se está utilizando. En un estudio que evaluó el efecto que tiene el Coumestrol en vacas que consumían Alfalfa, debido a signos del llamado Síndrome Estrogénico, observaron que el consumo diario de 500 mg de Coumestrol por vaca equivale a una concentración plasmática de 13 ng/dL, que es 1000 veces mayor a la concentración de 17 β -estradiol encontradas durante el estro en vacas. Aún considerando una actividad 160 veces menor del Coumestrol con relación al 17 β -estradiol, la cantidad equivale a seis veces la concentración de estrógenos sanguíneos durante el estro (Romero-Ramírez *et al.*, 1997)

En nuestro estudio, se utilizó una dosis de 1 a 8 ng/ml, lo que equivale a una concentración de 3.6 nM. Las concentraciones de estradiol en el estro son de entre 45 y 120 pg/ml, por lo tanto, se está usando aproximadamente 8.3 veces mayor a la concentración de estradiol de lo que normalmente hay en estro en las perras. El 80% de las perras que se utilizaron para este estudio se encontraban en estro, por lo que estaríamos utilizando una máxima concentración de hormona con una concentración también alta del fitoestrógeno sin llegar a ser una concentración farmacológica cuyos resultados y alteraciones serían no fisiológicas.

12.4 Microarreglos

Para la extracción de ARN se utilizó el método de Trizol® mezcla común de reactivos que se ha utilizado desde hace algunas décadas con muy buenos resultados dada la simplicidad del método y eficiencia al tener como componente fundamental las sales de guanidina que son potentes inhibidores de las ribonucleasas y que se ha utilizado en tejidos ricos en estas enzimas como el páncreas (Rutter *et al.*, 1978). Entre los

requerimientos del ARN para su utilización en microarreglos se debe tomar en cuenta que la concentración sea igual o mayor a 30 μg , y que tenga una pureza dentro de los estándares propuestos para ARN (Ramírez *et al.*, 2003). Nuestra concentración de ARN es por lo menos 7 veces más a la mínima requerida. Por otro lado, la evaluación de la pureza indicada por los coeficientes A_{260}/A_{280} , fué entre 1.8 y 2.1 que nos permite asegurar la pureza adecuada de nuestras preparaciones. Finalmente, la integridad de estas se determinó por fraccionamiento en un gel de agarosa al 2% en donde se pudo corroborar que fue satisfactoria.

Dado que el aumento en la cantidad de ARN para un gen podría indicar su síntesis, es decir la inducción de la transcripción, los valores de Z positivos se tomaron como una inducción. De manera análoga, la disminución en la cantidad de ARN se tomó como represión. Estos parámetros simples no deben tomarse como si fuesen absolutamente ciertos, pues está ampliamente documentado en la literatura que la cantidad de RNA no depende única y exclusivamente de su síntesis, sino que es el resultado de procesos múltiples como pudiera ser la degradación mediada por la interacción de RNAm con otros tipos de RNA y su estabilidad puede ser explicada más por su asociación a ribosomas, formación de partículas ribonucleoproteicas (RNP) u otro tipo de interacciones.

La síntesis y marcado del cADN resultante permitió hacer la evaluación de la expresión génica global de nuestros tratamientos. Al tener un sistema de evaluación comparativa y secuencial de todos nuestros tratamientos, nos permitió determinar la expresión de cada dosis en chips independientes. El factor común fue el uso del mismo grupo de muestras tratadas solamente con el vehículo en todos ellos. Este

tipo de estrategias se ha utilizado de manera frecuente ya que brinda la ventaja de tener una expresión basal y en el mismo chip, se compara una y solo una de las variaciones experimentales.

Es importante destacar que hasta donde tenemos conocimiento, el presente estudio es el primero que se realiza con el propósito de evaluar la expresión génica global en respuesta al Coumestrol por medio de la metodología de microarreglos. Después de revisar la información disponible en diversas bases de datos electrónicas como el ISI Web of Knowledge, PubMed y Scopus, corroboramos que, hasta el momento, no existen informes con los que podamos hacer una comparación de nuestros resultados, debido a ello, por el momento solo estamos en posibilidad de sugerir algunas vías metabólicas en las cuales se presentan al menos dos genes que estuviesen participando en ellas y que hayan tenido valores de Z que claramente indicaran la alteración ya sea asociada a una disminución de su expresión ($Z < -2$) o a su aumento ($Z > 2$).

Con todo lo anterior, en la Figura 17 se esquematizan, las posibles vías involucradas en tejido cortical de ovario en respuesta al Coumestrol, si se hace una correlación, entre la respuesta propuesta, con la fisiología de las perras que se encontraban en estro, y sabiendo que como ya se mencionó el Coumestrol, puede imitar la acción del estradiol entonces se puede decir que el Coumestrol está induciendo una proliferación en células foliculares, proceso que se da naturalmente en el proestro, entonces, si la mayoría (80%) de las perras del estudio se encontraban en estro, se podría decir que el Coumestrol esta llevando a una “regresión” en el ciclo estral, cabe mencionar que es muy aventurado decir esto, ya que la incubación del tejido solo fue

por 4 horas, y para poder medir con certeza este tipo de efecto, se necesitaría por lo menos que el tiempo de incubación fuera de 6 días, ya que es lo mínimo que dura el estró en las perras (Figura 18)

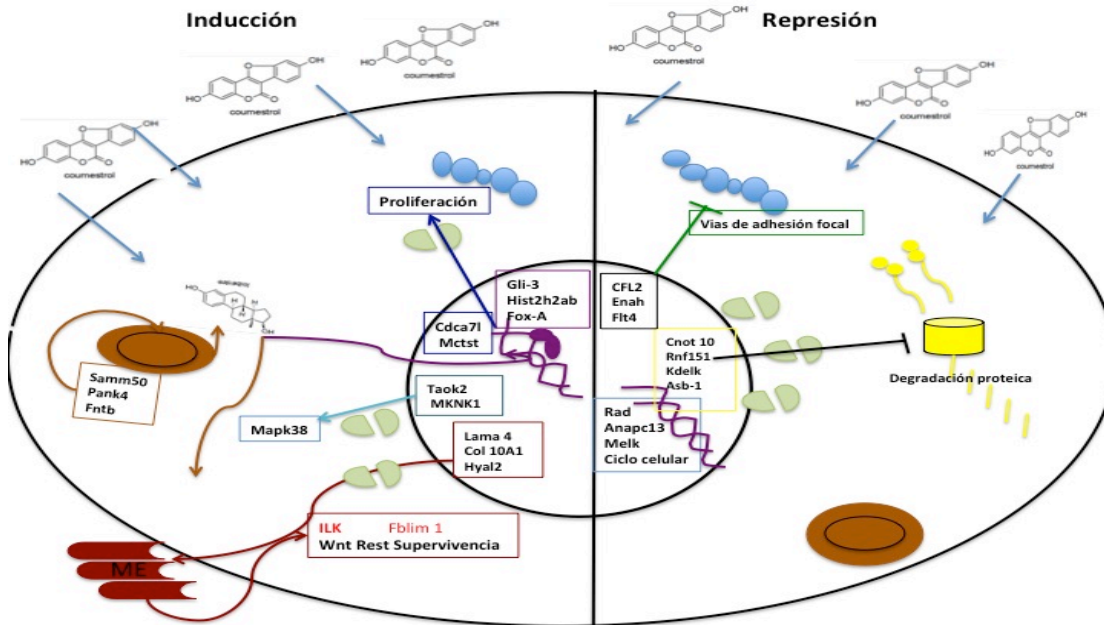


Figura 17. Posibles vías metabólicas y cambios inducidos en células ováricas en cultivo in vitro con coumestrol

13 Conclusiones

- El sistema *in vitro* que se utilizó con microcapsulas de alginato de Calcio al 1.5% proporcionaron estabilidad y rigidez al tejido ovárico de perra. La exposición del tejido ovárico de perra a concentraciones de 1, 2, 4, y 8 ng/mL de Coumestrol por 4 horas no afectó la histoarquitectura folicular.

- La concentración mínima utilizada en este trabajo fué suficiente para observar cambios importantes en la expresión de genes. La inducción de la expresión génica aumentó proporcionalmente al aumento de concentración de Coumestrol, la represión genética fue mayor a una concentración de 1 ng/mL de Coumestrol.
- Con el tratamiento *in vitro* con Coumestrol Se alteraron 38 genes en común en todos los tratamientos y 31 genes diferentes a los anteriores en común a todos los tratamientos se alteraron con el mismo tratamiento, por lo que la expresión génica fue diferencial.
- Las vías de señalización que se inducen con el Coumestrol, se encuentran relacionadas con la proliferación, remodelación y supervivencia celular como son: la vía JLK, WNT, Notch.
- Se indujeron dos genes que expresan proteínas importantes en la síntesis del colesterol, y por lo tanto en la esteroidogénesis, por lo que proponemos que el coumestrol, parece inducir la síntesis de colesterol
- La represión de genes está involucrada con puntos clave en la regulación del ciclo celular, la ubiquitinación de proteínas, apoptosis, estabilidad en citoesqueleto, vías de adhesión focal, y uniones celulares.
- Proponemos que fisiologicamente el Coumestrol, imitaría al estradiol y produciría un desbalance del ciclo estral.

14 Perspectivas

Para avanzar con esta línea de investigación, es necesario corroborar nuestros resultados con una metodología que no implique la hibridación de ácidos nucleicos. Una opción sería mediante la amplificación por qRT-PCR. Es importante mencionar que al no contar con una fuente de material inicial confiable como lo es la clonación de un gen conocido en un vehículo determinado, se sugeriría hacer la evaluación de este tipo de metodología utilizando al menos 2 genes de referencia. Asimismo, sería importante elaborar una genoteca que contenga todos los genes expresados para que, a partir de ella, se consiga evaluar las alteraciones de vías individuales, principalmente aquellas que encontramos alteradas.

Una de las limitaciones de nuestra estrategia experimental es que el estudio se hizo con el tejido ovárico completo, por lo que no fue posible identificar los cambios inducidos por el Coumestrol a nivel de tipos celulares específicos. Sería importante en futuros estudios utilizar nuestra metodología de inclusión junto con otras como la microdissección o la eliminación laser para evaluar lo que ocurre en distintos tipos celulares que conforman al tejido ovárico como respuesta a la acción de los fitoestrógenos.

15 Referencias

- Acevedo-Fernández JJ, Angeles-Chimal JS, Rivera HM, Petricevich-López VL, Nolasco-Quintana NY, Collí-Magaña DY, Santa-Olalla TJ. (2013). Bioactividad de péptidos derivados de proteínas alimentarias. (M. Segura-Campos, L. Chel Guerrero, & D. Betancur Ancona, Eds.) OmniaScience Monographs. OmniaScience. doi:10.3926/oms.136. Disponible en:
<http://omniascience.com/monographs/index.php/monograficos/article/view/15/3>
- Adams NR. (1995). Detection of the effects of phytoestrogens on sheep and cattle. *Journal of animal science*. 73:1509–1515.
- Almstrup K, Fernández MF, Petersen JH, Olea N, Skakkebaek NE, Leffers H. (2002). Dual effects of phytoestrogens result in u-shaped dose-response curves. *Environmental health perspectives*, 110:743–748.
- Bhardwaj AR, Pandey R, Agarwal M, Katiyar-Agarwal S. (2012). Northern blot analysis for expression profiling of mRNAs and small RNAs. *Methods in molecular biology*. 883:19–45
- Björnström L, Sjöberg M. (2005). Mechanisms of estrogen receptor signaling: convergence of genomic and nongenomic actions on target genes. *Molecular endocrinology*. 19:833–842.
- Burke TJ, Reynolds H A. (1975). Megestrol acetate for estrus postponement in the bitch. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 167:285–287.

- Carrión-Recio D, González-Delgado CA, Olivera-Ruano L, Correa-Fernández A. 1999. Introducción a la correlación in vivo-in vitro: Parte II. Revista Cubana de Farmacia. 33:201–207.
- Cederroth CR, Zimmermann C, Nef S. (2012). Soy, phytoestrogens and their impact on reproductive health. Molecular and Cellular Endocrinology. 355:192–200.
- Concannon PW. (2011). Reproductive cycles of the domestic bitch. Animal Reproduction Science. 124:200–210.
- Cortina E, Calderón V. (2004). Modelos de Experimentación Para el Estudio del Tejido Oseo. Departamento de Bioquímica del Centro de Investigación y Estudios Avanzados del I.P.N. 23: 107-116.
- Dunbar BS, Kaul G, Prasad M, Skinner SM. (2002). Molecular approaches for the evaluation of immune responses to zona pellucida (ZP) and development of second-generation ZP vaccines. Reproduction. 60:9–18.
- Eguiarte L, Souza V. (2007). Ecología Molecular. Editorial U. N. A. de México. 1^{era} ed, México D.F. p. 573.
- Eppig JJ, O'Brien MJ. (1996). Development in vitro of mouse oocytes from primordial follicles. Biology of reproduction. 54:197–207.
- Esquivel C. (2013). Gestación en la perra. Depto. de Reproducción FMVZ-UNAM. Disponible en: www.uv.mx/veracruz/fmvz/files/2013/04/Gestacion-en-la-perra.pdf

- Feldman y Nelson. (2007). *Endocrinología y reproducción canina y felina.*, 3^{era} Edición. Buenos Aires, Argentina. p. 1234.
- Figueiredo JR, Rodrigues APR, Silva JR. V, Santos RR. (2011). Cryopreservation and in vitro culture of caprine preantral follicles. *Reproduction fertility and development.* 23:40–47.
- Galina C, Javier V. (2009). *Reproducción de Animales Domésticos.* 3era Ed. México D.F. p. 582.
- Gobello C. (2006). Dopamine agonists, anti-progestins, anti-androgens, long-term-release GnRH agonists and anti-estrogens in canine reproduction: A review. *Theriogenology.* 66:1560–1567.
- Grøndahl ML, Borup R, Vikeså J, Ernst E, Andersen CY, Lykke-Hartmann K. (2013). The dormant and the fully competent oocyte: Comparing the transcriptome of human oocytes from primordial follicles and in metaphase II. *Molecular Human Reproduction.* 19:600–617
- Gualo, N. (2010). Efecto del coumestrol sobre la conducta sexual en perros (*Canis familiaris*) machos. Tesis de Maestría. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Gutiérrez CG, Ralph JH, Telfer EE, Wilmut I, Webb R. (2000). Growth and antrum formation of bovine preantral follicles in long-term culture in vitro. *Biology of reproduction,* 62:1322–1328.
- Hughes J, Macdonald DW. (2013). A review of the interactions between free-roaming domestic dogs and wildlife. *Biological Conservation.* 157:341–351.

- Kirkpatrick JF, Lyda RO, Frank KM. (2011). Contraceptive Vaccines for Wildlife: A Review. *American Journal of Reproductive Immunology*. 66:40-50.
- Kutzler M, Wood A. (2006). Non-surgical methods of contraception and sterilization. *Theriogenology*, 66:514–525.
- Lupo B, González C, Maestro A. (2012). Microencapsulación con alginato en alimentos. Técnicas y aplicaciones. *Revista Venezolana de Ciencia y Tecnología de Alimentos*. 3:130–151.
- Lydeard JR, Schulman B, Harper JW. (2013). Building and remodelling Cullin-RING E3 ubiquitin ligases. *EMBO*. 14:1050–1061.
- Fanjul M, Urdanivia M. (2008). *Biología funcional de los animales*. Sociedad de Datos Genómicos Funcionales (FEGD). 1^{era} Edición. Editorial siglo XXI. México D.F.
- McGee EA, y Hsueh AJ. (2000). Initial and cyclic recruitment of ovarian follicles. *Endocrine reviews*. 21:200–214.
- Medina M. (2006). Evaluación de la respuesta inmune en perras tratadas con un péptido derivado de la zona pelúcida de cerda conjugado a la subunidad Beta de la toxina del cólera. Tesis de Maestría. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Moebus K, Siepmann J, Bodmeier R. (2012). Novel preparation techniques for alginate-ploxamer microparticles controlling protein release on mucosal surfaces. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 45: 358–366.

- Oktem O, Oktay K. (2007). The role of extracellular matrix and activin-A *in vitro* growth and survival of murine preantral follicles. *Reproductive sciences*. 14:358–366.
- Olson PN, Kustritz MV, Johnston SD. (2001). Early-age neutering of dogs and cats in the United States (a review). *Journal of reproduction and fertility*. 57: 223–232.
- Patisaul HB, Jefferson W. (2010). The pros and cons of phytoestrogens. *Frontiers in neuroendocrinology*, 31:400–119.
- Pérez-Martínez M, Mendoza ME, Romano MC. (1999). Exfoliative vaginal cytology and plasma levels of estrone - GetInfo. *Small Ruminant Research*, 33:153–158.
- Pérez-Rivero JJ, Martínez-Maya JJ, Pérez-Martínez M, Aguilar-Setién Á, Serrano, H. (2009). Effect of coumestrol on sperm production and smell exploratory behavior in dogs stimulated with vaginal mucus. *Veterinaria México*. 40:9–16.
- Post, K. (1985). Canine vaginal cytology during the estrous cycle. *The Canadian veterinary journal. La revue veterinaire canadienne*. 26:101–104.
- Ramírez J, Chávez L, Santillán JL, Guzmán S. (2003). Microarreglos de DNA. *Mensaje Bioquímico*. 17:97–120.
- Ramos B. (2013). Programa en de Posgrado en Ciencias Bioquimicas. Universidad Nacional Autónoma de México Departamento de Biotecnología.

Disponible en: <http://www.iquimica.unam.mx/index.php/departamentosiq-alias/biomacromoleculasiq-alias?id=158>

- Rehm S, Stanislaus DJ, Williams AM. (2007). Estrous cycle-dependent histology and review of sex steroid receptor expression in dog reproductive tissues and mammary gland and associated hormone levels. *Birth defects research. Part B, Developmental and reproductive toxicology.* 80:233–245.
- Reynaud K, Chastant-Maillard S, Batard S, Thoumire S, Monget P. (2010). IGF system and ovarian folliculogenesis in dog breeds of various sizes: is there a link? *The Journal of endocrinology.* 206:85–92.
- Richards A, Luccarini C, Pope FM. (1997). The structural organisation of LAMA4, the gene encoding laminin alpha4. *European journal of biochemistry.* 248:15–23.
- Robinson MJ, Cobb MH. (1997). Mitogen-activated protein kinase pathways. *Current Opinion in Cell Biology.* 9:180–186.
- Romero-Ramirez CM, Tarragó-Castellanos MDR, Muñoz-Mendoza R, Arista-Reyes R, Rosado-García A. (1997). Síndrome estrogénico en vacas lecheras por consumo de alfalfas con grandes cantidades de coumestrol. *Veterinario México,* 28:25–30.
- Ropero AB, Alonso-Magdalena P, Ripoll C, Fuentes E, Nadal A. (2006). Rapid endocrine disruption: Environmental estrogen actions triggered outside the nucleus. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology.* 102:163–169.
- Rutter WJ, Pictet RL, Harding JD, Chirgwin JM, MacDonald RJ, Przybyla AE. (1978). An analysis of pancreatic development: role of mesenchymal factor and

other extracellular factors. The Society for Developmental Biology. Society for Developmental Biology. Symposium. 35: 205–227.

- Sanin YYL, Gómez MTG, Morales AMT. (2010). Efectos de los Fitoestrógenos en la Reproducción Animal. Revista Facultad Nacional de Agronomía – Medellín. 63:5555–5565.
- Savio D. (2006). Análisis de datos de Expresión Genética mediante técnicas de Biclustering. Lenguajes y Sistemas Informáticos. Disponible en: <https://www.lsi.us.es/docs/doctorado/memorias/Pontes,%20Beatriz.pdf>
- Schneider MR, Wolf E, Braun J, Kolb HJ, Adler H. (2008). Canine embryo-derived stem cells and models for human diseases. Human Molecular Genetics, 17: R42-R47.
- Secretaría de salud. Sé un dueño responsable, para el correcto cuidado de las mascotas. (2013). Disponible en:
http://www.salud.df.gob.mx/ssdf/index.php?option=com_content&task=view&id=5457
- Serrano H, Pérez-Rivero JJ, Aguilar-Setién A, de-Paz O, Villa-Godoy A. (2007). Vampire bat reproductive control by a naturally occurring phytoestrogen. Reproduction, Fertility and Development. 19:470–472.
- Serrano H, Perez-Rivero JJ, Martinez-Maya JJ, Aguilar-Setién A. Perez-Martinez, M, Garcia-Suarez MD. (2008). Fluorescence and immunohistological detection of estrogen receptors in dog testis and epididymis after oral coumestrol administration. Neuro endocrinology letters. 29:977–980.

- Serrano H, Suárez, MDG. (2001). Alteraciones en ovarios de perras por inmunización activa con proteínas de ovocitos de cerdo. *Veterinaria México OA*. 32:221-224
- Shaw I y McCully S. (2002). A review of the potential impact of dietary endocrine disrupters on the consumer. *International Journal of Food Science and Technology*. 37:471–476.
- Smith JF, Jagusch KT, Brunswick LFC, Kelly, RW. (1979). Coumestans in lucerne and ovulation in ewes. *New Zealand Journal of Agricultural Research*, 22:411–416.
- Smitz J, Dolmans MM, Donnez J, Fortune JE, Hovatta O, Jewgenow K, Picton H. M, Plancha C, Shea LD, Stouffer RL, Telfer EE, Woodruff TK, Zelinski MB. (2010). Current achievements and future research directions in ovarian tissue culture, *in vitro* follicle development and transplantation: implications for fertility preservation. *Human reproduction update*. 16:395–414.
- Songsasen N, Woodruff TK, Wildt, DE. (2011). In vitro growth and steroidogenesis of dog follicles are influenced by the physical and hormonal microenvironment. *Reproduction*.142:113–122.
- Subsecretaría de Prevención y Promoción de la Salud. Programa de Accion especifico Rabia y otras zoonosis. (2012). Disponible en: www.spps.gob.mx/programas-y-proyectos.html
- Takahashi Y, Lavigne JA, Hursting SD, Chandramouli GVR, Perkins SN, Barrett J. C, Wang TTY. (2004). Using DNA microarray analyses to elucidate the effects

of genistein in androgen-responsive prostate cancer cells: identification of novel targets. *Molecular carcinogenesis*. 41:108–119.

- Tevosian SG (2013). Genetic control of ovarian development. *Sexual development : genetics, molecular biology, evolution, endocrinology. Embryology, and pathology of sex determination and differentiation*. 7:33–45.
- Urroz, C. (2007). *Elementos de Anatomía y Fisiología Animal*. Editorial Universidad estatal a distancia. 1era Ed. San José, Costa Rica. p.435
- Valiente C, Corrada Y, de la Sota PE, Gerez PG, Gobello C. (2007). Effect of the GnRH antagonist, acyline, on canine testicular characteristics. *Theriogenology*. 68: 687–692.
- Vasconcellos Costa, A, Peña-Salazar P, Sepúlveda-Becker N, Miska W. (2006). Presencia de cbg (corticosteroid binding globulin) y receptores de estrógeno (fracción alfa) y progesterona en el sistema reproductor de ovejas en distintos estadios del ciclo reproductivo. Estudio inmunohistoquímico. *Revista Científica*. 16:655–661.
- Watson CS, Alyea RA, Jeng YJ, Kochukov MY. (2007). Nongenomic actions of low concentration estrogens and xenoestrogens on multiple tissues. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 274:1-7.
- Whitten PL, Patisaul HB. (2001). Cross-species and interassay comparisons of phytoestrogen action. *Environmental health perspectives*. 109:5–20.

- Wilson ME, Westberry JM, Prewitt AK. (2008). Dynamic regulation of estrogen receptor-alpha gene expression in the brain: A role for promoter methylation? *Frontiers in Neuroendocrinology*. 29:375-385.
- Wocławek-Potocka I, Mannelli C, Boruszewska D, Kowalczyk-Zieba I, Waśniewski T, Skarżyński DJ. (2013). Diverse effects of phytoestrogens on the reproductive performance: Cow as a model. *International Journal of Endocrinology*. 2013:1-15
- Xu M, West E, Shea LD, Woodruff TK. (2006). Identification of a stage-specific permissive in vitro culture environment for follicle growth and oocyte development. *Biology of reproduction*. 75:916–923.
- Zhao E, Mu Q. (2011). Phytoestrogen biological actions on Mammalian reproductive system and cancer growth. *Scientia pharmaceutica*. 79:1–20.
- Zhao RQ, Zhou YC, Ni YD, Lu LZ, Tao ZR, Chen WH, Chen J. (2005). Effect of daidzein on egg-laying performance in Shaoxing duck breeders during different stages of the egg production cycle. *British poultry science*. 46:175–181.

16 Anexo

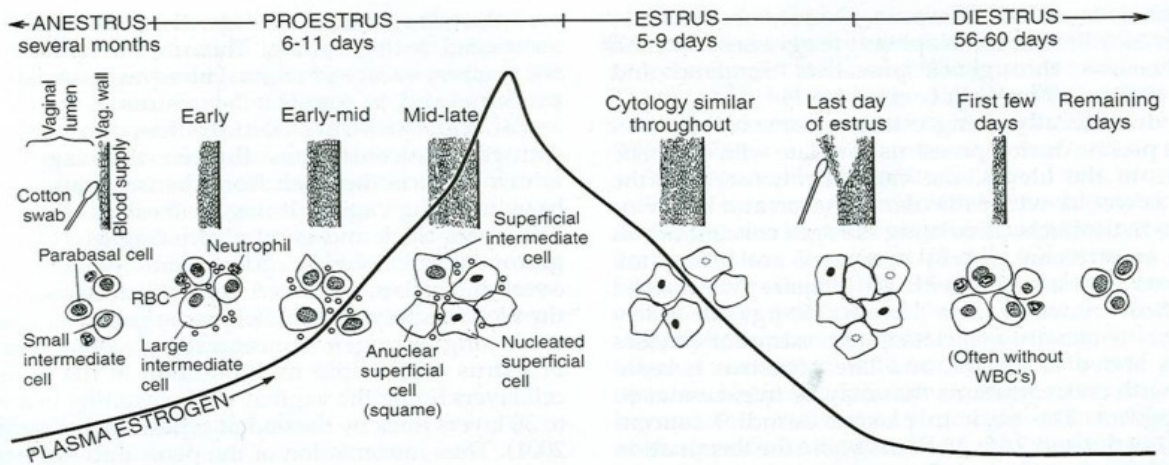


Figura 18. Cambios en el epitelio vaginal y en la citología vaginal en relación a la concentración sérica de estrógenos a lo largo del ciclo estral del perro hembra, se puede observar las transformaciones que sufren las células del lumen vaginal a través de las distintas fases del ciclo estral (Feldman y Nelson, 2007)

Tabla 11. Morfometría de folículos de fragmentos ováricos incluidos en microcápsulas de Alginato de Calcio

Individuo	[Cou ng/ml]	Estimación Porcentual Folicular				Diámetro Folicular			
		Prim	1°	2°	3°	Prim	1°	2°	3°
A	0	-	-	-	-	-	-	-	-
	1	48	28	16	8	103.05+-15.6	86.4+-10.5	27.25+-2.4	198.6+-8.7
	2	66.6	16.6	8.3	8.3	133.7+-26.4	71.8+-16.3	23.96+-2.9	192.3+-3.5
	4	81.7	5.6	5.6	7.5	16.6+-5.6	79.6+-3.8	22.7+-2.5	233.6+-7.5
	8	64.7	17.6	11.7	5.8	126.8+-16.3	50+-8.1	20.45+-1.2	198.6+-12.4
B	0	80	0	20	0	116.2+-12	0	26.2+-2.6	0
	1	33.3	26.6	26.6	13.3	135.55+-12.22	30.1+-1	28.4+-7.7	0
	2	80	5	5	10	60	80	27.3+-3.4	167.3+-3.5
	4	55.5	22.2	11.1	11.1	122.4	67.5+-3.5	26.9+-2	314
	8	60	21	12	6	122+-12.5	69.9+-20.5	27.9+-3.6	21.44
C	0	40	60	-	-	-	70+-7.5	34.9+-3.5	-
	1	68.2	17	7.3	7.3	134.9+-16.3	69.9+-14.0	27.6+-4	185.6+-3.7
	2	61.5	23	0	15.3	0	87.4+-6.5	26.5+-2	202
	4	34.7	17.3	39.1	8.6	134.5+-20	71.2+-5.9	30.9+-3.9	259.8+-38.7
	8	81.2	18.75	0	0	0	80.8+-12.8	28.8+-3.7	0
D	0	-	-	-	-	-	-	-	-
	1	36.3	0	36.3	27.2	126.5+-20.6	0	21.5+-3	196.2+-61.8
	2	34.3	28.1	6.2	31.2	97.4	72.4+-8.5	28.4+-6.7	179.5+-24
	4	65.7	5.7	11.4	17.1	123+-15.9	81.2+-5.3	25.2	281.8+-88.6
	8	-	-	-	-	-	-	-	-
E	0	61.1	27.7	11.1	0	118.6+-15	71+-11	24.3+-3.7	0
	1	66.6	8.3	8.3	16.6	127	75	20	166+-33
	2	-	-	-	-	-	-	-	-
	4	-	-	-	-	-	-	-	-
	8	75	0	25	-	0	90	34.1+-8	0

Tabla 12. Genes inducidos en común de todos los tratamientos. Se muestra; simbolo, nombre, y funciones del gen.

Simbolo	Nombre	Funciones Generales
Rest	RE1-silencing transcription factor	Diferenciacion de mioblasto de la celula muscular
Rabac1	Rab acceptor 1 (prenylated)	Citoplasma; vesicula citoplasmica; aparato de golgi, componente membranal
Brd3	bromodomain containing 3	Modificación de la cromatina
Samm50	sorting and assembly machinery component 50 homolog (S. cerevisiae)	Importacion de las proteinas a la membrana externa de la mitocondria
Taok2	TAO kinase 2	Organicacion de actina del citoesqueleto
Rexo1	REX1, RNA exonuclease 1 homolog (S. cerevisiae)	Procesos biologicos
Fntb	farnesyltransferase, CAAX box, beta	Regulacion negativa de la proliferacion celular
Afap1	actin filament associated protein 1	Regulacion de la transduccion de señales
Golga7b	golgi autoantigen, golgin subfamily a, 7B	Proceso biologico
Extl3	exostoses (multiple)-like 3	Regulacion positiva del crecimiento celular
Tial1	Tia1 cytotoxic granule-associated RNA binding protein-like 1	Proceso apoptotico
Sult1c2	sulfotransferase family, cytosolic, 1C, member 2	Sulfatación
Cdca7l	cell division cycle associated 7 like	Regulación positiva de la proliferacion celular
Mcts1	malignant T cell amplified sequence 1	Ciclo celular
Kdm5a	lysine (K)-specific demethylase 5A	Modificacion de cromatina
Pank4	pantothenate kinase 4	Proceso biosintetico de la coenzima A
Mesp1	mesoderm posterior 1	Formacion del atrio cardiaco
Tuba4a	tubulin, alpha 4A	Proceso catabolico del GTP
Gli3	GLI-Kruppel family member GLI3	Actividad del factor de transcripcion, union especifica de secuencia del ADN
Pitx3	paired-like homeodomain transcription factor 3	Actividad del factor de transcripcion, union especifica de secuencia del ADN
Rfng	RFNG O-fucosylpeptide 3-beta-N-acetylglucosaminyltransferase	Actividad de transferasa, grupos glucosil de transferencia
Stmn3	stathmin-like 3	Organización citoplasmica de microtubulos
Wnt11	wingless-type MMTV integration site family, member 11	Region regulatoria de transcripcion, enlaces de ADN
Col10a1	collagen, type X, alpha 1	Corteza celular
Hyal2	hyaluronoglucosaminidase 2	Hialuronidasas
Sspn	sarcospan	Uniones celulares
Purb	purine rich element binding protein B	Actividad represora de la traducción, union de acidos nucleicos
Sgcg	sarcoglycan, gamma (dystrophin-associated glycoprotein)	Organización membranal
Pnpla6	patatin-like phospholipase domain containing 6	Angiogenesis
Syt7	synaptotagmin VII	Excitosis
Kcnj15	potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 15	Actividad de canal ionico abierto por voltaje
Mknk1	MAP kinase-interacting serine/threonine kinase 1	Actividad de transferasa, transfiriendo grupos contenedores de forsoforo
Slc7a2	solute carrier family 7 (cationic amino acid transporter, y+ system), member 2	Transporte transmembranal de aminoacidos
Hist2h2ab	histone cluster 2, H2ab	Actividad de hterodimerizacion de proteinas
Lama4	laminin, alpha 4	Desarrollo de vasos sanguineos
Fblim1	filamin binding LIM protein 1	Enlaces ionicos de Zinc
Foxa1	forkhead box A1	Fromacion de estructura anatomica envuelta en morfogenesis
Hira	histone cell cycle regulation defective homolog A (S. cerevisiae)	Union de proteinas

Tabla 13. Genes reprimidos en común de todos los tratamientos. Se muestra; símbolo, nombre, y funciones del gen

Simbolo	Nombre	Funciones Generales
Rad1	RAD1 homolog (S. Pombe)	Respuesta celular a estímulos de daño de ADN, actividad de exonucleasa 3'-5'
Hmg20b	high mobility group 20B	Ciclo celular; modificación de cromatina; regulación negativa de la proteína, sumoilación
Smoc2	SPARC related modular calcium binding 2	Organización de la matriz extracelular, regulación positiva de la adhesión célula-sustrato; enlace iónico a metales
Kdelc1	KDEL (Lys-Asp-Glu-Leu) containing 1	Retículo endoplásmico
Asb1	ankyrin repeat and SOCS box-containing 1	Transducción intracelular de señales
Anapc13	anaphase promoting complex subunit 13	Ciclo celular; división celular; división mitótica, ubiquitinación de la proteína unida a K11
Mrpl44	mitochondrial ribosomal protein L44	Traducción mitocondrial, elongación, procesamiento de ARN, actividad endonucleasa, actividad de hidrolasa, actividad de nucleasa
Asl	argininosuccinate lyase	Ciclo de asimilación del amoniaco, proceso biosintético de la arginina, proceso biosintético de los aminoácidos celulares; actividad de liasa; purina; proceso biosintético de los nucleótidos
Bcas3	breast carcinoma amplified sequence 3	Periferia ceular, citoplasma, núcleo.
Tmem222	transmembrane protein 222	Componentes integrales de la membrana
Cnot10	CCR4-NOT transcription complex, subunit 10	Silenciamiento de genes por ARN, regulación de transcripción, regulación de traducción
Mmab	methylnalonic aciduria	Mitocondria, actividad de transferasa, enlace de nucleótidos
Ifih1	interferon induced with helicase C domain 1	Proceso de sistema inmune, sumoilación de proteínas de union, regulación del proceso apoptótico, actividad de la unión a ATP de la helicasa, union del ARN de cadena simple
Ppa2	pyrophosphatase (inorganic) 2	Desfosforilación, exosoma vesicular extracelular, actividad de hidrolasa, unión iónica de metales
Ptprd	protein tyrosine phosphatase, receptor type, D	Desfosforilación, adhesión heterofílica de célula a célula, actividad de hidrolasa, componente integral de la membrana, actividad de fosfatasa, adhesión celular
Irg1	immunoresponse gene 1	Respuesta celular a interferon beta, respuesta celular a interferon gama, respuesta celular a estímulos de progesterona.
Cfl2	cofilin 2, muscle	Despolimeración de filamentos de actina, citoesqueleto
Evl	Ena-vasodilator stimulated phosphoprotein	Movimiento basado en filamento de actina, activación de plaquetas, citoesqueleto
Fit4	FMS-like tyrosine kinase 4	Angiogénesis, morfogénesis de vesículas de sangre; regulación positiva de la proliferación celular, fosforilación, regulación positiva de la cascada de ERK1 y ERK2; regulación positiva de la cascada de JNK; regulación positiva de la cascada MAPK; vía de señalización del factor de crecimiento vascular del endotelio; componente integral de la membrana.
Hoxb13	homeobox B13	Maduración celular del epitelio envuelto en la maduración de la prostata, morfogénesis de la regulación de epitelio de la regulación de la transcripción de ADN
Cldn11	claudin 11	Adhesión celular, espermatogénesis, componente integral de la membrana
Snta1	syntrophin, acidic 1	Regulación negativa de la peptidil-cisteína, unión de canal iónico; unión dominante de PDZ
Sptlc2	serine palmitoyltransferase, long chain base subunit 2	Proceso biosintético, de la ceramida, proceso metabólico de lípidos, proceso metabólico de esfingolípidos, transferencia de grupos acilo al retículo endoplásmico
Dpm2	dolichol-phosphate (beta-D) mannosyltransferase 2	Proceso biosintético de macromoléculas, regulación de actividad catalítica, componente integral de la membrana, actividad de transferasa
Melk	maternal embryonic leucine zipper kinase	Proceso apoptótico, ciclo celular, proliferación celular, corteza celular, unión iónica de Calcio
Ptpla	protein tyrosine phosphatase-like (proline instead of catalytic arginine), member a	Procesos biosintético de ácidos grasos, proceso metabólico de lípidos, regulación de G2/M G1/S, transición del ciclo celular, componente integral de la membrana
Nop58	NOP58 ribonucleoprotein	Biogénesis del ribosoma, importación de las proteínas snRNP al núcleo, enlace poli-A de ARN
Gabbr1	gamma-aminobutyric acid (GABA) B receptor, 1	Inhibición del adenilato-ciclase, vía de señalización del receptor apareado de la proteína-G regulación negativa de la proliferación celular
Gtf2a1l	general transcription factor IIA, 1-like	Transcripción de ADN
Tsen34	tRNA splicing endonuclease 34 homolog	Procesamiento del ARNm, actividad liasa, actividad nucleasa
Rnf151	ring finger protein 151	Diferenciación de la célula, ubiquitinación proteica, espermatogénesis

Tabla 14. Expresión génica diferencial, agrupada por función.

Función	Genes Inducidos	Genes Reprimidos
Modificación de cromatina	Foxa1, Jarid1a, Hira , Rest	Anapc13, Asl, Dpm2, Flt4, Hmg20b, Ifih1, Melk, Ptprd, Rnf151.
Procesos Biosíntesis	Brd3, Cdca7l, Fntb, Foxa1 , Gli3, Hira, Hyal2, Jarid1a, Mcts1 , Mesp1, Mknk1, Pank4, Pitx3, Purb, Rest, Rfng, Taok2, Tial1, Wnt11	Asl, Cldn11, Dpm2, Flt4, Gabbr1, Gtf2a1l, Hmg20b, Hoxb13, Ifih1, Mmab, Ptpla, Rnf151, Sptlc2.
Metabolismo	Bex1, Brd3 , Cdca7l, Fntb, Foxa1, Gli3 , Hira, Hyal2, Jarid1a, Mcts1, Mesp1, Mknk1, Pank4, Pitx3 , Pnpla6, Purb, Rest, Stmn3, Sult1c2, Taok2, Tuba4a, Wnt11	Anapc13, Asb1, Asl, Cldn11, Dpm2, Evi, Flt4, Gabbr1, Gtf2a1l, Hmg20b, Hoxb13, Ifih1, Irg1, Melk, Mmab, Mrpl44, Nop58, Ppa2, Ptpla, Ptprd, Rad1, Rnf151, Smoc2, Snta1, Sptlc2, Tsen34.
Procesos Celulares	Afap1, Bex1, Brd3 , Cdca7l, Extl3 , Fblim1, Fntb , Foxa1, Gli3 , Hira , Hyal2, Jarid1a , Lama4 , Mcts1 , Mesp1 , Mknk1 , Pank4, Pitx3 , Pnpla6, Purb, Rest, Rfng, Sann50, Sgcg, Stmn3, Sult1c2, Syt7, Taok2, Tial1, Tuba4a, Wnt11	Anapc13, Asb1, Asl, Cfl2, Cldn11, Cnot10, Dpm2, Evi, Flt4, Gabbr1, Gtf2a1l, Hmg20b, Hoxb13, Ifih1, Irg1, Melk, Mmab, Mrpl44, Nop58, Ppa2, Ptpla, Ptprd, Rad1, Rnf151, Smoc2, Snta1, Sptlc2, Tmem222, Tsen34.
Proliferación	Bex1, Cdca7l, Extl3 , Fntb , Gli3 , Hyal2, Mcts1 , Mesp1 , Rest, Tial1, Wnt11, Taok2, Foxa1	Anapc13, Evi, Flt4, Flt4, Gabbr1, Hmg20b, Hoxb13, Hoxb13, Melk, Ptprd, Rad1, Snta1.
Regulación de transcripción	Bex1 Brd3, Cdca7l, Foxa1, Gli3, Hira , Hyal2, Jarid1a, Mcts1, Mesp1, Mknk1, Pank4, Pitx3, Purb, Rest, Stmn3 , Tuba4a Wnt11	Dpm2, Gabbr1, Gtf2a1l, Hmg20b, Hoxb13, Mrpl44, Rad1, Tsen34.
Diferenciación y Desarrollo	Bex1, Col10a1, Foxa1, Gli3 , Hira , Jarid1a, Lama4 , Mesp1 , Pitx3 , Pnpla6, Purb, Rest, Rfng, Stmn3 , Tial1, Wnt11	Anapc13, Asb1, Asl, Cldn11, Evi, Flt4, Gabbr1, Hmg20b, Hoxb13, Nop58, Ptpla, Ptprd, Rnf151, Snta1.
Regulación de señalización	Afap1, Foxa1, Gli3 , Hyal2, Mesp1 , Rest, Rfng, Stmn3 , Syt7 , Taok2, Wnt11, Mknk1 , Bex1	Asb1, Cldn11, Flt4, Gabbr1, Smoc2.
Apoptosis	Wnt11, Foxa1, Tial1, Hyal2, Purb, Gli3, Rest	Flt4, Ifih1, Melk.
Reproducción	Foxa1, Tial1, Rest, Syt7	Asb1, Cldn11, Hoxb13, Rnf151.
Locomoción	Stmn3 , Taok2, Wnt11, Sgcg, Lama4	Evi, Flt4.
No encontrados	Sspn, Rabac1, Hist2h2ab, Slc7a2	Bcas3, Kdelc1.
Ubiquitinación	-	Anapc13, Rnf151.
Sumoilación	-	Hmg20b, Ifih1.