

Universidad Nacional Autónoma de México

Escuela Nacional de Estudios Profesionales IZTACALA



DESARROLLO DE LAS CELULAS DE LEYDIG
EN TESTICULOS DE EMBRIONES DE POLLO

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
B I O L O G O
P R E S E N T A:

YOLANDA GOMAR GODINEZ



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

A MIS PADRES:

Con todo mi respeto, cariño y profunda admiración; que en todo momento me han apoyado y guiado, y a quines debo lo que soy.

A Dios que permitió que llegara hasta este momento.

AGRADECIMIENTOS

Dra: Amelia Sámano Bishop:
Jefe del Depto. de Embriología.

Con respeto y agradecimiento por
la atención y ayuda brindada.

Dr: Enrique Pedernera Astegiano:
Prof: Asociado de tiempo completo.
Depto. de Embriología.

Quién dirigió el trabajo y se preocupó
porque este llegara a feliz término, y
siempre me orientó y aconsejó adecuada
mente.

AL HONORABLE JURADO:

Dra. Elsa Calleja Quevedo
M.en C. José Luis Stephano Hornedo
Biol. Rodolfo Cardenas Reygadas
Bio. David Meza Galvan

Este trabajo de Tesis se realizó con apoyo,
Financiero de CONACYT, PCCBNAL 790024.

I N D I C E

	PAG.
INTRODUCCION.....	2
I. DIFERENCIACION Y FUNCION DEL TESTICULO EN MAMIFEROS.....	2
Estructura Testicular.....	4
Morfología de las Células de Leydig.....	6
Funciones de las Células de Leydig.....	8
Transporte de testosterona.....	9
Mecanismo de acción de la testosterona.....	10
Control hipofisiario de la función testicular...	12
II. DIFERENCIACION DEL TESTICULO EN EMBRIONES DE POLLO.....	13
Diferenciación gonadal en pollos.....	13
Desarrollo del testículo en pollos.....	14
Eje hipotálamo-hipófisis-testículo en aves.....	18
Objetivo.....	22
Material y Metodos.....	23
Técnica histológica para observaciones al microscopio óptico.....	23
Técnica de Incubación de los Testículos.....	24
Técnica de extracción de testosterona.....	25
Técnica de Radioinmuniensayo.....	26

	PAG
Reactivos.....	27
Especificidad del radioinmunoensayo.....	29
Sensibilidad y coeficiente de variación del Radioinmunoensayo.....	30
Análisis Estadístico.....	31
Resultados.....	33
Testículo de embrión de pollo de 8 días (estadío 34).....	33
Testículo de embrión de pollo de 10 días (estadío 36).....	34
Testículo de embrión de pollo de 12 días (estadío 38).....	36
Testículo de embrión de pollo de 14 días (estadío 40).....	40
Testículo de embrión de pollo de 16 días (estadío 42).....	40
Testículo de embrión de pollo de 18 días (estadío 44).....	41
Peso Húmedo.....	47
Secreción basal de testosterona.....	47
Secreción estimulada de testosterona con HCG..	48
Producción de testosterona in vitro en condi- ciones basales y estimuladas con HCG por tes- ticulos de embriones de pollo de diferentes - edades.....	54
Discusión.....	55
Conclusiones.....	61
Bibliografía.....	62

DESARROLLO DE LAS CELULAS DE LEYDIG EN TESTICULOS DE
EMBRIONES DE POLLO

INTRODUCCION

El presente estudio fué diseñado para observar el efecto de la gonadotropina cariónica humana sobre la producción de testosterona por las células de Leydig, demostrar a partir de que edad estas pueden responder a la estimulación gonadotrófica y aportar más información acerca de la integración funcional del eje hipotálamo-hipófisis-gónada durante el desarrollo prenatal de embriones de pollo.

Para introducirnos al tema resumiré cómo se diferencian las gónadas, especialmente el testículo, cuál es su estructura y función, qué tipo de información tenemos respecto a la producción de testosterona por las células de Leydig así como de su dependencia funcional con la hipófisis y el hipotálamo durante el desarrollo de mamíferos y aves.

I. — DIFERENCIACION Y FUNCION DEL TESTICULO EN MAMIFEROS

La diferenciación sexual se inicia en el momento en que ocurre la fecundación, dependiendo del tipo de espermatozoide fecundante. El proceso de diferenciación es determinado primeramente por factores genéticos y posteriormente por factores hormonales y ambientales (Brobeck, 1979).

La gónada en los embriones humanos adquiere características morfológicas masculinas o femeninas sólo hasta la 7a. semana de desarrollo, aproximadamente en la 4a. semana apare-

ce la primera manifestación de las gónadas en forma de un par de eminencias longitudinales, pliegues o crestas genitales o gonadales, a los lados de la línea media entre el mesonefros y el mesenterio dorsal. Si la gónada se diferencia hacia testículo es debido principalmente a la presencia de un cromosoma Y, durante la 7a. semana los cordones sexuales primitivos proliferan introduciéndose en la médula gonadal formando cordones testiculares. A la 7a. semana las células germinativas primordiales que migrarán desde el saco vitelino, están incorporadas dentro de los cordones testiculares. Ya cerca de la 8a. semana las células de Leydig aparecen en el mesénquima medular y su función asegura la subsecuente diferenciación masculina de los conductos genitales y genitales externos (Langman 1975).

Durante la 7a. semana de vida embrionaria, el embrión contiene primordios de los sistemas de conductos genitales - masculinos y femeninos, conductos mesonéfricos o de Wolff y -- conductos paramesonéfricos o de Muller. Si se desarrolla un macho el sistema de conductos mesonéfricos dará origen al epidídimo, conducto deferente, las vesículas seminales y el conducto eyaculador; mientras que en la hembra los conductos paramesonéfricos originan a las tubas uterinas y al útero. Durante el 3er. mes de vida fetal los conductos mesonéfricos o paramesonéfricos completan su diferenciación según el caso, mientras el otro involuciona. El mecanismo por medio del cuál, se deter

mina que uno de los conductos persista para formar los genitales internos durante el desarrollo embrionario, fué demostrado en embriones de conejo, observando que en presencia de un testículo las estructuras mesonéfricas se desarrollan y las paramesonéfricas involucionan, (Jost, 1953); de esta manera el mismo autor llegó a la conclusión de que los andrógenos estimulan el desarrollo mesonéfrico y sin la influencia de esta clase de esteroides, el sistema de conductos involuciona; por otro lado, el sistema de conductos paramesonéfricos se desarrolla en ausencia de estímulo hormonal a partir de la gónada, pero la regresión de este sistema de conductos se debe a una hormona proteica proveniente de los testículos, la cual constituye un factor inhibitor de los conductos paramesonéfricos; se cree que esta hormona estimula el crecimiento de las células mesenquimatosas, las cuales rodean a los conductos paramesonéfricos causando su regresión activa, (Jost, 1953).

Estructura testicular:

Es sabido que tanto los testículos como los ovarios tienen una doble función, gametogénica y hormonal; estas dos funciones en el caso de los testículos se llevan a cabo, una en los tubos seminíferos con la espermatogénesis y la otra en las células de Leydig con la biosíntesis de andrógenos.

El testículo es un órgano de forma ovalada, ubicado después del nacimiento en el escroto, su aspecto liso y brillante

se debe al revestimiento transparente externo, la túnica vaginal, su blancura depende de la capa fibrosa subyacente, la túnica albugínea, engrosada por su cara interna en el borde posterior formando el hilio del testículo, del que parten hacia el interior muchos tabiques incompletos radiados, que forman alrededor de 300 lóbulillos o compartimientos, cada uno de los cuales posee de 1 a 3 tubulos seminales contorneados. Estos se advierten como conductos filiformes que comienzan de extremos ciegos y se entrelazan uniéndose para formar tubos seminales rectos, que se abren en la rete-testis o red de Haller. Detrás del polo superior, la red de Haller se une con el epidídimo -- por medio de vasos eferentes rectos que se contornean formando masas cónicas, los lobulillos de la cabeza del epidídimo. Los tubos de cada lobulillo, que tienen alrededor de 15 cm de longitud, desembocan en el conducto del epidídimo que forma el -- cuerpo y la cola del epidídimo. Este conducto a nivel de la cola se ensancha y se engruesa convirtiéndose en conducto defe--rente. Antes de la pubertad, los cordones testiculares son macizos, posteriormente se canalizan transformándose en tubos seminíferos dentro de los cuales podemos encontrar varios tipos-celulares; espermatozonias que por mitosis se transforman en --espermatozonios primarios, estos a su vez sufren la primera división meiótica transformándose en espermatozonios secundarios, los cuales sufren la segunda división meiótica formando esper-

mátides, éstas por último son transformadas en espermatozoides por medio de un proceso llamado espermiogénesis. Las células de Sertoli se extienden desde la membrana basal hacia la luz del tubo seminífero; entre estos tubos se disponen grupos de células intersticiales o de Leydig que secretan la hormona sexual masculina, de la cual depende el desarrollo de los caracteres sexuales secundarios.

Morfología de las Células de Leydig:

Fawcett y Burgos (1960), estudiando la estructura fina de los testículos de los mamíferos observaron que el tejido intertubular de los testículos humanos adultos está compuesto de células intersticiales o de Leydig, macrófagos, mastocitos y células fusiformes que corresponden a fibroblastos. Las células de Leydig se agregan en grupos conspicuos en el espacio intertubular o se alinean a lo largo de los vasos sanguíneos.

Según Johnson (1970), la célula de Leydig típica de los mamíferos es una célula epitelioides de tipo poliédrico, que tiene un núcleo único excéntrico, de forma esférica o vesicular, con un nucléolo excéntrico, citoplasma con abundante retículo endoplásmico liso y abundantes lípidos.

Christensen (1965), estudiando la forma que presentan las células de Leydig llegó a resultados semejantes postulando que son fibroblastos modificados de tipo poliédrico que se en-

cuentran entre los intersticios de los tubos seminíferos, con un retículo endoplásmico liso de túbulos interconectados en la región central, en la periferia el retículo está comunmente - organizado dentro de grupos en forma de cisternas aplanadas fe- - nestradas, ocasionalmente se observan pequeñas piezas de re- - tículo endoplásmico rugoso que se conecta con el retículo endo- - plásmico liso, mitocondrias con crestas lamelares y con una ma- - triz densa, un complejo de Golgi disperso, citoplasma con go- - tas lipídicas, gránulos de pigmento Lipofucsina que son proba- - blemente cuerpos residuales polimórficos; los lípidos contie- - nen colesterol (precursor de las hormonas esteroideas), y pre- - sencia de la enzima $\Delta^5-3\beta$ hidroxisteroide dehydrogenasa - -- ($\Delta^5-3\beta$ HSD), que interviene en la formación de los Δ^4 -cetoes- - teroides como la progesterona a partir de los $\Delta^5-3\beta$ -hidroxis- - teroide como la pregnenolona.

La mayoría de las recientes investigaciones han descri- - to dos tipos de células de Leydig en los testículos adultos de - mamíferos:

- 1.- Células pequeñas en forma de huso (forma inmadura).
- 2.- Células grandes en forma redonda o poligonal (forma - madura).

Funciones de las Células de Leydig:

Las células intersticiales o de Leydig situadas en el mesénquima entre los tubos seminíferos tienen como función principal la producción de andrógenos, de los cuales el más importante es la testosterona. El mecanismo por medio del cual se sintetiza esta hormona es a partir del colesterol, el cual se forma desde acetato, luego el colesterol sufre oxidaciones y desdoblamientos de su cadena lateral y produce Δ^5 pregnenolona, esta puede seguir dos caminos para llegar a testosterona, la vía llamada Δ^4 pasando por progesterona; 17-hidroxiprogesterona y Δ^4 androsteno 3,17 diona, o la vía Δ^5 pasando a 17-hidroxipregnenolona; dehidroepiandrosterona; y Δ^4 androsteno 3,17 diona. Las enzimas que van catalizando estos pasos son -- Δ^5 -Isomerasa 3 β hidroxisteroide dehidrogenasa, 17 hidroxilasa, 17 desmolasa, y 17 β dehidrogenasa.

Las células de Leydig se diferencian y secretan andrógenos durante la 8a. semana de vida fetal en los humanos, su desarrollo inicial en fetos machos se debe a la estimulación por la gonadotropina coriónica proveniente de la placenta, después del nacimiento estas células sufren una regresión a un estado no diferenciado, activándose nuevamente en la pubertad debido a un incremento en las gonadotropinas del plasma provenientes de la hipófisis haciendo que produzcan testosterona.

Podemos decir que la testosterona es la causa de las ca

racterísticas distintivas del sexo masculino; cuando es producida durante el desarrollo fetal (2o. mes), estimula el desarrollo de las estructuras sexuales masculinas, como el crecimiento del pene, formación del escroto, desarrollo de la glándula prostática, de las vesículas seminales y de los conductos genitales masculinos; más tarde ayuda al descenso testicular y en la pubertad determina otra serie de características como el crecimiento del pelo en pubis y axilas, hipertrofia de la mucosa laríngea y agrandamiento del órgano provocando una voz ronca, aumento de intensidad de secreción en las glándulas sebáceas, aumento del volumen y resistencia de los huesos, aumento del desarrollo muscular esquelético, aumento de la excreción tubular renal de potasio, mantenimiento de los caracteres sexuales masculinos, facilitación de la libido y la potencia sexual.

Transporte de testosterona:

Puesto que la testosterona es relativamente insoluble en soluciones acuosas, es transportada en la sangre unida a proteínas del plasma, una de estas proteínas que se une a la testosterona con mucha afinidad es la globulina transportadora de testosterona y estradiol (TEBG); esta es una B-globulina de 94,000 de peso molecular; en los vasos solamente el 3% de la testosterona esta libre, mientras que el 42% esta unido al

TEBG; el 39% a la albúmina y el 16% a otras proteínas del plasma.

Los andrógenos unidos a TEBG no están fácilmente disponibles para el metabolismo in vivo, y la testosterona unida se vuelve inactiva, por lo tanto el grado de androgenicidad se relaciona directamente con los niveles de testosterona libre en el plasma. Sin embargo, como la TEBG no está presente en el plasma de todas las especies, no podemos generalizar acerca de si juega un papel esencial en el mecanismo de acción de los andrógenos.

Como la testosterona entra a la célula por difusión pasiva, la cantidad de la misma en un tejido dado es determinada por su concentración en el plasma, por la actividad de enzimas intracelulares y por la unión a proteínas específicas.

Mecanismo de acción de la testosterona:

La testosterona entra a la célula por difusión pasiva y puede seguir dos caminos diferentes, por un lado unirse con el receptor androgénico, o por el otro ser metabolizado por la enzima 5 α -reductasa a dihidrotestosterona (esteroide más potente que la testosterona); posteriormente testosterona o dihidrotestosterona se unen a una proteína específica intracelular, - el receptor androgénico; la presencia de esta proteína determinará en parte si un tejido responde o no a un andrógeno; una vez formado el complejo receptor-andrógeno, este es transferi-

do al núcleo de la célula, en donde reacciona con la cromatina nuclear (DNA), esta combinación a su vez regula la producción de RNAm que actúa como molde dirigiendo la síntesis de proteínas específicas.

En ciertos tejidos el AMP cíclico desempeña un papel importante en el mecanismo de acción de la testosterona ya que esta hormona activa a la adenil-ciclase que le sirve de blanco y produce un aumento de AMP cíclico; este activa a una proteín cinasa que cataliza la fosforilación, y de este modo la activa ción de una RNA polimerasa; la polimerasa activada a su vez es tímula la producción de RNA el cual funciona como mensajero pa ra la síntesis de proteínas.

La mayor parte de las acciones de la testosterona son mediadas por el camino de receptores androgénicos; sin embargo, en otros tejidos los receptores estrogénicos y otros efectores intracelulares son importantes. En algunos tejidos la testoste rona es aromatizada a estradiol; en otros los efectos de la -- testosterona no son mediados ni por receptores androgénicos, -- ni por receptores estrogénicos, como es el caso de sus accio-- nes sobre la próstata mediadas por el AMP cíclico. Recientes es tudios demuestran que los andrógenos pueden estimular en el hf gado la síntesis protéica microsomal, por un mecanismo indepen diente del receptor.

La testosterona que no es fijada por los tejidos, se --

transforma rápidamente (principalmente en el hígado) en androsterona y dihidroepiandrosterona que son conjugadas como glucoronidos o sulfatos, estas sustancias se excretan al intestino con la bilis o a la orina.

Control hipofisiario de la función testicular:

Se ha demostrado, estudiando en ratas, que la pars distalis de la hipófisis ejerce un control primario de la estructura y función de la gónada; según estas investigaciones cuando se hace una hipofisectomía hay atrofia testicular y de todo el sistema genital.

La adenohipófisis participa controlando dos funciones - importantes de los testículos, la gametogénica con producción de espermatozoides y la hormonal con producción de hormonas andrógenicas; estas dos funciones son controladas por medio de la secreción de gonadotrofinas; hormona folículo estimulante - - (FSH) y hormona luteinizante (LH). La asociación íntima de la hipófisis con el hipotálamo ofrecida por el sistema portal hipofisiario provee un camino para que hormonas liberadoras producidas por el hipotálamo regulen la función de la hipófisis.

La hormona liberadora de la LH es segregada desde el hipotálamo hacia la hipófisis, la cual a su vez secreta LH; esta hormona gonadotrófica estimula a las células de Leydig haciendo que produzca testosterona, y esta a su vez regula los caracos

teres sexuales.

La velocidad de síntesis de testosterona por las células de Leydig depende del nivel de LH en sangre. Un incremento en su secreción produce una hipertrofia de las células de Leydig y un aumento en la secreción de testosterona, el descenso de los niveles de LH se asocia con una actividad reducida de las células de Leydig testiculares y una disminución en la secreción de testosterona.

Cuando las células de Leydig son estimuladas, secretan más testosterona, y esta hormona inhibe la secreción de LH; de esta manera el eje hipotálamo-hipófisis-testículo forma una unidad funcional, la cual sirve para mantener relativamente constantes en la sangre los niveles de testosterona.

La hormona luteinizante de la hipófisis y la gonadotropina coriónica de la placenta tienen la misma actividad biológica (Dufau, 1978).

II.— DIFERENCIACION DEL TESTICULO EN EMBRIONES DE POLLO

Diferenciación gonadal en pollos:

Las gónadas se desarrollan a partir de un engrosamiento esplácnico y del mesodermo intermedio. La primera indicación visible de la gónada es una cresta genital medial con respecto al mesonefros. Las células germinativas primordiales van siendo incorporadas dentro del epitelio de la cresta, a medida que

este epitelio se diferencia, se condensa el mesenquima subyacente y forma el estroma de la gónada en desarrollo. Del epitelio germinal proliferan prolongaciones como brotes (cordones sexuales) en el estroma. Las proliferaciones sucesivas de estos cordones sexuales que contienen células de sostén y germinales, conducen a la formación de una gónada primitiva caracterizada por una médula de situación interna y una corteza.

Las gónadas femenina y masculina poseen generalmente -- una médula y una corteza. El ovario se caracteriza por una diferenciación de la corteza la cual forma tejido propio del órgano mientras que la médula experimenta regresión. En la formación del testículo la médula aumenta de tamaño y se diferencia, mientras la corteza generalmente involuciona. Poco después de que las gónadas se han diferenciado, comienzan a secretar las hormonas específicas del sexo, (Bodemer, 1972).

Desarrollo del testículo en pollos:

Los testículos son los órganos sexuales esenciales en las aves (machos), se encuentran localizados dentro de un saco, en la cavidad del cuerpo, ventral a la porción inferior del mesenterio; cada uno de ellos está unido por un mesorquio (pliegue peritoneal que envuelve al testículo fetal en el abdomen) a la pared del cuerpo dorsal. Los testículos están irrigados por la arteria espermática de la aorta dorsal. El testículo iz

quierdo es comunmente más grande que el derecho, su forma es - ovoídea y se encuentran cubiertos por una capa fibrosa, la túnica albugínea a la cual externamente la cubre una capa serosa, la túnica vaginal. Internamente cada testículo consiste en una serie de tubulos seminíferos, los cuales están muy unidos y no están separados por tabiques. En el interior de estos tubulos, se forma un epitelio germinal constituido por diferentes tipos celulares; durante el periodo de quiescencia sexual el epitelio germinal está formado por espermatogonias tipo A y células de Sertoli; sin embargo con los cambios de estaciones se produce una gran actividad mitótica por parte de las espermatogonias tipo A transformándose en espermatogonias tipo B, y estas en espermatocitos primarios, los cuales sufren la primera división meiótica transformándose en espermatocitos secundarios, - estos sufren la segunda división meiótica formando espermátides las cuales por último se transforman en espermatozoides -- por medio de un proceso llamado espermiogénesis; volviéndose - así mucho más grueso el epitelio germinal.

Una vez que los espermatozoides son liberados hacia la luz del tubo seminífero, migran hacia la rete testis y van hacia los vasos o conductos eferentes para finalmente ser eyaculados dentro del tracto genital de la hembra.

La diferenciación de las gónadas de embriones de pollo fue estudiada por diversos autores, (Swift, 1916; Venzke, 1954;

Stahl y Carlon, 1973; Woods y Erton, 1978). Se demuestra por la morfología la existencia de testículo u ovario en el día 6.5 de incubación.

Estudios in vitro utilizando precursores hormonales radioactivos, muestran que los testículos de 7 días producen pequeñas cantidades de testosterona y los ovarios estradiol y testosterona (Galli y Wassermann, 1973). De los 7 días en adelante los testículos aumentan su capacidad de producir testosterona y los ovarios de estrona y estradiol, manteniendo niveles menores de testosterona. (Guichard y colab., 1973). Estos hallazgos se confirman con mediciones por radioinmunoensayo tanto in vitro como en plasma (Guichard y colab., 1977; Woods y colab., 1975). Sin embargo Woods y Podczaski (1974), detectan que previo a los 7 días gónadas indiferenciadas de 3.5 días presentan inmunofluorescencia positiva para testosterona.

Si bien algunos estudios sugieren que las gónadas pueden ser capaces de iniciar la síntesis de hormonas sexuales antes de los 6 días de incubación, la mayoría de los autores coinciden en que a partir del 8o. día de incubación las gónadas pueden producir tanto estrógenos como andrógenos.

Se considera que las células de Leydig son una de las principales fuentes de esteroides (andrógenos), en el tejido intertubular de los testículos de embriones de pollo (Rothwell, 1973), estas células se caracterizan por presentar un gran de-

sarrollo del retículo endoplásmico liso en forma de vesículas, así como gotas lipídicas y colesterol en su citoplasma (Connell y colab., 1966); además poseen actividad positiva de la enzima Δ^{5-3} β hidroxisteroide dehidrogenasa, una enzima clave en la biosíntesis de esteroides (Haffen, 1970).

En testículos de embriones de pollo los lípidos están presentes después del día 8, y el colesterol en el día 10 de incubación (Narbaitz y Sabatini, 1963). La actividad de la enzima Δ^{5-3} β hidroxisteroide dehidrogenasa está presente en el día 8, en el tejido estromal (Chieffi y colab., 1964); sin embargo, Woods y Weeks (1969) observan histoquímicamente la presencia de esta enzima en las células de la cresta genital de embriones de pollo de dos días.

Respecto al origen de las células responsables de la producción de hormonas sexuales, las células de Leydig, De Simone-Santorno y colab., (1969) describieron precursores de células intersticiales en testículos de embriones de pollo de 7 días, como células basófilas, con ribosomas, poco RER y REL, varias inclusiones lipídicas, mitocondrias con crestas lamelares, núcleo pequeño e irregular. Sin embargo, otros autores como Scheib (1970) encuentra, células basófilas oscuras, como precursoras de las células intersticiales que inicialmente aparecen en los cordones seminíferos del testículo, las cuáles posteriormente entran al estroma testicular. Así pues podemos-

concluir que existen dos teorías respecto al origen del precursor de las células intersticiales o de Leydig en embriones de pollo: La primera teoría nos dice que el precursor de las células intersticiales se forma en el estroma y por tanto es de -- origen mesenquimatoso, (De Simone-Santorno, 1969; Brudas y -- Preuss, 1973; Narbaitz y Adler, 1966). Swift, 1916, Venzke, -- 1954. Aguilar y colab. 1981, han descrito en testículos de embriones de pollo formas transicionales entre fibroblastos y células intersticiales. Connell (1972), identificó células de -- Leydig en pollos de dos días de nacidos y describió la presencia de células fibroblastoides como precursoras de las células de Leydig. La segunda teoría nos dice que el precursor de las células intersticiales se forma dentro de los cordones testiculares, y desde ahí migra hasta situarse en el estroma; y por -- tanto es de origen epitelial, (Benoit, 1926; Scheib, 1970; --- Jordanov, 1979).

Eje hipotálamo-hipófisis-testículo en aves:

Diversos autores observaron que la gónada se forma independiente de la hipófisis durante la primera mitad del periodo de incubación. (Wolff y Stool, 1937; Ancel, 1938; Fugo y Witschi, 1938; Stool, 1939; Fugo, 1940). Además Wolff y Haffen -- (1952), demostraron que en cultivos organotípicos la gónada -- tiene capacidad de autodiferenciarse sin la hipófisis.

Hipofisectomía de embriones de pollo a las 33 y 38 ho-

ras de incubación provocan una reducción en los andrógenos testiculares por el día 13.5 de incubación, (Woods y Weeks, 1969), asociado con un decremento en la producción de la enzima Δ^5 -3 β hidroxisteroide dehidrogenasa y del contenido de colesterol, posteriormente a este día y hasta el día 17.5 la cantidad de andrógenos en los testículos privados de pituitaria es más baja con respecto a la observada en embriones intactos; por otra parte la administración de LH o la adición de transplante adenohipofisarios a la membrana corioalantoidea de embriones de pollo hipofisectomizados de 9.5 días restauran los andrógenos testiculares a niveles intactos por el día 15.5 de incubación; (Woods y colab., 1977; Vogel, 1956-1957; Betz, 1967).

La etapa ontogénica en la cual la adenohipófisis se vuelve capaz de sintetizar gonadotrofinas no se conoce; aunque algunos estudios indican que por el día II, las células gonadotróficas en adenohipófisis están bien diferenciadas morfológicamente, (Mikami y colab., 1973; Daikoku y colab., 1974). Sin embargo Grignon (1956) postula que células gonadotróficas aparecen en la adenohipófisis de embriones de pollo por el día 14 de incubación.

De acuerdo a los estudios realizados sobre el efecto de la hormona gonadotrofina coriónica humana (HCG) en gónadas de embriones de pollo Cedard y colab., (1968), encontraron que esta hormona produce un incremento en la biosíntesis in vitro de

esteroides sexuales en los testículos de embriones de pollo de 18 días; Guichard y colab. (1979) estudiando testículos de la misma edad demuestran que la HCG estimula la producción de testosterona in vitro. Connell y colab. (1966) estudiando el efecto de la HCG sobre los testículos de pollo de 2 días de nacido encontró que bajo este estímulo se producen más andrógenos. -- Byrel y Burrows (1938), inyectando gonadotrofina de suero de yegua preñada a pollos recién nacidos encontraron un incremento en el peso testicular.

Además es importante mencionar que la producción in vitro de estradiol y testosterona por los ovarios de embriones de pollo es estimulada cuando se añaden 20 ui de HCG al medio de incubación; tanto el ovario derecho como el izquierdo responden al estímulo gonadotrófico incrementando la producción de estrógenos y andrógenos, (Teng y Teng, 1977; Guichard y colab. 1979).

De los datos aportados por la literatura sobre la función del eje hipotálamo-hipófisis-testículo en embriones de pollo, y en las que se utilizan metodologías diferentes, podemos concluir que la diferenciación gonadal es autónoma durante los primeros días de incubación y que a partir del día 13.5 se hace funcional el eje hipotálamo-hipófisis-gónada, y por lo tanto la gónada se hace dependiente de la hipófisis. Sin embargo, no se conoce con exactitud la edad embrionaria de aparición de

actividad gonadotrófica en hipófisis.

No se han hecho experimentos en embriones de pollo acerca del momento ontogenético en el cuál las células de Leydig son capaces de responder a la estimulación gonadotrófica, incrementando la producción de testosterona; es importante conocer a partir de que día las células de Leydig pueden responder a este estímulo para poder relacionar esta información con la aparición de actividad gonadotrófica en adenohipófisis y poder aportar datos acerca de esta dependencia funcional.

OBJETIVO: Analizar la aparición de células de Leydig durante el desarrollo embrionario de testículos de pollo, - la producción de testosterona de los mismos y su - capacidad de responder al estímulo con gonadotrofina coriónica.

MATERIAL Y METODOS

Se utilizaron 250 embriones de pollo Rhode island, los cuales se obtuvieron de una incubadora a 37.8°C, con circulación de aire y humedad controlada. Los embriones fueron clasificados de acuerdo a las tablas de Hamburger y Hamilton (1951), tomando en cuenta sus características morfológicas internas y externas, descartando así embriones que tuvieran un mayor o menor desarrollo. Se estudiaron embriones del estadio 34 (8 días), estadio 36 (10 días), estadio 38 (12 días), estadio 40 (14 - - días), estadio 42 (16 días), estadio 44 (18 días). Los embriones fueron disecados, con el objeto de extraer los testículos, analizando su peso, morfología de las células productoras de testosterona (Leydig) a nivel de microscopía óptica y finalmente se determinó por radioinmunoensayo, la secreción de testosterona in vitro.

Técnica histológica para observaciones al microscopio óptico:

Los embriones de las diferentes edades fueron decapitados y disecados por su parte media ventral, extrayendo los testículos, para fijarlos inmediatamente en glutaraldehído al 2.5% en buffer de fosfatos 0.16M, pH 7.4, durante 2 horas, una vez transcurrido este tiempo los testículos fueron lavados con buffer de fosfatos 0.16M pH 7.4 (300 mili-osmoles), una vez lavados fueron pasados sucesivamente a través de alcoholes de con-

centración creciente, iniciando con alcohol al 30% hasta llegar a absoluto (3 cambios en este último), durante 10 minutos en cada uno, después fueron pasados a xilol, 3 cambios de 10 minutos cada uno y finalmente se embebieron en Paraplast 56°C-57°C. (3 cambios de 1.30 horas); los cortes fueron hechos a 6-micras por medio de un microtomo, para que finalmente se les tiñiera con hematoxilina y eosina montándolos con bálsamo de Canadá para observaciones al microscopio óptico.

Técnica de Incubación de los Testículos:

Los embriones fueron extraídos del huevo, decapitados y disecados por su parte media ventral, tomando los testículos; estos se pasaron a una caja de Petri que contenía medio de incubación (medio Eagle modificado por Dulbecco + Albúmina 0.1%). Con el objeto de que el peso no se viera afectado por el medio, antes de pesarlos, se procedió a secarlos con la ayuda de papel filtro, fueron colocados en una cápsula hermética, para después pesarlos directamente en una balanza analítica. Según el tamaño de los testículos y de acuerdo a la edad del embrión se cortaban en pequeños fragmentos (14 y 16 días), o se les utilizaba enteros (8, 10 y 12 días) para después pasarlos a matraces de 10 ml. (frascos de incubación), a los cuales previamente ya se les había puesto 2 ml. de Dulbecco + Albúmina 0.1%, ph 7.2. La cantidad de testículos puestos dentro de cada fras-

co de incubación varió de acuerdo a su tamaño, desde 2 a 9 pares de testículos.

Inmediatamente después se procedió a poner en un grupo de los frascos de incubación 2.5 ui/ml. de HCG, (Hormona Gonadotrofina Coriónica Humana, Sigma Chemical Co., St Louis); quedando una parte como grupo control; la hormona fue disuelta en Dulbecco + Albúmina. Posteriormente todos los frascos fueron gaseados durante 5 segundos con 5% de CO₂ + 95% de aire y tapados herméticamente para después ser colocados en baño tipo Dubnoff a 38°C, durante 2 horas de incubación y con agitación de 80-90 ciclos por segundo; una vez transcurrido este tiempo, se procedió a efectuar la extracción de la testosterona con éter.

Técnica de extracción de testosterona:

- 1.- Vaciar el contenido de los frascos de incubación en tubos de extracción con 10 ml. de éter frío, -- evitando dejar caer los fragmentos del testículo.
- 2.- Agitar por 30 seg.
- 3.- Meter los tubos al cuarto frío por 1 hora.
- 4.- Sacarlos y congelarlos en hielo-seco-acetona, separando de esta manera dos fases, una acuosa y otra de éter.
- 5.- Extraer todo el éter, vaciándolo a otros tubos y -- esperar a que se descongele la fase acuosa.

- 6.- Volver a repetir la extracción una vez más, (paso-
No. 2 al No. 5).
- 7.- Una vez extraído todo el éter en los tubos, poner-
los en baño maría a 35°C hasta dejar evaporar todo
el éter.
- 8.- Poner a cada tubo 0.5 ml. de Buffer RIA con gelatii
na.
- 9.- Tapar los tubos y agitar 30 seg.
- 10.- Dejarlos en el cuarto frío por una hora.
- 11.- Sacarlos y agitar por 5 seg. para proceder directam
ente con el Radio-inmunoensayo.

Técnica de Radioinmuniensayo:

- 1.- Pipetear por duplicado 0.2 ml. de muestras titula-
das de testosterona a tubos de ensayo. Preparar el
tubo control de cuentas totales, el de la unión no
específica y la unión con muestra 0.
- 2.- Pipetear por duplicado 0.2 ml. de las muestras proo
blema.
- 3.- Añadir 0.1 ml. de testosterona tritiada a todos --
los tubos (aproximadamente 3,000 cuentas por minu-
to).
- 4.- Añadir 0.2 ml. de antisuero antitestosterona a to-
dos los tubos excepto al tubo total y al de la - -

- unión no específica, a estos últimos añadir 0.2 -- ml. de Buffer.
- 5.- Agitar rápidamente, tapar.
 - 6.- Llevarlos al baño maría a 38°C por 1 hora.
 - 7.- Llevarlos al cuarto frío por otra hora.
 - 8.- Añadir a 4°C, 0.5 ml. de carbón activado a todos los tubos, excepto a los de las cuentas totales, a los cuales se les añade 0.5 ml. de Buffer RIA con gelatina.
 - 9.- Mezclar todos los tubos con un vortex, dejándolos reposar por 10 min. a 4°C.
 - 10.- Centrifugar a 4°C, a 3,000 revoluciones por min. - durante 15 min.
 - 11.- Pasar todo el sobrenadante a frascos para contador de centelleo, y añadir 5 ml. de líquido de centelleo.
 - 12.- Agitar 15 seg.
 - 13.- Contar en el contador de centelleo, se utilizó un contador Packard, con una eficiencia del 30% para tritio.

Reactivos:

- 1.- Buffer de fosfatos 0.16M, ph 7.4:
Solución A. KH_2PO_4 - 21.7 gr/1 litro de solución.

Solución B. Na_2HPO_4 -22.7 gr/1 litro de solución.

Tomar 196 ml. (solución A) + 804 ml. (solución B).

- 2.- Glutaraldehído al 2.5% en buffer de fosfatos - --

0.16M. ph 7.4:

Glutaraldehído al 25% - 10 ml.

Buffer de fosfatos 0.16M. ph 7.4 - 90 ml.

- 3.- Buffer RIA:

0.05 M Tris HCL buffer (ph 8.0), conteniendo 0.1 m.
de Na CL, 0.1% NaN_3 y 0.1% gelatina.

- 4.- Carbón activado dextran:

0.5% peso/vol. Norit A, carbón activado y,

0.5% peso/vol. dextran T-70 en buffer RIA.

- 5.- Curva de Titulación de testosterona:

Preparar una solución titulada de $1\mu\text{g/ml}$. de tes-
tosterona en etanol absoluto. Diluir una alícuota
en etanol a una concentración de 10ng/ml (1:100).
Hacer 5 diluciones dobles con buffer para obtener
las siguientes concentraciones:

1.0 ng/ml.

0.5 ng/ml.

0.25 ng/ml.

0.12 ng/ml.

0.62 ng/ml.

0.31 ng/ml.

6.- Antisuero:

Antitestosterona- 7 α BSA, Miles-YEDA, extraído -- por medio de inmunización a conejos con testosterona- 7 α carboxy-methyl-thioéter albúmina de suero-bobino. Reconstituir el antisuero en hielo seco -- con 0.5ml. de buffer (solución madre de antisuero).

7.- Testosterona radioactiva:

Testosterona 1, 2, 6, 7, ^3H (N) 98.8 Ci/m M (New - England Nuclear, Boston, Mass, U.S.A.).

Preparar una solución de 80,000- 100,000 dpm/ml de testosterona tritiada en buffer.

8.- Eter.

9.- Hielo- seco.

10.- Acetona.

Especificidad del radioinmunoensayo:

El anticuerpo anti-testosterona utilizado posee una -- gran especificidad para la testosterona, como se observa en la siguiente tabla de reactividad cruzada:

Porcentajes de reacción cruzada:

ESTEROIDE	PORCENTAJE
Testosterona	100%
5 α Dehidrotestosterona	17%
5 β Dehidrostestosterona	5%

17 α Epitestosterona	17%
Androstenodiona	6%
5 α -Androstane-3,17 diona	< 0.001%
5 β -Androstane-3,17 diona	
3 α -Hydroxy-5 Androsten-17-ona	
Dehydroepiandrosterona	< 0.001%
5 α -Androstane-3, 17B-diol	
5 α -Androstane-3B-17B-diol	< 0.001%
11-oxotestosterona	
11-B Hydroxytestosterona.	
5 α -Androstane-3B,11B,17B Triol-Cortisol	< 0.001%
5 α -Androstane-3B,11B,17B Triol-17B estradiol	0.001%
Progesterona	< 0.001%

Sensibilidad y coeficiente de variación del Radioinmunoensayo:

La fig. No. 1 representa una curva standard del radioinmunoensayo, donde se muestra el porcentaje de unión con respecto a la cantidad de testosterona expresada en picogramos - por tubo (Pg/tubo), pudiéndose detectar la sensibilidad del mismo (6 Pg/tubo por testosterona).

El ensayo presenta un coeficiente de variación interensayo del 7.3% y un coeficiente de variación intraensayo del 4%, por lo que se considera un modelo confiable y reproducible.

Análisis estadístico:

Los resultados fueron analizados estadísticamente aplicando la prueba de "t" Student para comparar los grupos testigos con los tratados.

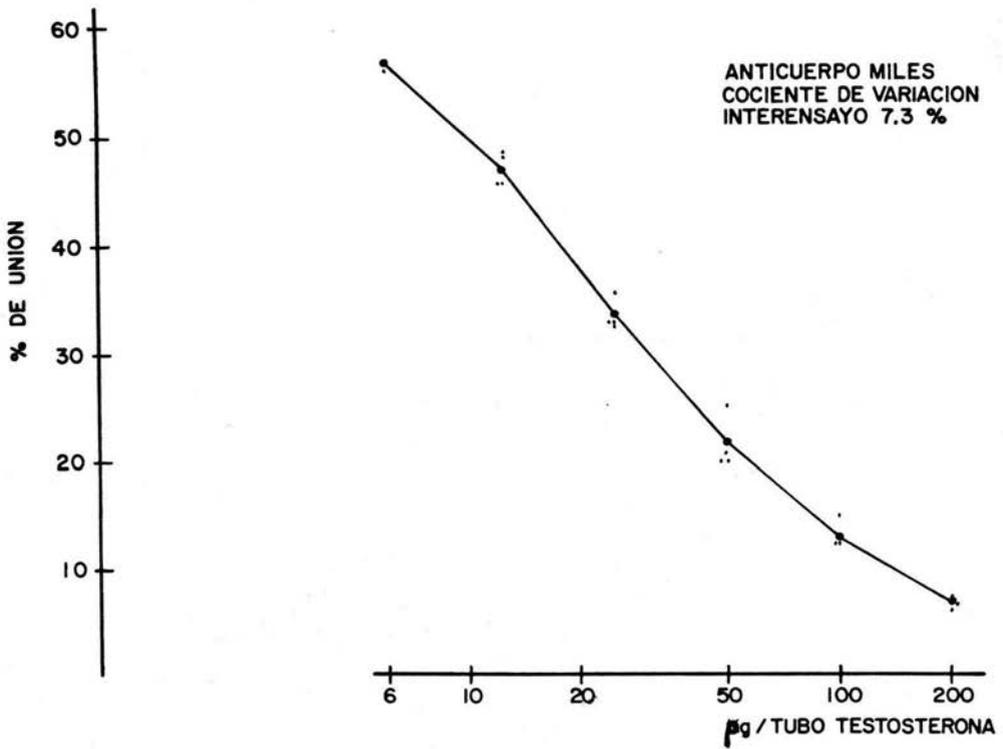


Fig. 1: Curva patrón de testosterona para el Radioinmunoensayo. Valores promedios de 4 ensayos.

RESULTADOS

Se describirá la histología del testículo de embriones de pollo a diferentes edades vistos a través del microscopio óptico.

Testículo de embrión de pollo de 8 días (estado 34):

En esta edad se observa que el testículo se encuentra rodeado por un epitelio celómico de tipo cúbico.

Si analizamos su estructura interna podemos notar que existe una diferenciación en dos zonas; una oscura y otra -- clara, las cuáles corresponden respectivamente a los cordones testiculares y al tejido intersticial.

Determinando los tipos celulares que se encuentran dentro del cordón testicular, tenemos primeramente a un tipo de células que corresponden a los gonocitos, caracterizados por ser grandes, redondos, de núcleo esférico y excéntrico con -- cromatina laxa con un nucléolo y con un citoplasma vacuolado -- ligeramente basófilo; la otra variedad de células son de tipo indiferenciadas y no presentan ninguna disposición característica, su forma es irregular, y presentan un núcleo de cromatina laxa y un citoplasma ligeramente basófilo.

En el tejido intersticial del testículo encontramos vasos sanguíneos y dos tipos de células: unas poco diferenciadas cuya forma varía desde alargadas a estrelladas con múlti-

ples prolongaciones que poseen un núcleo de cromatina laxa y un nucléolo evidente; las otras células, que podrían corresponder a fibroblastos, se encuentran en muy poca cantidad y dispersas dentro del tejido intersticial, son mucho más pequeñas, su forma es alargada y su núcleo presenta cromatina más condensada.

Dentro del tejido intersticial no se observan células con características de células de Leydig.

Encontramos gran cantidad de figuras mitóticas tanto en cordón testicular como en el tejido intersticial, (Fig. 2).

Testículo de embrión de pollo de 10 días (estado 36):

El epitelio celómico que rodea al testículo en su mayor parte es de tipo cúbico, aunque en ciertas regiones se vuelve plano.

Internamente la diferenciación entre cordón testicular y tejido intersticial es mucho más evidente, observándose figuras mitóticas en ambas zonas.

Los cordones testiculares poseen un diámetro mayor, dentro de los mismos se observa una mejor organización de sus células, encontrándose dos tipos de ellas:

- 1.- Células indiferenciadas pequeñas, cuyos núcleos se disponen periféricamente dentro del cordón y su citoplasma se dirige hacia el centro del mismo, ad--

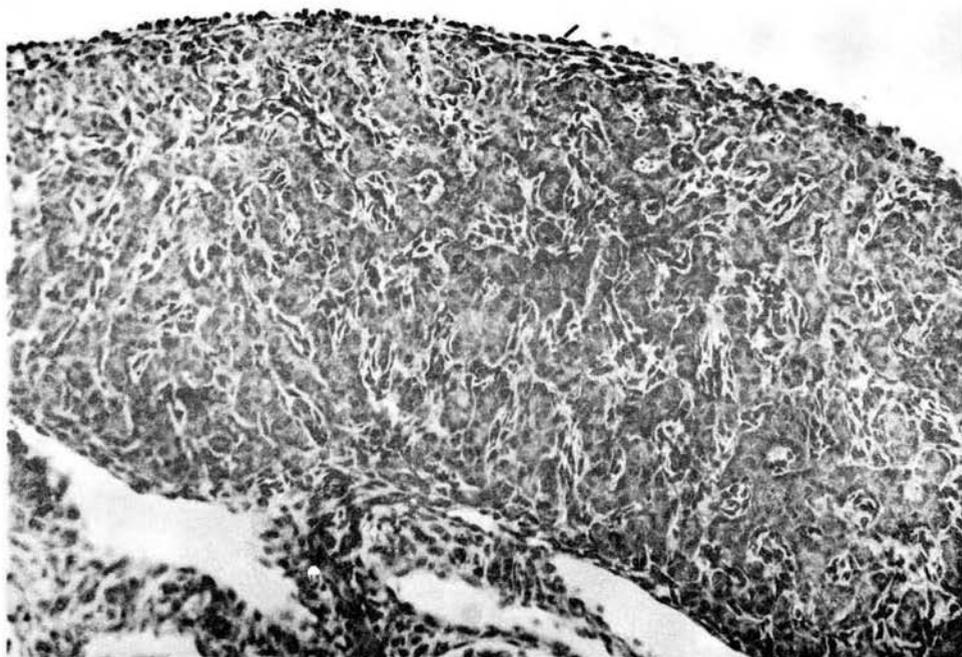


Fig. 2:

Corte transversal de testículo de embrión de pollo, de 8 días, teñido con H-E. En la superficie se observa el epitelio celómico de tipo cúbico simple, existe una diferenciación entre cordón testicular (Ct) y tejido intersticial (Ti), aparición de gonocitos (g) dentro del cordón testicular. 16X.

quiriendo una disposición pseudoacinar.

- 2.- Células grandes redondas de núcleo esférico, ex--
céntrico de cromatina laxa cuyo citoplasma es va-
cuolado y ligeramente basófilo, las cuales adquie-
ren una disposición central dentro del cordón tes-
ticular (gonocitos).

En el tejido intersticial encontramos vasos sanguíneos, heterófilos (glóbulos blancos) y diferentes grupos de células. Un grupo de células se encuentran rodeando a los cordones tes-
ticulares, su forma es alargada y su núcleo de cromatina poco condensada y con un nucleólo; el otro grupo celular se encuen-
tra un poco más alejado de los cordones, posee múltiples pro-
longaciones y su núcleo presenta cromatina laxa con un escaso citoplasma perinuclear. Ambos grupos celulares pertenecen a -
células poco diferenciadas, además se observa escasas células que corresponden a fibroblastos con las características seña-
ladas anteriormente, (Fig. 3).

Testículo de embrión de pollo de 12 días (estado 38):

A partir de esta edad el epitelio celómico que rodea al testículo es completamente plano.

Se observa una marcada diferenciación entre cordón tes-
ticular y tejido intersticial, además se siguen observando fi-
guras mitóticas en ambas zonas.

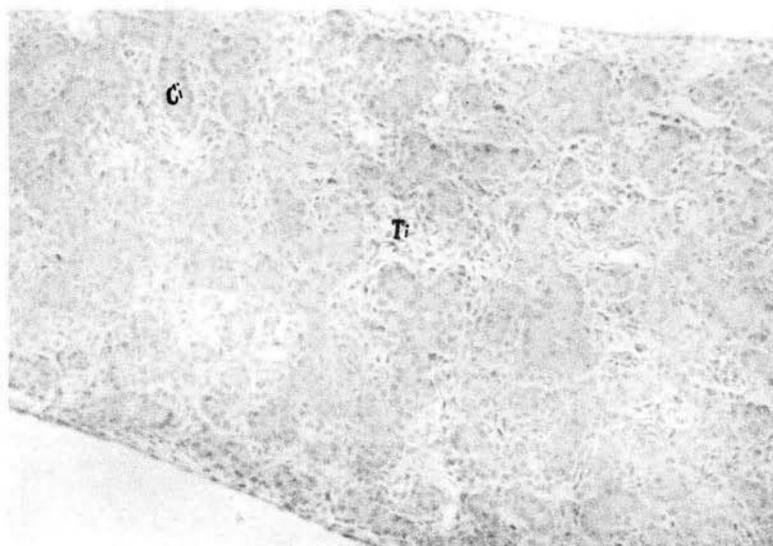


Fig. 3:

Corte transversal de testículo de embrión, de pollo de 10 días, teñido con H-E. Dentro de los cordones testiculares los núcleos de las células indiferenciadas (Ci), toman una disposición periférica, existe una mayor cantidad de tejido intersticial. 16X.

Los cordones testiculares están mucho más desarrollados y poseen un diámetro mayor; dentro de los mismos se observan gonocitos, pero además podemos detectar que las células indiferenciadas pequeñas descritas en el espécimen anterior (embrión de pollo de 10 días), toman una disposición bien definida con los núcleos dispuestos periféricamente y su citoplasma en posición apical; esta disposición ya simula la que van a tener en lo sucesivo, ya que esta población celular va a originar a las células de Sertoli.

Dentro del intersticio existen vasos sanguíneos y una buena cantidad de heterófilos en los espacios intercelulares.

Se identifican células dentro del intersticio rodeando a los cordones testiculares, cuya forma es alargada con un núcleo de cromatina laxa y un nucléolo, a estas células en lo sucesivo las llamaremos pericordonaes. El otro tipo de células que rellenan los espacios intercordonaes corresponden a fibroblastos. Eventualmente, pueden encontrarse en el intersticio gonocitos, los cuáles pueden aparecer solos o acompañados por células más pequeñas como si fuesen cordones en transformación.

Es importante mencionar que dentro del tejido intersticial se llegan a observar células con características de células de Leydig, como grupos de tres a cuatro células redondas, de núcleo excéntrico con un nucléolo y un citoplasma vacuolado eosinófilo, (Fig. 4).

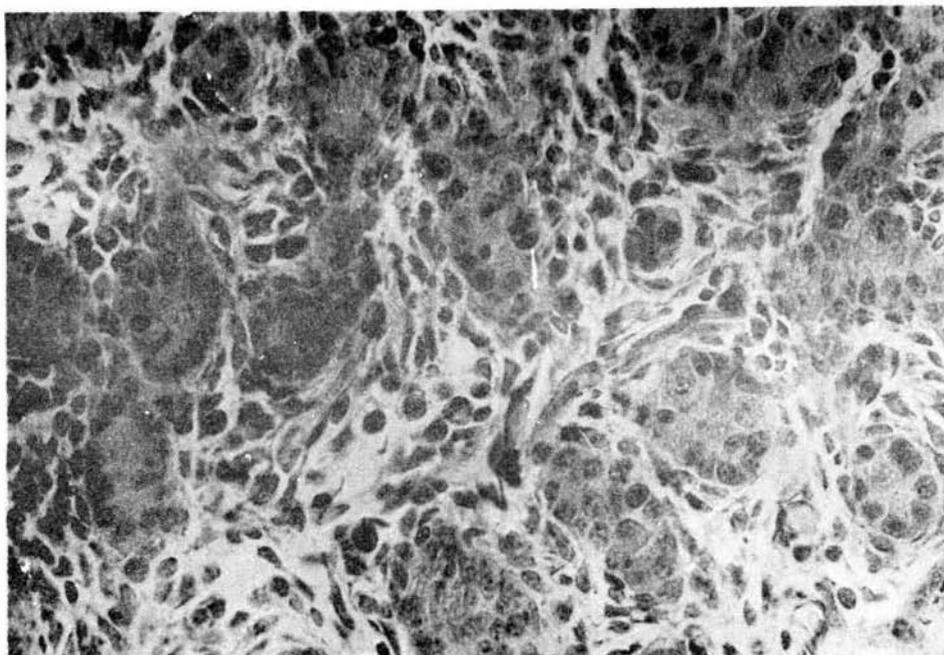


Fig. 4:

Corte transversal de testículo de embrión de pollo, de 12 días, teñido con H-E. Dentro de los cordones testiculares se observan gonocitos (g) y futuras células de Sertoli (s), se delimita el tejido pericordonal (Tp) que rodea a los cordones testiculares y dentro del tejido intersticial la primera aparición de grupos de células de Leydig (l). 40X.

Testículo de embrión de pollo de 14 días (estado 40):

El epitelio celómico se conserva plano.

Debajo de este epitelio, se observa una condensación de una capa de tejido conectivo laxo con vasos sanguíneos.

Los cordones testiculares se encuentran bien desarrollados pudiéndose localizar dentro de los mismos dos tipos de células, los gonocitos con las características ya descritas y -- las células de Sertoli de forma piramidal con un núcleo que se dispone en la base del cordón testicular.

Dentro del tejido intersticial, el tejido pericordonal adquiere una mayor desarrollo y se empieza a esbozar una capa bicelular rodeando a los cordones testiculares.

En el resto del intersticio se siguen observando vasos sanguíneos, heterófilos y fibroblastos; en forma notable se encuentran grupos de células de Leydig bien definidas con un núcleo excéntrico, basófilo y un citoplasma eosinófilo, (Fig. 5).

Testículo de embrión de pollo de 16 días (estado 42):

El epitelio que reviste al testículo es plano; ya se observa un esbozo de cápsula rodeándolo, la túnica albugínea.

Dentro de los cordones testiculares podemos observar -- bien delimitados gonocitos y células de Sertoli, con las características antes mencionadas.

En el tejido intersticial, la capa bicelular que rodea-

a los cordones se hace mucho más evidente, formando un tejido-pericardonal al cual se le pueden delimitar dos capas:

- 1.- Capa interna, de aspecto pseudoepitelial, cuyas células son ligeramente alargadas, con núcleos redondos de cromatina poco condensada y con prolongaciones citoplasmáticas dirigidas hacia la membrana basal del cordón.
- 2.- Capa externa, cuyas células presentan también una forma alargada, cuyos núcleos son de la misma forma, con cromatina poco condensada.

Dentro del intersticio nuevamente se observan vasos sanguíneos, heterófilos, fibroblastos y una mayor cantidad de células de Leydig, cuyo citoplasma es mucho más vacuolado, - -- (Fig. 6).

Testículo de embrión de pollo de 18 días (estadio 44):

En esta edad ya existe una verdadera túnica albugínea rodeando al testículo.

Dentro de los cordones testiculares, se siguen observando gónocitos y células de Sertoli.

El tejido pericardonal se encuentra ahora limitado por tres capas:

- 1.- Capa interna, de aspecto pseudoepitelial, cuyas células son ligeramente alargadas, con núcleos redondos de cromatina poco condensada.
- 2.- Capa externa, cuyas células son de forma alargada, con núcleos de la misma forma, con cromatina poco condensada.
- 3.- Capa superficial, células de forma alargada con un citoplasma vacuolado, células de tipo transicional Aguilar y colab. (1981).

Dentro del intersticio observamos vasos sanguíneos, heterófilos y células de Leydig perfectamente bien definidas, -- (Fig. 7a. y 7b.).

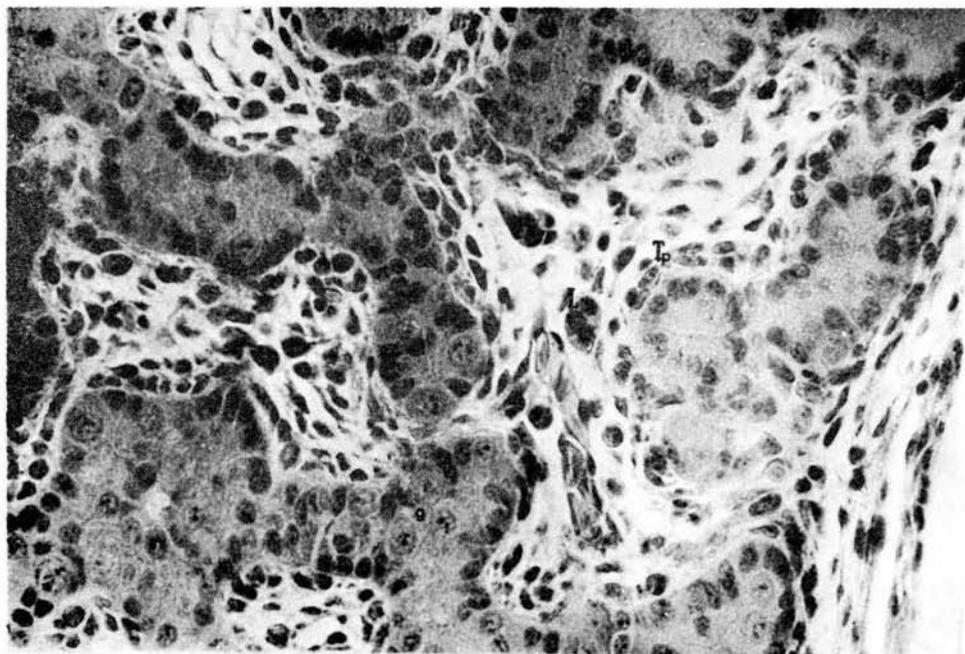


Fig. 5:

Corte transversal de testículo de embrión de pollo, de 14 días, teñido con H-E. Dentro del cordón testicular se observan con mayor claridad los gonocitos (g), existe un mejor desarrollo del tejido pericordonal (Tp), aparecen grupos de células de Leydig (l) dentro del tejido intersticial. 40X.

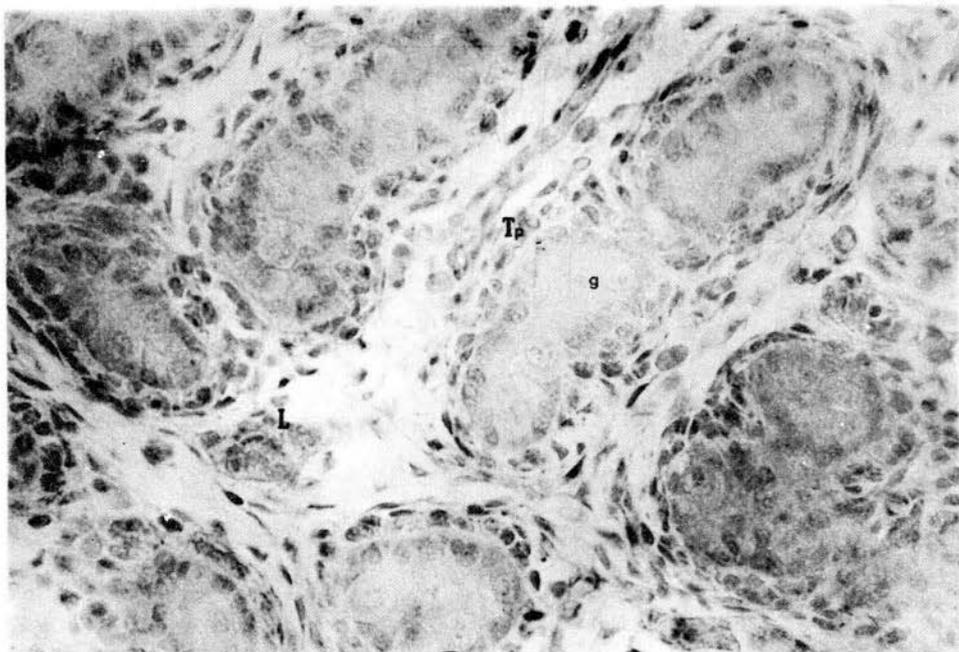


Fig. 6:

Corte transversal de testículo de embrión de pollo, de 16 días, teñido con H-E. Dentro de los cordones testiculares se observan gonocitos (g), el tejido pericordonal (Tp) se encuentra mejor delimitado y formando parte del tejido intersticial grupos de células de Leydig (l). 40X.

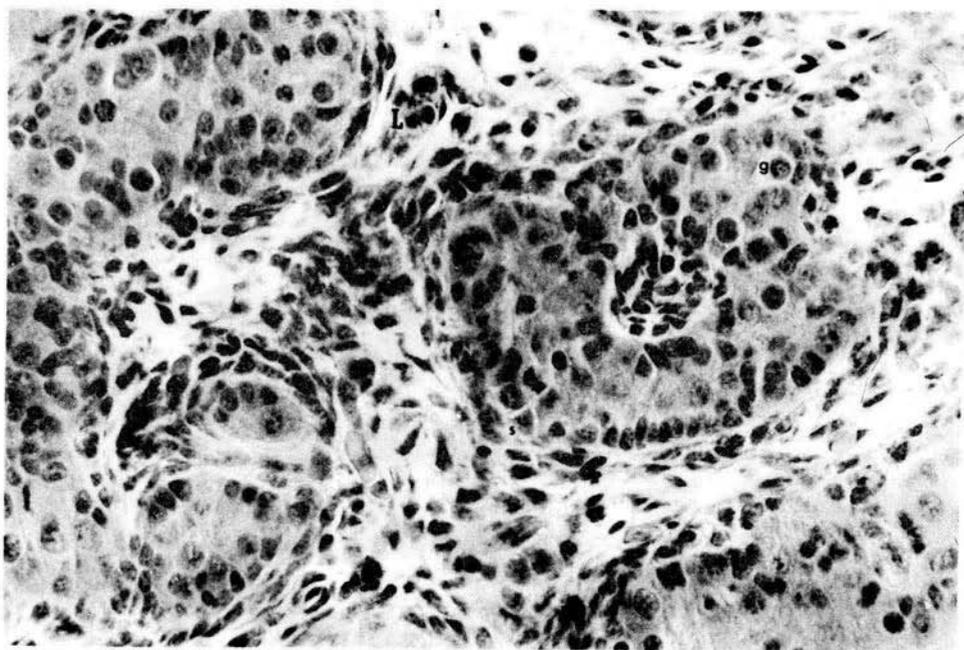


Fig. 7a:

Corte transversal de testículo de embrión de pollo de 18 días, teñido con H-E, dentro del cordón testicular se observan bien definidos los gonocitos (g) y las células de Sertoli (s), dentro del tejido intersticial grupos de células de Leydig (l). - 40X.

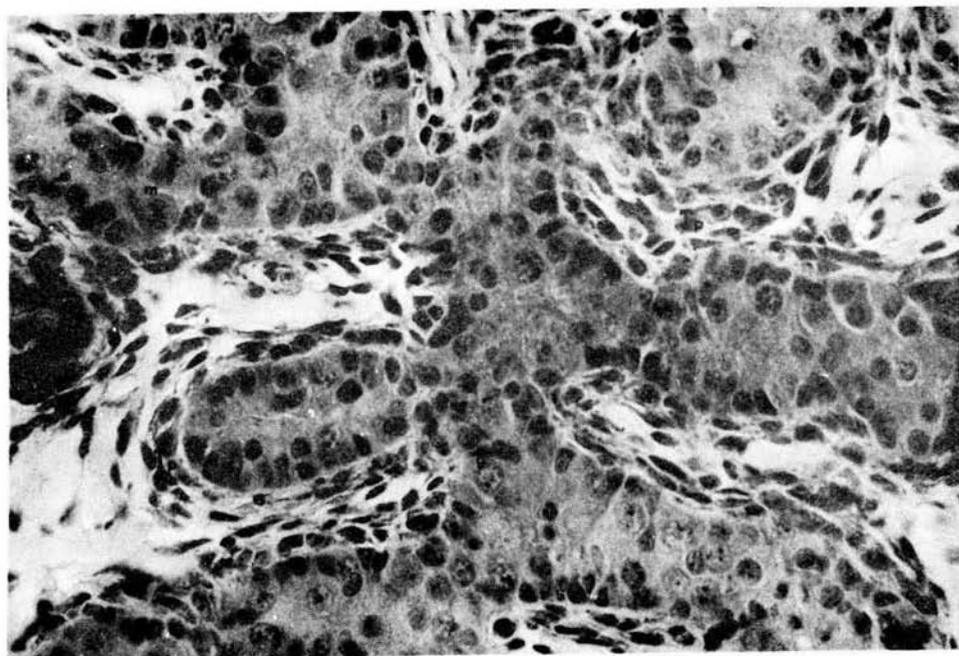


Fig. 7b:

Corte transversal de embrión de pollo, de 18 días, teñido con H-E. Dentro del cordón testicular nuevamente genocitos (g), células de Sertoli (s) y figuras mitóticas (m); el tejido pericordonal (Tp) se encuentra limitado por tres capas 40X.

Peso húmedo:

Analizando el peso del testículo de embriones de pollo de las diferentes edades se obtuvo lo siguiente:

El peso del testículo expresado en mg por embrión de pollo, con respecto a la edad en días de incubación representado en la Fig. 8, muestra claramente como se va incrementando conforme va avanzando la edad del embrión.

Entre los 10 y 14 días los valores se incrementan desde 0.74 mg. hasta 1.65 mg. a los 16 días es notorio un mayor incremento aproximadamente en un 300% con un valor de 5.05 mg.

Secreción basal de testosterona:

La secreción basal de testosterona se refiere a la cantidad de la misma que producen las células de Leydig en condiciones de incubación ya descritas sin el agregado de ningún estímulo hormonal.

La secreción basal de testosterona expresada en pg/embrión mostrada en la Fig. 9 presenta un comportamiento muy semejante a la gráfica de la Fig. 8, de peso corporal del testículo. Entre los 8 y 14 días la producción de testosterona expresada en pg/embrión, se mantiene más o menos constante, con valores que varían entre 7.99 pg y 14.52 pg. Sin embargo, a los 16 días se nota un incremento en la producción basal de testosterona en aproximadamente un 250%, con un valor de 34.85 pg/em

brión.

Este incremento a los 16 días, se debe más que nada al peso del testículo, esto lo comprobamos corrigiendo estos datos y expresándolos ahora en pg/mg de peso de testículo, tal como lo muestra claramente la Fig. 9 la producción de testosterona por las células de Leydig de embriones de pollo de 10, 12, 14 y 16 días se mantiene constante, con valores que varían desde 8.21 pg/mg hasta 10.32 pg/mg.

Secreción estimulada de testosterona con HCG:

Este tipo de secreción se refiere a la cantidad de testosterona que producen las células de Leydig in vitro, al añadir a los frascos de incubación que contenían los testículos de las diferentes edades, la HCG, 2.5 ui/ml.

La secreción estimulada de testosterona por las células de Leydig expresada en pg/embrión como respuesta al estímulo gonadotrófico se encuentra representada en la Fig. 10, si comparamos en esta gráfica la secreción basal de testosterona con respecto a la secreción estimulada con HCG, podemos notar que durante las primeras edades; 8 y 10 días, la secreción estimulada de testosterona por las células de Leydig no difiere de la basal; en cambio a los 12 días, observamos claramente un aumento en un 300% en la secreción de testosterona estimulada por HCG con un valor de 37.9 pg, esto implica que en esta edad

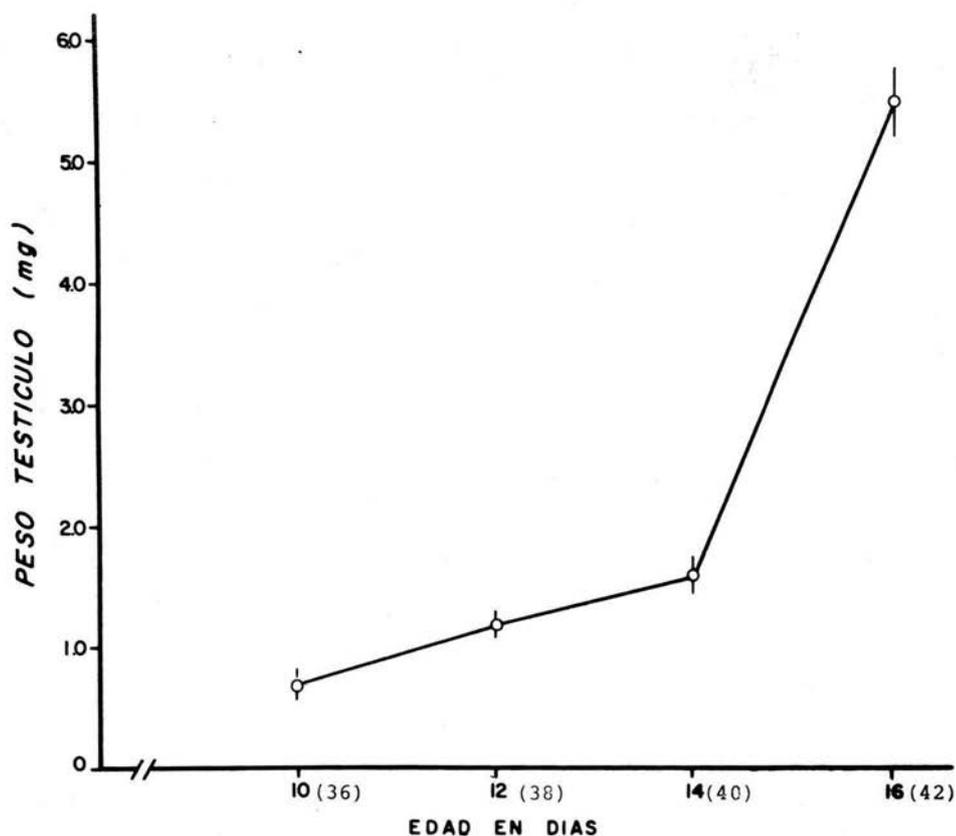


Fig. 8:

Incremento en el peso húmedo del testículo de embriones de pollo, en diferentes edades del desarrollo. Los valores representan la media \pm error estándar de la media. En la abscisa entre paréntesis el estadio correspondiente (Hamburger y Hamilton, 1951).

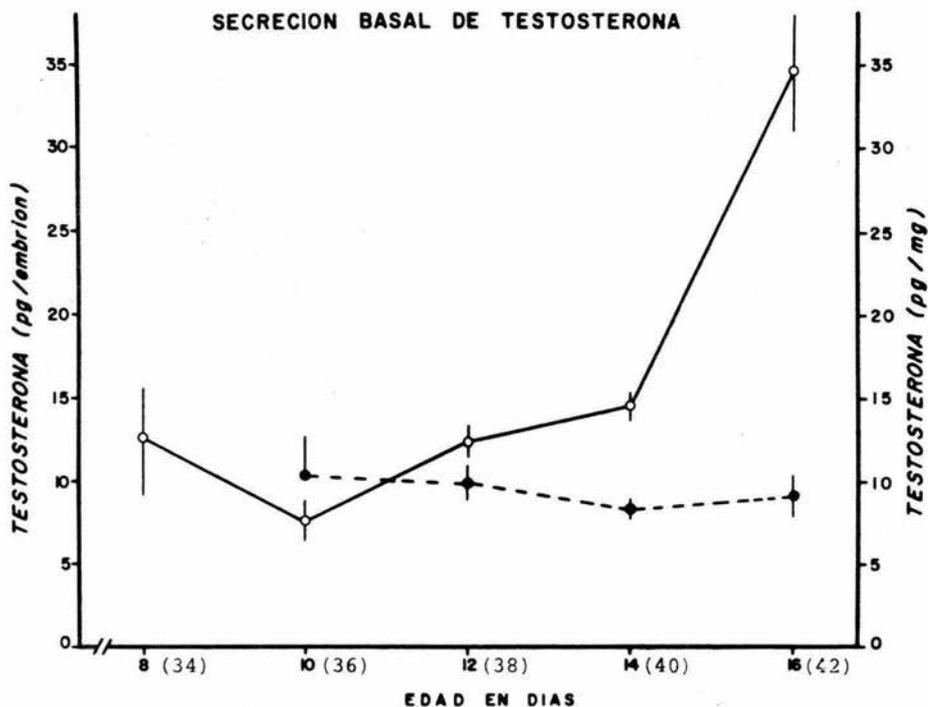


Fig. 9:

Secreción basal de testosterona producida in vitro por los testículos de embriones de pollo de 8 a 16 días de incubación.

—○—○—○— pg/embrión de testosterona.

-----●-----●----- pg/mg de testosterona.

Los valores representan la media \pm error estándar de la media.

En la abscisa entre paréntesis del estado correspondiente - -

(Hamburger y Hamilton, 1951).

las células de Leydig responden al estímulo gonadotrófico, produciendo una mayor cantidad de testosterona. A los 14 y 16 días la secreción estimulada de testosterona por las células de Leydig, con valores de 31.49 pg y 84.38 pg respectivamente, son claramente superiores a los valores basales. El mayor incremento a los 16 días se debe al incremento del peso testicular a esta edad.

La secreción estimulada de testosterona por las células de Leydig expresada ahora en pg/mg de peso testicular se muestra en la Fig. 11. Si comparamos nuevamente la secreción estimulada de testosterona con respecto a la secreción basal notamos semejanzas con la gráfica de la Fig. 10, a los 10 días la secreción estimulada de testosterona por las células de Leydig no aumenta con respecto a la basal; en cambio a los 12 días se nota claramente el incremento en la secreción de testosterona en un 300%, con un valor de 34.29 pg; nuevamente observamos que en esta edad hay respuesta de las células de Leydig al estímulo con HCG. A los 14 y 16 días el incremento en la secreción estimulada de testosterona es semejante, con un incremento en un 100% por sobre la basal con valores respectivamente de 19.99 pg/mg y 20.01 pg/mg.

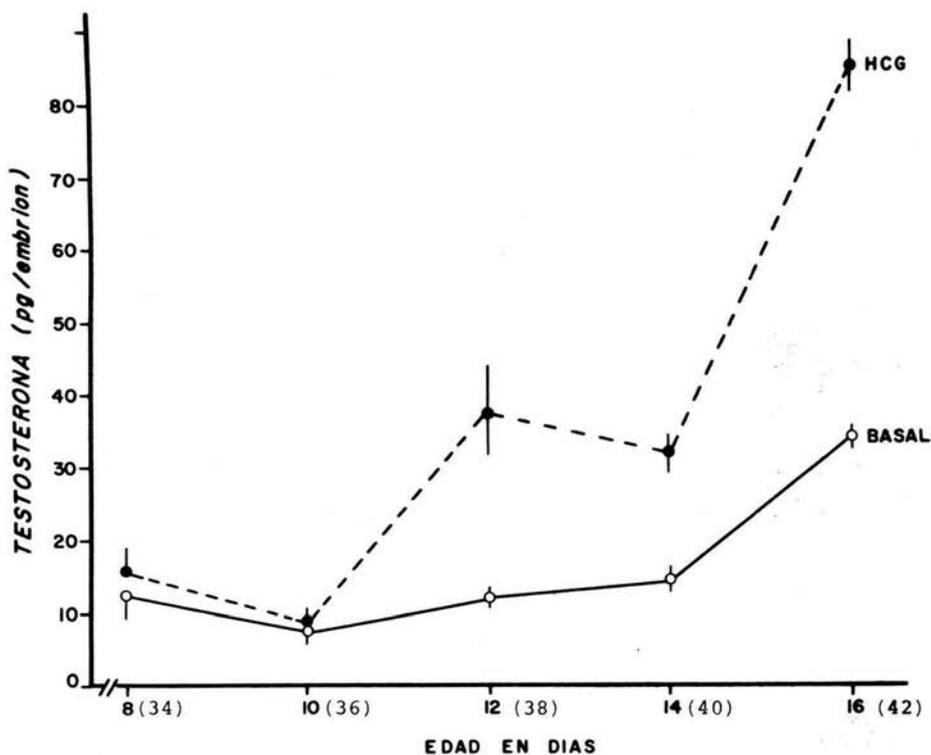


Fig. 10:

Secreción in vitro de testosterona estimulada por 2.5 ui/ml - de HCG (----●----) comparada con la secreción basal (—○—) de embriones de pollo de 8 a 16 días de desarrollo, los valores representan la media \pm error estándar de la media. En la abscisa entre paréntesis el estadio correspondiente (Hamburger y Hamilton, 1951).

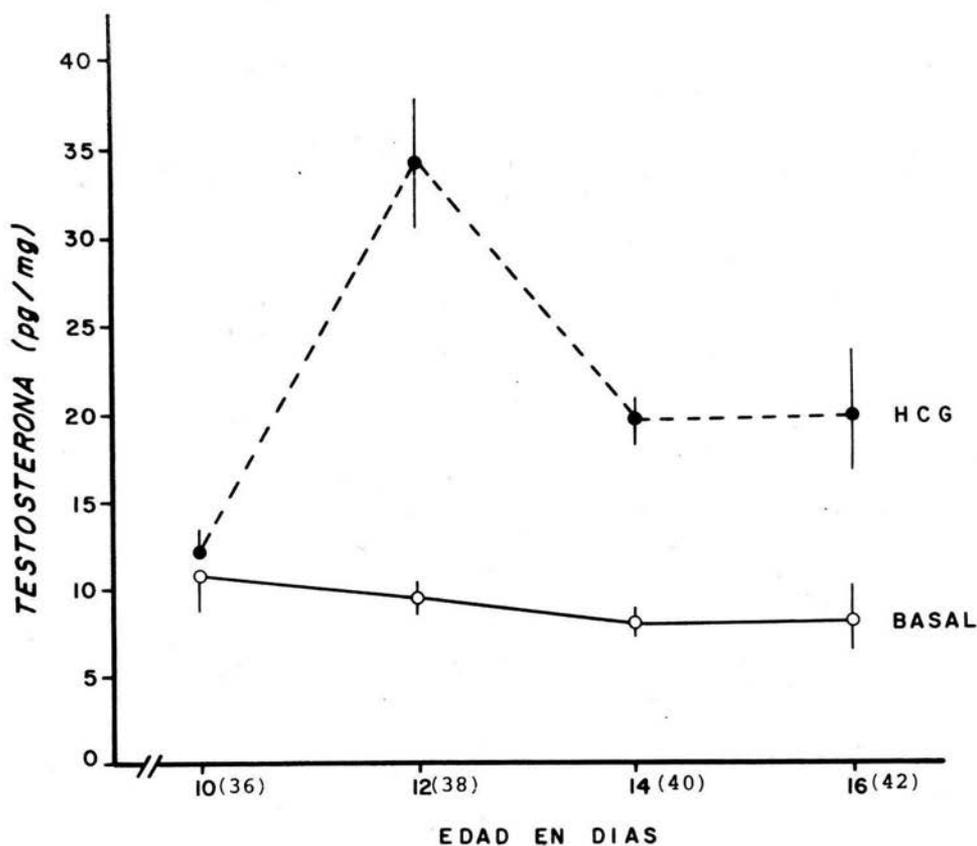


Fig. 11:

Comparación de la secreción in vitro de testosterona, estimulada con 2.5 ui/ml de HCG (---●---) respecto a la secreción basal (—○—) de embriones de pollo de 10 a 16 días. Los valores representan la media \pm error estándar de la media. En la abscisa entre paréntesis el estadio correspondiente (Hamburger y Hamilton, 1951).

PRODUCCION DE TESTOSTERONA IN VITRO EN CONDICIONES
 BASALES Y ESTIMULADAS CON HCG POR TESTICULOS DE
 EMBRIONES DE POLLO DE DIFERENTES EDADES

Edad en días (edad)	No. total de embriones	Peso Mg/Embrión	Sec. de Testosterona por embrión		Sec. de Testosterona Mg. de peso	
			Basal	HCG	Basal	HCG
8 (34)	76		12.7± 3.16 (4)	15.4±4.35 (5)		
			ns			
10 (36)	62	0.74 ± .063 (10)	7.99± 1.85 (5)	8.90±1.30 (5)	10.32±2.54 (5)	12.45±1.86 (5)
			ns		ns	
12 (38)	61	1.20± .093 (14)	12.43± .969 (7)	37.9±7.88 (8)	9.87±1.06 (7)	34.29±4.8 (8)
			p < 0.02		P < 0.005	
14 (40)	32	1.65 ± .075 (11)	14.52± 1.21 (5)	31.49±3.65 (6)	8.21±.538 (5)	19.99±1.68 (6)
			P < 0.02		P < 0.01	
16 (42)	16	55.05± .696 (10)	34.85± 1.45 (4)	84.38±4.10 (5)	9.05±1.22 (4)	20.01±3.7 (5)
			P < 0.01		P < 0.05	

* Los valores representan la media ± el error standard de la media.

* Entre paréntesis el número de determinaciones "Pools" efectuado en cada edad.

ns No significativo.

DISCUSION

La metodología empleada en este trabajo explora la capacidad que tiene el testículo de embrión de pollo de las diferentes edades de producir testosterona y de responder al estímulo de la HCG. Por ser un modelo in vitro, el testículo se mantiene aislado de influencias del resto del organismo y evita que cambios en los niveles hormonales sanguíneos puedan influir sobre su función. El tiempo de incubación ha sido el adecuado para evitar cambios degenerativos del testículo, manteniendo éste su capacidad funcional. El método de radioinmunoensayo es el más adecuado para cuantificar testosterona, debido a su alto grado de confiabilidad y reproductibilidad; ya que presenta un coeficiente de variación interna del 7.3%, utiliza un anticuerpo que es altamente específico para la testosterona, con una reacción cruzada del 17% con 5 α dihidrotestosterona y mediante este método se pueden detectar 6 pg de testosterona por tubo.

El uso de la hormona gonadotropina coriónica humana, nos permite observar la respuesta de las células de Leydig a la hormona luteinizante (LH), ya que los receptores para la LH son los mismos que para la hormona gonadotropina coriónica, habitualmente se les designa como receptor LH-HCG, (Dufau y colab. 1978).

El tratamiento con HCG humana en el medio de incubación es agudo, por lo que se descartan modificaciones tales como -- síntesis de nuevos receptores, debido a que el tiempo de incubación no permite el desarrollo de fenómenos que requieran de una síntesis protéica.

A los 8 días las características morfológicas observadas a través del microscopio óptico, que presenta el testículo de embrión de pollo muestra que ya se trata de una gónada diferenciada. Swift, (1916) Venzke, (1954) Sthal y Carlon, (1973) - Woods y Podczaski, (1974) Woods y Ertón, (1978). ya habían mostrado que la diferenciación morfológica de las gónadas de embriones de pollo hacia testículo es en el día 6.5 de incubación.

Al hacer el estudio cuantitativo de la producción de -- testosterona por los testículos de embriones de pollo de 8 - - días en condiciones normales, efectuado por medio de radioinmunoensayo, se nota claramente que a esta edad el testículo - -- tiene la capacidad de producir pequeñas cantidades de - --- testosterona; esto coincide con los hallazgos de Chieffi y Colab. (1964), quienes encontraron actividad de la enzima 5α - 3β hidroxisteroide dehydrogenase en testículos de embriones de pollo de 8 días en el tejido estromal, de Narbaitz y Sabatini (1963) que demostraron depósito de lípidos en testículos de embriones de pollo después del octavo día de incubación, De Ce

dard y colab. (1970) y Galli y Wassermann (1973), quienes incubando testículos de embriones de pollo de 7 días con progesterona, encontraron que los testículos sintetizan testosterona, - así como de Guichard y colab. (1973) quienes muestran que los testículos de embriones de pollo de 8 días producen andrógenos. Esta capacidad por parte del testículo de embrión de pollo de 8 días de producir testosterona, se debe a la existencia de células con capacidad esteroidegénica, probablemente células mesenquimatosas poco diferenciadas, ya que no fué posible identificar células de Leydig en el intersticio. Woods y Podczaski, - (1974) demuestran por inmunofluorescencia que en testículos - de embriones de pollo de 8 días, la testosterona se localiza - en las células del intersticio que rodean a los cordones testiculares.

La secreción de testosterona por testículos de embriones de pollo de 8 días estimulados con HCG, no muestran diferencias comparada con la secreción basal, es decir que a esta edad, las células que producen testosterona, no responden al estímulo gonadotrófico, esta ausencia puede ser explicada por una falta de maduración en la capacidad de respuesta, posiblemente localizada a nivel de los receptores LH-HCG.

A los 10 días de incubación existe una mayor diferenciación entre cordón testicular y tejido intersticial, sin observarse células de Leydig en el intersticio. Comparando la secre

ción basal de testosterona con respecto a la secreción estimulada por HCG en testículos de embriones de pollo de 10 días se nota nuevamente una falta de respuesta al estímulo gonadotrófico.

A partir de los 12 días ya se encuentran pequeños grupos de células de Leydig dentro del tejido intersticial testicular. Venzke, (1954) ha descrito la aparición de células de Leydig en testículos de embriones de pollo de 11.5 días de incubación.

Comparando la secreción de testosterona en testículos de embriones de pollo de 12 días estimulados con HCG con la secreción basal de testosterona, se observa un gran incremento en la producción de los testículos tratados, este dato indica que a partir de los 12 días ya existen células capaces de responder a la hormona gonadotrofina coriónica humana, es decir que poseen receptores y los mecanismos intracitoplásmicos necesarios para esta respuesta.

Tanto en 14 días como en 16 días se siguen observando, cada vez en mayor cantidad células de Leydig en el tejido estromal testicular, así como una respuesta en la secreción de testosterona de los testículos estimulados con HCG.

El aumento que se observa tanto en la secreción basal, como en la secreción estimulada de testosterona a lo largo del desarrollo expresada en pg/embrión, se debe al aumento de peso

del testículo, ya que si corregimos estos datos, y los expresamos en pg de testosterona por mg de peso, se observa que los valores permanecen constantes. Trabajos previos (Pedernera y colab. 1980) habían encontrado que entre los 17 días y el nacimiento el testículo aumentaba la cantidad de testosterona producida por mg de peso, esto quiere decir que en las etapas estudiadas en la presente tesis, 8 a 16 días, el crecimiento de las células esteroideogénicas es paralelo al crecimiento testicular, mientras que al final del desarrollo probablemente -- existe un crecimiento mayor en la población de células de Leydig, o un cambio cuantitativo en su respuesta.

Se observó que desde a los 8 días hay células con capacidad de biosíntesis de testosterona, sin embargo, recién a -- los 12 días del desarrollo se establece la capacidad de respuesta a la hormona gonadotrofina coriónica humana. Este cambio cualitativo puede relacionarse con la aparición de células de Leydig en el intersticio o con una maduración funcional de las células esteroideogénicas.

La adenohipófisis presenta células gonadotróficas diferenciadas por microscopio electrónico a los 11 días de desarrollo del embrión de pollo (Mikami y colab. 1973, Daikoku y colab. 1974), nuestros hallazgos acerca del inicio de la respuesta a la HCG a los 12 días podría coincidir con el fenómeno de maduración funcional de células gonadotróficas. La aparición --

de la capacidad de responder del testículo a los 12 días puede deberse al inicio de la secreción de LH por adenohipófisis o, - estar genéticamente programada; la respuesta a esta interrogante requerirá de investigaciones futuras.

Realizando hipofisectomía en embriones de pollo numerosos autores demostraron que el testículo dependía de hipófisis a partir de los 13.5 días, igualmente comprobaron que el testículo se desarrolla independientemente de hipófisis antes de esta fecha. (Wolff y Stool 1937, Ancel 1938, Fugo y Witschi -- 1938, Stool 1939, Fugo 1940, Wolff y Haffen 1952, Vogel 1956-- 1957, Woods y colab. 1977). Los hallazgos del presente estudio inducen a postular dos etapas en la maduración del testículo, - una previa a los 12 días en que las células esteroidogénicas - producen testosterona pero no responden a la hormona gonadotrófica, y otra posterior a los 12 días en que se comportan como células adultas; la primera podría corresponder a la etapa de independencia del testículo con respecto a adenohipófisis y la segunda a la aparición de la dependencia funcional.

CONCLUSIONES

- El testículo de embrión de pollo produce testosterona - desde a los 8 días de desarrollo.
- El incremento observado en la secreción de testosterona a lo largo del desarrollo embrionario está correlacionado con el aumento de peso testicular entre los 10 y 16-días de incubación.
- Las células de Leydig maduras se distinguen dentro del-tejido intersticial a partir de los 12 días del desarrollo embrionario.
- La capacidad del testículo de responder a la hormona gonadotrofina cariónica humana, aparece a partir de los -12 días de incubación.

BIBLIOGRAFIA

- Aguilar M. C., Romano M and Pedernera E. (1981). Ultrastructure of Leydig cells in the testis of chicken submitted to early embryonic surgical bursectomy. J. Anat 133, 4, 534-553.
- Ancel, P. (1938). Sur le rôle de l'hypophyse et de la thyroïde dans le développement embryonnaire des vertébrés amniotes. Actua lites Sci. Ind-603, 185-200.
- Benoit, J. (1926). Sur l'origine des cellules interstitielles de l'ovaire de la Poule". C. R. Soc. Biol. 94, 873-875.
- Betz T, W. (1967). The effects of embryonic pars distalis - - - grafts on the development of hypophysectomized chick embryos. - Gen. Comp. Endocrinol 9, 172-186.
- Bodemer, W. (1972) Embriología Moderna. Ed. Interamericana. - - la. edición. 286-288.
- Brobeck R, J. (1979). Physiological Basis of Medical Practice.- The Williams Wilkins Co. Baltimore.
- Brudas, K. D., and F. Preuss. (1973). Elektronemikroskopische Untersuchungen zur embryonalen und postembryonalen Genese der Eierstochzwischenzellen des Haushuhnes. Z. Zellforsch 136, 59--83.
- Byrel T. C. and Burrows W. H. (1938). Chick Testis weight response to Gonadotropic Hormone. Endocrinology 22, 366-369.
- Cerdar, L, Haffen, K., et Guichard, A. (1968). Influence de l'Hormone gonadotrope chorionique sur la production d'oestrogènes à partir d'acétate de Na et de déhydroépiandrostérone - radioactifs par les gonades embryonnaires de Poule, cultivées in vitro. C. R. Acad. Sci. 267, 118-120.
- Cedard, L., Guichard, A., Et Haffen, K. (1970). Metabolisme de la prégnénone-7 α -³H et de la progestérone-4-¹⁴C par les gonades embryonnaires de Poulet, cultivées in vitro. C. R. Acad. Sci. 271, 1707-1710.
- Chieffi, G., Manelli, H., Botte, V. Matroli, L. (1964). II'differenziamento istochimico dell'interrenale e dei tessuti somatici della gonade embrionale di pollo: Comportamento della - - steroide-3 β -olo-deidrogenase. Acta Embryol. Morphol. Exp. 7, --89-91.

Connell, G. M., Connell, C. J, and Eik-nes, K. B. (1966). Testosterone Synthesis by the Two-Day-Old Chick Testis in vitro.- Gen. Comp. Endocrinol 7, 158-165.

Connel, C. J. (1972). The effect of Luteinizing Hormone on --- The Ultrastructure of the Leydig Cell of the Chick. Z. Zell--forsch. 128, 139-151.

Daikoku, S., Ikeuchi, C., and Nakagawa. (1974). Development of the hypothalamo-hypophysial unit in the chick. Gen. Comp. Endo Crinol. 23, 256-275.

Dufau, M. L., and Catt, K. J. (1978). Gonadotropic Receptors - and Regulation of Steroidogenesis in the testis and ovary. Vitamins and Hormones. 36, 461-592.

Fawcett, D. W. and Burgos, M. H. (1960). Studies on the fine--structure of the Mammalian testis. II. The human interstitial-tissue. Amer. J. Anat. 107, 245-269.

Fugo, N. W. (1940). Effects of hypophysectomy in the chick - - embryo. J. Exptl. Zool. 85, 271-297.

Fugo, N. W., and Witschi, E. (1938). Removal of the hypophyseal primordium in the chick during the second day. Acta Biol. Latvi ca, VIII, 73-79.

Galli, F. E. and Wassermann, G. F. (1973). Steroid Biosynthesis by Gonads of 7- and 10-day-old chick embryos. Gen. Comp. Endo--crinol. 21. 77-83.

Grignon,, G. (1956). Développement du Complexe hypophysaire chez l'embryon de poulet. Societe d'Impressions Typographiques, Nancy, France. 113-114.

Guichard, A., Cedard, L. and Haffen, K. (1973). Aspect Comparatif de la synthèse de stéroïdes sexuels par les gonades embryonnaires de Poulet á differents stades du développement (étude en-culture organotypique á partir de précurseurs radioactifs). --- Gen. Comp. Endocrinol. 20, 16-28.

Guichard, A., Cedard, L. Mignot, T. M. Scheib, D. and Haffen, - K. (1977). Radioinmuassay of Steroids Produced by Cultured - -- Chick Embryonic Gonads: Differences according to Age, Sex, and-Side. Gen. Comp. Endocrinol. 32, 255-265.

Guichard, A., Haffen, K., Cedard, L., Mignot, T. M. and Scheib D. (1979). Effects of HCG and season on in vitro steroidogene-sis by 18-day chick embryo gonads. Annales de biologie animales, biochimie et biophysique. 19, 1317-1325.

Haffen, K. (1970). Biosynthesis of steroid hormones by the embryonic gonads of vertebrates. Adv. Morphol. 8, 285-306.

Hamburger, V., and Hamilton, H. L. (1951). A series of normal stages in the development of the chick embryo. J. Morphol. 88, 49-92.

Jordanov, J. Angelova, P., Boyadjieva-Michailova, and Bakalska, M. (1978). Ultrastructure of Developing Interstitial Cells in Chick Embryonic Gonad in relation to their Genesis and Steroidogenic function. Z. mikroskop. Anat. Forsch. 92, 449-464.

Jost, A. (1953). Problems of fetal Endocrinology: The gonadal and hypophyseal hormones. Recent Progr Horm Res. 8, 379-418.

Johnson A. D., Gomes, W. R., y Vandermark, N. L. (1970). The Testis. New York, Academic Press, Inc. Vol. I.

Kent Christensen. (1965). The fine structure of interstitial Tissue of the rat testis at various ages and after experimental treatment. Department of Anatomy, Cornell Medical College, 367-368.

Langman. J. (1981). Embriología médica. Ed. Médica Panamericana. 4a. edición. 244-288.

Mikami, S., Hashikawa, T., and Farner, D. S. (1973). Cytodifferentiation of the adenohypophysis of the domestic fowl. Z. Zellforsch. 318, 299-314.

Narbaitz, R., and Adler, R. (1966). Submicroscopical observations on the differentiation of chick gonads. J. Embryol. - exp. Morph. 16, 41-47.

Narbaitz, R. Sabatini, M. T. (1963). Histochemical demonstration of cholesterol in differentiating gonads. Z. Zellforsch. 59, 1-5.

Pedernera, E., Romano, M., Besedovsky, H. y Aguilar, M. C. -- (1980). The bursa of Fabricius Is Required For Normal Endocrine Development in Chicken. Gen. Comp. Endocrinol. 42, 413-419.

Rothwell, B. (1973). The ultrastructure of Leydig cells in the testis of the domestic fowl. J. Anat. 116, 2. 245-253.

- Scheib, D. (1970). Sur la présence de cellules "interstiellles primaires" dans les cordons du testicule de l'embryon de Poulet. C. R. Acad. Sci. Paris. 270, 123-125.
- De Simone Santorno, I. (1969). Morphology Ultrastructurale de l'ovaire de l'embryon de Poulet au cours de sa différenciation et de son organogénèse, J. Microsc. 8, 739-752.
- Stahl, A., et Carlon, N. (1973). Morphogénèse des cordons - - sexuels et signification de la zone médullaire de la gonade - chez l'embryon de Poulet. Acta anat., Basel. 85, 248-274.
- Stool, R. (1939). L'agénésie de l'hypophyse et de la Thyroïde est sans influence sur le développement de l'embryon de Poulet. C. R. Soc. Biol. 130, 926-928.
- Swift, C. H. (1916). Origin of the sex cords and definitive - spermatogonia in the male chick. Amer. J. Anat. 20, 375-410.
- Teng, C. T., and Teng, C. S. (1977). Studies of sex organ development. The hormonal regulation of steroidogenesis and -- adenosine 3':5'-cyclic monophosphate in embryonic-chick ovary. Biochem. J. 162, 123-134.
- Venzke, W. G. (1954). The Morphogenesis of the testis of chicken embryos. Amer. J. Vet. Res. 15, 450-456.
- Vogel, N. W. (1956). Pituitary-Gonad Relationship in the - -- chick embryo. P.h. Dissertation, Indiana, University.
- Vogel, N. W. (1957). Free Tissue Cholesterol and growth in the chick embryo hypophysectomized by decapitation. Anat. Rec. 127, 382.
- Wolff, E. Haffen, K. (1952). Sur la différenciation sexuelle des gonades embryonnaires de l'embryon de poulet en culture in vitro. Ann. End. 13, 724-731.
- Wolff, E. T., and Stool, R. (1937). Le rôle de l'hypophyse -- dans le développement embryonnaire de Poulet d'après l'étude - des cyclocéphales expérimentaux. C. R. Soc. de Biol. 126, - - 1215-1217.
- Woods, J. E., and Erton, L. H. (1978). The synthesis of Estrogens in the gonads of chick embryo. Gen. Comp. Endocrinol. - 36, 360-370.

Woods, J. E., and Podczaski, E. S. (1974). Androgen Synthesis in the gonads of the chick embryo. Gen. Comp. Endocrinol. 24, 413-423.

Woods, J. E., and Weeks, R. L. (1969). Ontogenesis of Pituitary-Gonadal Axis in the chick embryo. Gen. Comp. Endocrinol. - 13, 242-254.

Woods, J. E., Simpson, R. M., and Moore, P. L. (1975). Plasma testosterone levels in the chick embryo. Gen. Comp. Endocrinol 27, 543-547.

Woods, J. E., Podczaski, E. S., Erton, L. H., Rutherford, J.E. and Carter, C. F. M. (1977). Establishment of the Adenohypophyseal-Testicular Axis in the Chick embryo. I Testicular Androgen Levels. Gen. Comp. Endocrinol 32, 390-394.