



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**"EFECTO DE LA HORMONA FOLICULO
ESTIMULANTE EN TESTICULO DE POLLO
RECIENTE NACIDO".**

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



MEXICO, D. F.

1993

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



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 está 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.

INDICE

RESUMEN

I.- INTRODUCCION:

1.1.-	TESTICULO EMBRIONARIO	3
1.2.-	APARATO REPRODUCTOR ADULTO	8
1.3.-	ESPERMATOGENESIS	11
1.4.-	EJE HIPOTALAMO-HIPOFISIS-TESTICULO ...	14
1.5.-	GONADOTROPINAS:	
1.5.1.-	CONSTITUCION QUIMICA DE LA FSH.....	17
1.5.2.-	MECANISMO DE ACCION HORMONAL	18

II.- ANTECEDENTES:

2.1.-	EFECTO DE LAS GONADOTROPINAS SOBRE LOS TESTICULOS	21
	HIPOTESIS DE TRABAJO	25
	OBJETIVO DE TRABAJO	26
III.-	MATERIAL Y METODOS.....	27
IV.-	RESULTADOS	30
V.-	DISCUSION	47
VI.-	CONCLUSIONES.....	51
VII.-	APENDICE	52
VIII.-	BIBLIOGRAFIA CITADA	54

RESUMEN

Se utilizaron embriones de pollo de la raza white Leghorns, los cuales se dividieron en tres lotes experimentales, siendo uno control, y los otros dos tratados con 1 μ g, 40 μ g; de hormona Folículo Estimulante (FSH), administrada sobre la membrana corioalantoidea los días 13, 15 y 17 de incubación, al lote control se le administró Dulbecco que fue el medio de disolución de la hormona. Los pollos fueron decapitados recién nacidos y se diseccionaron los testículos procesándolos de diferentes formas.

Algunos fueron fijados en glutaraldehído (2,5%) e incluidos en Epon 812, observándose los cambios morfológicos y morfométricos. Se realizó la técnica de conteo de puntos (Weibel, 1966), para conocer las variaciones en el área ocupada por los túbulos seminíferos e intersticio.

También se realizó la medición del diámetro de los túbulos seminíferos y conteo de las células germinales y de Sertoli. Encontrándose cambios significativos en los lotes experimentales con respecto al control.

Otros se fijaron en formol realizando cortes por congelación, para corroborar por medio de la técnica de Rojo Oleoso la presencia de los lípidos en el tejido.

Los resultados obtenidos muestran que existe un incremento en el área ocupada por los túbulos seminíferos, así como una

mayor organización de estos; el tejido intersticial es más laxo y existe una mayor secreción de lípidos, siendo positiva con la reacción de Rojo Oleoso. Así mismo, hay diferencias en cuanto al diámetro de los túbulos y el número de células germinales y de Sertoli.

Con base a los resultados obtenidos podemos concluir que los testículos de pollo responden a la Hormona Folículo Estimulante (FSH), provocando una mayor diferenciación y desarrollo de éstos.

I: INTRODUCCION

1.1. TESTICULO EMBRIONARIO

La gónada indiferenciada en los embriones de pollo consta de dos tipos celulares; las células germinales, que son ovoides y altamente alcalinas debido a su gran contenido de fosfatasa alcalina; y las células somáticas del mesénquima, las cuales son de forma irregular (Ruiz, 1988).

Las células germinales primordiales se encuentran distribuidas uniformemente en el blastodermo, estas se reagrupan pronto en una zona denominada disco germinativo; al finalizar el primer día de incubación los gonocitos abandonan la región del disco germinativo a las 36 horas de incubación para dirigirse a la zona de las futuras gónadas, esta migración dura de 15 a 20 horas y concluye al empezar el tercer día de incubación (Huillon, 1977).

En las aves, las células germinales migran por el torrente sanguíneo del epiblasto a la cresta germinal, iniciando aproximadamente a las 33 horas de incubación (estadio 11-16), escapándose por vasos sanguíneos hasta localizarse en el mesodermo esplácnico (estadio 15-18), rápidamente alcanzan la arteria omfalomeséntérica y de ahí migran hacia el primordio gonadal por movimientos ameboides (Kuwana et al, 1987), influenciados por sustancias químicas de composición esteroideal o por mediadores del tipo de las glicoproteínas (Kuwana, 1986), (Crawford, 1990);

secretada por las células somáticas, ubicadas en la región de la futura gónada derecha (Huillon, 1977).

En el embrión de pollo, el primordio gonadal se localiza en el epitelio celómico del lado derecho (estadio 17-18), del cual las células germinales van a iniciar su recorrido, formando así el epitelio gonadal. Después de las 96 horas de incubación, la distribución de las células germinales primordiales es relativamente uniforme en ambos epitelios gonadales; pero antes de las 96 horas la distribución es asimétrica, ya que más del 70% de las células germinales colonizan la gónada izquierda y el 30% la derecha; esto está dado por una migración activa de derecha a izquierda y sucede en ambos sexos; la razón o causa no es conocida aún. Ya que en esta etapa embrionaria las células germinales permanecen bipotenciales, es decir, son capaces de diferenciarse a uno u otro sexo.

La diferenciación del epitelio germinal se dá primero en el mesénquima iniciando la formación de una red tisular, la cual formará el tejido medular y los cordones primarios en la gónada indiferenciada dependiendo del sexo, si existiera una mala condensación o escaso tejido mesonéfrico puede causar un desarrollo anormal de la gónada (Crawford, 1990).

Si la futura gónada se diferencia a un ovario entonces la corteza prolifera y no la médula, en el caso del testículo, la médula prolifera y la corteza se vuelve estéril (Crawford, 1990), (Lake, 1971).

Después se inicia la proliferación de la médula y la formación de los cordones medulares o cordones sexuales primarios, los cuales aparecen como extensiones del epitelio gonadal durante las 112-136 horas de incubación. Los cordones sexuales primarios están formados por células dispuestas de manera compacta, el mesénquima inicial rodea los cordones constituyendo el tejido intersticial; a las 148 horas de incubación los cordones primarios se separan o fragmentan del epitelio; estos cordones están constituidos por células germinales y células de sostén, conocidas como células de Sertoli.

Aproximadamente en el día 7 de incubación se desarrolla el tejido conectivo que formará la túnica albugínea primaria, separada de los cordones y asociada al estroma del epitelio gonadal. Así mismo la formación de la túnica albugínea marca el fin del desarrollo de la gónada indiferenciada; esta túnica le dá al testículo una apariencia lisa (Crawford, 1990), (Lake, 1984). La diferenciación sexual es más precoz en machos (6-7 día) que en hembras (8-9 día).

La determinación del sexo esta dada genéticamente por los cromosomas del cigoto; en los mamíferos el macho es heterogámico, pero en las aves no sucede así, ya que la hembra es heterogámica (ZW) y el macho homogámico (ZZ). Así, en mamíferos la diferenciación del testículo es atribuido por la expresión de una proteína plasmática llamada antígeno H-Y; en las aves la diferenciación hacia ovario es determinada por la

expresión del antígeno H-W.

Se ha propuesto al antígeno H-W como el inductor de los cambios sexuales primarios, en la gónada heterogamética. Por lo tanto la organogénesis ovárica va a estar bajo el control del antígeno H-W, y la organización testicular como resultado de la ausencia del antígeno H-W (Crawford, 1990).

Después de que la túnica albugínea primaria se ha separado del epitelio gonadal, los cordones sexuales primarios presentan los componentes principales de la gónada masculina diferenciada.

Las células germinales primordiales permanecen dispersas azarosamente durante el desarrollo de los túbulos seminíferos, hasta el día 13 de incubación, en el cual por divisiones mitóticas sucesivas se diferencian a espermatogonias (Ruiz, 1988), y es hasta el día 20 de incubación cuando se alinean las espermatogonias, formando el epitelio espermatogénico; este epitelio está formado de una monocapa en un macho inmaduro, y consta de espermatogonias y algunas células de Sertoli, que se incorporan en los cordones sexuales primarios durante la diferenciación de la gónada estas células producen la hormona anti-Mülleriana que permite la diferenciación de los genitales externos masculinos, así como, el sistema de ductos respectivamente (Crawford, 1990), (Lake, 1971).

Las células intersticiales también conocidas como células de Leydig se encuentran dispersas y su número incrementa

significativamente por el día 17 de incubación (Cole y Cupps, 1977); los cambios morfológicos en las células intersticiales se dan en diferentes etapas en ambos sexos; en el día 7 al 11.5 de incubación en testículo y en ovario del día 7 al 13.5 de incubación; éstas cambian progresivamente de una forma irregular a una forma oval (Romanoff, 1960), la citolocalización del receptor a la hormona luteinizante (LH) interviene durante la morfogénesis progresivamente hasta que adquiere la forma oval, esto se da en el día 12.5 en testículo y en el día 15.5 en ovario (Woods, 1987); la transformación de estas células les confiere la capacidad de sintetizar hormonas esteroides como la testosterona (Crawford, 1990), (Lake, 1971).

La red de cordones aparece durante el quinto día de masculina diferenciada, la red de cordones subsecuentemente se desarrolla en la red de testis en el macho diferenciado.

El desarrollo de los gonoductos se da a partir del sistema mesonéfrico en una etapa fetal temprana (aproximadamente en el décimo segundo día de incubación), el mesonefros se trasforma en el epidídimo y los ductos mesonéfricos, a ductos deferentes; antes de que éstos conductos degeneren e inicie la formación del metanefros. Los embriones de pollo white Leghorns poseen un pequeño tubérculo genital el cual se forma en el día 12 de incubación (Marshall, 1961).

1.2. APARATO REPRODUCTOR ADULTO

El sistema reproductor consiste en un par de testículos, el izquierdo es un poco más largo que el derecho (Lake, 1971). Los testículos se localizan cerca del extremo cefálico de los riñones y ventrales a los mismos. Esta localización los mantiene a una temperatura de 43°C (Cowles, 1965), y no existe influencia de los sacos aéreos postabdominales para disminuir la temperatura de éstos; ya que se encuentran a la misma temperatura de la cavidad visceral, por lo tanto, la temperatura es benéfica para la espermatogénesis de las aves, esto no sucede en mamíferos (Lake, 1971).

El peso de los testículos comprende el 1% del peso corporal (Parker, 1949). La túnica albugínea es muy delgada y no posee septos que los dividan como en mamíferos. Los testículos están constituidos de túbulos seminíferos, la *rete de tubuli* y los vasos eferentes (Crawford, 1990). Las aves no poseen glándulas de Cowper ni vesícula seminal como en los mamíferos (Lake, 1971).

Los túbulos seminíferos son una red extensa anastomosada en el testículo, constituidos por espermatogonias y células de Sertoli o de sostén; y en el intersticio se localizan las células de Leydig.

Posteriormente los túbulos seminíferos forman los túbulos rectos en los cuales se pierden las células germinales, estos son muy cortos y su función es conectar a los túbulos seminíferos con

la red de testis que consta de una serie de canales irregulares embebidos en tejido conectivo, siendo la mayor parte extratesticular, localizandose en la superficie dorsomedial del testículo uniendose al final del epidídimo.

La red de testis abre en los conductos eferentes a lo largo del epidídimo, estos ductos se anastomosan en el ducto epididimal. Los ductos eferentes derivan de los túbulos convulcionados del glomérulo distal y proximal del mesonefros embrionario. Los ductos epididimales y ductos conectores, derivan de los ductos colectores y excretorios del mesonefros respectivamente. El ducto epididimal es extremadamente corto en aves, y deriva de la parte distal del ducto Wolffiano (Lake, 1971). El epidídimo, que deriva del mesonefros (Marshall, 1961), no está dividido como en mamíferos y es extremadamente pequeño. Los ductos epididimales se unen a los ductos deferentes formando el sistema de ductos de salida (excurrent); los ductos deferentes continúan hasta la cloaca, vía papila del ducto deferente. El ducto deferente es altamente convulcionado excepto hacia el fin (llamado ducto deferente recta); éste incrementa su diámetro hasta un punto llamado receptáculo. Es el principal órgano de almacenaje de esperma, así el sistema de ductos de salida funcionan transportando, madurando y almacenando espermatozoides; secreta y/o reabsorbe varios fluidos y materiales, incluyendo espermatozoides en proceso degenerativo.

En galliformes no existe un verdadero falo u órgano intromitente, poseen un órgano copulador localizado en la zona ventromedial del proctodeum; éste órgano en erección se ingurgita, con linfa procedente de los pliegues linfáticos. Este líquido linfático se añade al semen en el *vas deferens* y ambos eyectan simultáneamente a lo largo del surco longitudinal del falo (Crawford, 1990).

Las células de Sertoli tienen una función muy importante en el proceso espermatogénico, son consideradas como células de soporte y nutrición, así como involucradas en la biosíntesis de hormonas esteroides y fagocitosis de células germinales, las cuales se encuentran en proceso degenerativo (Crawford, 1990); están unidas en su parte proximal a la membrana basal, alcanzando en su parte distal la luz del túbulo, su forma es variable, ya que proyectan su citoplasma lateralmente entre las espermatogonias. Su citoplasma por lo general es un poco más oscuro que el de las células germinales, el núcleo es claro y oval y contiene un nucléolo con un centro acidófilo y dos masas laterales basófilas (Welsch, 1980).

En el intersticio se localiza a las células de Leydig o intersticiales, su forma es variada, poseen un citoplasma acidófilo con una gran cantidad de Retículo Endoplasmático Liso (REL) y Mitocondrias con crestas tubulares, así como cantidades variables de inclusiones lipídicas, éstas secretan la testosterona (Ruiz, 1988; Balinsky, 1985).

1.3. ESPERMATOGÉNESIS

La espermatogénesis, inicia en la quinta semana de edad del pollo, con la división y proliferación de espermatogonias; a lo largo de la cual existe un aumento del diámetro de los túbulos por semana; ésta, se divide en tres etapas: la prepuberal, puberal y de madurez o espermatogénesis.

Etapas Prepuberal; durante las cinco primeras semanas de edad se organizan los túbulos seminíferos y prolifera la capa basal, por mitosis se multiplican las espermatogonias; aproximadamente después de la sexta semana de edad aparecen e incrementa el número de espermatoцитos primarios, así mismo ocurre una proliferación y diferenciación de la células de Sertoli. De la octava a la novena semana el crecimiento de los espermatoцитos prevalece, existiendo un aumento en el diámetro de los túbulos (Crawford, 1990). El desarrollo de los espermatoцитos primarios parece tener una dependencia específica a la testosterona (Lofts y Massa, 1980).

Etapas Puberal; está caracterizada por un incremento en el crecimiento testicular, así como un aumento continuo del diámetro de los túbulos, en esta fase los espermatoцитos primarios inician su división meiótica aproximadamente a las diez semanas de edad, dando como resultado los espermatoцитos secundarios, los cuales son de menor tamaño y rápidamente pasan a la segunda división meiótica para formar 4 espermátides en total; las cuales

aparecen en los túbulos seminíferos, aproximadamente a las 12 semanas de edad; en ésta existe un notable incremento de las células de Leydig (Lake, 1971; Cole y Cupps, 1977); y a las 20 semanas de edad ya están presentes en todos los túbulos (Crawford, 1990), en esta etapa los testículos de los gallitos Leghorns blancos pesan 16.7 gramos (Sturkie, 1967).

Etapa de Espermatogénesis o Madurez Sexual; caracterizada por la producción de espermatozoides, y con el término del crecimiento testicular, esto ocurre de la vigésima semana de edad en adelante; pero la fertilidad no es buena, sino hasta que los gallitos tienen de 24 a 26 semanas de edad (Crawford, 1990), (Sturkie, 1967).

La duración de la espermatogénesis es relativamente corta, a partir de la división meiótica de los espermatoцитos primarios que se estima dura de 5 a 6 días, las espermátides aparecen 6 o 7 días después de la división de los espermatoцитos secundarios y las espermátides se alargan durante el décimo y décimo segundo día, lo cual marca el fin de la espermiogénesis. Por lo cual los espermatozoides aparecerán en una eyaculación de 13 a 15 días después de la multiplicación de los espermatoцитos primarios (Parker, 1949; Lake, 1984).

Los espermatozoides poseen una larga pieza cefálica con un acrosoma puntiagudo y una pieza media corta, a la que se inserta un largo flagelo. Estos deben madurar en el epidídimo antes de que sean capaces de fertilizar.

El semen usualmente es blanco y opaco, pero puede ser claro y acuoso, particularmente cuando la concentración de espermatozoides es baja. El pH del semen es de 7.04, y el número de espermatozoides por milímetro cúbico es de 3.5 millones . El semen aviar tiene su capacidad fertilizante *in vivo* hasta 30 días (Sturkie, 1967).

1.4. EJE HIPOTALAMO-HIPOFISIS-TESTICULO

En base a numerosos experimentos realizados, se sabe que el hipotálamo tiene una función muy importante en la regulación endocrina. Los componentes de este eje son autónomos en etapas tempranas antes de que funcionen como unidad; tales componentes son: Hipotálamo-Hipófisis-Gónada. Se ha demostrado inmunohistoquímicamente la presencia de factores liberadores de LH en el infundibulum del presunto hipotálamo en el día 5.5 de incubación (Woods et al, 1985). Así mismo la pituitaria es capaz de sintetizar hormonas gonadotrópicas antes de la comunicación vascular entre el hipotálamo; en el día 7.5-8.0 de incubación se ha encontrado el factor liberador de LH en el plexus capilar primario de la eminencia media anterior de la hipófisis y se presenta tempranamente factor de hormona circulante en el día 10.5 (Woods, 1984; Woods, 1987). Este funcionamiento continua hasta el día 13 en el cual se establece el sistema de venas porta, que comunica al hipotálamo con la hipófisis y es cuando se establece el eje en machos (Woods, 1987).

Se ha comprobado la dependencia del hipotálamo al realizar hipofisectomía, mediante la cual se ha podido comparar la respuesta de los embriones al no existir la hipófisis, o al no existir comunicación entre hipotálamo e hipófisis.

La hipófisis en aves carece de lóbulo intermedio y está formada de lóbulo caudal y lóbulo cefálico; el lóbulo anterior o Adenohipófisis es muy pequeño, y pesa de 7-10 μg en pollos adultos (Scanes, 1986).

Tanaka y Yasuda (1980) realizaron adenohipofisectomía total, los gallos fueron sacrificados a diferentes intervalos después de la adenohipofisectomía (3,5,10,15,20,25,30,40,50 días).

La adenohipofisectomía total causa serios daños, ya que se observa decremento del peso testicular, aumento considerable del volumen ocupado por el intersticio; disminución del diámetro tubular; todas las células en proceso degenerativo, tales como las espermatogonias, espermatoцитos y células de Sertoli hasta encontrar un epitelio germinal formado por una monocapa, con algunas espermatogonias y células de Sertoli en proceso degenerativo; así mismo, causa un proceso de interrupción de la espermatogénesis.

Fugo (1940) fue el primero en implicar la pituitaria en el crecimiento y desarrollo de las gónadas de pollo, y demostró un desarrollo normal de la gónada de pollo hasta el día 13; así Vogel (1956; 1957) observa que después del día 13 no aumenta ya la concentración de colesterol que es el precursor de las hormonas esteroideas, Woods y Weeks (1969) observaron que en el día 13 se alcanzaba el pico máximo de esteroidogénesis, y lo corroboraron al realizar adenohipofisectomía observando una disminución en la esteroidogénesis, y al restaurar por

transplantes la adenohipófisis se vió que restauraba su actividad. También Woods (1977) observó que al realizar adenohipofisectomía disminuían los niveles de andrógenos y por inmunohistoquímica en el día 13.5 se recuperaban los niveles de andrógenos al realizar transplantes de adenohipófisis. Woods (1983b) observó que la testosterona y LH alcanzaban sus máximos niveles en plasma en el día 13.5.

Brown (1975) observó que al realizar adenohipofisectomía había una regresión testicular y esta se revertía al suministrar FSH la cual actúa a nivel de espermatogénesis, aumentando y recuperando el diámetro tubular de los túbulos seminíferos.

Estos son algunos de los experimentos realizados, para corroborar la existencia e importancia del eje Hipotálamo-Hipófisis-Testículo.

1.5. GONADOTROPINAS:

1.5.1. CONSTITUCION QUIMICA DE LA HORMONA FOLICULO ESTIMULANTE (FSH).

Desde el punto de vista químico las hormonas se clasifican en tres grupos principales.

a) *LAS DERIVADAS DEL AMINOACIDO TIROSINA*, tales como dopamina, adrenalina, y tiroxina entre otras.

b) *LAS HORMONAS PEPTIDICAS Y PROTEICAS*; las cuales varían en tamaño; tales como secretina e insulina por mencionar algunas; pero otras son proteínas bastante grandes como las hormonas glucoproteínicas de la hipófisis anterior, como las gonadotropinas Hormona Luteinizante (LH) y Hormona Foliculo Estimulante (FSH), las cuales estan constituidas por dos cadenas peptídicas, una es la subunidad denominada α y la otra β ; estas subunidades no estan unidas por puentes disulfuro (como en el caso de la insulina).

La subunidad α es muy similar en ambas hormonas, pero las subunidades β son diferentes; lo cual les confiere la especificidad biológica (Barrington, 1977).

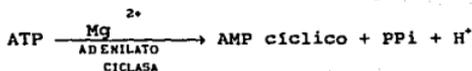
c) *LAS HORMONAS ESTEROIDES*; que comprende aquellas hormonas producidas por la corteza suprarrenal (cortisol) y los esteroides sexuales producidas por las gónadas (testosterona, progesterona y estradiol) (O'Riordan, 1988).

1.5.2. MECANISMO DE ACCION HORMONAL

El mecanismo de acción hormonal se refiere a la descripción de la cadena de fenómenos moleculares iniciados por la hormona, y estos son observados en el metabolismo de la célula.

Actualmente se conoce el mecanismo de acción hormonal de distintas hormonas. Por ejemplo se sabe que las hormonas peptídicas como la FSH utilizan AMPc como segundo mensajero; esto es, la hormona en sí funciona como primer mensajero y no requiere entrar en la célula, sino, que su acción radica en la membrana plasmática al unirse a su receptor específico (el cual es un complejo lipoproteico); una vez establecido este complejo se activa a la adenilato ciclasa que se encuentra en la membrana, la cual utiliza ATP como sustrato y algunos cofactores (metales bivalentes Ca^{2+} , Mg^{2+}) para producir AMPc y pirofosfato (Fig.1) de donde el AMPc va a dar los efectos biológicos dentro de la célula al aumentar sus niveles.

a)



b)

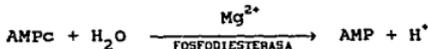


Fig.1. a) La síntesis de AMPc es catalizado enzimáticamente; b) y se degrada por hidrólisis.

Además de la adenilato ciclasa existe una proteína; la proteína G, que se encarga de mandar la señal de que el complejo Hormona-Receptor se ha establecido y activa a la adenilato ciclasa de la siguiente forma.

La proteína G, es un intermediario en el proceso de activación; es una proteína de membrana periférica, que consta de tres subunidades α , β y γ (Fig.2); podemos encontrarla de dos formas ya sea como Guanosin Difosfato (GDP) o Guanosin Trifosfato (GTP), esta última es la forma activa que se localiza en la subunidad α y al establecerse el complejo Hormona-Receptor se cambia GDP por GTP; es decir se activa, y se disocia de la subunidad β y γ ; la subunidad α contiene al GTP, por difusión llega a la adenilato ciclasa donde se une y la activa, aumentando de esta forma los niveles del AMPc por acción de la adenilato ciclasa (Fig.3). (Stryer, 1988; Alberts, 1989).

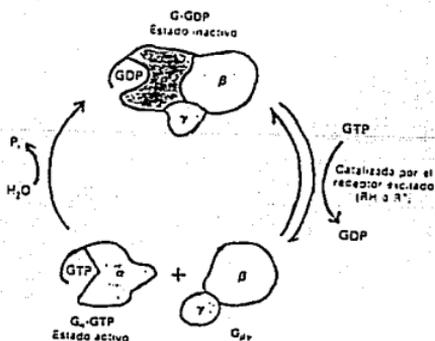


Fig.2. Las proteínas G se interconvierten de la forma inactiva-GDP a la activa-GTP, el cambio es catalizado por el complejo Hormona-Receptor.

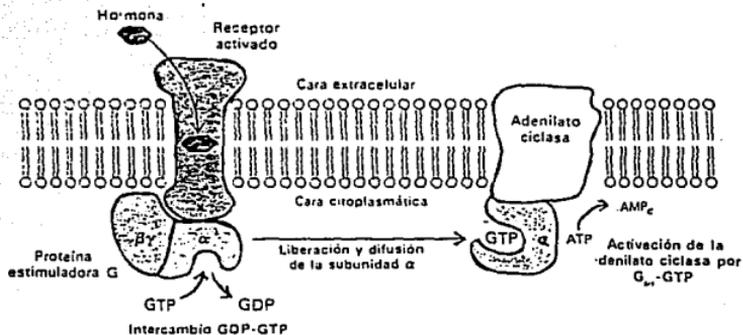


Fig.3. Activación de la adenilato ciclasa por medio de la proteína G (subunidad α).

II. ANTECEDENTES

2.1. EFECTO DE LAS GONADOTROPINAS SOBRE LOS TESTICULOS

Actualmente se han realizado una gran cantidad de trabajos con respecto a la función de las gonadotropinas en aves; pero la mayoría de ellos, se han realizado en etapas adultas y existen muy pocos trabajos en etapas embrionarias. Así mismo, se han comparado los efectos entre aves y mamíferos.

En general se utilizan tres técnicas para determinar la presencia y acción de las gonadotropinas: a) La administración de hormonas en el animal intacto, b) Hipofisectomía; y c) Terapia de reemplazo. En el animal hipofisectomizado pueden ser implantados extractos o fragmentos de la glándula; o administrar hormonas de la misma u otra especie (Sturkie, 1967).

Al realizar hipofisectomía en aves inmaduras Nalbandov, (1959); observó que evita la madurez sexual; ya que las células germinales se pueden multiplicar, pero no alcanzan la madurez sexual. Nalvandov, 1959; Marshall, 1961; Brown et al, 1975; y Tanaka y Fujioka, 1981; encontraron que al realizar hipofisectomía en aves adultas existe una regresión testicular, así como una notable disminución del peso y tamaño testicular, decremento del diámetro tubular, así como un aumento del área ocupada por el intersticio; también se observaron células

de Sertoli atrofiadas (núcleos colapsados) y células espermatogénicas en regresión, de la misma forma regresión de órganos sexuales accesorios y cambios en las características del plumaje. Se ha observado que la destrucción de la eminencia media y del sistema porta causa detención de la espermatogénesis, así como regresión de órganos accesorios y características sexuales secundarias (Graber et al, 1967).

Al realizar adenohipofisectomía se observó disminución del peso testicular, del diámetro tubular y colapsamiento de éstos; así como un aumento significativo del intersticio encontrándose hasta fibroblastos, el epitelio germinal constituido de una monocapa con células de Sertoli atrofiadas y células espermatogénicas en regresión (Tanake y Yashuda, 1980).

En ratas y otros mamíferos hipofisectomizados se ha observado, que la administración de FSH restaura la espermatogénesis y actúa a nivel de células de Sertoli; así mismo, es más importante su acción en etapa prepuberal, ya que estimula la multiplicación de espermatogonias; y la LH en etapa adulta, por mantener la espermiogénesis (Lofts y Marshall, 1958; Ortavant et al, 1969; Courot et al, 1971).

Se ha observado en diversos experimentos realizados que al administrar FSH en polluelos existe un aumento del peso testicular, una diferenciación temprana, aumento del diámetro tubular a causa de la estimulación del epitelio germinal

(Breneman, Zeller y Beekman, 1959; Nalbandov, 1959; Nakajo e Imai, 1956, 1961; Heirick, McGibbon y Meshan, 1962; Graber et al, 1967; Brown y Follet, 1977; Brown et al, 1975).

También se ha observado que la FSH estimula las células de Sertoli, aumentando sus prolongaciones citoplasmáticas lo cual es importante por su función en la espermatogénesis (Nagano, 1966; de Kretser y Burger, 1972; Cooksey y Rothwell, 1973; Steinberger et al, 1975; Dorrington et al, 1976; Hansson et al, 1976; Steinberger y Steinberger, 1976; Kaya y Harrison, 1976). Se ha postulado el aumento de receptores de membrana en las células de Sertoli por acción de la FSH (Zuckerman y Baker, 1977; Parvinen et al, 1980).

Al administrarse FSH en codorniz y pollos hipofisectomizados, se observa que ésta actúa primeramente en células de Sertoli, a nivel de espermatogénesis, sin estimular aparentemente a las células de Leydig (Brown et al, 1975). De la misma forma , la administración de FSH induce una marcada hipertrofia de células de Sertoli en gallos y existe un incremento del diámetro de los túbulos seminíferos (Siegel y Siegel, 1964; Ishii y Furuya 1975; Ishii y Yamamoto, 1976).

Se ha observado, que la LH actúa a nivel de células intersticiales, existe una mayor diferenciación de fibroblastos a células de Leydig, aumenta la capacidad secretora de estas (Graber et al, 1967; Connell, 1972; Van Tienhoven, 1961; Lofts y Massa,

1980; Lake, 1984). En polluelos esta hormona aumenta los niveles de testosterona en plasma (Sturkie, 1967; Van Tienhoven, 1961).

En testículo embrionario de pollo cultivado con precursores de progesterona o pregnenolona, se ha visto producción de hormonas esteroides, tales como testosterona (C'edard et al, 1970; Galli y Wasserman, 1972; Pedernera y Gomar, 1983); también se ha visto que existe una síntesis de testosterona entre el día 7.5 y décimo octavo día de incubación, incrementado la síntesis de ésta en el día 10 momento en el cual, entran en regresión los conductos de Müller (Galli y Wasserman, 1973; Woods et al, 1975; Guichard et al, 1977 Guichard et al, 1979).

HIPOTESIS DE TRABAJO

Observar si existe una respuesta en testículo de pollo, al administrar Hormona Foliculo Estimulante (FSH), en etapa embrionaria.

OBJETIVO DE TRABAJO

Considerando todo lo anteriormente planteado el objetivo del presente trabajo es:

Conocer el efecto de la hormona Folículo Estimulante (FSH), sobre la organización, cambios morfológicos y morfométricos del testículo de pollo recién nacido, tratado en etapa embrionaria.

OBJETIVOS PARTICULARES:

- Denotar los cambios anatómicos del testículo de pollo tratado con respecto al control.
- Evaluar los cambios morfológicos de los túbulos seminíferos de los animales tratados con respecto al control.
- Cuantificar como varía el área de los componentes del testículo.
- Medir el diámetro de los túbulos seminíferos y observar si existe variación de los tratados con respecto al control.
- Cuantificar el número de Células Germinales Primordiales y de células de Sertoli en el túbulo seminífero del testículo tratado con respecto al control.

III: MATERIAL Y METODO

Se utilizó huevo fértil de la raza white Leghorns, el cual se incubó a 37°C en condiciones óptimas de humedad, después de 11 días de incubación se realizó ovoscopia descartándose los embriones en mal estado. Los embriones viables se colocaron horizontalmente, marcándose la cámara de aire, con la ayuda de una aguja de disección, se hizo un pequeño orificio en ésta, posteriormente con ayuda de una segueta se hizo una pequeña ventana en la parte proximal de la cámara de aire teniendo precaución de no perforar la membrana corioalantoidea, una vez hecha la ventana se colocó sobre ella suero fisiológico para humedecer la membrana externa y la corioalantoidea y poder separarlas por succión en la cámara de aire, haciendo previamente un orificio en ésta. Una vez bajado el embrión, se quitó la membrana externa con unas pinzas de punta roma; los orificios se taparon con cinta adhesiva transparente.

Una vez realizado esto los embriones se dividieron en tres lotes experimentales: Control, y tratados con 1 µg, y 40 µg de FSH y se colocaban nuevamente en la incubadora. Todo esto se realizó en un cuarto estéril, para evitar la contaminación.

En el día 13 de incubación se suministró la primera dosis de hormona, 100 µl por individuo (la hormona se diluyó en medio de Dulbecco), a los 15 días se administró la segunda dosis, y en

el día 17 la tercera dosis. A los embriones del lote control se les suministró Dulbecco en la misma cantidad que los embriones tratados, pero sin hormona.

Una vez que nacían los polluelos se sacrificaban por decapitación; y se diseccionaron los testículos; los cuales fueron procesados de diferente forma: Algunos fueron incluidos en Epon 812 de la siguiente forma: Una vez obtenidos los testículos se eliminaron las puntas y sólo se procesaron los cilindros del centro; de los cuales se hicieron fragmentos de platina de 0.20 mm aproximadamente cada uno. Estos fueron fijados en glutaraldehído al 2.5 % (ver apéndice) por 1 hr. a continuación se realizaron de 2-3 enjuagues con buffer de Cacodilatos (ver apéndice) cada 10 minutos. Posteriormente se realizó una postfijación en tetróxido de Osmio al 1% (1 hr.), se lavó nuevamente con buffer de Cacodilatos y se procedió a la deshidratación con cetona gradualmente cada 10 minutos (70°, 80°, 90°), y dos cambios en acetona 100%. A continuación se realizó la preinclusión en Acetona 100%-Epon 1:1 por 18 horas y por último se incluyó en epon 100% y se colocaron en la estufa a 60°C por 18 horas. Una vez incluidos se obtuvieron cortes semifinos de 1µm y se tiñó con Azul de Toluidina (ver apéndice).

Se realizó el método de conteo por puntos (Técnica Weibel, 1966), midiendo el área ocupada por tejido intersticial y túbulos

seminíferos, en un área del corte del testículo (27892.2 μm^2) expresando el porcentaje del volumen total.

También se realizaron cortes por congelación; los órganos fueron fijados en formol al 10% por 3 días. Posteriormente se lavaron con agua corriente y se incluyeron en gelatina al 10%, 15%, 20%, y 30% en cada una por 24 horas; una vez en la gelatina de 30% se procedió a colocarlos en cajitas de inclusión donde se dejó que solidificara dentro de formol al 10% y se colocaron en refrigeración para que el bloque se endureciera y tomara consistencia. Al cabo de 24 horas se enjuago el bloque a cortar, y se eliminó el exceso de gelatina y se colocaron en el criostato, se cortó longitudinalmente a -20°C con un grosor de 15 μm , se realizó tinción con Rojo Oleoso (ver apéndice), por 10 min y se enjuagó con alcohol de 70°, se montó con gelatina glicerizada, y se observaron.

La tinción de Rojo Oleoso se realizó con el fin de corroborar la presencia de los lípidos dentro del tejido, y hacer evidente la diferencia de inclusiones lipídicas de las células de Leydig entre los animales controles y tratados.

IV: RESULTADOS

ASPECTOS ANATOMICOS

Los testículos de pollo recién nacidos son un par de órganos amarillos claros, de forma ovoide alargados, siendo el testículo izquierdo más delgado y alargado que el derecho; se localizan cerca del extremo cefálico de los riñones y ventrales a los mismos, presentan un tamaño aproximado de 5 mm.

Se observa que en los testículos tratados aumenta un poco el grosor, observándose el testículo derecho un poco más engrosado y ovoide.

CAMBIOS HISTOLOGICOS

Los cambios morfológicos observados fueron muy evidentes en los cortes de testículo, se observa en los controles un tejido intersticial muy compacto, existen muy pocos cordones y estos se localizan en la periferia, sus células se encuentran muy desorganizadas y existen muchas agrupaciones celulares en el tejido intersticial.

A diferencia de los controles, en los tratados con 1 μ g (FSH) se observa un tejido intersticial más laxo, existen pocas agrupaciones celulares y se observan ya túbulos seminíferos tanto en la periferia como en el centro; formando una red extensa

anastomosada, algunos incluso presentan una luz; los túbulos seminíferos se encuentran delimitados por una membrana basal, y un epitelio que está constituido por células germinales y células de Sertoli; éstas se observan más organizadas, así como podemos distinguir la morfología de las células de Sertoli como de las células Germinales.

Las células de Sertoli se encuentran paralelas a la membrana basal, su forma es ovoide, y su citoplasma se proyecta perpendicularmente al centro del túbulo seminífero, hacia la luz; entre ellas se encuentran las espermatogonias. Su citoplasma es un poco más claro que el de las células germinales.

Las células de Sertoli tienen una función de soporte y nutrición de las células germinales, por lo cual son más numerosas que las células germinales.

A diferencia de las células de Sertoli las células germinales son de mayor tamaño, ovoides, su núcleo más claro y su citoplasma hialino.

En los individuos tratados con 40 µg. (FSH) se encuentra un tejido intersticial más laxo, en el cual podemos observar la presencia de las células de Leydig éstas presentan una forma variable un núcleo amorfo y varios nucleólos, en su citoplasma podemos encontrar inclusiones lipídicas, las cuales ocupan casi todo el espacio del citoplasma llegando a formar grandes

cordones de inclusiones lipídicas, como se observan en las Figuras E y G.

Los túbulos seminíferos presentan una mejor organización, con una luz central, el epitelio de los túbulos seminíferos se delimita perfectamente, así como la organización de un epitelio plano.

CAMBIOS MORFOMETRICOS

Los datos morfométricos se obtuvieron de estos cortes en Epon, y son los que a continuación se presentan.

Se realizó conteo de puntos de un área determinada ($27892.2\mu\text{m}^2$) para conocer el área ocupada por los túbulos y el intersticio, aún, dentro del intersticio se evaluó el área ocupada por las agrupaciones celulares y por las secreciones lipídicas. Estos datos se observan en la tabla 1, que muestra que existen diferencias en el área (v/v) ocupada por los túbulos seminíferos; ya que en los controles el área ocupada por los túbulos es menor y se observa cómo aumenta ésta significativamente en los lotes experimentales; de la misma forma el área ocupada por el tejido intersticial disminuye paulatinamente conforme aumenta el área ocupada por los túbulos; siendo en $40\mu\text{g. (FSH)}$ el área ocupada por los túbulos y por el intersticio casi igual.

Al realizar la cuantificación del área (v/v) ocupada, dentro

del tejido intersticial por las secreciones lipídicas y por las agrupaciones de células germinales, se observa que el área ocupada por las agrupaciones de células germinales es mayor en controles y ésta disminuye considerablemente con el tratamiento de 1 μ g. y casi es nula en el tratamiento de 40 μ g. (FSH) De la misma forma las secreciones lipídicas muestran un aumento significativo en los lotes experimentales.

Estos valores son visualizados en la gráfica 1.

En los controles podemos observar claramente las agrupaciones de células germinales, en el tejido intersticial y este tejido muy compacto (Fig. A y B), también se observa la presencia de las secreciones lipídicas, y éstas son pequeñas y escasas. Existen pocos cordones y éstos se localizan principalmente en la periferia, son pequeños y poco organizados.

En los pollos tratados con 1 μ g. (FSH), se observan los túbulos seminíferos con una membrana basal que los delimita perfectamente y presentan un epitelio bien definido y más organizado, así como un tejido intersticial más laxo (Fig. C y D). Los túbulos se localizan en todo el testículo formando una red extensa y anastomosada y algunos presentan ya una luz (Fig. G). Las secreciones lipídicas se observan formando cordones.

En los individuos tratados de 40 μ g. (FSH) se observa una organización muy similar a los de 1 μ g. (FSH) a diferencia de que existe una mayor secreción y los cordones lipídicos ocupan un área mayor, así como los túbulos seminíferos (Fig. E, F y H).

Como se mencionó se observó que los cordones del lote control eran más pequeños y aumentaba su tamaño en los tratados, esto se corroboró tomando la medición del diámetro de los túbulos, estos resultados se observan en la tabla 2, la cual muestra que realmente existe un aumento en el diámetro de los cordones con respecto a los controles, siendo estas diferencias significativas. Esto se obtuvo aplicando la prueba estadística de "t" de Student.

Los valores se visualizan en la gráfica 2.

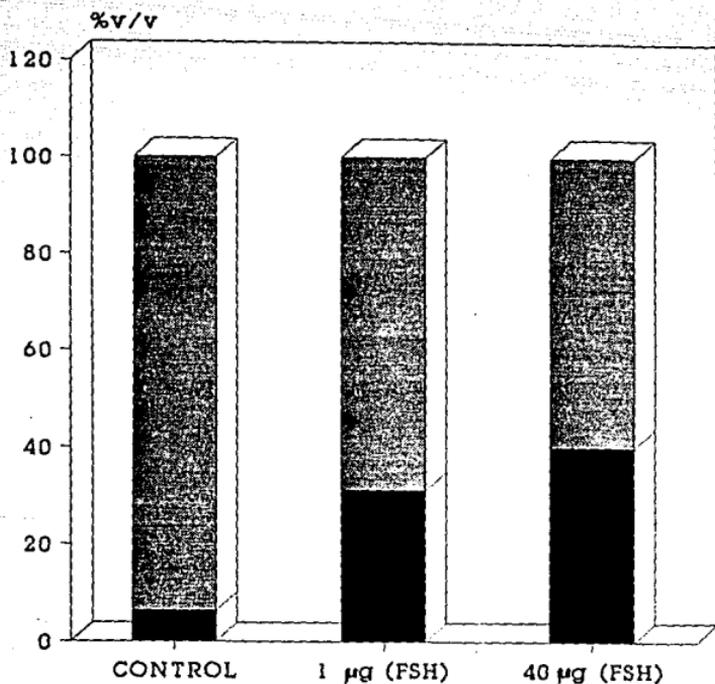
Para conocer si el aumento del diámetro tubular, fue dado por una estimulación de la hormona en el epitelio germinal, ya sea, acelerando su división o causando además de una hiperplasia una hipertrofia de las células del túbulo seminífero, se realizó un conteo y se aplicó la "t" de Student, para conocer la significancia de las diferencias obtenidas. Estos valores se muestran en la tabla 3; muestra que sí existe un aumento en el número de células germinales y de Sertoli; pero fue mayor el aumento de las células de Sertoli con respecto a las células germinales. Estos resultados se visualizan en la gráfica 3.

Tabla 1. Variación en los porcentajes de los componentes del testículo de pollo recién nacido por efecto de la FSH.

TRATAMIENTO	V/V TUBULOS	V/V INTERSTICIO	V/V SECRECIONES LIPÍDICAS	V/V AGRUPACIONES CELULARES
CONTROL n=7	6.25 ± 1	93.70 ± 1	5.36 ± 0.3	28.85 ± 1
1 µg (FSH) n=7	31.22 ± 1 ***	68.70 ± 1 ***	7.07 ± 0.3 **	4.09 ± 0.3 ***
40 µg (FSH) n=7	41.40 ± 2 ***	59.93 ± 2 ***	8.45 ± 1 ***	1.10 ± 0.2 ***

Los valores son expresados como la media ± error estándar en un área = 27892.2 µm².

p=0.001 (***); p=0.01 (**).



■ TUBULOS SEMINIFEROS ■ INTERSTICIO

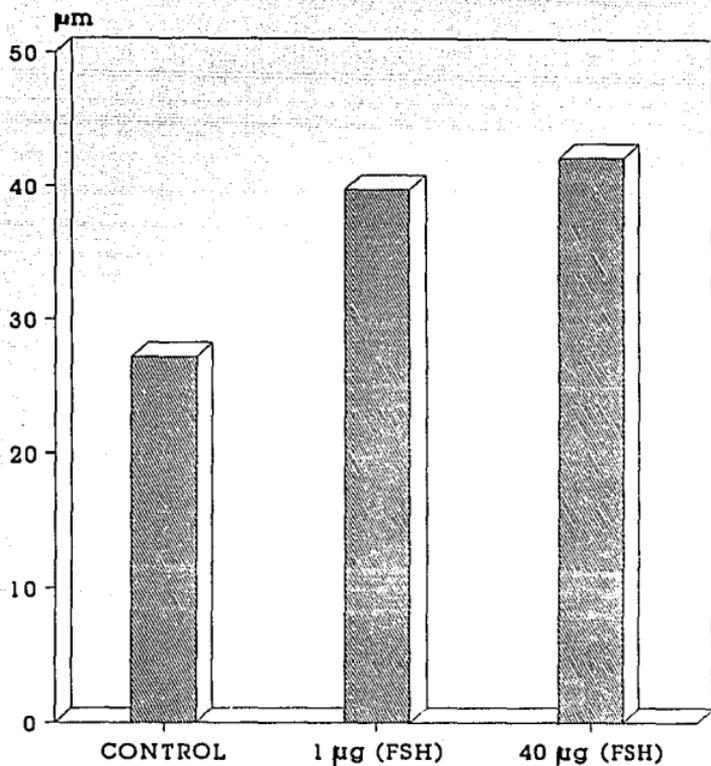
Gráfico 1. Datos morfométricos de los componentes del testículo representando el volumen de intersticio y túbulos en los diferentes tratamientos con FSH.

Tabla 2. Diámetro de los túbulos seminíferos de testículo de pollo recién nacido, tratado con FSH.

TRATAMIENTO	DIAMETRO DEL TUBULO SEMINIFERO (μm)
CONTROL n=7	27.2 \pm 0.88
1 μg (FSH) n=7	39.8 \pm 0.6 ***
40 μg (FSH) n=7	42.2 \pm 1.5 ***

Los valores son expresados como la media \pm error estandar.

p= 0.001 (***)



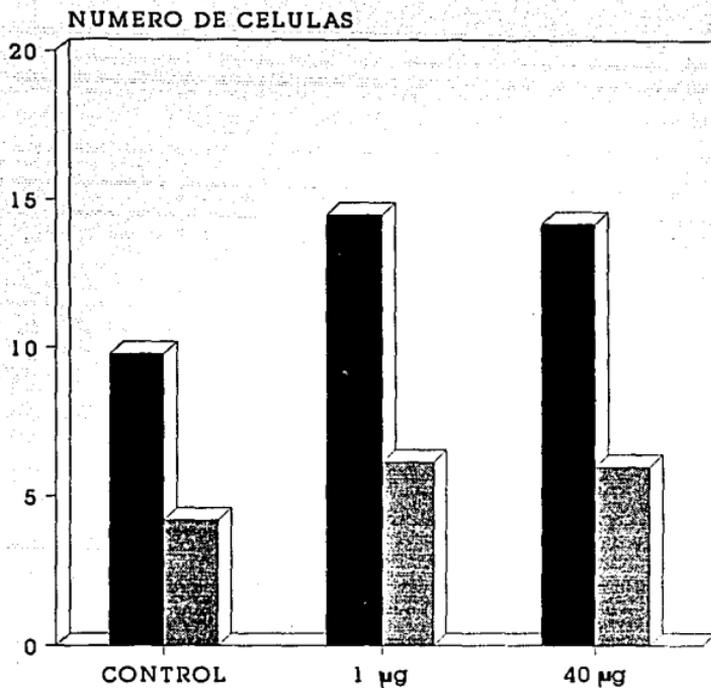
Gráfica 2. Comparación del diámetro de los tubulos seminíferos en los diferentes tratamientos con FSH

Tabla 3. Cuantificación del número de células de Sertoli y células germinales en los túbulos seminíferos del testículo de pollo recién nacido tratado con FSH.

TRATAMIENTO	NÚMERO DE CELULAS DE SERTOLI	NÚMERO DE CELULAS GERMINALES
CONTROL n=7	9.8±0.14	4.2±0.34
1 µg (FSH) n=7	*** 14.5±0.29	*** 6.16±0.16
40 µg (FSH) n=7	*** 14.2±0.8	*** 6.06±0.23

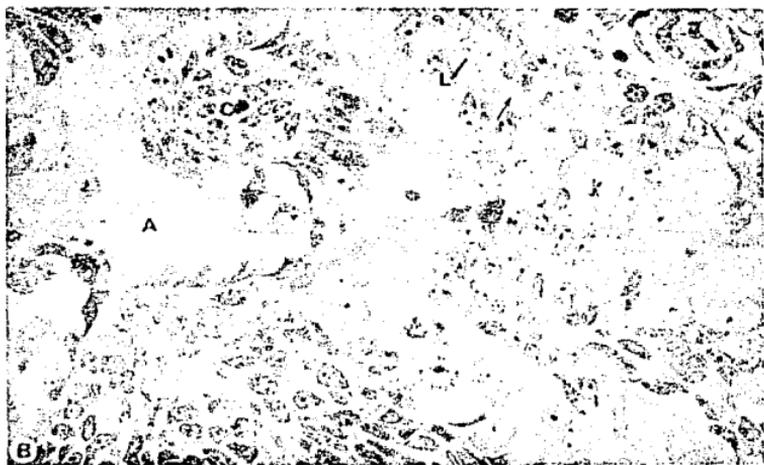
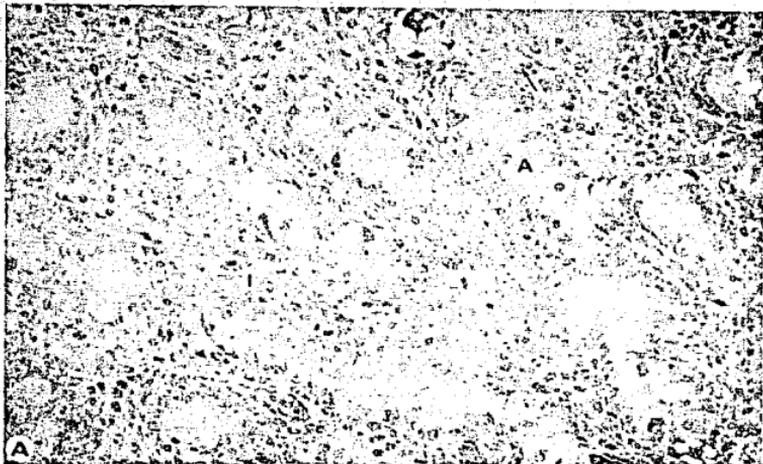
Los valores son expresados como la media ± error estándar.

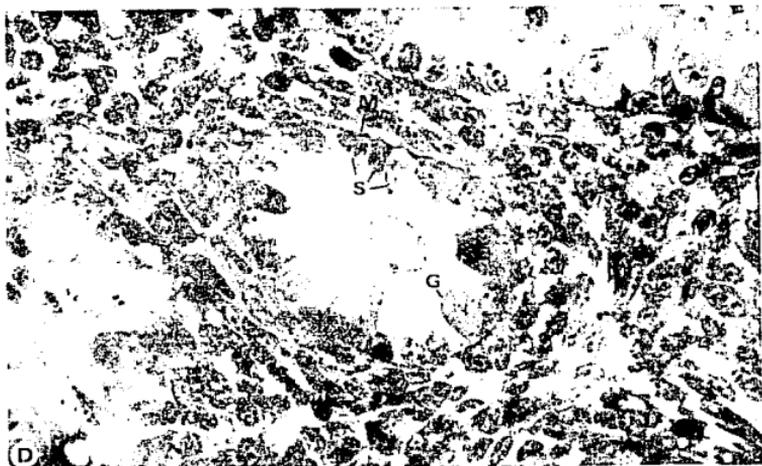
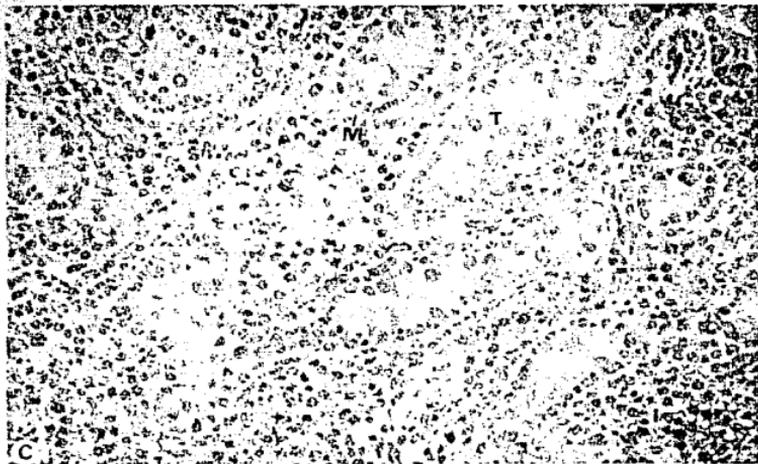
p < 0.001 (***)



CELULAS DE SERTOLI
 CELULAS GERMINALES

Gráfica 3. Comparación gráfica del número de células germinales y células de Sertoli en los tubulos seminíferos del testículo de pollo en los diferentes tratamientos con FSH





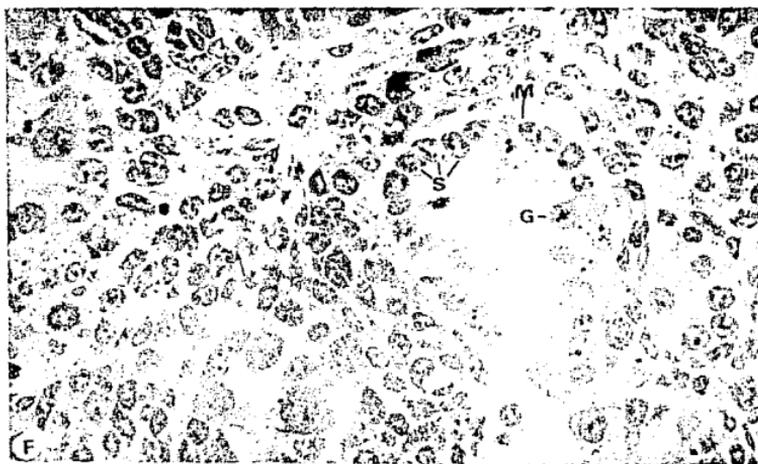
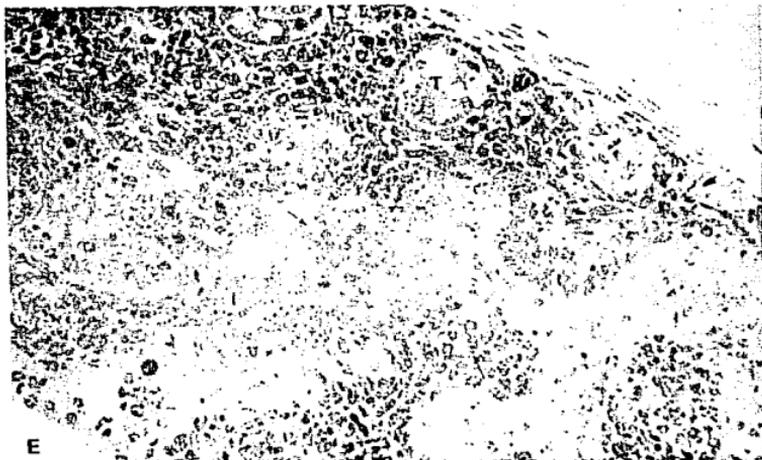


Fig.A Corte longitudinal de testículo Control.

En esta panorámica las agrupaciones de células germinales (A) se encuentran formando redes, entre éstas se localiza el tejido intersticial(I) muy compacto y algunas pequeñas secreciones lipídicas en éste (→) .(320 X).

Fig.B Corte longitudinal de testículo Control.

En este acercamiento se observa que el intersticio presenta las células de Leydig (L) con sus nucleólos y pequeñas inclusiones lipídicas (→). Así como pequeños cordones (C) y agrupaciones de células germinales (A) (800 X).

Fig.C. Corte longitudinal de testículo tratado con 1µg (FSH).

Túbulos seminíferos (T) formando una red, sus células más organizadas y delimitadas por una membrana basal (M), se aprecian cordones lipídicos (→) alrededor de los túbulos. Intersticio más laxo (I). (320 X)

Fig.D. Corte transversal de testículo tratado con 1µg (FSH).

Túbulo seminífero con una membrana basal (M) bien delimitada, formado de un epitelio simple con células germinales(G) y células de Sertoli(S). (800 X).

Fig.E. Corte transversal de testículo tratado con 40µg (FSH).

El área ocupada por el intersticio (I) es menor y éste es más laxo conteniendo una mayor cantidad de cordones lipídicos (→). Los túbulos se observan en todo el testículo (T). (320 X).

Fig.F. Corte longitudinal testículo tratado con 40µg (FSH).

Túbulo seminífero con una mayor organización, la membrana basal bien delimitada (M), se distinguen las células de Sertoli (S) y las células germinales(G). Los cordones de inclusiones lipídicas (→) rodean los túbulos, y se observan las células de Leydig. (800 X).

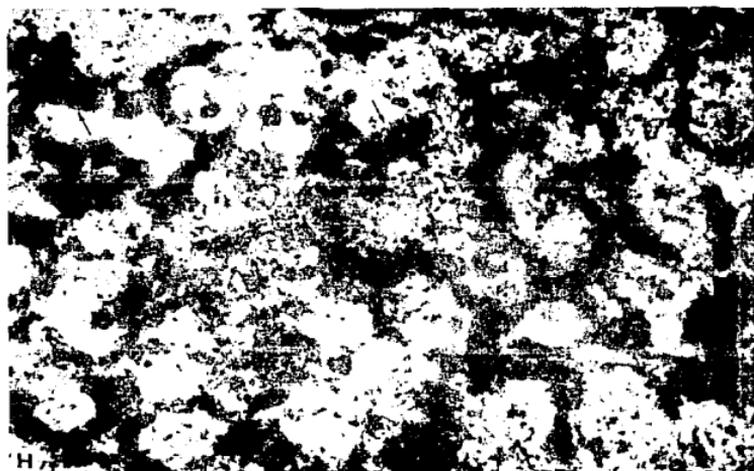
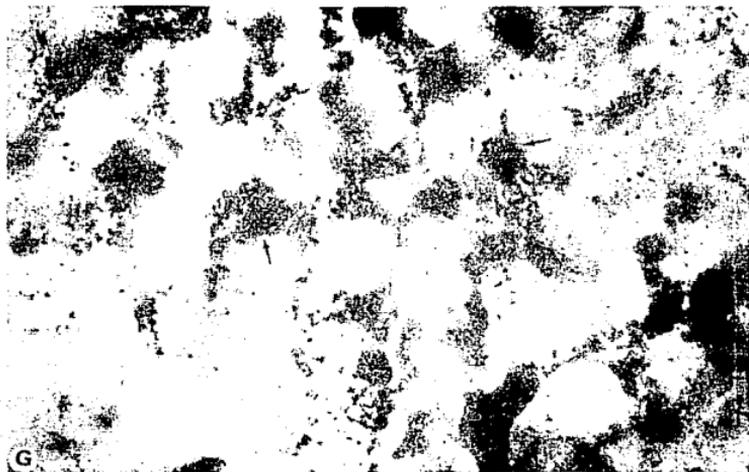


Fig.G. Corte longitudinal de testículo Control.
Se muestran los lípidos que rodean los cordones (→), por la prueba de Rojo Oleoso. (320 X).

Fig. H. Corte longitudinal de testículo tratado.
Se muestran los lípidos que rodean los túbulos seminíferos, éstos se observan formando grandes cordones (→). (320 X).

V: DISCUSION

En el presente trabajo se utilizaron embriones de pollo, debido a que se puede controlar su ambiente interno ya que es un sistema cerrado y no existe intervención materna; se utilizaron las siguientes dosis de hormona Folículo Estimulante (1 μg ; 40 μg) por ser concentraciones fisiológicas previamente determinadas; así mismo, se aplicaron a partir del día 13 de incubación, ya que como menciona Woods (1987) es el día en el cual se activa el eje Hipotálamo-Hipófisis-Testículo.

Se utilizó testículo debido a que no existen trabajos en etapa embrionaria de éste.

En los individuos control los cordones seminíferos no presentan una organización, son pequeños y escasos, no existe una membrana basal como tal que los delimite, así como, las células que los componen están poco diferenciadas (células germinales y células de Sertoli), estas tienden a alinearse en un epitelio espermatogénico, estas observaciones son similares a las descritas por Crawford (1990) y Lake (1971); estos cordones presentan un diámetro mínimo, debido a que las células que los componen apenas se están organizando.

En el caso de los animales tratados se observa que existe un mayor número de tubúlos seminíferos bien organizados, así como un aumento en el número de células germinales y de Sertoli en

relación con los controles; de esto podemos deducir que la hormona Folículo Estimulante está actuando a nivel del túbulo seminífero estimulando su actividad espermatogénica. Tal como lo muestran las investigaciones realizadas por varios autores al realizar hipofisectomía como Brown et al, (1975) quien observó que ésta causaba una disminución del diámetro tubular y un aumento del tejido intersticial, pero al administrar FSH se lograba restablecer la espermatogénesis, aumentando el diámetro tubular.

De igual forma Tanaka y Yashuda (1980) al realizar adenohipofisectomía observaron una clara disminución del diámetro tubular y colapsamiento de estos, aumentando el área ocupada por el tejido intersticial, y mostrando un epitelio germinal simple con células en proceso degenerativo.

Por lo cual se ha demostrado que la FSH induce un aumento del peso testicular y del diámetro tubular por estimulación del epitelio germinal (Brown et al, 1975; Brown y Follet, 1977, Marshall, 1990).

También observamos un incremento del número de células de Sertoli en el túbulo seminífero de los animales tratados, lo cual confirma que las células de Sertoli son el blanco de la FSH, tal como lo muestran Ortavan et al, (1969), Siegel y Siegel, 1962 ; Ishii y Furuya en 1975 encontraron que la administración de FSH induce una hipertrofia de las células de Sertoli y como consecuencia un incremento del diámetro tubular; por otra parte,

Dorrington et al (1976); Kaya y Harrison, (1976); y Hansson et al (1976) encontraron un aumento de las prolongaciones citoplasmáticas.

Estos resultados son similares a los obtenidos en mamíferos por Ortavant et al, 1969; Courot et al, 1971; quienes observaron que la FSH en animales hipofisectomizados restaura la espermatogénesis.

Con el tratamiento aplicado en el presente trabajo, también se obtuvo un aumento en cuanto a las secreciones lipídicas; se sabe que la LH actúa a nivel esteroidogénico aumentando la capacidad secretora de las células de Leydig, (Lofts y Massa, 1980); esto puede ser explicado por el cambio que sufren los túbulos seminíferos, estando más activos y modificando el microambiente de las células, produciendo como respuesta LH por un mecanismo de retroalimentación negativa, actuando en las células de Leydig.

Se observa que la FSH actúa en etapa embrionaria como la acción obtenida en etapa adulta, tanto en aves como en mamíferos.

Estos resultados dejan el campo abierto para futuras investigaciones a nivel de ultraestructura; conocer como cambian estructuralmente las células blanco a la FSH (células de Sertoli) si esta existiendo además de una hiperplasia, una hipertrofia; localizar por inmunohistoquímica los receptores de las células de Sertoli; de igual forma, medir como están variando los

niveles hormonales tanto de hormonas esteroides como de la hormona luteinizante (LH) y de AMPc.

También es necesario hacer un seguimiento de los cambios ocurridos en el adulto al administrar la hormona, para determinar si realmente existe una madurez temprana o de que manera se manifiesta en el adulto.

VI: CONCLUSIONES

De todo lo anterior podemos concluir que, el testículo de pollo recién nacido tratado con Hormona Foliculo Estimulante (FSH):

-Muestra un incremento en el área ocupada por los túbulos seminíferos y por consecuencia disminuye el área ocupada por el tejido intersticial.

-Existe un incremento de secreciones lipídicas en las células de Leydig, llegando a formar cordones esteroideogénicos.

-Existe un aumento del diámetro de los túbulos seminíferos, así como un incremento en el número de células Germinales y de Sertoli.

VII: APENDICE

PREPARACION DE GLUTARALDEHIDO AL 2.5%

- 10 ml de glutaraldehído al 25% (Polysciences, Inc.)
- Aforar a 100 ml. con buffer de Cacodilatos.

PREPARACION DE EPON

- 4.3 ml. Poly/Bed 812 Epon 812 (polímero)*
- 4.3 ml. Dodecenylsuccinic Anhydride (DDSA endurecedor)*
- 1.96 ml. Nadic Methyl Anhydride (NMA plastificador)*
- 0.33 ml. 2,4,6-Tri(Dimethylaminomethyl)phenol (DMP catalizador)*

NOTA: Se agregan los componentes en este orden, y la mezcla debe de moverse constantemente por 4 minutos.

* Polysciences, Inc.

PREPARACION DE BUFFER DE CACODILATOS

- 19.26 g. Acido Cacodílico (Polysciences, Inc.)
- 900 ml. Agua destilada.

NOTA: Se ajusta el pH a 7.2 con HCl y se refrigera.

PREPARACION DE ROJO OLEOSO

- 1 g. de Rojo "O" de aceite (Sigma).
- 25 ml. de butanol (Monterrey, S. A.)
- 75 ml. de etilenglicol (Baker)

PREPARACION DE AZUL DE TOLUIDINA

- 0.5 g. de Azul de Toluidina (Sigma)
- 1.0 g. de Borato de Sodio (Baker)
- 100 ml. de agua destilada.

VIII: BIBLIOGRAFIA CITADA

- Alberts, B. D., D. Bray., J. Lewis., M. Raff., K. Roberts., y J. D. Watson., 1989. *Molecular Biology of The Cell*. Garland. New York. pp. 693-699.
- Balinsky, B. I., 1985. *Introducción a la Embriología*. Omega. Barcelona. pp.43-49; 485-496.
- Barrington, E. J. W. 1977. *Introducción a la Endocrinología general y Comparada*. Cap.7. Blume. Madrid. pp 119-144.
- Breneman, W.R., F.Z. Zeller, y B.E. Breekman (1959). Gonadotrophin assay in chicks. Poultry sci. 38:152.
- Brown, N.L., J.D. Baylé, C.G. Scanes y B.K. Follett (1975) The actions of avian LH and FSH on the testes of hypophysectomized quail. Cell Tissue Res. 156:499.
- Brown, N.L., y B.K. Follet. (1977) Effects of androgens on the testes of intact and hypophysectomized Japanese quail. Gen. Comp. Endocrinol. 33:267.
- C'edard, L., Guichard, A., y K. Haffen. (1970). Métabolisme de la prégnenolone 7α H³ et de la progestérone -4-¹⁴C, par les gonades embryonnaires de Poulet, cultivées "in vitro". C.R. Acad. Sci. Ser. D. 271:1707.

- Crawford, R.D., 1990. *Poultry Breeding and Genetics*. Chap. 3. Elsevier. New York. pp. 61-90.
- Cole, H.H., y Cupps P.T. 1977. *Reproduction in Domestic Animals*. Vol.II. Academic Press. New York. pp. 344-390.
- Connell, C.J., (1972) *The effect of luteinizing hormone on the ultrastructure of the Leydig cell of the chick.* Z.Zellforsch. 128:139.
- Cooksey, E.J., y Rothwell, B., (1973) *The ultrastructure of the Sertoli cell and its differentiation in the domestic fowl. (Gallus domesticus)* J. Anat. 114:329.
- Courot M; R.Ortavant; y M.M. Reviers de, (1971) *Variations du controle gonadotrope du testicule selon l'âge des animaux.* Experimentation animale. 4:201.
- Cowles R.B. 1965. *Hiperthermia, aspermia, mutation rates and evolution.* Quarterly reviews of Biology. 40:341.
- De Krestser, D.M., y H.G. Burger 1972. *Ultrastructural studies of the human Sertoli cell in normal men and males with hypogonadotropic treatment.* En *Gonadotropins* B.B.Saxena, et al., ed. Wiley-Intersci. New York., N.Y.pp. 640-655.

- Dorrington, J.H., I.B. Fritz y D.T. Armstrong. (1976) Site at which FSH regulates estradiol-17 β biosynthesis in Sertoli cell preparations in culture. Mol. Cell. Endocrinol. 6:117.
- Fugo, N.W. (1940) Effects of hypophysectomy in the chick embryo. J. Exp. Zool. 85:271.
- Galli, F.E., y G.F. Wassermann (1972) Steroid biosynthesis by testes and ovaries of 15-day-old chick embryos. Gen. Comp. Endocrinol. 19:509.
- Galli, F.E., y G.F. Wasserman (1973) Steroid biosynthesis by gonads of 7- and 10-day-old chick embryos. Gen. Comp. Endocrinol. 21:77.
- Graber, J.W., A.F. Frankel., y A.V. Nalvandov (1967) Hypothalamic center influencing the release of LH in the Cockerel. Gen. Comp. Endocrinol. 9:187.
- Guichard, A., L. Cedard., Th.-M. Mignot, D. Scheib., y K. Haffen (1977) Radioimmunoassay of steroids produced by cultured chick Embryonic Gonads: Differences according to Age, Sex and Side. Gen. Comp. Endocrinol. 32:255.

Guichard, A., L. Cedard, T.-M. Scheib, D., y K. Haffen (1979) Radioimmunoassay of steroids produced by chick embryo gonads cultured in the presence of some exogenous steroids precursors. Gen. Comp. Endocrinol. 39:9.

Hansson, V., O. Djoseland, O. Torgersen, E.M. Ritzen, F.S. French, y S.N. Nayfeh (1976) Hormones and hormonal target cells in the testis. Andrologia. 8:195.

Herrick, R.B., W.H. McGibson, y W.H. McShan (1962) Gonadotrophic activity of chicken pituitary glands. Endocrinol. 71:487.

Huillon, C., 1977. Embriologia. Omega. Barcelona. p.183.

Ishii, S., y T. Furuya (1975) Effects of purified chicken gonadotropins on the chick testis. Gen. Comp. Endocrinol. 25:1.

Ishii, S., y K. Yamamoto (1976) Demonstration of Follicle Stimulating Hormone (FSH) Activity in Hypophyseal Extracts of various vertebrates by the response of the Sertoli cells of the chick. Gen. Comp. Endocrinol. 29:506.

Kaya, M., y R.G.Harrison (1976) *The ultrastructural relationships between Sertoli cells and spermatogenic cell in the rat.* J. Anat. 121:279.

Kuwana, T., H.Maeda-Suga, y T. Fujimoto (1986) *Attraction of chick primordial germ cells by gonadal anlage in vitro.* Anat. Rec. 215:403.

Kuwana, T., Y. Miyayama, Y. Kajiwara., y T. Fujimoto (1987) *Behavior of chick primordial germ cells moving toward gonadal primordium in vitro: Scanning electron microscopics study.* Anat. Rec. 219:164.

Lake, P.E., y B.J.A. Furr., 1971. *The Endocrine testis in reproduction.* En "Physiology and biochemistry of the domestic fowl". Vol.3 D.J. Bell y B.M.Freeman, ed. Academic Press, London, New York. pp. 1469-1488.

Lake, P.E. 1984. *The Male in Reproduction.* En "Physiology and Biochemistry of the domestic fowl". Vol.5 B.M. Freeman, ed. Academic Press, London. pp. 381-405.

Lofts, B., y A.J. Marshall (1958) *An investigation of the refractory period of reproduction of birds by means of exogenous prolactin and follicle stimulating hormone.* J. Endocrinol. 17:91.1. 17:91.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

Lofts, B., y R.Massa 1980. *Male Reproduction*. En *Avian Endocrinology*. A. Eppele y M.H. Stetson, ed. Academic Press. New York. pp. 413-434.

Marshalls, A.J., 1961. *Biology and Comparative Physiology of Birds*. Vol.II. Academic Press. New York and London. pp 120-213.

Marshall, A.J. 1990. *Physiology of Reproduction*. Vol.2 Academic Press. New York and London . pp. 100-182.

Nagano, T., (1966) *Some observations on the fine structure of the Sertoli cell in the human testis*. Z. Zellforsch. 73:89.

Nakajo, S., y K. Imai. (1956) *Studies on gonadotrophin of the anterior pituitary in domestic fowls. I. Content of gonadotrophin in cocks, laying and non-laying hens*. Japan J. Animal Reprod. 2:41.

Nakajo, S., y K. Imai (1961) *Gonadotrophin content in the cephalic and caudal lobe of the anterior pituitary in laying non-laying and broody hens*. Poultry Sci. 40:739.

Nalvandov, A.V. 1959. In *Comparative Endocrinology*. (A.Gorbman, ed.). J. Wiley and Sons, New York. pp. 524-532.

O 'Riordan J.L. H., P.G. Malan., y R.P. Gould. 1988. *Fundamentos de Endocrinología*. Limusa. México. p. 225.

Ortavant R; M. Courot; y M.M. Reviers de. 1969. *Activités spécifiques des différents FSH et LH sur le testicule des mammifères*. En: *spécificité zoologique des hormone hypophysaires et de leurs activités*. Colloques Internationales CNRS 177:369.

Parker, J.E., 1949. *Fertility and Hatchability of chicken and turkey eggs*. Chapter III, *Fertility in chickens and Turkeys*. John Wiley & Sons, Inc., New York, ed. L.W. Taylor.

Parvinen, M., R. Marana, D.M. Robertson, V. Hansson, y E.M. Ritzen. 1980. *Functional cycle of rat Sertoli cells: Differential binding and action of Follicle Stimulating hormone at various stages of the espermatogenic cycle*. In: *Testicular Development, Structure and Function*. A. Steinberger y Steinberger, eds. Raven Press, New York. pp 425-532.

Pedernera. E., y Y. Gomar (1984) *Onset of the response to chorionic Gonadotropin in the chick Embryo Testis*. Gen. Comp. Endocrinol. 54:344.

Ruiz, D.M.F. 1988. *Fundamentos de Embriología y Fisiología de la Reproducción*. C.U. México. pp. 24-40.

Romanoff, A.L., 1960. *The avian Embryo*. Mcmillan Company, New York.

Scanes, C.G., 1986. *Pituitary Gland*. En *Avian Physiology*. P.D. Sturkie. ed. Springer-Verlag. New York. Tokyo. pp. 383-462.

Siegel, H.S., y P.B. Siegel (1964) *Genetic variation in chick bioassays for gonadotropins. II: Histological and Histochemical response*. Va. J. Sci. 15:204.

Steinberger, A., J.J.Heindel, J.N. Lindsey, J.S.H. Elkingron, B.M. Sanborn, y E.Steinberger (1975) *Isolation and culture of FSH responsive Sertoli cells*. Endocrine Res. Communications. 2:261.

Steinberger, A., y E. Steinberger (1976) *Secretion of an FSH-inhibiting factor by cultured Sertoli cells*. Endocrinology. 99:918.

Stryer, L. 1988. *Bioquímica*. Tomo 2. 3a ed. Reverté s.a. Barcelona. Cap. 38. pp. 981-993.

Sturkie, P.D., 1967. *Fisiología Aviar*. Cap.16 y 17. Acribia. España. pp 411-450.

Tanaka, S., y M.Yasuda (1980) *Histological changes in the testis of the domestic fowl after adenohipophysectomy*. Poultry Sci. 59:1538.

Tanaka, S., y T.Fujioka (1981) *Histological changes in the testis of the domestic fowl after partial adenohipophysectomy*. Poultry Sci. 60:444.

Van Tienhoven, A. 1961. *Endocrinology of reproduction in birds*. Chapter 28. Sex and internal secretions, ed. William C. Young. Vol.IIWilliams & Wikins, Co., Baltimore. pp. 1088-1169.

Vogel, N.W. (1956) *Pituitary-Gonad Relationships in the chick Embryo*. PhD. Dissertation, Indiana University.

Vogel, N.W. (1957) *Free tissue cholesterol and growth in chick embryos hypophysectomized by "decapitation"*. Anat. Rec. 127-382.

Weibel, E.R., G.S. Kistler y W.F. Scheile (1966) *Practical stereological Methods for morphometric cytology*. J. Cell. Biol. 30:23.

Welsch, V., y V. Storch. 1980. Estudio comparado de la citología e histología animal. Cap. 11. Urmo. España. pp 339-350.

Woods, J.E., y R.L. Weeks (1969) Ontogenesis of the pituitary-gonadal axis in the chick embryo. Gen. Comp. Endocrinol. 13:242.

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

Woods, J.E., E.S. Podczaski, L.H. Ertton, J.E. Rutherford, y C.F. McCarter (1977) Establishment of the adenohipophyseal testicular axis in the chick embryo I. Testicular androgen. Gen. Comp. Endocrinol. 32:242.

Woods, J.E., J.E. Rutherford, y R.C. Thomes (1983b) Functional development of the hypothalamic-adenohipophyseal - testicular (HAT) axis in the chick embryo. Gen. Comp. Endocrinol. 50:235.

Woods, J.E., y R.V. Thommes (1984) Ontogeny of hipotalamo-Adenohipophyseal-gonadal (HAG) interrelationships in the chick embryo. J. Exp. Zool. 232:435.

Woods, J.E., W.E.Hopkins., J.Caliendo., M.J.Sorrentino., J.B.Martens y R.C. Thommes 1985. *Ontogenesis of LHRH in the hypothalamus and LH and FSH in the pars distalis of the chick embryo*. In: *Current Trends in Comparative Endocrinology*. B.Lofts y W.K.Holmes, ed. Hong Kong University Press, Hong Kong, pp 131-134.

Woods, J.E: (1987) *Maturation of the Hypothalamo-Adenohypophyseal-Gonadal (HAG) Axes in the chick Embryo*. J. Exp. Zool. Suppl. 1:265.

Zuckerman, S., y T.G. Baker (1977) In "*The ovary*" C.S. Zuckerman y B.J. Weir, (eds)., 2nd ed., Vol.1, p. 41 Academic Press, New York.pp.41.