

1409
2ej.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

"EFECTO DE GONADOTROPINAS SOBRE LA
DIVISION CELULAR EN CULTIVOS PRIMARIOS
DE OVARIO 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 :

IRMA PERALTA DELGADO



MEXICO, D. F.



1994

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

SECRETARÍA DE EDUCACIÓN
PÚBLICA



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

TESIS DE LICENCIATURA:

"EFECTO DE GONADOTROPINAS SOBRE LA DIVISION CELULAR EN CULTIVOS
PRIMARIOS DE OVARIO DE EMBRIONES DE POLLO"

DIRECTOR Y ASESOR DE TESIS: DR. PEDRO NICOLAS VELAZQUEZ

ALUMNA: IRMA PERALTA DELGADO

CIUDAD UNIVERSITARIA



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS
División de Estudios
Profesionales
Exp. Núm. 55

M. EN C. VIRGINIA ABRIN BATULE
Jefe de la División de Estudios Profesionales
Universidad Nacional Autónoma de México.
P r e s e n t e .

Por medio de la presente, nos permitimos informar a Usted, que habiendo
revisado el trabajo de tesis que realizó la pasante Peralta
Delgado Irma
con número de cuenta 8308009-2 con el título: Efecto de gonadotropinas sobre la división celular en cultivos
primarios de ovario de embriones de pollo

Consideramos que reúne los méritos necesarios para que pueda conti-
nuar el trámite de su Examen Profesional para obtener el título de -
Bióloga

GRADO NOMBRE Y APELLIDOS COMPLETOS

FIRMA

<u>Dr. Pedro Nicolás Velázquez</u>	<u>[Firma]</u>
<u>Director de Tesis</u>	
<u>Dra. Marcela Esperanza Arullar Morales</u>	<u>[Firma]</u>
<u>Biol. Julio Prieto Sagredo</u>	<u>[Firma]</u>
<u>M. en C. Patricia Rivas Manzano</u>	<u>[Firma]</u>
<u>Suplente</u>	
<u>M. en C. Sergio Corona García</u>	<u>[Firma]</u>
<u>Suplente</u>	

RECONOCIMIENTO

Este trabajo de tesis se realizó en el Departamento de Biología Celular y Tisular de la Facultad de Medicina de la U.N.A.M. bajo la dirección del Dr. Pedro Nicolás Velázquez.

AGRADECIMIENTOS

Gracias a la vida por concederme el milagro de existir, por brindarme la oportunidad de reír, llorar, amar, odiar, observar y gozar de personas y lugares maravillosos, gente y cosas que hasta ahora me han ayudado a seguir adelante y a reconocer lo conveniente o no de este mundo. Gracias por dejarme hacer y recoger lo que he sembrado, así como del tener la enorme dicha de tenerte aquí.

Agradezco a mis padres, hermanas y hermanos, a Dayna, Pao, Héctor, y Dani que me han apoyado con su cariño.

A mi mamá Carmen Delgado por ayudarme con su apoyo y a quien gracias a su gran esfuerzo he llegado hasta aquí.

A Pedro N.V., por compartir parte de mi vida, por ser mi amigo y maestro, y quien espero sepa que gran parte de este trabajo fué hecho por la confianza, paciencia, perseverancia y cariño que mostró conmigo, espero que sigamos aprendiendo el uno del otro, y que nuestra amistad cada día se consolide más.

Gracias a mis amigas y amigos, Andrea Navarro, Leti, Andrea Cerecero, a todo el grupo de Ciencias del Mar (Isabel, Carmen, Mauri, Angeles, David) a Alejandro, Misael, Vic, Arturo, Yolanda Gomez, Anita, Elma y otros que he tenido el agrado de conocer.

En memoria de Rosendo y Fernando grandes amigos
de mi infancia, a quienes el destino trunco su
maravillosa existencia.

CONTENIDO

RESUMEN 1 - 2

INTRODUCCION 3 - 26

GENERALIDADES

EL OVARIO DE AVES Y MAMIFEROS

DIFERENCIAS ENTRE EL OVARIO DE AVES Y MAMIFEROS

ESTRUCTURA, REGULACION Y FUNCION DE LAS GONADOTROPINAS

BIOSINTESIS DE HORMONAS ESTEROIDES EN EL DESARROLLO GONADAL

RECEPTORES PARA HORMONAS FSH Y LH

FACTORES DE CRECIMIENTO

REGULACION HORMONAL DE LA PROLIFERACION CELULAR EN EL

OVARIO

OBJETIVOS E HIPOTESIS 27

MATERIALES Y METODOS 28 - 34

RESULTADOS 35 - 43

DISCUSION 44 - 46

CONCLUSIONES 47 - 48

APENDICE 49

BIBLIOGRAFIA 50 - 56

RESUMEN

En el ovario de los vertebrados se sintetizan hormonas que participan en diversos procesos relacionados con el desarrollo y la conducta sexual; un grupo importante de estas hormonas lo constituyen las hormonas esteroides cuya síntesis se encuentra regulada por la acción de dos hormonas hipofisiarias: la Hormona Folículo Estimulante (FSH) y la Hormona Luteinizante (LH); la primera como su nombre lo indica, estimula el desarrollo y crecimiento folicular, mientras que la LH, causa la ruptura del folículo con la consecuente liberación del ovocito maduro.

En el ovario de las aves estas hormonas actúan en diferentes tipos celulares promoviendo diversas funciones metabólicas, se sabe que la LH estimula la esteroidogénesis, mientras que la FSH se encarga de activar las enzimas relacionadas con la aromatización de andrógenos. Por otra parte, la acción de estas hormonas sobre el crecimiento y proliferación celular no ha sido bien establecido, aunque se sabe que en este proceso además del estímulo hormonal también intervienen algunos factores de crecimiento que regulan la división celular. El propósito del presente trabajo fué evaluar el efecto de las hormonas hCG, FSH y 17β -estradiol en la división celular del ovario prefolicular de aves. Para cumplir este objetivo se utilizaron ovarios de embriones de pollo de 18 días de incubación que se disociaron enzimáticamente obteniéndose una población mixta ovárica y a través de dos gradientes de metrizamida se obtuvieron cuatro subpoblaciones celulares F2, F4, F5 y F6, las cuales al igual que la población mixta se sembraron

en membranas de policarbonato y fueron cultivadas con medio mínimo esencial modificado por Dulbecco (DMEM) y adicionando FSH, hCG o Estradiol de acuerdo al grupo experimental de que se trató , además a todos los grupos se les agregó 0.1 μ Ci de ³H-timidina para cuantificar su incorporación. Los cultivos se incubaron durante 60 horas a 37°C en una atmósfera de 95% de aire y 5% de CO₂

Se lograron establecer cultivos primarios de células ováricas sin ser necesaria la adición de suero bovino fetal o factores de crecimiento. En la población mixta se observaron células esteroideogénicas, ovocitos primarios, cordones de células indiferenciadas y fibroblastos; la fracción F2 sólo contuvo células con características esteroideogénicas típicas, la F4 ovocitos primarios y las fracciones F5 y F6 presentaron células pregranulosas, somáticas indiferenciadas y fibroblastos. Por otra parte, la incorporación de timidina de cultivos primarios de población mixta ovárica tratados con FSH mostraron un aumento estadísticamente significativo en la incorporación de timidina tritiada con respecto a los grupos control y los tratados con hCG y 17 β -estradiol. Las subpoblaciones que respondieron al estímulo de FSH fueron la F5 y la F6, mientras que la F2 y F4 no respondieron al estímulo hormonal.

Con el empleo de este modelo se demostró que la FSH incrementa significativamente la síntesis de DNA en cultivos primarios de células ováricas y más específicamente en las células indiferenciadas, pregranulosas y somáticas indiferenciadas que constituyen la fracción F6.

INTRODUCCION

Generalidades

Los ovarios son glándulas mixtas, que se encuentran rodeadas por un epitelio germinativo y en los cuales pueden diferenciarse dos regiones: la región cortical y la región medular. En la corteza, que constituye la mayor parte del ovario, se encuentran los folículos preovulatorios considerados como la unidad reproductora de este órgano, están formados por un ovocito de aproximadamente 25 μm de diámetro rodeado por una capa de células granulosas, la membrana basal, la teca interna y la teca externa. El resto de la gónada lo conforman vasos sanguíneos, fibras musculares, nervios y tejido conjuntivo (Knobil y Neill, 1988). (Fig.1). En este órgano se producen hormonas sexuales que participan en diversos procesos relacionados con la aparición de los caracteres primarios y secundarios, la conducta sexual y la preparación del útero para el momento del parto entre otros.

Dentro de las hormonas ováricas se encuentran las esteroides, que incluyen andrógenos, estrógenos y progestágenos; estas hormonas intervienen en la diferenciación sexual y la conducta reproductiva de los vertebrados. Los estrógenos además de participar en los procesos antes mencionados, aumentan la capacidad de coagulación sanguínea y modulan el control de la función del músculo liso.

Además de las hormonas esteroides, también se sintetizan relaxina y prostaglandinas; la relaxina es secretada por el cuerpo lúteo (Anderson, 1973) y es la encargada de relajar los ligamentos pélvicos, cervix y musculatura vaginal; inhibe movimientos

uterinos espontáneos y junto a los estrógenos y la progesterona, estimula el crecimiento uterino (Bone, 1988.; Anderson y Long, 1978). Por otra parte, las prostaglandinas intervienen en la contracción del músculo liso del útero . y del tracto gastrointestinal, aumentan la depuración de sal y agua por el riñon y aumentan la función tiroidea en mamíferos (Brobeck,1982).

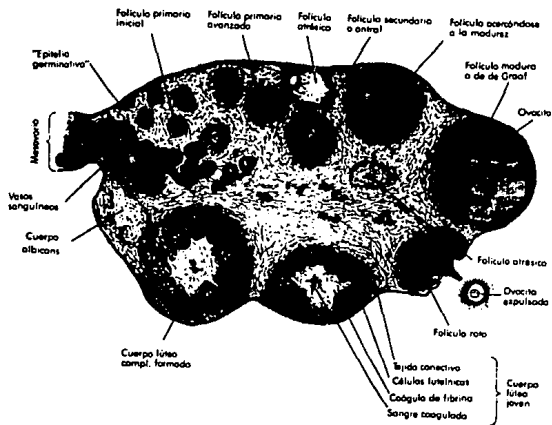


Fig. 1. Esquema del ovario de mamíferos, en que se observan folículos en diferentes estadios de desarrollo, cuerpo amarillo y la atresia folicular (Tomado de Ross y cols., 1992).

EL OVARIO DE AVES Y MAMIFEROS

AVES

El ovario de embriones de aves de 18 días de incubación se encuentra rodeado por un epitelio germinativo, inmediatamente por debajo del mismo en la región cortical se observan acúmulos de ovocitos primarios rodeados de tejido intersticial, mientras que en la porción medular entre los conductos lacunares y los vasos sanguíneos, se encuentran células con abundantes inclusiones lipídicas secretoras de andrógenos, células somáticas indiferenciadas y células pregranulosas. (Fig. 2).

Durante las primeras etapas del desarrollo en las aves ambos ovarios son funcionales, pero a partir del noveno día de incubación, el ovario derecho comienza a involucionar hasta que deja de ser funcional en el nacimiento (Teng, 1979), mientras que el ovario izquierdo continua su diferenciación hasta constituir un ovario funcional (Jones, 1978). Hasta ahora los factores que producen esta involución no han sido claramente establecidos, en las primeras investigaciones se creyó que la degeneración del ovario derecho se debía a factores no esteroideogénicos producidos por el ovario izquierdo (Witschi, 1935), a una composición genética diferente y variaciones en las poblaciones de células (Hamilton, 1963) y a la migración desigual de las células germinales primordiales hacia el lado izquierdo durante el desarrollo embrionario (Gardner y cols., 1964). Se ha observado que la respuesta de ambos ovarios al ser estimulados con hormonas de tipo luteinizante como la Gonadotropina Coriónica humana (hCG), es

similar en ambas gónadas hasta el doceavo día de incubación, dicha respuesta comienza a decrecer en el ovario derecho a partir del día 15 llegando a ser aproximadamente del 50% (Teng, 1979).

Por otra parte, aunque en la mayoría de especies de aves el ovario derecho es el que degenera, existen algunas excepciones como las familias Accipitrinae, Falconinae, Bufoinae y Cathartidae, en las que los dos ovarios son funcionales, pero el desarrollo del oviducto es unilateral (Stanley y Witschi, 1940; Lofts y Murton, 1973).

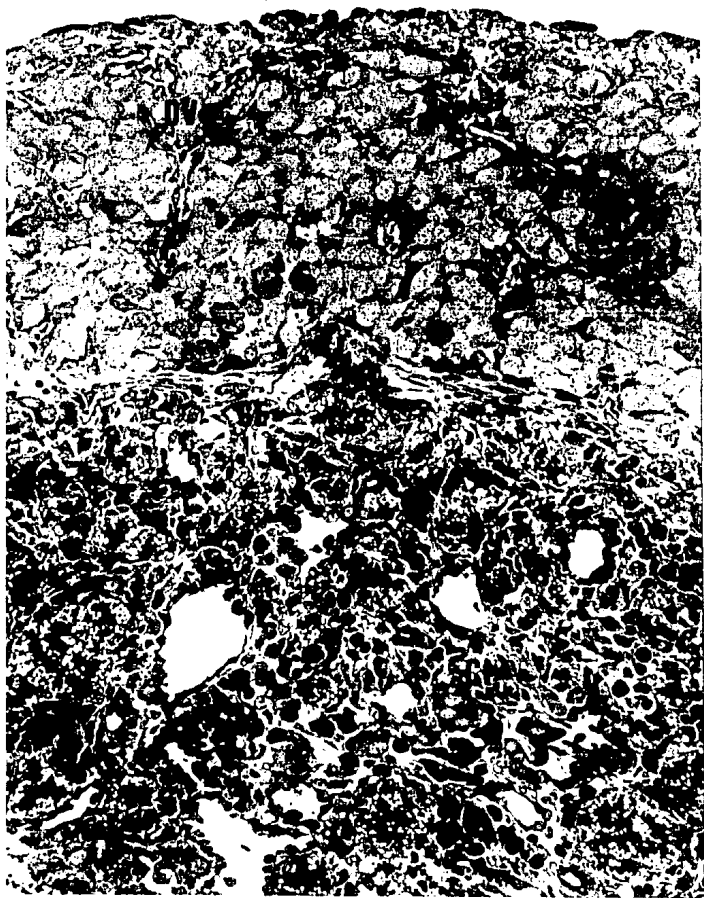


Fig.2. Corte semifino de un ovario prefolicular de aves de 18 días de incubación que muestra la disposición de los nidos de ovocitos en la zona cortical(OV) y la presencia en la porción medular de células con características esteroideogénicas típicas (CE) y cordones celulares de aspecto indiferenciado (CI) localizados entre los conductos lacunares y vasos sanguíneos.

MAMIFEROS

En mamíferos ocurre algo distinto, en la mayoría los dos ovarios son funcionales, pero existen pocas especies que sólo presentan un ovario funcional (Tabla 1).

<u>Ornithorhynchus</u> <u>anatinus</u>	ovario izquierdo funcional
--	----------------------------

MURCIELAGOS

<u>Miniopterus</u> <u>schreibersi</u>	ovario izquierdo funcional
---------------------------------------	----------------------------

<u>Rhinolophus</u> sp.	ovario derecho funcional
------------------------	--------------------------

<u>Tadarida</u> <u>cyanophala</u>	ovario derecho funcional
-----------------------------------	--------------------------

<u>Molossus</u> <u>ater</u>	ovario derecho funcional
-----------------------------	--------------------------

<u>Lagidium</u> <u>peruanum</u>	ovario derecho funcional (pero si es extraído, el izquierdo recupera su función)
---------------------------------	--

Tabla 1. Especies de mamíferos con un ovario funcional (Tienhoven, 1983).

DIFERENCIAS ENTRE EL OVARIO DE AVES Y MAMIFEROS

El ovario de ambas clases de vertebrados presenta un patrón morfológico muy parecido, epitelio germinativo y folículos en diferentes estadios de desarrollo entre otros, pero existen diferencias funcionales importantes que deben mencionarse, después de la salida del ovocito, en mamíferos se forma el cuerpo lúteo en el cual se produce progesterona, mientras que en aves no se forma esta estructura. Sin embargo se ha demostrado que la capa granulosa del folículo postovulatorio de las aves incrementa su actividad secretora de progesterona aunque no se tiene una explicación funcional de este fenómeno, ya que esta actividad sólo se mantiene por pocas horas (Shahabi y cols., 1975; Armstrong y cols., 1977; Dick y cols., 1978; Huang y Nalvandov, 1979 a y b; Hammond y cols., 1980; Tojo y cols., 1982).

Otra diferencia importante es que la síntesis de hormonas esteroideas se lleva a cabo en diferentes capas celulares de los folículos ováricos de aves y mamíferos; en aves la capa de células granulosa que rodea al ovocito produce progesterona y carece de actividad de aromatasa, la teca interna sintetiza testosterona y la externa estrógenos, principalmente 17β -estradiol. (Babette y cols., 1983; Huang y cols., 1979a).

En mamíferos la capa granulosa aromatiza andrógenos para producir 17β -estradiol (Armstrong y cols., 1981; Channing y cols., 1980; Hillier y cols., 1981; Leung y Armstrong, 1980) y en la teca folicular se sintetizan andrógenos y estrógenos.

ESTRUCTURA, REGULACION Y FUNCION DE LAS GONADOTROPINAS

La hormona luteinizante (LH) y la hormona folículo estimulante (FSH) sintetizadas en la hipófisis, la gonadotropina coriónica humana (hCG) producida por la placenta y la hormona estimuladora de la tiroides (TSH), constituyen un grupo de hormonas glucoproteicas que poseen dos cadenas peptídicas muy similares (β y α) ricas en enlaces disulfuro (Pierce, 1981), la subunidad α es común a las cuatro hormonas (Tager y Steiner, 1974), mientras que la subunidad β varía en cada una (Pierce et al., 1976; Pierce and Parsons, 1981), esta última tiene una gran importancia biológica, ya que participa en el reconocimiento de receptores específicos en las células del ovario (Woods, 1991., Lich, y cols. 1977).

La síntesis y secreción de gonadotropinas esta regulada por factores externos (luz, temperatura) y factores internos (metabolismo, alimentación) (Warren, 1983), que influyen a su vez sobre el sistema nervioso central a través de sustancias neurohumorales transportadas a la hipófisis por el sistema hipotalámico-adenohipofisiario (Goodman y Gilman. 1978). Estas sustancias denominadas hormonas de liberación o factores de liberación, participan en la síntesis y liberación de hormonas adenohipofisarias (Schally y cols. 1978). (Fig. 3).

Dentro de los factores de liberación se encuentra la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) la cual ha sido purificada e identificada; este factor es un decapeptido que tiene la secuencia de aminoácidos piroGlu-His-Trip-Ser-Tir-Gli-Leu-Arg-Pro-Gli-NH² y se encarga de regular la producción de hormonas gonadotropas,

que a su vez regulan diferentes funciones en el ovario, la FSH estimula el crecimiento y la maduración de los folículos, mientras que la LH causa la ruptura del folículo.

Además de participar en las funciones antes mencionadas, las gonadotropinas tienen un papel importante en la regulación de diversos procesos (Tabla 2) como la producción de AMPc a través del estímulo de la adenil-ciclasa (Hsueh y cols. 1984), también regulan la producción de andrógenos en las células tecaes del ovario de mamíferos y en la teca interna del ovario de las aves, así como en las células de Leydig del testículo (Dorrington, 1993); la FSH interviene en la aromatización de andrógenos (Dorrington, 1978; Dorrington, 1979).

Por otra parte, las concentraciones de ambas hormonas varían durante la ovulación en aves y en mamíferos. En el ciclo menstrual de la especie humana, la LH alcanza niveles máximos antes de la ovulación y causa la producción de 17β -estradiol acompañado de la liberación de progesterona. La mayor parte de la progesterona es producida por el ovario en respuesta al estímulo de la LH, cabe mencionar que pequeñas cantidades de progesterona son sintetizadas por la glándula adrenal (Tanabe y cols. 1979); los niveles de FSH al igual que los de LH alcanzan un pico máximo antes de la ovulación. Estas variaciones en los niveles de ambas hormonas producen cambios en la estructura y bioquímica de algunas células, es así que bajo la influencia de cantidades basales de FSH y LH, las células granulosa del folículo de mamíferos secretan estrógenos, principalmente 17β -estradiol, pero después del rompimiento del folículo y la consecuente liberación del ovocito,

las células granulosas proliferan y sufren cambios estructurales y metabólicos que tienen como resultado la formación del cuerpo lúteo, el cual secreta grandes cantidades de progesterona y 17 β -estradiol (Pierce, 1988).

En aves al igual que en mamíferos las concentraciones de LH y FSH varían durante el ciclo ovárico, el pico de LH puede detectarse de 4 a 6 horas antes de la ovulación en gallinas (Wilson y Sharp, 1973; Furr y cols., 1973; Lague y cols., 1975) y este generalmente coincide con el de progesterona (Marshaly y cols., 1976), los niveles máximos de FSH se encuentran a las 14 horas antes de la ovulación (Imai y Nalbandov, 1971).

GONADOTROPINA CORIONICA HUMANA

La hCG es una hormona secretada por la placenta aproximadamente de los 8 a los 11 días después de la fecundación en humanos (Catt y cols., 1975). Se desconoce la función biológica precisa de esta hormona y su efecto sobre el embarazo, pero se sabe que estimula la producción de progesterona por el cuerpo lúteo (Norman y Litwack, 1987). Esta gonadotropina tiene un peso molecular de 37 000 y esta formada como ya se mencionó por las subunidades α y β las cuales presentan homologías estructurales importantes con las subunidades presentes en la LH, esto nos proporciona una base química para explicar el efecto luteinizante similar de ambas hormonas en el ovario.

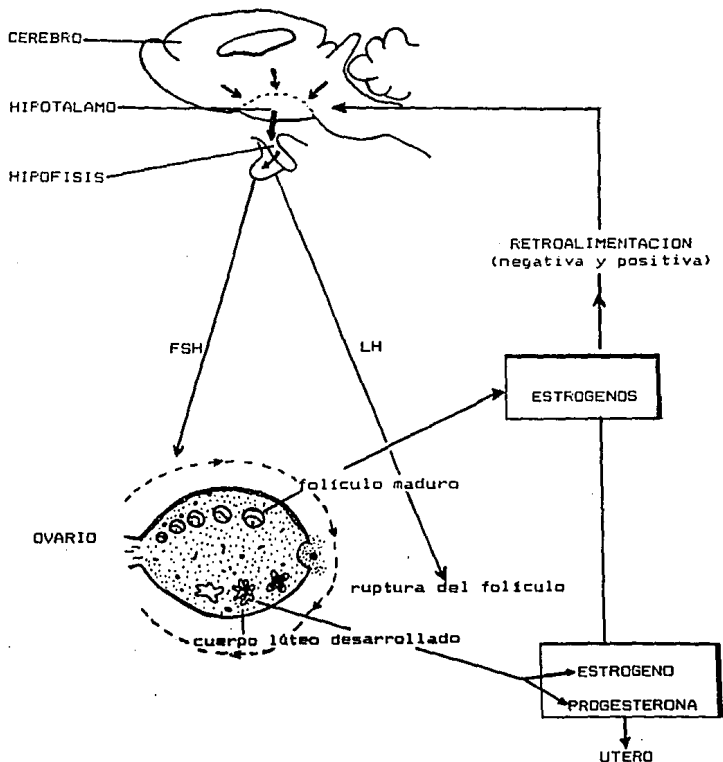


Fig.3. Diagrama del control que ejercen las hormonas folículo estimulante (FSH) y luteinizante (LH) en el ciclo ovárico (Fink, 1988).

Procesos estimulados por la FSH

1. Maduración gonadal
2. Aumento en la esteroidogénesis
 - a. biosíntesis de estrógenos
activación del sistema enzimático de aromatasas
 - b. biosíntesis de progesterona
3. Secreción de productos no esteroideos
 - a. inhibina
 - b. prostaglandinas
 - c. algunos mucopolisacáridos
4. Estimulación de funciones en general
 - a. síntesis de ADN
 - b. síntesis de proteínas
 - c. activación de la adenil-ciclase y formación de AMPc

Procesos regulados por la LH

1. Maduración gonadal
2. Aumento en la esteroidogénesis
 - a. biosíntesis de andrógenos
 - b. biosíntesis de progesterona
3. Secreción de productos no esteroideos
 - a. relaxina
 - b. prostaglandinas
 - c. mucopolisacáridos
4. Estimulación de funciones celulares en general
 - a. producción de AMP cíclico

Tabla 2. Funciones en las que intervienen la FSH y la LH (Hsueh E. y cols. 1984).

BIOSINTESIS DE HORMONAS ESTEROIDES EN EL DESARROLLO
GONADAL

Debido a la estrecha relación de las hormonas esteroides con la conducta reproductiva de los vertebrados, es importante conocer las etapas del desarrollo embrionario en que empiezan a sintetizarse estas hormonas.

En etapas tempranas del desarrollo embrionario en aves y mamíferos la secreción de hormonas esteroides se encuentra regulada por las gonadotropinas hipofisiarias, principalmente por la FSH a partir de los 13 días de desarrollo en embriones de pollo (Woods y Erton, 1978; Woods y cols.1981; Woods y cols., 1991; Terada y cols., 1984). En las primeras etapas del desarrollo, el ovario no es el único productor de hormonas esteroides, las glándulas suprarrenales también participan en la síntesis de estas hormonas (Tanabe y cols, 1979), aunque en estado adulto el ovario constituye el principal productor de esteroides. Las células involucradas en los procesos esteroidogénicos son las células intersticiales, tecaes y granulosas del folículo ovárico (Gilbert, 1979). Todos estos tipos celulares son estimulados por las gonadotropinas; la LH y la hCG promueven la secreción de testosterona y estradiol (Teng,1977), este último ya es sintetizado en las primeras fases del desarrollo (5 y 7 días de incubación) (Weniger 1968, 1971); la FSH en cambio actúa sobre el sistema de aromatasas induciendo la transformación de andrógenos a hormonas estrogénicas. La LH en células granulosas de aves incrementa la síntesis de progesterona y se ha establecido que

facilita la conversión del colesterol (principal precursor de esteroides) a pregnenolona que posteriormente puede ser convertida a progesterona o a 17 α -hidroxipregnenolona (Armstrong, 1968., Channing, 1980., Wells y cols., 1981) dependiendo de la ruta metabólica de que se trate (Fig. 4); mientras que la FSH regula la transformación de andrógenos aromatizables a estrógenos, fenómeno conocido como aromatización en el cual participa la aromatasa P450 scc. Las enzimas involucradas en la síntesis de testosterona y estrógenos (reductasas y deshidrogenasas) se incrementan progresivamente en el desarrollo testicular y ovárico respectivamente (Guichard y cols. 1973). Una de estas enzimas es la 3 β -hidroxi-esteroide deshidrogenasa (3 β -HSD) cuya actividad esta presente en diferentes estadios del desarrollo gonadal, primero en los cordones medulares de la gónada indiferenciada y después de la diferenciación sexual, en los cordones y las células intersticiales de embriones de pollo (Haffen. 1970). La 3 β -HSD interviene en la transformación de pregnenolona a progesterona en la vía 4-ene-3-oxo.

Vía 5-ene-3 β -hidroxi

Vía 4-ene-3-oxo

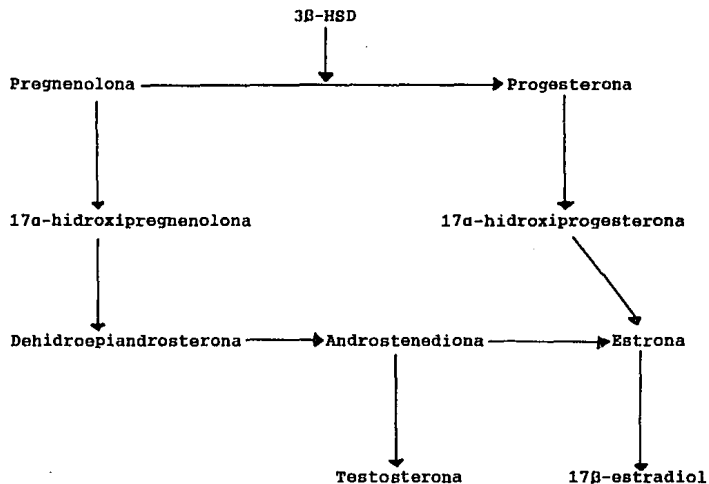


Fig. 4. Biosíntesis y metabolismo de estrógenos y andrógenos (Tomado de Comunicación Neuroendócrina, Sociedad Mexicana de Ciencias Fisiológicas, pag. 37, 1993).

RECEPTORES PARA FSH Y LH

" La capacidad de las células para comunicarse entre ellas es de vital importancia para que su desarrollo, división, organización y crecimiento se lleven a cabo en armonía " (Alberts, 1989).

La comunicación celular se ha clasificado en tres tipos: 1) en la que participan sustancias que actúan como señales químicas para las células situadas a cierta distancia; 2) en donde se presentan moléculas de señalización unidas a la membrana plasmática, que influyen sobre las células con las que establecen contacto físico directo, 3) y por último, las uniones comunicantes o gap que permiten el paso de pequeñas moléculas de una célula a otra (Alberts, 1989).

La comunicación endocrina se caracteriza por la producción y liberación de hormonas al torrente sanguíneo, dichas hormonas actúan sobre órganos blanco (órganos diana) generalmente lejanos al lugar donde se produjo la hormona, por lo cual la transmisión del mensaje químico depende de la difusión y circulación sanguínea. Sin embargo en ocasiones la hormona secretada actúa sobre las mismas células que la producen (regulación autócrina) o ejerce su acción sobre células adyacentes (regulación paracrina), en ambos tipos de secreción, la formación del complejo hormona-receptor dura poco tiempo. (Fig. 5).

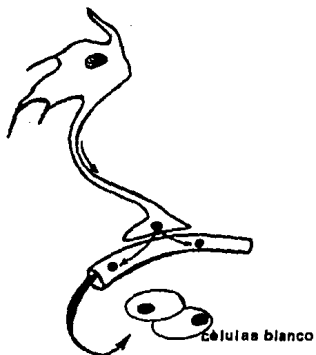
Para que se lleve a cabo la comunicación endocrina es indispensable la presencia de receptores de membrana o

citoplasmáticos en las células blanco, dependiendo de la naturaleza química de la hormona (esteroide o proteica).

En la membrana plasmática de las células ováricas se ha demostrado la presencia de receptores para gonadotropinas y TSH (Woods, 1991); durante el desarrollo gonadal temprano en aves, los receptores para estas hormonas carecen de especificidad para reconocer cada tipo de hormona, al parecer, a medida que las células maduran van adquiriendo una alta afinidad para unirse a cada hormona, es decir, pasan de un estado no específico a un estado específico (Csaba, 1980, 1981).

Se ha demostrado que de los 6.5 a los 11.5 días de incubación, los receptores de las células ováricas de embriones de pollo, se unen indistintamente a la FSH y TSH, a partir del día 12, los receptores se unen específicamente a la FSH (Woods y cols. 1991). Tanto los receptores para FSH como para TSH están presentes en el ovario de embriones de pollo a partir de los 6.5 a los 11.5 días de incubación en los cordones medulares, y del día 12.5 al 19.5 en los cordones corticales (Woods, 1991).

La localización de receptores para gonadotropinas varía de acuerdo a la maduración gonadal y al tipo celular ovárico de que se trate, es así que los receptores para FSH se han localizado en las células granulosas de los folículos preovulatorios pequeños F6 y F5 disminuyendo a medida que el folículo madura (Dorrington, 1979; Terada, 1984; Ritzhaup, 1987; Camp y cols., 1991), mientras que las células tecaes de folículos preovulatorios de mayor tamaño F2 y F1 así como las células granulosas poseen receptores para LH (Dorrington H.J., 1979; Peng, y cols. 1991).



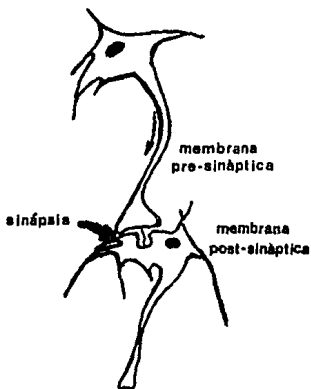
NEUROENDOCRINA



ENDOCRINA



PARACRINA AUTOCRINA



NEUROTRANSMISOR

Fig. 5. Esquema de los diferentes tipos de comunicación neuroendócrina entre las células (tomado de Yen, 1991).

FACTORES DE CRECIMIENTO

La proliferación y diferenciación celular son procesos biológicos regulados por factores que actúan estimulando o inhibiendo ambos fenómenos. Con la aparición de nuevas técnicas bioquímicas y de biología molecular se han identificado diversos factores en distintas fases del desarrollo embrionario y en procesos de regeneración y remodelación tisular (Zentella, 1993).

El efecto de estos factores se lleva a cabo al establecerse la unión de estos con un receptor específico en la membrana celular, con lo cual el mensaje bioquímico se transmite al interior de la célula desencadenándose una serie de mecanismos intracelulares que influyen en la regulación de la proliferación celular.

Por otra parte, debido a las diferencias observadas en la actividad de estas moléculas sobre la proliferación celular se han clasificado estas, en factores promotores e inhibidores. Dentro de los factores que promueven la proliferación se encuentran los de competencia y los de progresión. Los primeros son capaces de estimular a las células para que pasen de un estado de reposo (G_0)

a un estado activo (G_1) en el ciclo celular, aunque el estímulo producido por estos no es el necesario para completar el ciclo celular, por lo que necesitan del estímulo de factores de progresión que actúan en la fase tardía de G_1 continuando hasta la

división celular; los factores de competencia comprenden al factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), al factor de crecimiento epidérmico (EGF) y al factor de crecimiento fibroblástico (FGF); la insulina y el factor de crecimiento

insulínico tipo I (IGF-I) constituyen a los factores de progresión descubiertos hasta ahora.

FACTORES DE CRECIMIENTO QUE FAVORECEN LA PROLIFERACION

FACTOR DE CRECIMIENTO EPIDERMICO (EGF)

Este factor fué originalmente aislado de glándula submaxilar de ratón y se ha observado que actua en diferentes tipos celulares estimulando o inhibiendo la proliferación dependiendo del tipo celular de que se trate. Este factor y el TGF- α compiten por el mismo receptor e inducen la fosforilación de la tirosina.

FACTOR DE CRECIMIENTO DERIVADO DE PLAQUETAS (PDGF)

El PDGF es una proteína de 30,000-Da caracterizada en el humano por la presencia de dos subunidades A y B unidas por puentes disulfuro, este factor estimula la proliferación y la quimiotaxis, y provoca un incremento en la tasa metabólica de células de origen mesenquimatoso

FACTOR DE CRECIMIENTO FIBROBLASTICO (FGF)

Existen dos tipos de FGF, uno ácido y otro básico; al primero también se le conoce como HBGF-1 y pertenece a la familia de factores de crecimiento unidos a la heparina en la cual también esta incluido el FGF básico (HBGF-2) que es un potente inductor de la síntesis de DNA en varios tipos de células diploides de origen mesodérmico y neuroectodérmico en mamíferos, así como de líneas celulares establecidas.

El factor de crecimiento fibroblástico básico o HBGF-2 es estructuralmente similar al FGF ácido pero difieren en la función que desempeñan; por ejemplo, mientras que la heparina aumenta la actividad mitogénica del FGF ácido, esta, no aumenta la misma actividad en el FGF básico.

INSULINA

La insulina es una hormona que además de intervenir en el metabolismo de carbohidratos, lípidos, nucleótidos y aminoácidos se ha demostrado que estimula la proliferación celular en células granulosa porcinas, bovinas y humanas, aunque su acción mitogénica es mediada por otros factores como el IGF-I e IGF-II (Zentella. 1993; Bley y cols. 1992).

INTERLEUCINA-II (IL-II)

Es un péptido de 14,500 kDa producido in vivo por mitógenos o por antígenos activados de linfocitos T. Estimula la diferenciación y proliferación de estos, así como la diferenciación de linfocitos granulares.

Es importante mencionar que la acción de los diferentes factores de crecimiento se da a través de las diferentes etapas del ciclo celular.

Por otra parte, los factores que inhiben la proliferación generalmente actúan reduciendo la expresión de genes promotores del ciclo celular como el c-myc por ejemplo y la activación de la proteína RB que frena el ciclo celular. Los factores que se ha encontrado tienen efectos antiproliferativos son:

FACTOR DE CRECIMIENTO TRANSFORMANTE β (TGF- β)

El TGF- β constituye una familia de cinco moléculas relacionadas estructuralmente (desde el TGF- β_1 hasta el β_5). Todos estos factores participan en diversos procesos como el crecimiento, diferenciación y morfogénesis en cultivos celulares y en organismos desde insectos hasta mamíferos, además tienen una acción inhibitoria en la proliferación de células epiteliales y tumorales, y estimuladora en el crecimiento de varios tipos celulares fibroblásticos. Se ha observado que bloquean la expresión de algunos proto-oncogenes relacionados con la proliferación celular y pueden aumentar la expresión de otros proto-oncogenes. Las células mesenquimatosas y epiteliales estimuladas por el TGF- β aumentan la expresión de fibronectina, varios tipos de colágena y otras proteínas celulares de adhesión.

FACTOR DE NECROSIS TUMORAL α (TNF- α)

El TNF- α es una citocina de 17,000Da secretada por macrófagos en respuesta a varios agentes.

INTERLEUCINA Interleucina-I (IL-I)

Esta interleucina es un polipéptido de 17,000 Da que interviene en gran variedad de respuestas fisiológicas, estimula la proliferación de timocitos a través de la liberación de IL-II, además de la maduración y proliferación de células B.

REGULACION HORMONAL DE LA PROLIFERACION EN CELULAS DEL OVARIO

En el ovario de los vertebrados como ya mencionamos, las hormonas gonadotropas FSH y LH regulan los diferentes procesos de secreción y maduración que se llevan a cabo en este órgano. Los mecanismos desencadenados por la acción de estas hormonas que tienen como finalidad la regulación de la maduración estructural del ovario, así como la secreción de hormonas ya se han descubierto, aunque faltan aun procesos por comprender.

En los últimos años el descubrimiento de moléculas que regulan la diferenciación y proliferación celular ha logrado responder algunas interrogantes al respecto. Se ha demostrado que la FSH junto con algunas hormonas esteroides, como el 17β -estradiol y algunos factores de crecimiento como el TGF- β se encargan de regular la proliferación celular en el ovario, particularmente en las células granulosas de mamíferos, el estradiol estimula la síntesis de DNA in vivo, mientras que el TGF- β estimula la síntesis de DNA in vitro; la respuesta de ambos compuestos es aumentada por la FSH; con lo cual se propone que en estas células existe una estrecha relación entre el estradiol que participa en la producción de TGF- β y la FSH con lo cual se desencadena la respuesta mitogénica en estas células (Bendell y Dorrington, 1991).

OBJETIVO

Los objetivos del presente trabajo fueron:

- a) Determinar el efecto de la Hormona Folículo Estimulante (FSH), la Gonadotropina Coriónica humana (hCG) y el 17 β -estradiol sobre la división celular en cultivos primarios de ovarios de embriones de pollo de 18 días de incubación.
- b) Determinar el efecto proliferativo que las hormonas antes mencionadas producen en cada una de las subpoblaciones celulares que constituyen el ovario prefolicular de embriones de pollo de 18 días de incubación.

HIPOTESIS

Si la FSH, la hCG y el 17 β -estradiol tienen efecto sobre la proliferación de las células ováricas, entonces dicho efecto podrá ser valorado cuantificando la timidina incorporada en la población mixta ovárica y en las subpoblaciones obtenidas por un gradiente de densidad.

MATERIALES Y METODOS

MATERIAL BIOLÓGICO

Embriones de pollo de 18 días de incubación proporcionados por la granja avícola de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la U.N.A.M.

REACTIVOS

Acido acético concentrado (Merck, México, S.A.)
Acido tricloro acético (Merck, México, S.A.)
Albumina sérica bovina (SIGMA, St. Louis, USA No. Cat. A-7888)
Azul tripano (SIGMA, St. Louis, USA No. Cat. T 0776)
Bicarbonato de sodio NaHCO_3 (J.T. Baker S.A. de C.V. México)
Cloruro de potasio KCl (Merck, México, S.A.)
Cloruro de sodio NaCl (Merck, México, S.A.)
Hormona folículo estimulante (Serono de México, S.A. de C.V.)
Gonadotropina coriónica humana (SIGMA, St. Louis, USA No. Cat. CG-2).
Inhibidor de tripsina (SIGMA, St. Louis, USA No. Cat. T-9128)
Líquido de centelleo (AQUASOL-2 NEN Research Products, Boston No. Cat. NEF-952) Massachusetts No. Cat. NEF-952)
Metrizamida (SIGMA St. Louis, USA. No. Cat. M-3383)
Suero bovino fetal (Microlab, México)
Timidina tritiada (ICN No. Cat. 24070)
Tripsina (GIBCO, Grand Island, N.Y. USA)
DMEM (GIBCO No. de cat. 430-1600EB)

CULTIVOS PRIMARIOS DE CELULAS OVARICAS

Se utilizaron aproximadamente 48 ovarios izquierdos de embriones de pollo de 18 días de incubación para cada experimento, los cuales se obtuvieron en condiciones estériles en una campana de flujo laminar. Los ovarios se colocaron en una caja de Petri con solución salina balanceada libre de Ca^{++} y Mg^{++} (SSB) y se lavaron dos veces en esta misma solución para eliminar residuos de sangre, posteriormente se colocaron en un matraz Erlenmeyer con tripsina (2.5 mg/ml disuelta en SSB) para disociarlos durante 20 minutos a 37 °C en agitación constante, después de este tiempo, los ovarios se resuspendieron hasta obtener una población mixta ovárica totalmente disgregada a la cual se le agregó un volumen equivalente de inhibidor de tripsina (5 mg/ml) disuelto en DMEM (Medio Mínimo Esencial modificado por Dulbecco) + BSA (Albúmina Sérica Bovina), la suspensión celular obtenida se filtró con una malla de nylon, para eliminar el tejido no disociado, así como la mayor parte del tejido conjuntivo presente. Posteriormente las células se centrifugaron en un tubo cónico de 50 ml. a 1000 r.p.m. durante 10 minutos, eliminándose el sobrenadante. El botón celular obtenido, se resuspendió en DMEM, centrifugando nuevamente a la misma velocidad por el mismo tiempo dos veces más. Después de centrifugar, el botón celular se resuspendió en 1.5 ml. de medio de cultivo y parte de éste se tomó como población mixta, mientras que el resto de la suspensión celular se sembró en un gradiente de metrizamida 0-20% (SIGMA Chemical, Co.) centrifugando a 3200

r.p.m. durante 20 minutos obteniéndose las bandas F2, F4, F5 y F6. A las bandas obtenidas se les dieron dos lavados con medio de cultivo para eliminar la metrizamida. A las bandas F2 y F5 así como a la población mixta se les determinó la viabilidad celular por la técnica de exclusión del azul tripano (Tennant, 1964). Las bandas restantes F4 y F6 fueron sembradas en un segundo gradiente de metrizamida centrifugando a 3200 r.p.m. durante 20 min. Obtenidas ya purificadas estas bandas se determinó la viabilidad celular por la técnica antes mencionada. A los grupos experimentales se les adicionaron dosis específicas de hormonas y se organizaron de la siguiente manera:

POBLACION MIXTA	SUBPOBLACIONES CELULARES
1) DMEM + BSA (grupo control)	1) F2 CONTROL FSH (0.5 UI/ml)
2) DMEM + BSA + FSH (0.5 UI/ml)	2) F4 " " " "
3) DMEM + BSA + hCG (0.5 UI/ml)	3) F5 " " " "
4) DMEM + BSA + FSH + hCG	4) F6 " " " "
5) DMEM + BSA + ESTRADIOL -8 (2 X 10 ⁻⁸ M)	5) F6 " " hCG (0.5 UI/ml)

Después de determinar la viabilidad, todos los grupos se incubaron durante 60 horas a 37°C en una atmósfera de 95% de aire y 5% de CO₂ en presencia de 0.1 µCi de H-timidina.³

Para cuantificar la incorporación de timidina tritiada se utilizó la siguiente técnica:²

TECNICA DE COSECHA PARA MEDIR LA INCORPORACION DE ³H-TIMIDINA EN
CULTIVOS PRIMARIOS DE OVARIO DE EMBRIONES DE POLLO DE 18 DIAS DE
INCUBACION

- 1) Se eliminó el medio de cultivo con una micropipeta hasta donde fué posible, sin mover el botón celular.
- 2) Se agregó sobre la membrana nucleopore 2 ml. de fijador (metanol- ácido acético 3:1) durante 15 minutos.
- 3) Se retiró el fijador y se agregaron 2 ml. de ácido tricloro acético (TCA) frio al 10 % y se incubaron las células a 4°C durante una hora sin mover .
- 4) Se eliminó cuidadosamente el TCA.
- 5) Se pasó la membrana nucleopore con el botón celular a un vial agregándose 400 µl. de duodecil-sulfato de sodio (SDS) al 2% y se incubaron durante 30 minutos a 60°C.
- 7) Se agregaron 5 ml. de líquido de centelleo y se contaron.

Por otra parte se elaboró una curva dosis-respuesta para FSH con una población mixta de células ováricas, para la cual se sembraron

⁶
1 x 10 células sobre membranas nucleopore (Nucleopore Corporation No. Cat. 110410) colocadas sobre 2 ml de DMEM en cajas de petri (NUNC LON 35 x 10 mm) utilizando las dosis de FSH señaladas en la siguiente tabla:

GRUPO	DOSIS FSH	GRUPO	DOSIS FSH
basal	0.0		
1	0.00024 UI/ml	7	0.0.0156 UI/ml
2	0.00048 UI/ml	8	0.03125 UI/ml
3	0.00097 UI/ml	9	0.0625 UI/ml
4	0.0019 UI/ml	10	0.125 UI/ml
5	0.0039 UI/ml	11	0.25 UI/ml
6	0.0078 UI/ML	12	0.5 UI/ML

A los datos obtenidos de población mixta y subpoblaciones ováricas se les realizó un análisis de varianza y posteriormente una prueba estadística de Duncan y Tukey con una $p < 0.001$

MICROSCOPIA

Para determinar los tipos celulares presentes en poblaciones ováricas en cultivo, se utilizaron técnicas de microscopía de luz y de microscopía electrónica de transmisión.

TECNICA GENERAL DE MICROSCOPIA ELECTRONICA

FIJACION

Después de obtener el tejido ya disociado o en cultivo, se fija durante 48 horas con glutaraldehído en amortiguador de fosfatos 0.15 M a pH 7.4 por un lapso de 1.15 horas. Posteriormente se lava con amortiguador de cacodilatos 0.15 M a pH 7.4, dando tres cambios de 15 minutos cada uno y el tejido permanece en el tercer cambio.

POST-FIJACION U OSMIFICACION

Se hace con tetraóxido de osmio al 1% en buffer de fosfatos 0.2 M a un pH 7.4 durante 1 a 2 horas.

DESHIDRATAACION

Se hace con alcoholes graduales en las siguientes concentraciones:

50% a 4°C

70% a 4°C dos cambios sin tiempo, se elimina por decantación

80% a 4°C 1 cambio de 10 minutos

95% a 4°C 2 cambios de 10 min. cada uno.

100% a 4 °C el primer cambio, el segundo y tercero a temperatura

ambiente. Cada cambio es de 15 minutos.

INFILTRACION

Se utilizan 21 ml de resina epóxica Poly/Bed 812 más 11 ml de DDSA y 13 ml. NMA

La mezcla se agita durante 20 minutos. Posteriormente se mezclan 10 ml. de resina con 0.10 ml. de acelerador DMP-30.

POLIMERIZACION

En cápsulas de gelatina o cápsulas Beem de polietileno se coloca una tarjeta para identificar las características de la muestra, después una gota de resina; posteriormente se coloca el tejido y se orienta de manera que quede centrado, después se llena cuidadosamente la cápsula con más resina. Las cápsulas se dejan en el horno a 60 °C durante 24 horas.

CORTE

Para la elaboración de cuchillas se utilizaron barras de vidrio LKB, de 7 mm. de grosor lavadas y libres de polvo y grasa. Los cortes se realizaron con ultramicrotomo manual Porter-Blum, MT-1. Los cortes semifinos de entre 190 - 240 nm de espesor se utilizaron para microscopía de luz, mientras que los cortes finos de entre 60 - 90 nm. se contrastaron con acetato de uranilo para posteriormente observarse en el microscopio electrónico de transmisión (Zeiss, EM-109).

RESULTADOS

MORFOLOGIA

Población mixta

En cultivos primarios de población mixta ovárica, se observaron cordones epiteliales de células indiferenciadas que presentan uniones celulares tipo desmosoma, pequeñas colonias de ovocitos primarios y acúmulos de células esteroidogénicas en las que se observan inclusiones lipídicas a bajos aumentos, mientras que a microscopía electrónica de transmisión se logra caracterizar esta población por la presencia de mitocondrias con crestas tubulares y un retículo endoplásmico liso bien desarrollado, también se logró determinar que estas células a las 60 hrs. de cultivo característicamente presentan uniones de tipo comunicante.

Además de los tipos celulares anteriormente mencionados se encontraron células pregranulosas que típicamente presentan recubrimientos de membrana (lining-bodies), mitocondrias con crestas tubulares y escasas inclusiones lipídicas (Fig.7)

Subpoblaciones

A través de gradientes de densidad se obtuvieron cuatro fracciones celulares la F2 constituida por células con características esteroidogénicas típicas (inclusiones lipídicas, mitocondrias con crestas tubulares y retículo endoplásmico liso bien desarrollado) (Fig. 8), la F4 presenta ovocitos primarios (Fig. 9) y en las fracciones F5 y F6 se observaron células pregranulosas, células

somáticas indiferenciadas y fibroblastos (Fig. 10).

CURVA PATRON PARA FSH

Los resultados obtenidos de la curva-dosis respuesta para FSH mostraron que la dosis efectiva 50 (DE₅₀) se encuentra entre las 0.03 y 0.06 UI de FSH (fig. 11).

3 CUANTIFICACION DE H-TIMIDINA INCORPORADA

POBLACION MIXTA

Nuestros resultados mostraron que en población mixta, los grupos tratados con hCG y 17 β -estradiol no presentan diferencias significativas con respecto grupo control, mientras que la FSH produjo un incremento estadísticamente significativo en la incorporación de ³H-Timidina. En la mezcla de gonadotropinas no se encontraron diferencias con los grupos tratados únicamente con FSH (fig. 12).

Con respecto a las subpoblaciones ováricas, la F2 y la F4 no responden al estímulo de la FSH; la F5 eleva su incorporación de ³H-timidina significativamente con respecto al basal, mientras que la fracción 6, es la que muestra un aumento considerable en la incorporación de timidina tritiada. La F6 al igual que la población mixta no respondió al estímulo de la hCG (fig. 13).

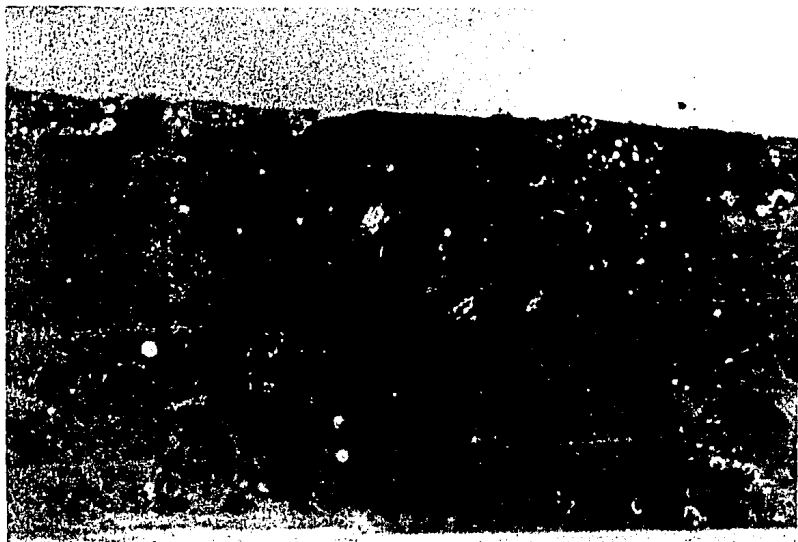


Fig. 7. Cultivo celular de una población mixta ovárica (antes de pasar por el gradiente de densidad), se observan cordones epiteliales de células indiferenciadas y pequeños acúmulos de células con inclusiones lipídicas (CL) y ovocitos primarios (OV) X 1400.



Fig. 8. Electromicrografía de cordones de células esteroidogénicas típicas (CE), caracterizadas por la presencia de mitocondrias con crestas tubulares (M), abundantes lípidos (L) y unionss celulares de tipo comunicante (UC). X 30,000,

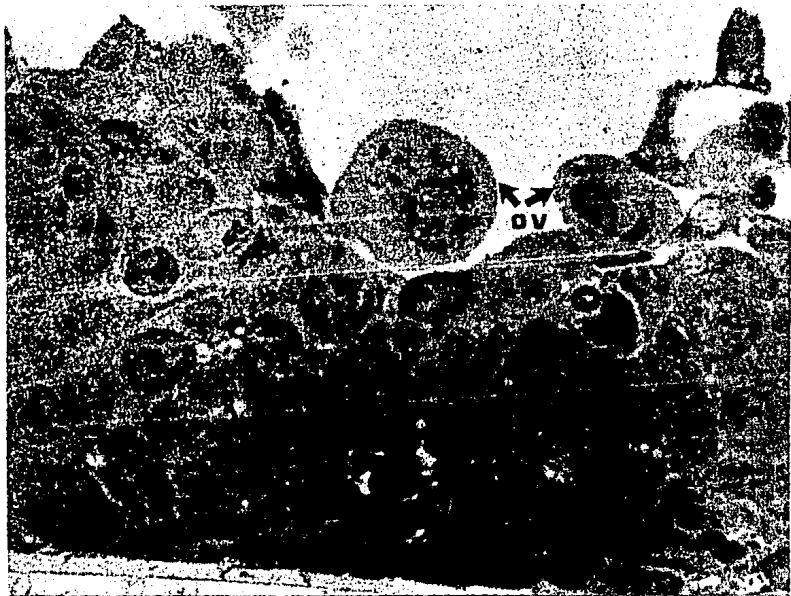


Fig. 9. Cultivo de células ováricas obtenido por un gradiente de metrizamida perteneciente a la F4, pueden observarse células germinales X 1400.

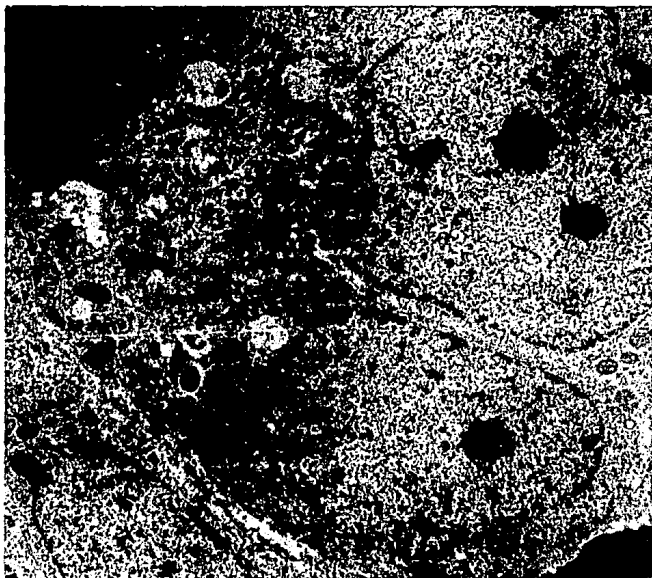


Fig.10. Ultraestructura de los cordones de células indiferenciadas (CI), que corresponde a la fracción de mayor densidad (1,070 g/ml) F6. Se observan entre las células uniones desmosómicas (UD) que las caracterizan. X 24,000.

POBLACION MIXTA
OVARIO 18D (CURVA PATRON)

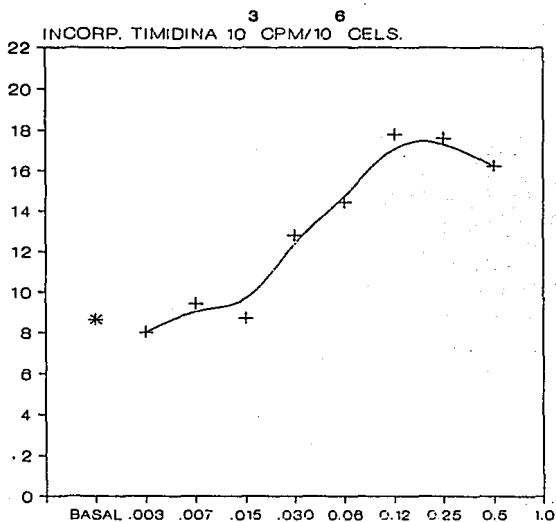


Figura 11. La curva dosis-respuesta para FSH muestra en orden creciente las ocho dosis de FSH a las que fueron expuestos los cultivos de población mixta ovárica. La dosis efectiva (DE₅₀) se encuentra entre 0.03 y 0.06 UI/ml. de FSH.

EFFECTO DE GONADOTROPINAS Y ESTROGENOS
POBLACION MIXTA (OVARIO 18 DIAS)

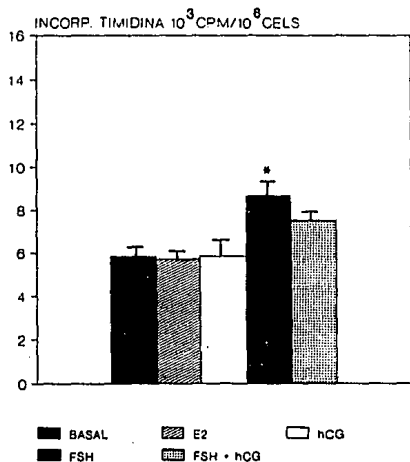


Figura 12. Incorporación de 3 H-Timidina (c.p.m.x 10^3) del grupo control y los grupos experimentales de población mixta ovárica tratados con 17β -estradiol(E2), hCG, FSH y ambas gonadotropinas.

INCORPORACION DE TIMIDINA
SUBPOBLACIONES CELULARES (OVARIO 18 D)

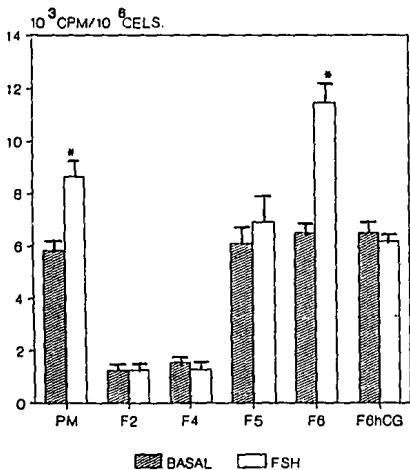


Figura 13. Incorporación de ³H-Timidina (c.p.m. x 10³) de las fracciones ováricas F2, F4, F5 y F6, controles y expuestas a FSH. La F5 y F6 respondieron al estímulo hormonal, mientras que la F2 y F4 no respondieron a la FSH.

DISCUSION

Se ha demostrado que la FSH "in vitro" en el ovario participa en el metabolismo de hormonas esteroides activando el sistema enzimático de aromatasas en las células granulosas de folículos preovulatorios de mamíferos, obteniéndose un aumento en la secreción de 17β -estradiol, (Dorrington y cols. 1975., Moon y cols. 1975.; Erickson y Hsueh, 1978) mientras que la LH actúa sobre las células tecales induciendo la producción de andrógenos. Además de su efecto sobre la actividad de las aromatasas, la FSH participa en la regulación de la división celular en las células granulosas in vitro (Ryle, 1969 a y b; Barañao, 1991); en este proceso se cree que además de la FSH participan factores de crecimiento como el TGF- β , IGF y los estrógenos. Esta hipótesis concuerda con la necesidad de algunos factores de crecimiento para la progresión de la fase G1 del ciclo celular a la fase S en la que el material genético se duplica para después dividirse en la mitosis (Pledger, 1985). Un hecho interesante es que al parecer los factores de crecimiento requeridos para inducir la división celular en células granulosas de ovarios humanos, bovinos, porcinos y de cobayos son diferentes de los requeridos para estimular las mismas células en ratas (Gospdarowicz y Bialecki, 1979; Savion y cols. 1981).

En nuestro modelo experimental utilizando una población mixta ovárica demostramos que la FSH efectivamente participa en la proliferación de células ováricas incrementando significativamente

3

la incorporación de H-timidina con respecto a los grupos sin

estimulo hormonal y los estimulados con hCG y estradiol. Con respecto a las subpoblaciones obtenidas a través de un gradiente de densidad, la respuesta al estímulo de la FSH sólo fué observado en las fracciones F5 y F6, siendo esta última la fracción que más respondió al estímulo de la FSH.

Estudios previos en nuestro laboratorio han demostrado que la fracción F2 que no responde al estímulo con FSH, presenta características esteroidogénicas típicas, es secretora de andrógenos y presenta una alta actividad de 3β -HSD y de P-450 C17 (Pedernera y cols. 1988; Alvarez-Fernández y cols. 1992). Por otra parte, las células de las fracciones F5 y F6 que presentan características de células somáticas indiferenciadas son productoras de estrógenos, muestran actividad de 17β -HSD, de 5β -reductasa y de P450 aromatasas; es importante mencionar que aún no se ha determinado si una misma célula presenta las actividades enzimáticas antes mencionadas o si en la F6 se encuentran subpoblaciones celulares con actividades enzimáticas diferentes. Debido a la presencia de actividad aromatasas y la secreción de 17β -estradiol por la F6, creemos que en esta subpoblación se encuentran las células que dan origen a las granulosa y a las células de la teca externa.

Por otra parte, la fracción constituida por ovocitos primarios (F4) tampoco respondió a ningún tratamiento hormonal.

Los resultados anteriormente mencionados coinciden con lo descrito por Dorrington, 1975 y Bley. 1992, con respecto al efecto estimulador en la incorporación de timidina tritiada causado por la FSH en células granulosa de mamíferos. Ya se ha descrito que

el efecto proliferativo de esta hormona esta relacionado con factores de crecimiento y de estrógenos; Dorrington en 1993 demostró que el factor de crecimiento transformante tipo β (TGF- β) interviene junto con la FSH en el estímulo a la actividad mitogénica en cultivos de células granulosas de mamíferos, también comprobó que el estradiol interviene en la síntesis de TGF- β . Basándonos en lo anterior, sabemos que el efecto de la FSH no se da directamente, sino que en la proliferación celular del ovario intervienen estrógenos y factores como el TGF β u otros que en conjunto desencadenan la síntesis de DNA, por lo que suponemos que la respuesta de la F6 al estímulo con FSH puede estar determinado por la población característica de esta fracción, formada por células indiferenciadas productoras de estrógenos, y que en el ovario adulto de aves dará origen a las células de la teca externa, pues es la única población que obtenida por un gradiente celular, presenta actividad del sistema de aromatasas y además produce estrógenos al ser estimulada por LH o FSH.

CONCLUSIONES

La hormona folículo estimulante (FSH) tiene un efecto proliferativo, en cultivos primarios de células obtenidas por una disociación mecánico-enzimática de ovarios prefoliculares de aves de 18 días de incubación, es importante hacer notar que el tratamiento con hCG (hormona de tipo luteinizante) y con 17 β -estradiol (agente mitogénico in vivo) no tuvo ningún efecto sobre el modelo antes mencionado, por lo que se puede diferenciar un efecto luteinizante de un efecto folículo estimulante; incluso este efecto puede proponerse como un bioensayo para FSH puesto que es perfectamente reproducible en las condiciones descritas en el presente trabajo y estadísticamente comprobado, además presenta ventajas metodológicas con respecto a otros modelos para probar la efectividad de la FSH.

La respuesta de las subpoblaciones celulares obtenidas por el gradiente de metrizamida al estímulo de la FSH fué la siguiente: la subpoblación celular con características esteroideogénicas típicas y secretora de andrógenos (F2) y la constituida por ovocitos primarios (F4) no incrementaron significativamente la incorporación de ³H-timidina con respecto al grupo control. Una de las subpoblaciones celulares constituidas por células somáticas indiferenciadas, fibroblastos y pregranulosas (F5) no presentó diferencias significativas en la incorporación de timidina con respecto a los controles, mientras que el máximo efecto hormonal se presentó en la (F6) que es la fracción celular de mayor

densidad y que se ha comprobado en reportes previos que secreta 17 β -estradiol (Pedernera y cols. 1988).

APENDICE

MEDIO DE CULTIVO

DMEM.....10.3 grm.

NaHCO₃3.7 grm.

Albúmina.....1.0 grm.

Estreptomycin.....0.5 UI (por cada 100 ml.)

Aforar a 1000 ml. con agua desionizada

(Para el medio de cultivo con suero bovino fetal, se toman 85 ml. de DMEM y se le agregan 15 ml. de suero bovino fetal)

SOLUCION SALINA BALANCEADA

NaCl8.0 grm.

KH₂PO₄0.2 grm.

KCl0.2 grm.

Na₂HPO₄1.15 grm.

Agua bidestilada.....1000 ml.

Para la técnica de incorporación de timidina se utilizarón los siguientes reactivos:

SDS (duodecil-sulfato de sodio) al 2%

Acido tricloro-acético al 10%

Solución de metanol-ácido acético en proporción 3:1

BIBLIOGRAFIA

- Alberts, B. (1989). Molecular biology of the cell. Garland Publishing, Inc. New York. pp. 767-775.
- Alvarez-Fernández G., Juárez-Oropeza M.A., Pedernera E. (1992). steroid biosynthesis in cell subpopulations obtained from the ovary of the newly hatched chicken. 25th annual meeting of the society for the study of reoroduction (Abst 239).
- Anderson, L.L., Bast J.D., Melamphy R.M.(1973). Relaxin in ovarian tissue during different reproductive stages in the rat. J. Endocrinol. 59: 371-372.
- Anderson, M.L. and Long J.A.(1978). Localization of relaxin in the pregnant rat. Bioassay of tissue extracts and cell fractionation studies. Biol. Reprod. 18: 110-117.
- Armstrong, D.T. (1968). Gonadotrophins, ovarian metabolism and steroid metabolism. Recent Prog. Horm. Res. 24: 255-319.
- Armstrong, D.G., Maida F. Davison., A.B. Gilbert and J.W. Wells. (1977). Activity of 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase in the postovulatory follicle of domestic fowl (*Gallus domesticus*). J. Reprod. Fert. 49: 252-259.
- Armstrong, D.T., T.J. Weiss, G. Selstam and R.F. Seamark.(1981). Hormone and cellular interactions in follicular steroid biosynthesis by the sheep ovary. J. Reprod.Fertil.Suppl. 30: 143-154.
- Babetta, L.M. and Hertelendy F. (1983). Steroidogenesis by avian ovarian cells: effects of luteinizing hormone and substrate availability. Am. J. Physiol. 244 (Endocrinol. Metab. 7): E487-E493.
- Baraño, J.L., Bley M.A., Batista F.D., and Glikin G.C.(1991). A DNA topoisomerase I inhibitor blocks the differentiation of rat granulosa cells induced by follicle-stimulating hormone. Biochem. J. 277: 557-560.
- Bendell, J.J. and Dorrington J. (1991). Estradiol-17 β stimulates DNA synthesis in rat granulosa cells: action mediated by Transforming Growth Factor- β . Endocrinology. 128:5, 2663-2665.
- Bley, A.M., Simón C.J., Estevéz G.A., Jiménez de Asúa L. and Baraño L.J.(1992). Effect of follicle-stimulating hormone on insulin-like growth factor-I-stimulated rat granulosa cell deoxyribonucleic acid synthesis. endocrinology.131:3, 1223-1229.
- Bone, F.J. (1988). Animal anatomy and physiology. Prentice-Hall, Inc.USA. pp. 358.

- Brobeck, R.J.(1982). Bases fisiológicas de la práctica médica. Ed. Panamericana. México. pp. 984-985.
- Camp, A.T., Rahal O. J. and Mayo E. K., (1991). Cellular localization and hormonal regulation of Follicle-Stimulating hormone and Luteinizing hormone receptor messenger RNAs in the rat ovary. *Molecular Endocrinology*. 5: 1405-1417.
- Channing, C.P., and Kammerman, S. (1974). Binding of gonadotrophins to ovarian cells. *Biol. Reprod.* 10: 179-198.
- Channing, C.P., F.W. Schaerf, L.D. Anderson and A. Tsafiri.(1980). Ovarian follicular and luteal physiology. In: *Reproductive Physiology III. International Review of Physiology*, edited by R.O. Greep. Baltimore: Univ. Park Press. 22: 117-201.
- Catt, K.J. and Dufau M.L. and Vaitukaitis J.L.(1975). Appearance of hCG in pregnancy plasma following the initiation of implantation of the blastocyst. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 40; 537-540.
- Csaba, G., Shahin M.A. and Dobozy O.(1980). The overlapping effect of gonadotropins and TSH and embryonic chicken gonads. *Arch. Anat. Histol. Embryol. Strasbourg.* 63: 31-38.
- Csaba, G., Nagy, S.U., and Shahin, M.A. (1981). Overlapping binding of FSH and TSH in embryonic chicken testicle and thyroid gland. *Acta Phys. Acad. Sci. Hung.* 58: 253-255.
- Dick, H.R., Culbert, J., Wells, J.W., Gilbert, A.B. and Davidson, M.F.(1978). Steroid hormones in the postovulatory follicle of the domestic fowl (*Gallus domesticus*). *J. Reprod. Fert.* 53: 103-107.
- Dorrington, J.H., Moon S.Y. and Armstrong T.D. (1975). Estradiol-17 β biosynthesis in cultured granulosa cells from hypophysectomized immature rats; stimulation by Follicle-stimulating Hormone. *Endocrinology*. 97:5, 1328-1330.
- Dorrington, J.H., Fritz I.B. and Armstrong D.T. (1978). Control of testicular estrogen synthesis. *Biol. Reprod.* 18: 55-64.
- Dorrington, J.H., and Armstrong T.D. (1979). Effects of FSH on Gonadal Functions. *Recent Progress in hormone research.* 35: 301-342.
- Dorrington, J.H., Bendell J.J. and Khan A. Shafiq. (1993). Interactions between FSH, estradiol-17 β and transforming growth factor- β regulate growth and differentiation in the rat gonad. *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.* 44: 4-6, 441-447.
- Erickson, G.F. and Hsueh, A.J.W.(1978). Stimulation of aromatase activity by follicle stimulating hormone in rat granulosa cells in vivo and in vitro. *Endocr.* 102: 1275-1283.

- Fink, G. (1988). Gonadotropin secretion and its control. In: The physiology of reproduction. Edit. by E. Knobil and J. Neill et al. Raven Press, Ltd, New York. pp 1349-1350.
- Furr, B.J.A., Bonney, R.C., England, R.J. and Cunningham, F.J. (1973). Luteinizing hormone and progesterone in peripheral blood during the ovulatory cycle of the hen *Gallus domesticus*. *J. Endocrinol.* 57: 159-169.
- Gardner, W.A., Wood, H.A., and Taber, E. (1964). Demonstration of a nonestrogenic gonadal inhibitor produced by the ovary of the brown leghorn. *Gen. Comp. Endocrinol.* 4: 673-683.
- Gilbert, A.B. (1979). Female genital organs. In form and function in birds. Eds. A.S. King y J. McLelland. London Academic Press. pp 273-360.
- Goodman, S.L., Gilman G.A. (1978). Bases Farmacológicas de la Terapéutica. Edit. Interamericana. México. pp. 1167-1173.
- Gospodarowicz D. and Bialecki H. (1979). Fibroblast and epidermal growth factors are mitogenic agents for cultured granulosa cells of rodent, porcine and human origin. *Endocrinology* 104: 757-764.
- Guichard, A., Cedard, L., and Haffen, K. (1973). Aspect comparatif de la synthèse de stéroïdes sexuels par les gonades embryonnaires de Poulet à différents stades du développement (étude en culture organotypique à partir de précurseurs radioactifs). *Gen. Comp. Endocrinol.* 20: 16-28.
- Haffen, K. (1970). Biosynthesis of steroid hormones by the embryonic gonads of vertebrates, in *Advances in Morphogenesis*. M. Abercrombie, J. Brachet and T.J. King, eds. Academic Press, New York. 8: 285-303.
- Hamilton, T.H. (1963). Hormonal control of Mullerian duct differentiation in the chick embryo. *Proceedings of the 13th. Congress of the Institute of Ornithology*. Ithaca, New York. pp. 1004.
- Hammond, R.W., Todd, H., and Hertelendy, F. (1980). Effect of mammalian gonadotropins on progesterone release and cyclic nucleotide production by isolated avian granulosa cells. *Gen. Comp. Endocr.* 41: 467-476.
- Hillier, S.G., L.E. Reichert, and E.V. vanHall. (1981). Control preovulatory follicular estrogen biosynthesis in the human ovary. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 52: 847-856.
- Huang, E., and Nalvandov, A.V. (1979a). Steroidogenesis of chicken granulosa and theca cells: in vitro incubation system. *Biol. Reprod.* 20: 442-461.

Huang, E.S.R., K.J. Kao, and A.V. Nalbandov. (1979b). Synthesis of sex steroid by cellular compartments of chicken follicles. *Biol. Reprod.* 20: 454-461.

Hsueh W. J. A., Adashi E.Y., Jones B.C. Phillip and Welsh Jr H.T.(1984). Hormonal regulation of the differentiation of cultured ovarian granulosa cells. *Endocrine Reviews.* 5: 1, 76-127.

Jones, R.E.(1978). *The vertebrate ovary.* Plenum Press, New York.

Knobil, E. and Neill, J.(1988). *The physiology of reproduction.* Raven Press. New York. 2: 1971-1973.

Lague, P.C., van Tienhoven, A. and Cunningham, F.J. (1975). Concentrations of estrogens, progesterone and LH during the cycle of the laying chicken (*Gallus domesticus*). *Biol. Reprod.* 12: 590-598.

Leung, P.C.K., and D.T. Armstrong. (1980). Interactions of steroids and gonadotropins in the control of steroidogenesis in the ovarian follicle. *Annu. Rev. Physiol.* 42: 71-82.

Licht, P., Papkoff, H., Farmer, S.W., Muller, C.H., Tsui, H.W., and Crews, D.(1977). Evolution in gonadotropin structure and function. *Rec.Prog. Horm. Res.* 33, 169-248.

Lofts, B., and Murton, R.K.(1973). Reproduction in birds. in: *Avian Biology.* D.S. Farner and J. R. King, eds. Acad. Press, New York. 3: 1-109.

Mashaly, M.M., Birrenkott, G.P., El-Begearmi, M.M. and Wentworth, B.C. (1976). Plasma LH and progesterone concentrations in the turkey hen during the ovulatory cycle. *Poult. Sci.* 55: 1226-1234.

Moon S.Y., Dorrington H.J. and Armstrong T.D. (1975). Stimulatory action of follicle-stimulating hormone on estradiol-17 β secretion by hypophysectomized rat ovaries in organ culture. *Endocrinology* 97: 244-249.

Norman, W.A. and Litwack G.(1987). Hormones of pregnancy and lactation. in: *Hormones.* Academic Press, inc. San Diego California. Cap. 14. pp 575-576.

Pedernera E., Gómez Y., Velázquez P., Juárez-Oropeza M.A. and González del Pliego M. (1988). Identification of steroidogenic cell subpopulations in the ovary of newly hatched chicken. *General and Comparative Endocrinology* 71: 153-162.

Pedernera E. (1993). Cooperación celular en la biosíntesis de hormonas esteroides. en: *Comunicación Neuroendócrina: Bases celulares y moleculares.* Sociedad Mexicana de Ciencias Fisiológicas A.C. México. pp. 33-46.

Peng, Xiao-Rong., Hsueh J.W. A., Lapolt S.P. Bjersing L. and T. NY. (1991). Localization of Luteinizing Hormone Receptor Messenger Ribonucleic Acid Expression in Ovarian Cell Types During Follicle Development and Ovulation. *Endocrinology*. 129: 6.

Pierce, J.G., Faith, M.R., Giudice, L.C., and Reeve, J.R. (1976). Structure and structure-function relationship of glycoprotein hormones. In "The Peptide Hormones, Ciba Found. Symp. 30," pp. 116-131. Elsevier, Amsterdam.

Pierce, J.G., and Parsons, T. (1981). Glycoprotein hormones structure and function. *Annu. Rev. Biochem.* 50, 465-495.

Pierce, J.G. (1988). Gonadotropins: Chemistry and biosynthesis. In *The physiology of reproduction*. Edit. by Knobil E. and Neill J. Raven Press, Ltd. New York. pp. 1335-1348.

Pledger W.J. (1985). Regulation of cell proliferation : serum growth factor control of ordered series of G1 events. In *Control of cell growth and proliferation*. Edited by C.M. Veneziale. Van Nostrand Reinhold Co. New York. pp. 108-131.

Richards, J.S. Ireland, J.J., Rao, M.C., Bernath, G.A., Midgley, A.R., Jr. and Reichert, L.E., Jr. (1976) Ovarian follicular development in the rat: Hormone receptor regulation by estradiol, follicle stimulating hormone and luteinizing hormone. *Endocrinology*. 99: 1562-1570.

Ritzhaup, L.K. and Bahr J.M. (1987). A decrease in FSH receptors of granulosa cells during follicular maturation in the domestic hen. *J. Endocr.* 115, 303-310.

Ross, H.M., Reith, J.E. and Romrell J.L. (1992). *Histología. Panamericana.* Marcelo T. de Alvear 2145. Buenos Aires. pp. 624.

Ryle, M. (1969a). The duration of an FSH effect in vitro. *J. Reprod. Fertil.* 19: 349.

Ryle, M. (1969b). A quantitative in vitro response to follicle-stimulating hormone. *J. Reprod. Fertil.* 19: 87.

Savion H., Lui G-E., Laherty R. and Gospodarowicz D. (1981). Factors controlling proliferation and progesterone production by bovine granulosa cells in serum-free medium. *Endocrinology* 109: 409-420.

Shally, A.V.; Arimura A.; and Kostin A.J. (1978). Hypothalamic regulatory Hormones. *Science*. Wash. 179: 341-350.

Shahabi, N.A., Norton, H.W. and Nalvandov, A.V. (1975). Steroid levels in follicles and in the plasma of hens during the ovulatory cycle. *Endocrinology* 96: 972-979.

- Stanley, A.J., and Witschi, E. (1940). Germ cell migration in relation to asymmetry in the sex glands of hawks. *Anat. Rec.* 76: 329-342.
- Tager, H.S., and Steiner, D.F. (1974). Peptide hormones. *Annu. Rev. Biochem.* 43: 509-538.
- Tanabe, Y., Nakamura, T., Fujioka, K., and Doi, O. (1979). *Gen. Comp. Endocr* 39: 26-33.
- Teng, C.T. and Ching Sung Teng. (1977). The hormonal regulation of steroidogenesis and adenosine 3' 5' cyclic monophosphate in embryonic chick ovary. *Biochem. J.* 162: 123.
- Teng, T.C. and Teng, S.C. (1979). Studies on sex organ development: separation and culture of steroid-producing cells from growing and regressing embryonic ovaries. *Endocrinology.* 104: 5.
- Tennant, J.R. (1964). Evaluation of the trypan blue technique for the determination of cell viability. *Transplantation* 2: 685.
- Terada, N., Kuroda H., Namiki M., Kitamura Y. and Matsumoto K. (1984). Augmentation of aromatase activity by FSH in ovaries of fetal and neonatal mice in organ culture. *J. Steroid Biochem.* 20: 3, 741-745.
- Tienhoven, A.V. (1983). Reproductive physiology of vertebrates. Cornell University Press. USA.*
- Tojo, H., Fujii, M., and Ogawa, K. (1982). Proteolytic enzymes and gonadal hormones of the ovarian follicle wall during ovulation in: the domestic fowl (*Gallus domesticus*). *J. Reprod. Fertil* 64: 73-77.
- Warren, M.P. (1983). Effects of undernutrition on reproductive function in the human. *Endocr. Rev.* 4: 363-377.
- Wells, J.W., H.R. Dick, and A.B. Gilbert. (1981). The biosynthesis of progesterone by fowl granulosa cells in vitro from ¹⁴C labeled substrates. *J. Steroid Biochem.* 14: 651-656.
- Weniger, J.P. (1968). Sur la précocité de la sécrétion d'oestrogènes par les gonades embryonnaires de Poulet cultivées in vitro. *C.R. Acad. Sci., Paris, Sér. D.* 266: 2277-2279.
- Weniger, J.P. (1971). Biosynthèse d'oestrogènes par les ébouches gonadiques de Poulet. *Gen. Comp. Endocrinol.* 16: 391-397.
- Wilson, S.C. and Sharp, P.J. (1973). Variations in plasma LH levels during the ovulatory cycle of the hen, *Gallus domesticus*. *J. Reprod. Fertil.* 35: 561-564.
- Witschi, E. (1935). The origin of asymmetry in the reproductive system of bird. *Am. J. Anat.* 56: 119-141.

Woods J.E. and Erton H.L. (1978). The synthesis of estrogens in the gonads of the chick embryo. General and comparative endocrinology 36: 360-370.

Woods J.E. and Brazzil D.M. (1981). Plasma 17β -estradiol levels in the chick embryo. Gen. Comp. Endocr. 44: 37-43.

Woods, E.J. (1991). FSH- and TSH- binding cells in the ovary of the developing chick embryo. Gen. Comp. Endocrinol. 82: 487-494.

Yen, S.C.S. (1991). Reproductive Endocrinology . Third edition. W.B. Saunders Company. Philadelphia.

Zentella A. (1993). Factores de crecimiento: un balance entre acelerar y frenar la proliferación celular, en: Mensaje bioquímico. Vol. XVII pp. 1-30.