

197  
52)



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

"EFECTO DE LA HORMONA FOLICULO  
ESTIMULANTE (FSH) SOBRE LA DIVISION CELULAR  
EN GONADAS DE AVE DURANTE EL DESARROLLO  
EMBRIONARIO"

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 :

S O L I S   A R R I E T A   L I L I A



DIRECTOR DE TESIS: DR. PEDRO NICOLAS VELAZQUEZ

NOVIEMBRE 1996

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

RECEBIÓ EN LA FACULTAD DE CIENCIAS  
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



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 esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

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



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

M. en C. Virginia Abrín Batule  
Jefe de la División de Estudios Profesionales de la  
Facultad de Ciencias  
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo de Tesis: Efecto de la hormona  
folículo estimulante (FSH) sobre la división celular en gónadas  
de ave durante el desarrollo embrionario,  
realizado por Solís Arrieta Lilia

con número de cuenta 8817703-8 , pasante de la carrera de Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis

Propietario Dr. Pedro Nicolás Velázquez

Propietario Dra. Marcela Esperanza Aguilar Morales

Propietario Dra. Maricela Villagrán Santa Cruz

Suplente M. en C. Yolanda de las Mercedes Gómez y Gómez

Suplente Biol. Ignacio Daniel González

Consejo Departamental de Biología

## RECONOCIMIENTOS.

El presente trabajo fue realizado en el Departamento de Biología Celular y Tisular de la Facultad de Medicina U.N.A.M. bajo la Dirección del Dr. Pedro Nicolás Velázquez y la asesoría de la Biól. Irma Peralta Delgado. El proyecto fue realizado con el apoyo económico parcial de DGAPA, UNAM (IN203594).

## AGRADECIMIENTOS.

A los miembros que forman parte del jurado:

Dr. Pedro Nicolás Velázquez.

Dra. Maricela Villagrán Santa Cruz.

Dra. Marcela Esperanza Aguilar Morales.

M. en C. Yolanda de las Mercedes Gómez y Gómez.

Biól. Ignacio Daniel González Mora.

Por la revisión del manuscrito y las útiles aportaciones que permitieron mejorar este trabajo.

## AGRADECIMIENTOS.

**A DIOS** que permitio que llegara hasta este momento.

### **A MIS PADRES:**

*Con infinito amor y gratitud por su apoyo incondicional, y a quienes debo lo que soy.*

### **A MIS HERMANOS**

*Guadalupe, Alberto, Irma, Carlos, Adrian, Hector y Mariana: Con gran cariño, por su comprensión y ayuda.*

### **A MIS AMIGOS**

*Gaby, Mary, Jalna, Clara, Elia, Angelica, Dolores, Ale y Juan con los cuales compartí los momentos gratos y amargos, durante la carrera.*

*Al Dr. Pedro N. V. por su paciencia y consejos.*

*A mis compañeras del laboratorio por su apoyo y colaboración; Irma y Elma.*

## I N D I C E

	Página
RESUMEN .....	1
1) INTRODUCCION.....	3
Funciones de la Hormona Folículo Estimulante.....	3
Características de la FSH .....	3
Receptores para FSH.....	4
Síntesis de hormonas esteroides.....	4
Ruta de Biosíntesis de hormonas esteroides.....	6
Diferenciación Gonadal.....	9
Formación del testículo.....	10
Formación del ovario.....	14
Ciclo celular.....	19
Factores de crecimiento.....	20
2) JUSTIFICACION.....	24
3) OBJETIVOS.....	25
4) MATERIALES Y METODOS.....	26
5) RESULTADOS.....	30
6) DISCUSION .....	38
7) CONCLUSIONES.....	41
8) BIBLIOGRAFIA.....	42
9) APENDICE.....	47

## RESUMEN.

La fisiología gonadal esta regulada por hormonas hipofisarias (FSH y LH) y por factores tanto autocrinos como paracrinos.

La hormona folículo estimulante (FSH) actúa en las células granulosas del ovario y en las células de Sertoli del testículo de los mamíferos controlando la división celular y su metabolismo. Las gónadas de las aves adultas al igual que las de los mamíferos están reguladas por dicha hormona. sin embargo, no se han realizado trabajos que demuestren como actúa en los primeros estadios del desarrollo gonadal. Por lo que el objetivo del presente trabajo fue determinar en que etapa del desarrollo gonadal se inicia la respuesta a la hormona folículo estimulante (FSH) para inducir proliferación celular en el ovario prefolicular y en el testículo inmaduro de aves.

Para ello se realizaron cultivos primarios de ovario derecho, ovario izquierdo y testículo de embriones de pollo de la clase Leghorn blanca (Babcock B-300) con 8, 10, 13, 15 y 18 días de incubación. Las gónadas fueron disociadas mecánico-enzimáticamente con tripsina (0.025%) deteniendo la reacción enzimática con inhibidor de tripsina (0.50%). Las células fueron contadas y sembradas (500 000 células) sobre membranas de policarbonato flotando en medio mínimo esencial modificado por Dulbecco (DMEM) al cual se le adicionó 0.5 UI de hFSH y 0.1  $\mu$ Ci de  $^3$ H-Timidina a los grupos tratados. El agregado celular fue incubado durante 60 horas en una atmósfera de 5% CO<sub>2</sub> y 95% de aire.

El incremento de DNA celular fue valorado por la técnica de incorporación de  $^3$ H-Timidina.

De los resultados obtenidos, el ovario izquierdo incorporó la mayor cantidad de  $^3$ H-Timidina que el ovario derecho y el testículo. Además presenta un pico



de incorporación de los 8 a los 13 días de incubación, sin embargo, no hay respuesta al tratamiento hormonal, en este período del desarrollo

El ovario derecho al ser tratado con hFSH muestra una mayor incorporación de <sup>3</sup>H-Timidina entre los 8, 10 y 13 días con respecto a los grupos control, disminuyendo gradualmente hasta el día 18 debido al proceso de regresión del órgano.

En el testículo la hFSH incrementa la incorporación de timidina un 50% con respecto a los basales, presentando una mayor incorporación a los 8 y 18 días de incubación.

Los resultados del presente trabajo demuestran que antes de que se establezca el eje hipotálamo-hipofisis-gónada (HHG) en el día 13.5, las células gonadales tienen receptores para la FSH por lo tanto el desarrollo y diferenciación gonadal es independiente del funcionamiento del eje HHG.

## INTRODUCCION.

### FUNCIONES DE LA HORMONA FOLICULO ESTIMULANTE (FSH).

Las gonadotropinas (FSH y LH) y la hormona estimulante de la tiroides (TSH) constituyen uno de los tres grupos de hormonas secretadas por la adenohipófisis

La hormona foliculo estimulante (FSH) regula la función y maduración de las células somáticas, asociadas con la gametogénesis en las gónadas (Dorrington y Amstron, 1979).

En el ovario de los mamíferos (Hsueh y Adashi, 1984) y de las aves (Yoshimura y Tamura, 1988) la FSH es necesaria para la proliferación de las células granulosa del folículo ovárico, la cual se puede asociar con algunos factores de crecimiento (TGF- $\beta$ , IGF y EGF) para modular el efecto. También provoca que estas células secreten estrógenos, andrógenos, progestagenos (Well y Gilbert, 1984), así como sustancias no esteroideas (Hsueh y Adashi, 1984).

En el testículo la FSH produce la maduración de los tubos seminíferos y la espermatogénesis (Dorrington y Armstrong, 1979) sin embargo, el mantenimiento de la espermatogénesis requiere de la participación de andrógenos los cuales son sintetizados en las células de Leydig ante el estímulo de la hormona luteinizante (LH). (Dorrington y cols, 1993).

### CARACTERISTICAS DE FSH.

La hormona foliculo estimulante (FSH), hormona luteinizante (LH) y la hormona estimulante de la tiroides (TSH), son dímeros compuestos por dos subunidades polipeptídicas glucosiladas ( $\alpha$  y  $\beta$ ) unidas por asociaciones no covalentes (Pierce y Parsons, 1981).

La subunidad  $\alpha$  es común a todas las hormonas glucoproteicas, que poseen en esencia la misma secuencia de amino ácidos con una similitud de 70 a 90% en las diferentes especies.

La subunidad  $\beta$  de cada hormona tiene regiones no similares lo que le confiere la especificidad hormonal que se expresa cuando esta subunidad se asocia con la subunidad  $\alpha$  (Yen y Jaffe, 1991).

### **RECEPTORES PARA FSH.**

La FSH de aves tiene un peso molecular de 38000 Kd (Kristhnan, 1991), sus receptores se encuentran en la membrana plasmática tanto de las células granulosas de ovarios maduros e inmaduros como en las células de Sertoli del testículo (Dorrington y Armstrong, 1979).

Csaba y cols (1980), han postulado que durante el desarrollo fetal y posnatal de los vertebrados hay una maduración de los receptores de FSH, LH y TSH; por lo que hay una gradual progresión de unión de una forma no específica a una específica.

En el caso de las aves se encontró que entre los días 6.5 - 11.5 de incubación no hay un reconocimiento específico para el receptor, sin embargo, al inicio del día 12.5 ya lo hay (Woods y cols, 1991).

En estudios realizados en ovarios de mamíferos se ha visto que la respuesta a la FSH cambia con el desarrollo folicular, Richards (1994) señala que puede ser por la cantidad de receptores la cual disminuye en los folículos que no son seleccionados para seguir creciendo o que en las células se producen diferentes transcritos de adenilato ciclasa como de proteínas G y que no todas estas isoformas pueden ser activas en cada estadio del desarrollo para producir o no una respuesta ante la FSH.

### **SINTESIS DE HORMONAS ESTEROIDES.**

Las gónadas de las aves producen hormonas sexuales (estrógenos,

andrógenos y progestagenos). En los adultos estas hormonas participan en la expresión de los caracteres sexuales secundarios (crecimiento de la cresta, forma y color de las plumas), el desarrollo de órganos accesorios y el comportamiento. En la etapa embrionaria se han definido como las causantes de la diferenciación morfológica en hembras y machos, según la porción gónadal que se desarrolle (Woods y Erton, 1978) :

Se ha demostrado que la producción de estas hormonas se inicia desde etapas muy tempranas del desarrollo, Woods y Weeks (1969) demostraron la presencia de la enzima  $\Delta^5$ - $3\beta$ - hidroxisteroide deshidrogenasa ( $\Delta^5$ - $3\beta$ -HSD) en la cresta genital de embriones de aves con dos días de desarrollo.

Woods y Podczaski en (1974), por medio de inmunofluorecencia histoquímica encontraron que los andrógenos son las primeras hormonas sexuales, que se sintetizan a los 3.5 días de desarrollo. Sin embargo en estudios posteriores Woods y Erton (1978), encuentran que también los estrógenos se sintetizan en esta misma edad. Lo cual quiere decir que 3 días antes de la diferenciación morfológica (ovario y testículo), la gónada tiene la capacidad de producir hormonas sexuales.

El ovario izquierdo de los 7.5 a 18 días de desarrollo sintetiza principalmente  $17\beta$ -estradiol y estrona. El ovario derecho al igual que el izquierdo, sintetiza  $17\beta$ -estradiol y estrona, pero debido al proceso de involución únicamente presenta un pico de secreción a los 5.5 días de desarrollo y a los 13.5 días los niveles que presentan no son detectables.

El testículo de los 7.5 a 18 días produce principalmente testosterona (T), dehidroepiandrosterona (DHEA) y estrona (E1)(Guichard y cols, 1977).

Además de las gónadas también las glándulas suprarrenales participan en la producción de hormonas esteroideas principalmente testosterona durante el desarrollo embrionario (Tanabe y cols, 1979).

La secreción de estas hormonas en las aves está regulada por el eje hipotalámico - adenohipófisis - gónada (HAG), sin embargo, cada componente es independiente hasta el día 13.5 del desarrollo embrionario, momento en el cual inician una función integradora, teniendo como consecuencia un aumento en el tamaño de la gónada, peso y grado de diferenciación histológica (Woods, 1987).

#### **RUTA DE BIOSÍNTESIS DE LAS HORMONAS ESTEROIDES.**

El nombre de esteroide, deriva de la palabra griega estereos = sólido, ya que los esteroides constituyen la fracción sólida residual que permanece después de la saponificación de las grasas animales. Presenta un núcleo químico constituido por diecisiete átomos de carbono distribuidos en tres anillos ciclohexanos (A, B y C) y un ciclopentano (D), llamado ciclo pentanoperhidrofenantreno (Hall, 1988).

#### **BIOSÍNTESIS DE COLESTEROL.**

El colesterol es el precursor común de todos los esteroides y puede ser tomado de tres fuentes diferentes: a) incorporado de la sangre a partir de las lipoproteínas circundantes, b) como colesterol almacenado bajo la forma de ésteres en las inclusiones de lípidos del citoplasma y c) por medio de la síntesis de "novo" a partir de acetato.

Tanto en el ovario como en el testículo, el colesterol circulante en lipoproteínas es el más utilizado para la síntesis de hormonas esteroides y dependiendo de la especie van a emplear lipoproteínas de baja densidad o lipoproteínas de alta densidad (Hall, 1988).

#### **BIOSÍNTESIS DE PREGNENOLONA.**

El colesterol es hidroxilado en la posición 22 - 20, lo que permite el corte de la

cadena lateral formando la pregnenolona (C21) y aldehído isocaproico. El sistema enzimático que cataliza esta reacción se localiza en la membrana interna mitocondrial, es un complejo multienzimático formado por tres componentes:

a) El citocromo P-450 proteína de tipo hemo que hidroxila y que puede cortar las Uniones C - C, b) flavoproteína, flavina adenina dinucleótido (FAD) y c) una proteína hemo que sirve como acarreadora de electrones entre los otros dos componentes. La reacción necesita tres moles de NADPH y O<sub>2</sub> por mol de colesterol transformado a pregnenolona.

#### **METABOLISMO DE LA PREGNENOLONA.**

La pregnenolona es convertida a progesterona por el complejo enzimático 3 $\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa,  $\Delta^5$ -4 isomerasa. La enzima utiliza NAD<sup>+</sup> como aceptor de electrones y es irreversible bajo condiciones fisiológicas.

#### **BIOSINTESIS DE ANDROGENOS.**

El factor que limita la biosíntesis de andrógenos como en otros órganos que secretan andrógenos es la 17 $\alpha$ -hidroxilasa: un complejo enzimático de C-17-20 liasa. Se localiza en el retículo endoplasmático liso, este sistema es un citocromo P-450 que requiere NADPH y oxígeno molecular. La reacción puede utilizar pregnenolona o progesterona como sustrato, resultando la formación de: dehidroepiandrosterona (DHEA) o androstenediona respectivamente.

Para la formación de estos productos se utilizan dos vías alternas la 5-ene-3 $\beta$ -hidroxí ( $\Delta^5$ ) y la 4-ene-3-oxo ( $\Delta^4$ ), sin embargo, el uso preferencial de una u otra vía varía de especie a especie.

## BIOSINTESIS DE ESTROGENOS.

Tanto la androstenediona como la testosterona son convertidas a estrógenos (estrona y 17β-estradiol) por un complejo enzimático localizado en la membrana del retículo endoplasmático liso. Este complejo enzimático es denominado aromatasas, cataliza la remoción del grupo metil del C-10 como ácido fórmico seguido de un reordenamiento de el anillo A a una estructura aromática. La reacción requiere NADPH y 3 moles de O<sub>2</sub> (Fig. 1) (Hall, 1988).

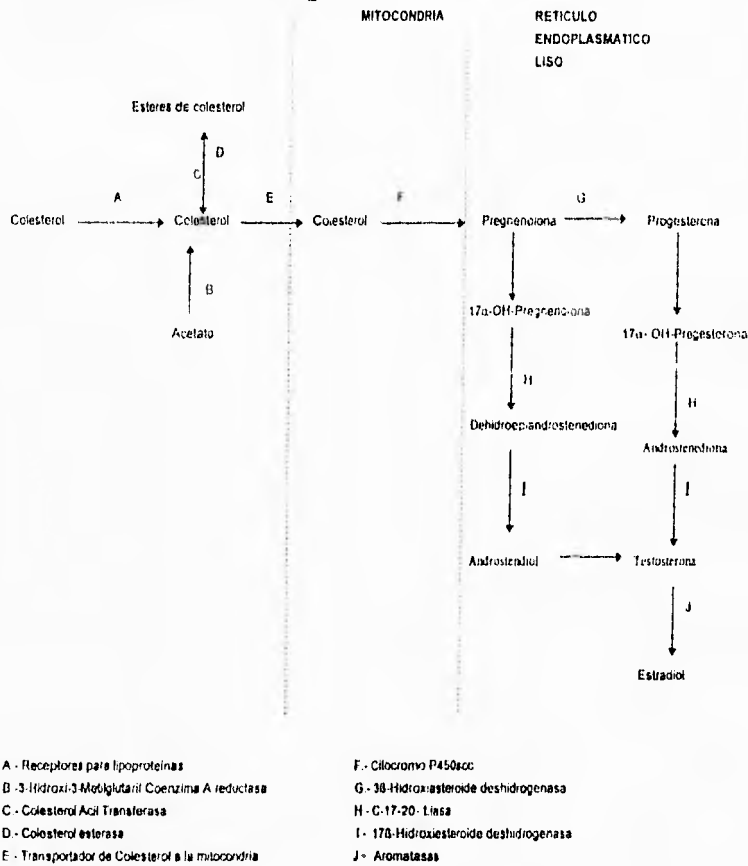


Fig 1. Ruta de biosíntesis de las hormonas esteroides (Tomado de Hsueh y Adashi, 1984).

## DIFERENCIACION GONADAL.

Para el establecimiento de la gónada indiferenciada en las aves. Witschi (1956) (trabajo referido por Jones, 1978) establece que parte del blastema mesonéfrico, que no es utilizado en la formación de los túbulos y corpúsculos renales, va a formar la corteza adrenal y la médula de la gónada. Apoyan también esta hipótesis estudios más recientes realizados en embriones de pollo, que llegan a la conclusión de que la médula gonadal se origina del blastema mesonéfrico (Carlton y cols, 1983; Carlton y Stahl, 1985).

Aunque Witschi (1956) también visualiza el establecimiento de una gónada indiferenciada como un proceso que involucra un doble desplazamiento celular en dirección opuesta: las células medulares descienden al blastema mesonéfrico y las células corticales ascienden al epitelio celómico. Otros autores han interpretado el establecimiento de una gónada indiferenciada como resultado de dos proliferaciones consecutivas del epitelio celómico: el primero forma la médula y el segundo la corteza (Willier, 1939; Benoit, 1950; Gallien, 1973. trabajos referidos por Jones, 1978). Posteriormente se determinó que a los 3.5 días de incubación varias células germinales primordiales alcanzan el epitelio celómico. La zona genital es aislada por vasos sanguíneos y células mesenquimales del área mesonéfrica, a su vez el epitelio es cubierto por una lámina basal pasando por aquí tanto las células germinales primordiales como las células somáticas. Los grupos de células que se localizan en la superficie interna del epitelio no están rodeadas por la lámina, lo cual les permite moverse y formar un puente. En el cuarto día de incubación la región genital es proyectada hacia la cavidad celómica, la superficie epitelial es de 3 a 4 células de grosor, no hay formación de la lámina basal en la parte intermedia del tejido epitelial en crecimiento por lo que está en contacto directo con las células mesenquimales.

Hay una organización de cordones epiteliales internos, los cuales son llamados cordones medulares, incrementándose la actividad mitótica en el epitelio y en las células mesenquimales.



Apartir de este momento dependiendo de la región gónadal que se desarrolle se origina a un macho o una hembra (Jones, 1978).

#### **FORMACION DEL TESTICULO.**

Los eventos morfogenéticos que se llevan a cabo durante la diferenciación sexual del testículo son producidos por la presencia de las CGP en el epitelio celómico de la cresta genital. Al unirse las CGP al epitelio celómico forman los cordones epiteliales, los cuales migran desde la superficie del testículo hasta los cordones medulares. En este momento la médula crece y la corteza se hace estéril (Jones, 1978).

Los testículos son órganos pareados de diferentes tamaños pero ambos funcionales, rodeados por la túnica albugínea. Internamente el testículo queda formado por los tubos seminíferos, cada tubo presenta una sola capa de células formada por dos poblaciones celulares las células de Sertoli y las espermatogonias. Las células de Sertoli tienen forma de columnas alargadas y están unidas por la parte proximal a la membrana basal alcanzando en su parte distal la luz del tubo.

Cada célula de Sertoli está unida con su célula vecina por medio de uniones ocluyentes, las cuales evitan la difusión de sustancias dentro del espacio intercelular. Las células germinales se unen a las células de Sertoli por medio de tres tipos de uniones: 1) desmosomas, 2) uniones con hendidura, (nexos) que tienen como función servir como vías para la difusión de metabolitos y iones y por último 3) las espermatidas emiten proyecciones dentro del citoplasma de las células de Sertoli (Ritzén y cols, 1989).

Entre los cordones sexuales se forma el tejido intersticial donde hay tejido conectivo con capilares sanguíneos, vasos linfáticos y las células de Leydig secretoras de hormonas esteroideas que presentan características esteroideogénicas como son retículo endoplasmático liso bien desarrollado y mitocondrias con crestas tubulares.

En las aves durante las primeras cinco semanas de edad los tubos seminíferos inician su organización y comienza la multiplicación de las células germinales.

En la sexta semana aparece el espermatocito primario y en las siguientes 2-3 semanas aumenta la mitosis y se incrementan las capas espermatogoniales. El espermatocito secundario está formado en la décima semana y espermátides inmaduras (espermatozoides inmaduros) se encuentran en los tubos seminíferos cerca de la doceava semana (Sturkie, 1968).

La pubertad en el gallo doméstico dura de 8-10 semanas (de las 16 a 24 semanas de edad), se caracteriza por una fase de rápido crecimiento testicular y por la terminación de la espermatogénesis.

#### **TESTICULO ADULTO.**

El peso del testículo adulto constituye cerca del 1% del peso total del cuerpo. El epitelio del tubo seminífero deja de estar formado por una sola capa de células y se convierte en un epitelio múltiple, que representa los diferentes estados de desarrollo de los espermatozoides, ocupa de un 65 a 90% del peso total del testículo y cada tubo tiene un diámetro de 150 a 200  $\mu\text{m}$ . (Johnson, 1986)

#### **ESPERMATOGENESIS.**

La transición de las células germinales primordiales, mitóticamente activas, a espermatozoides maduros recibe el nombre de espermatogénesis, la cual se divide en tres fases principales: Multiplicación mitótica, meiosis y espermiogénesis.

##### **A) Multiplicación mitótica y meiosis.**

Las células germinales primordiales llegan a la cresta genital del embrión y es hasta la madurez, tiempo en el cual los cordones sexuales forman los tubos seminíferos y el epitelio de los tubos se diferencia en las células de Sertoli.

Después de llegar a la gónada las células germinales primordiales se dividen en espermatogonias tipo A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>, A<sub>3</sub> y A<sub>4</sub>, espermatogonia intermedia y finalmente en espermatogonias tipo B. Las cuales se dividen mitóticamente para generar los espermatoцитos primarios (Balinski y Fabian, 1983).

Los espermatoцитos primarios entran a dos divisiones meióticas para generar 4 espermátidas haploides (Fig. II).

B) En la espermiogénesis se da la diferenciación de las células espermáticas, ya que hay una condensación de la cromatina, se forma la cabeza espermática y la vesícula acrosomal cubre la cabeza de la espermátida. El centrosoma de la espermátida después de la segunda división meiótica queda formado por dos centríolos, uno que es necesario durante la división celular en el huevo fecundado y el segundo origina el filamento axial del flagelo, también es utilizado para fijar el anillo de mitocondrias (Gilbert, 1991).

#### **ESPERMATOZOIDE MADURO.**

El espermatozoide está formado por: la cabeza cilíndrica curvada (12.5 µm largo), pieza media (4 µm largo) y la cola o flagelo (80 µm largo). En el extremo anterior de la cabeza está el acrosoma que tiene una forma cónica y mide 1.75 µm de largo por 0.5 µm de ancho cuya función es capacitar al espermatozoide para penetrar a través de las membranas del óvulo (Lake, 1971).

La parte media tiene la base del flagelo y alrededor están las mitocondrias que son portadoras de enzimas oxidativas y enzimas responsables de la fosforilación oxidativa las cuales aportan la energía para el movimiento del flagelo.

Por último se encuentra el flagelo o cola que es la parte más larga del espermatozoide que tiene como función provocar el desplazamiento. Formado por 9 filamentos externos y dos centrales constituidos por tubulina (Balinski y Fabian, 1983; Gilbert, 1991).

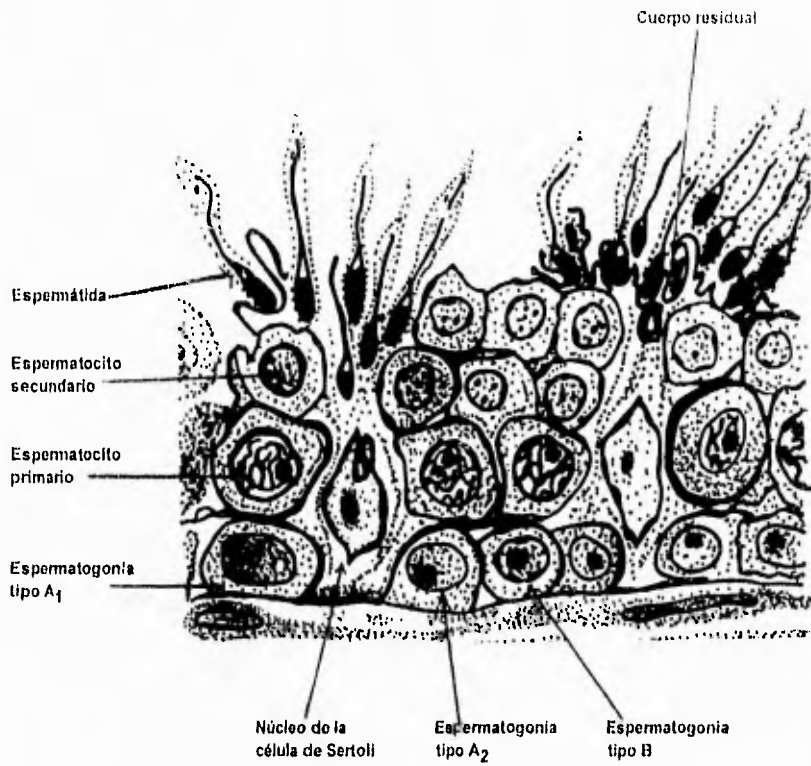


Fig. II. Corte de un tubo seminífero, que muestra la interacción celular entre las células de Sertoli y las células germinales. Mostrando las diferentes etapas del desarrollo de los espermatozoides (Gilbert, 1991).

## FORMACION DEL OVARIO.

El desarrollo asimétrico de los ovarios es una característica de las especies de aves, el ovario izquierdo continúa su crecimiento y se convierte en el ovario funcional de la ave, sin embargo, el ovario derecho crece hasta el noveno día de incubación y después inicia un proceso de regresión para convertirse en un rudimento no funcional al nacimiento (Teng y Teng, 1977).

No se han definido los fenómenos que están asociados con la regresión del ovario derecho, pero se atribuye una distribución asimétrica de las células germinales primordiales, por lo que hay una mayor cantidad en el ovario izquierdo que en el derecho a partir del tercer día de incubación (Jones, 1978).

También se ha demostrado que cuando el ovario derecho es estimulado con la hormona gonadotrópica coriónica (hCG) hay una mayor producción de AMPc, al cual se le atribuye un importante papel en la regresión del órgano ya que en los ratones con linfoma celular la muerte celular es provocada por los altos niveles de AMPc (Teng y Teng, 1977).

Esencialmente el desarrollo del ovario se inicia en el tercer día de incubación cuando las células germinales primordiales y las células mesenquimales son incorporadas en el epitelio germinal. Durante el sexto y séptimo día de incubación los cordones sexuales primarios forman la médula y en los días siguientes se forma la corteza. A los diez días la corteza muestra cordones corticales constituidos por ovogonias y/o ovocitos y en la médula se desarrollan cordones de células secretoras de esteroides, así como un sistema lacunar característico de la gónada femenina (Carlon y Stahl, 1985).

En el nacimiento, la corteza ovárica está constituida por las células germinales las cuales se observan en forma aislada o organizados en conglomerados. Entre los ovocitos se encuentran las células prefoliculares que van rodeándolos poco a poco

hasta formar la capa de la granulosa en el adulto. La médula queda constituida por cordones celulares rodeados por la lámina basal y un sistema lacunar. Presenta dos tipos celulares 1) Células estereidogénicas típicas que tienen mitocondrias con crestas tubulares, retículo endoplasmático liso y gotas de lípidos en el citoplasma. y 2) células poco diferenciadas tienen un núcleo esférico u ovoide con un nucleolo prominente, citoplasma escaso y pocos organelos ( González del pliego y cols, 1988).

#### **OVARIO MADURO.**

Cerca de las 18 a 20 semanas de edad la gallina es sexualmente activa, su peso ovárico incrementa de 0.4 g a 2.0 g. Tiempo después hay un rápido incremento en el peso (40 a 60 g), este aumento es debido al desarrollo folicular, sin embargo, al eliminarlos la corteza y la médula sólo pesan 6 g (Gilbert, 1971).

En los animales adultos a diferencia de los jóvenes, se encuentran los folículos en diferentes etapas de desarrollo, los cuales maduran de manera cíclica para ser ovulados.

El folículo está constituido por seis regiones (de adentro hacia a fuera) : (a) la membrana vitelina, (b) membrana granulosa, (c) teca interna, (d) teca externa, (e) tejido conectivo derivado del estroma ovárico y (f) epitelio germinal (Gilbert, 1971).

#### **MEMBRANA VITELINA.**

La membrana vitelina es la membrana primaria del ovocito, deriva del ovocito y esta formada de pequeñas redes de fibras.

#### **CELULAS GRANULOSAS.**

El ovocito primordial está cubierto por las células foliculares planas, las cuales muestran poco desarrollo de organelos y RNA (Callebaut, 1975; Gray, 1976. Trabajos referidos en Jones, 1978), algunos cuerpos lipídicos compuestos de fosfolípidos y triglicéridos.

El ovocito de tamaño intermedio tiene células foliculares largas debido al desarrollo de organelos y citoplasma con un núcleo ovoide. En los folículos vitelogénicos el epitelio cambia de pseudoestratificado a una sola capa de células planas, el cual se ve acompañado por una alteración en la forma de las células de columnares a cúbicas (Well y Gilbert, 1984). La estructura pseudoestratificada del epitelio folicular se observa como una adaptación a las demandas del rápido crecimiento del ovocito.

Las funciones que se le atribuyen a las células foliculares en el ovario son secretar lípidos, glucógeno, proteínas, RNA y posiblemente DNA para nutrir al oocito, entre otras. Estas conclusiones se basan principalmente sobre consideraciones de sus características citológicas, autoradiográficas e histoquímicas.

La manera como atraviesan estas moléculas la membrana de las células foliculares y del ovocito es por difusión, pinocitosis y fagocitosis (Jones, 1978).

#### **TECA FOLICULAR.**

La membrana basal es una barrera de permeabilidad selectiva que separa a las células de la teca interna y las células granulosa.

La teca está formada por las células estromáticas, fibras de colágena, vasos sanguíneos y capilares. La vascularización y la colágena aumentan progresivamente con el crecimiento del folículo, a partir de este momento las fibras de colágena forman paquetes con un arreglo concéntrico por lo que se puede dividir anatómicamente a esta capa en células de la teca interna y células de la teca externa.

Las células de la teca interna se dividen en tres capas la primera contienen fibras de colágena, la segunda fibroblastos y la última es una capa vacuolada (Lillie, 1952)(citado en Gilbert, 1971).

La mayoría de las células de la teca interna son intersticiales, conocidas como células esteroidogénicas desarrollando retículo endoplasmático liso y mitocondrias con crestas tubulares. La teca externa está compuesta principalmente de fibroblastos y tejido conectivo. (Hiroaki y cols, 1991)

#### **TEJIDO CONECTIVO DERIVADO DEL ESTROMA OVARICO**

El folículo es cubierto por tejido conectivo que contiene músculo liso derivado del estroma ovárico y finalmente toda la masa folicular esta rodeada por el epitelio germinal (Fig. III).



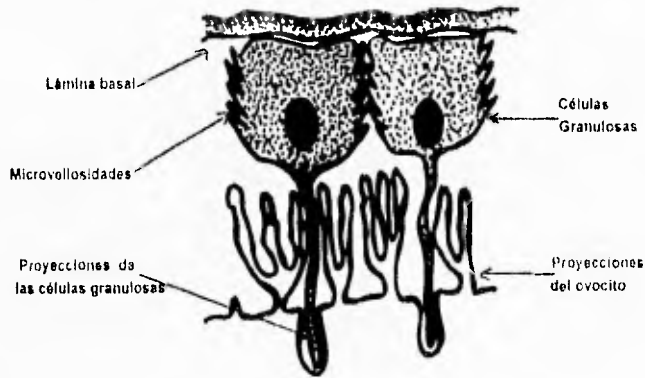
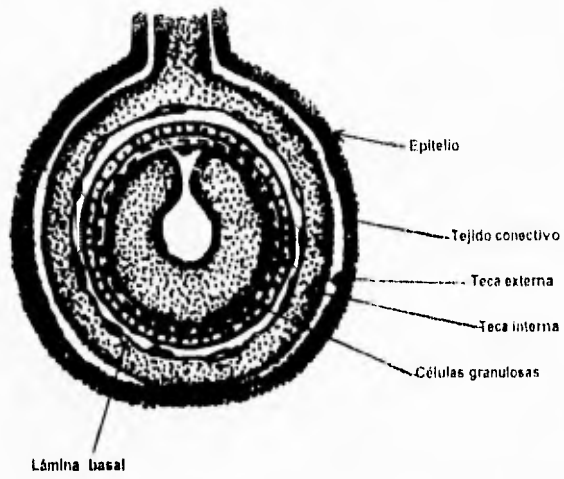


Fig. III. Esquema de las diferentes partes que componen a un folículo maduro  
 (a) estructura del ovocito- células granulosas (Gilbert, 1979)

## CICLO CELULAR.

La proliferación celular está regulada por una serie de eventos moleculares y celulares que permiten que la duplicación del material genético y la división celular ocurra de manera coordinada, la cual puede ser acelerada o frenada en diversos estadios del desarrollo, por factores de crecimiento y hormonas (Zentella, 1993).

El ciclo de vida de una célula somática tiene como finalidad generar dos células hijas idénticas con una capacidad genética equivalente a la célula madre. Cada ciclo esta formado por la interfase y la mitosis (Lewin, 1994).

La interfase es dividida a su vez en  $G_1$ , S y  $G_2$ .

1) La fase  $G_1$  inicia cuando la célula termina la mitosis, en la cual hay síntesis de RNA y proteínas pero no hay replicación de DNA.

2) La fase S (síntesis) se caracteriza porque ocurre la replicación del DNA.

3) La fase  $G_2$  o segunda fase de reposo, precede a la mitosis.

La mitosis o fase M al igual que la interfase es un proceso continuo que se divide en cuatro etapas secuenciales: profase, metafase, anafase y telofase. En la cual ocurre la división nuclear y produce dos núcleos hijos iguales.

Para que una célula pueda pasar de una fase del ciclo celular a otra necesita un sistema de regulación. Entre los factores que regulan este sistema se encuentran dos familias de proteínas: Proteína kinasa dependiente de ciclinas (Cdk) que fosforila proteínas en residuos de serina y treonina. La segunda es una familia de proteínas activadoras denominadas ciclinas que se unen a las Cdk y controlan la habilidad para fosforilar proteínas específicas en una fase particular del ciclo celular.

Las ciclinas son llamadas así por que ellas sufren una síntesis y degradación de manera cíclica en cada división celular (Alberts y cols, 1994).

Las ciclinas A y B son ciclinas mitóticas que llevan a la célula de la fase de  $G_2$  a M.

Los eventos que llevan a la célula dentro de la mitosis, son una acumulación gradual de ciclinas durante G<sub>2</sub> las cuales se unen a las Cdk formando un complejo conocido como factor de promoción de la fase M (MPF) que es característico de todas las células eucariotes.

### **CAMBIOS PROVOCADOS POR EL MPF.**

El MPF produce cambios radicales tanto directos como indirectos.

1) Los cambios directos producidos se deben a la fosforilación de componentes arquitecturales de la célula, por ejemplo en la membrana nuclear fosforila residuos de serina provocando un rompimiento de la membrana y como consecuencia la liberación de los cromosomas. Otra molécula que fosforila directamente son las histonas, se cree que está fosforilación ayuda a la condensación de los cromosomas.

2) En los cambios indirectos fosforila a otras proteínas kinasa que actúan en una cascada alterando el estado de la célula.

Las ciclinas son destruidas por proteólisis en la transición de metafase a anafase, permitiendo que la célula pueda salir de la mitosis (Lewin, 1994).

Al igual que las ciclinas mitóticas existen otras que actúan en otras etapas del ciclo como es el caso de las ciclinas D (CLN D) que se expresa en respuesta a la estimulación con factores de crecimiento en la fase temprana de G<sub>1</sub> y la ciclina E (CLN E) que indica la transición de G<sub>1</sub> a S (Zentella, 1993).

### **FACTORES DE CRECIMIENTO.**

Algunas hormonas polipeptídicas tienen actividad de factores de crecimiento, por que pueden acelerar o frenar la división celular y la síntesis de DNA.

Estas hormonas pueden ser: endocrinas, paracrinas o autocrinas. Las primeras son

las hormonas clásicas, las cuales son secretadas por células localizadas en una parte del cuerpo y atraviesan largas distancias para interactuar con sus células blanco, las hormonas paracrinan operan a cortas distancias y estimulan a sus células vecinas y las hormonas autocrinas que tienen la capacidad de regular a las células que las producen (Norman y Litwack, 1987).

Los factores de crecimiento pueden ser agrupados en base a sus efectos sobre la proliferación celular, los que la favorecen (EGF, FGF, PDGF, Insulina y IL-2) y los que inhiben (TGF $\beta$ , TNF- $\alpha$  y la IL-1). Los factores proliferativos sólo estimulan a la célula en G<sub>1</sub>, sin embargo, estos factores se dividen en factores de competencia los cuales le confieren a la célula la capacidad de entrar de nuevo al ciclo llenando de G<sub>0</sub> a G<sub>1</sub> y los de progresión que ayudan a la célula para que pase de la fase de G<sub>1</sub> a S (Zentella, 1993).

#### **FACTORES PROMITOGÉNICOS.**

##### **FACTORES DE COMPETENCIA.**

- Factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF) es un polipéptido de dos cadenas con un peso molecular de 30000 a 35000 daltons.

Se le atribuye un papel mitogénico aunque se ha encontrado que su estímulo no es suficiente para provocar síntesis de DNA y división celular.

Provoca migración celular, síntesis de proteínas y síntesis de ésteres de colesterol.

En el ovario incrementa el estímulo de la hormona folículo estimulante y con ello la formación de receptores de LH, "in vitro", aumenta la producción de progesterona.

- Factor de crecimiento epidérmico (EGF) fue aislado originalmente como una fracción de un extracto de glándula submaxilar en ratón. Está constituido por una sola cadena polipeptídica de 6045 Da., estabilizada por tres puentes disulfuro.

La fosforilación producida por la unión del ligando con su receptor produce la activación de proteínas, como la proteína *ras* que parece estar asociada al estímulo mitogénico. En las células granulosas ováricas suprime la inducción de receptores de LH dependientes de FSH, disminuye los precursores utilizados en la biosíntesis de estrógenos por inhibición de los andrógenos en las células tecales o intestinales e incrementa la maduración del oocito in vitro (Hsueh y Adashi, 1984).

- Factor de crecimiento fibroblástico (FGF) se han encontrado dos formas, la forma básica y ácida.

El FGF básico tiene un peso molecular de 43000 Da, es un agente que posee actividad mitogénica en células derivadas del mesodermo y neuroectodermo. La forma ácida (15000 a 16000 Da.) induce la proliferación de células endoteliales. En el ovario de la rata inmadura modula la esteroidogénesis ya que inhibe la síntesis de estradiol e incrementa la biosíntesis de progesterona ante el estímulo de la FSH, por lo tanto puede desarrollar las funciones del cuerpo luteo (Baird y Hsueh, 1981).

#### **FACTORES DE PROGRESION.**

- La Insulina afecta el metabolismo de los carbohidratos, lípidos, nucleótidos y amino ácidos. A parte de la insulina se encontraron dos factores de crecimiento el IGF-I y el IGF-II los cuales tienen un 45% de homología a la insulina. El IGF estimula la replicación de las células granulosas o la citodiferenciación celular (Hammond y cols, 1991).

- Interleucina 2 (IL-2) induce la proliferación de linfocitos T (en la etapa G<sub>1</sub> tardía las células T producen y secretan IL-2 necesaria para que la célula entre a S y se divida). La regulación del crecimiento por IL-2 es inespecífica ya que estimula a cualquier célula que tenga receptores para IL-2.

La IL-2 humana tiene una sola cadena polipeptídica con peso molecular de 15000 Da. (Stites, 1988).

#### FACTORES ANTIMITOGÉNICOS.

- El Factor de crecimiento transformante (TGF) se clasifica en dos tipos, TGF- $\alpha$  que se une al receptor del EGF y el TGF- $\beta$  el cual no se une a este receptor.

El TGF- $\beta$  es un dímero de dos polipéptidos (35000 Da) unidos por puentes disulfuro, inhibe de manera reversible la proliferación de células derivadas de varios orígenes embrionarios. Frena la proliferación celular en la fase tardía de G<sub>1</sub>, por la disminución en la transcripción de c-myc y la activación continua de la proteína codificada por el gen RB. Las células tecales producen TGF- $\beta$  que regula el crecimiento y diferenciación de las células granulosas e inhibe la estimulación de el EGF en las células granulosas (Dorrington y cols, 1988).

- Interferón tipo II o interferón inmune, es producido durante reacciones inmunológicas por linfocitos T, con un peso molecular de 20000 a 25000 Da. Presenta diferentes efectos celulares pero el principal es la inhibición de la proliferación celular (Zentella, 1993).

## J U S T I F I C A C I O N .

La síntesis y secreción de hormonas esteroideas han sido cuantificadas por radioinmunoanálisis e inmunocitoquímica desde etapas muy tempranas del desarrollo gonadal de las aves (Woods y Erton, 1978; Woods y Podczaski, 1978; Woods y Weeks, 1969 y Woods y cols, 1991) y se sabe que las hormonas gonadotropas LH y FSH participan en este proceso (Teng y cols, 1982).

Sin embargo, es poco conocido el efecto que tienen la FSH en el proceso de división celular en ovarios prefoliculares de aves.

Estudios previos en nuestro laboratorio han demostrado que el ovario izquierdo de las aves de 18 días de desarrollo, responden al tratamiento con hFSH lograndose un incremento en la división celular y en la secreción de 17- $\beta$  estradiol y testosterona (Perala, 1994).

Hasta el momento no se ha determinado con precisión en que momento del desarrollo gonadal de las aves se inicia la respuesta a la FSH en la división celular y esteroidogénesis.

Además por las características propias del desarrollo unilateral del ovario y del oviducto en las aves se podrían plantear las siguientes preguntas:

I) ¿En qué momento del desarrollo embrionario se inicia la respuesta a la hormona folículo estimulante, en la división celular?

II) ¿Cómo es la respuesta a la FSH en un ovario en regresión (ovario derecho) y en un ovario en desarrollo (ovario izquierdo)?.

III) ¿Cómo es la respuesta en un órgano con desarrollo bilateral (testículo)?.

IV) ¿La respuesta a las hormonas gonadotropas es dependiente del establecimiento del eje Hipotálamo-Hipófisis-Gónada?

## **O B J E T I V O S.**

- Determinar en que etapa del desarrollo gonadal la hormona foliculo estimulante (FSH) inicia la proliferación celular en el ovario prefolicular y en el testículo inmaduro de aves.

- Comparar la división celular ante el estímulo de la FSH en un ovario en regresión (ovario derecho), en un ovario en desarrollo (ovario izquierdo) y en un órgano con desarrollo bilateral (testículo) a los 8, 10, 13, 15 y 18 días del desarrollo embrionario.



## MATERIALES Y METODOS.

El material biológico ( huevos de pollo de la clase Leghorn blanca Babcock B-300) fue adquirido de la granja avícola Alpos II S.A. (Tehuacan, Puebla) e incubados en un período de 8, 10, 13, 15 y 18 días, determinando la edad exacta de los embriones por las tablas de Hamburger y Hamilton (1951).

### MATERIAL QUIMICO.

- Acido Acético concentrado ( $\text{CH}_3\text{COOH}$  Glacial) Merck, México S. A.
- Acido Tricloro Acético ( $\text{CCL}_3\text{CO OH}$ ). Merck, México S.A.
- Albumina Bovina. Sigma, St Louis MO USA.
- Azul Tripano. Sigma, México S.A.
- Carbonato de Sodio ( $\text{Na HCO}_3$ ) J.T. Baker S.A de C.V México.
- Cloruro de Sodio ( $\text{NaCl}$ ) Merck, México S.A.
- Cloruro de Potasio ( $\text{KCl}$ ) Merck, México S.A.
- Dodesil Sulfato de Sodio J.T. Baker S.A de C.V. México.
- Fosfato de potasio ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ) Baker, México S.A.
- Hormona Foliculo Estimulante (FSHh) Serono de México S.A.
- Inhibidor de Tripsina. Sigma, St Louis MO USA.
- Líquido de Centelleo. Aquasol-2 NEN Research Products. Boston.
- Medio Mínimo Esencial modificado por Dulbencco (DMEM) Gibco BRL  
Grand Island N.Y. USA.
- Metanol. Merck, México S.A.
- Penicilina- estreptomycin. In Vitro S.A.
- Tripsina. Gibco, Grand Island N.Y.

## M E T O D O S.

Se utilizó el ovario izquierdo, ovario derecho y los testículos de embriones de pollo con 8, 10, 13, 15 y 18 días de incubación para realizar cultivos primarios. Una vez que las gónadas tenían la edad requerida se realizó la disección y obtención de estas, de manera esteril en una campana de flujo laminar.

Las gónadas se colocaron con una pipeta (10 ml) en una caja petri con solución salina balanceada libre de  $Ca^{++}$  y  $Mg^{++}$  (SSB) y se lavaron una vez con esta misma solución para eliminar el excedente de sangre y tejido mesonefrico. Posteriormente las gónadas se colocaron en un tubo cónico con tripsina (0.25%) disuelta en SSB durante 10 mín. a 37°C en una atmósfera de 95% de aire y 5% de  $CO_2$  para realizar una disociación mecánico - enzimática, la actividad enzimática fue detenida agregando a la suspensión celular inhibidor de tripsina (0.50%) disuelto en Medio Mínimo Esencial modificado por Dulbecco (DMEM).

Las células obtenidas se centrifugaron por 10 mín. a 1000 r.p.m., se les eliminó el sobrenadante y el botón celular fue resuspendido y lavado dos veces más con DMEM, entre cada lavado se eliminó el sobrenadante.

Al botón celular se le agregó de 1 a 5 ml de DMEM (dependiendo del tamaño de la gónada) se les determinó la viabilidad celular por medio de la técnica de exclusión de azul tripano (Tennan, 1960).

Posteriormente se sembraron 500 000 células sobre membranas de policarbonato (1  $\mu m$  de diametro de poro) flotando sobre 2 ml de medio de cultivo.

Los grupos formados para cada una de las gónadas (ovario derecho, ovario izquierdo y testículo) quedaron de la siguiente manera:

-----  
Grupo control: DMEM + BSA + 500 000 céls.  
-----

Grupo tratado: DMEM + BSA + 500 000 céls. + FSH (0.5 UI/ml)  
-----

A los dos grupos se les adicionó 0.1  $\mu\text{Ci}$  de  $^3\text{H}$ -Timidina (100 000 c.p.m.) y se incubaron por 60 horas a 37 °C en una atmósfera de 95% de aire y 5% de  $\text{CO}_2$  para posteriormente valorar la proliferación celular por medio de la Técnica de Incorporación de Timidina.

#### **TECNICA DE COSECHA PARA MEDIR LA INCORPORACION DE TIMIDINA TRITIADA.**

- 1) Se colocó la membrana de policarbonato con el botón celular en un vial.
- 2) Cuidadosamente se agregó sobre la membrana 2 ml. de fijador (Metanol - Acido Acético 3:1) y se dejó durante 15 minutos a temperatura ambiente.
- 3) Se eliminó el fijador y se les agregó 2 ml. de ácido Tricloro Acético (TCA) al 10 % y se incubaron las células a 4°C durante una hora.
- 4) Se eliminó el TCA.
- 5) Se agregó 400  $\mu\text{l}$  de Dodesil Sulfato de Sodio (SDS) al 2% y se metieron a incubar a 60°C durante 30 minutos. Después se les adicionó 5 ml de líquido de centelleo, se agitaron con un vortex aproximadamente por 30 segundos.
- 6) Se cuantificó la timidina tritiada incorporada al cultivo en un contador de centelleo líquido (Beckman LS 6000 IC) con un 40% de eficiencia.

#### **MICROSCOPIA ELECTRONICA.**

Para determinar que tipos celulares constituyen las gónadas indiferenciadas se realizó la técnica de microscopía electrónica de transmisión.

#### **ANALISIS ESTADISTICO.**

Se utilizó un Análisis de Varianza completamente Aleatorio de dos factores y la prueba de Tukey ( $P < 0.01$ ) para determinar las diferencias significativas entre los grupos basales con respecto a los grupos tratados con FSH.

## R E S U L T A D O S.

### **PROLIFERACION CELULAR**

De acuerdo a los resultados obtenidos se puede apreciar que la FSH estimula la división celular a través del tiempo de desarrollo embrionario.

#### **Ovario Derecho.**

Los cultivos celulares de ovario derecho tratados con hFSH de los días 8, 10 y 13 de incubación presentaron diferencias significativas ( $P < 0.01$ ) en la incorporación de 3H-Timidina con respecto a los grupos basales, notándose un decremento en la respuesta al tratamiento hormonal a los 15 y 18 días, en los cuales no hubo una significancia estadística lo cual concuerda con la regresión del órgano (Fig. IV).

#### **Ovario Izquierdo.**

En el ovario izquierdo encontramos la mayor división celular en los embriones de 8, 10 y 13 días de incubación, reduciéndose aproximadamente estos valores en un 40% a los 15 y 18 días. Al ser estimulados con FSH incrementa la respuesta proliferativa a los 18 días de incubación, no presentando efecto a los 8, 10, 13 y 15 días (Fig. V). Por lo tanto de todas las edades analizadas sólo a los 18 días hay diferencias significativas debidas al tratamiento ( $P < 0.01$ ).

#### **Testículo.**

En el testículo hay dos picos de incorporación de timidina (8 y 18 días de incubación), el primero disminuye gradualmente hasta los 15 días, siendo evidente un estímulo proliferativo hasta de un 50% sobre la basal en respuesta al tratamiento hormonal en todas las edades estudiadas ( $P < 0.01$ ) (Fig. VI).

## **DESCRIPCION MORFOLOGICA.**

En el cultivo de agregados celulares de ovario prefolicular se observó una reasociación celular de la médula ovarica ya que en la parte inferior hay acúmulos de cordones celulares con características esteroideogénicas, cordones celulares con características indiferenciadas y algunos espacios que no sabemos si sean lacunares o vasculares, en el caso de la región cortical no se puede apreciar dicho reacomodo (Fig. VII).

### **Ovario Derecho.**

De todas las edades estudiadas se seleccionaron las de 10 días de desarrollo embrionario para la caracterización morfológica, ya que este es un periodo crítico para el ovario derecho debido a que está en involución a partir del noveno día de incubación, sin embargo, las células cultivadas no muestran indicios de degeneración celular, las cuales presentan abundantes mitocondrias, retículo endoplásmico y además se puede apreciar la formación de un conducto lacunar o vascular (Fig. VIII).

### **Ovario Izquierdo.**

En el caso del ovario izquierdo a los 10 días hay cordones celulares esteroideogénicos poco diferenciados con uniones celulares (desmosomas), abundantes mitocondrias y nucleólos evidentes (Fig. IX).

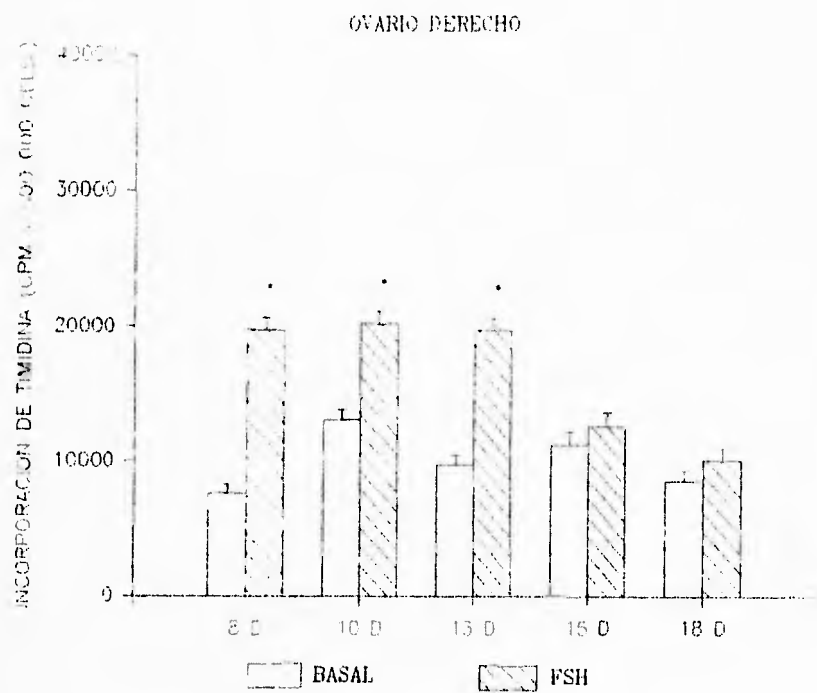


Fig. IV. Gráfica que muestra la incorporación de  $^3\text{H}$ -Timidina en grupos basales y estimulados con hFSH (media  $\pm$  E.S) de ovario derecho en embriones de pollo de diferentes edades de incubación (\*  $P < 0.01$ ).

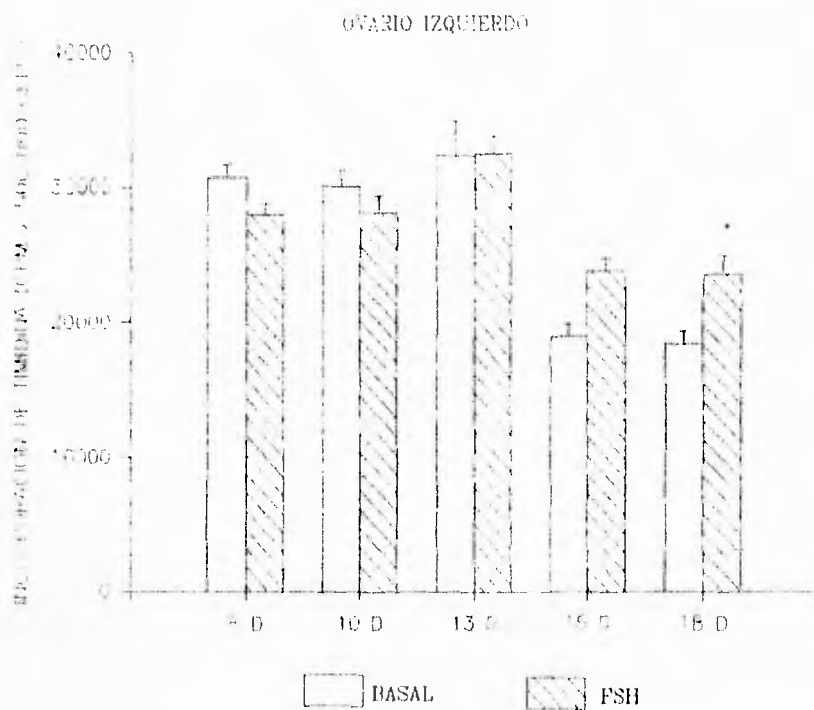


Fig. V. Gráfica que indica la cantidad de timidina incorporada (media  $\pm$  E.S.) en cultivos de agregados celulares de ovario izquierdo con 8, 10, 13, 15 y 18 días de incubación. (\* $P < 0.01$ )



TESTICULO.

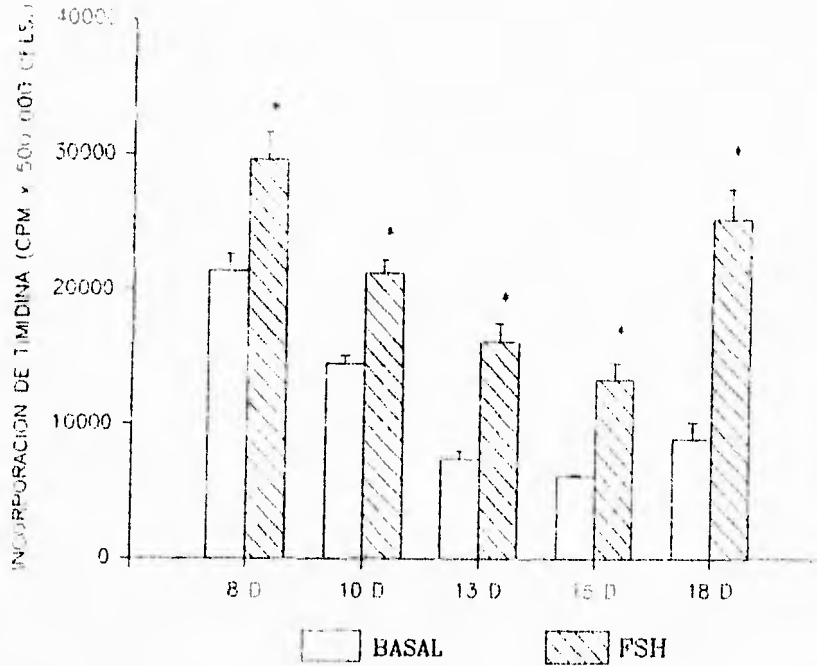


Fig. VI. Gráfica de incorporación de <sup>3</sup>H-Timidina (media ± E.S) en cultivos primarios de testículo embrionario con 7, 8, 10, 13, 15 y 18 días de incubación. (\*significancia estadística fue establecida con una P< 0.01).

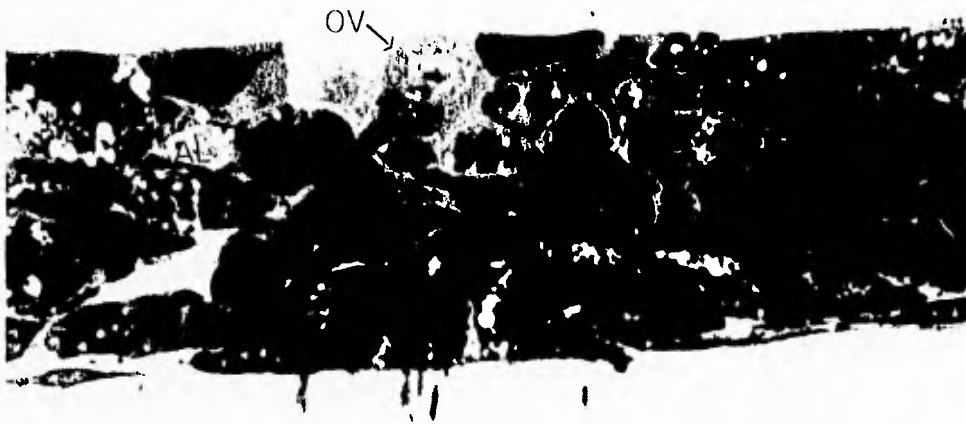


Fig VII Microfotografía de células de ovario prefolicular de embriones de pollo de 18 días de incubación cultivadas sobre membranas de policarbonato durante 60 horas. Donde se pueden observar acúmulos de células esteroidogénicas con inclusiones lipídicas (AL), ovocitos (OV) y cordones celulares poco diferenciados



Fig. VIII. Micrografía electrónica de ovario derecho con 10 días de incubación que muestra células con abundantes mitocondrias (M), retículo endoplásmico (RE), además de la formación de un conducto lacunar o vascular, que se encuentra proximo a un ovocito en migración. Apesar de que es un órgano en regresión a partir del noveno día de desarrollo no se observan procesos que indiquen cambios degenerativos en el mismo (3000 X).



Fig. IX Micrografía electrónica que muestra, parte de un acúmulo celular esteroideogénico poco diferenciado de ovario izquierdo con 10 días de desarrollo embrionario, las células presentan mitocondrias con crestas bien definidas (M), nucleolos prominentes (NP), espacios intercelulares (EI) y uniones celulares tipo desmosoma (UC). 7000 X

## DISCUSION.

El cultivo de agregados celulares de gónadas indiferenciadas sobre membranas de policarbonato es equivalente a un cultivo de órganos pues se observó una reasociación celular y por lo tanto, las interacciones entre las diferentes subpoblaciones de ovario y testículo. Aún cuando el medio de cultivo no fue suplementado con suero bovino fetal (S. B. F. ) las características morfológicas de las células cultivadas no mostraron indicios de degeneración celular, además el incremento en la incorporación de timidina en las células gonadales nos hace pensar que la fisiología de los cultivos no fue alterada .

De acuerdo a los resultados que obtuvimos la hormona foliculo estimulante provoca la proliferación celular a través del periodo de desarrollo gonadal, sin embargo la respuesta en cada gónada es diferente. Esto concuerda con los estudios hechos en mamíferos (Dorrington y cols,1988; Orth, 1984) así como en el folículo preovulatorio (F2) de la ave adulta (Yoshimura y Tamura, 1988), pero el estímulo en mamíferos no está bien claro ya que en animales inmaduros no hay respuesta a la FSH (Dorrington y cols, 1988) mientras que en los animales adultos de otras especies donde la concentración de FSH es mucho mayor si la hay (Gosporadowicz y Bialecki, 1979).

De esta misma manera en nuestro laboratorio ya se había demostrado que la adición de la FSH al medio de cultivo incrementa el número celular y la incorporación de timidina en el ovario izquierdo a los 18 días de incubación, esto fue demostrado utilizando hFSH de alta pureza (hFSH HP) y hFSH recombinante, la cual carece de acción luteinizante, siendo evidente que el efecto proliferativo se debe a la FSH y no a la LH (Velázquez y cols, 1996 en prensa).

De las tres gónadas estudiadas (ovario derecho, ovario izquierdo y testículo), la que presenta una menor incorporación es el ovario derecho, debido a que es un órgano en involución a partir del noveno día de incubación que se convierte en un rudimento no funcional al nacimiento (Teng y Teng, 1977), en el cual no va a ocurrir proliferación de la corteza ovarica (Gilbert, 1971).

El ovario izquierdo tiene una mayor proliferación celular sin embargo, no responde en los días 8, 10 y 13 al tratamiento hormonal. Probablemente este fenómeno sea debido a que en la primera mitad del desarrollo, la gónada es independiente del eje hipotálamo-hipofisario (Woods, 1987), por lo cual es posible la síntesis y producción de factores autocrinos y paracrinos que modulen su crecimiento, esto ha sido demostrado en células granulosa de mamíferos y de aves donde actúan factores de crecimiento (TGF- $\beta$  y EGF) para promover la división celular, aunque también se ha encontrado que el TGF- $\beta$  actúa de manera conjunta con la FSH y el estradiol para potenciar el estímulo proliferativo (Dorrington y cols, 1993).

Probablemente la diferente respuesta de la FSH también se deba al número de receptores (Ritzhaupt y Bahr, 1987) y su especificidad durante el desarrollo (Woods y cols, 1991) o a diferentes isoformas de adenilato ciclasa presentes en la diferenciación gonadal (Richards, 1994).

En cuanto a la diferenciación testicular las células de Sertoli son las células que tienen mayor proliferación durante el desarrollo embrionario de los mamíferos (Orth, 1982) además son las células efectoras para la FSH (Means y cols, 1980; Dorrington y Armstrong, 1979; Orth, 1984 y Dorrington y cols, 1993). De acuerdo con lo antes mencionado nosotros esperaríamos que los dos picos proliferativos que observamos a los 8 y 18 días de incubación fueran de las células de Sertoli. Sin embargo como tenemos una mezcla de todas las poblaciones testiculares, no podemos asegurar que las células que responden son estas, lo que sí aseguramos es que el estímulo que observamos se debe únicamente a la hFSH por lo tanto es necesario

caracterizar las subpoblaciones celulares que constituyen el testículo, las técnicas que resultarían adecuadas para esto son gradientes de densidad y autoradiografía.

El realizar gradientes de densidad tiene ventajas, ya que se obtienen las poblaciones celulares con alto grado de pureza que nos indicarían cuáles son las células efectoras de la hFSH. Además se podría determinar, si la interacción morfofuncional entre las diferentes subpoblaciones celulares, modula la respuesta proliferativa como se ha demostrado en el ovario izquierdo de 18 días de incubación, esto sería posible para 15 y 18 días pero en días anteriores (8, 10 y 13) debido al pequeño volumen de tejido sería apropiado emplear la técnica de autoradiografía complementada con estudios de microscopía electrónica para evaluar las características ultraestructurales de las células blanco de la hFSH.

De acuerdo con todo lo mencionado anteriormente la FSH estimula la división celular, sin embargo no sabemos que cambios provoca en el ciclo celular, posiblemente estimula una sincronización celular antes de las 36 horas de cultivo ya que en las primeras horas (3, 6, 12 y 24) muy pocas células se dividen (Velázquez y cols, 1996 en prensa), por lo tanto se necesitan realizar estudios posteriores para determinar si se acorta alguna fase del ciclo celular.

## CONCLUSIONES.

- La hFSH estimula la división celular de las gónadas durante el desarrollo embrionario.

- El ovario derecho al ser un órgano en involución sólo presenta respuesta proliferativa ante la hormona en los días 8, 10 y 13 de incubación.

- El ovario izquierdo no responde en los primeros tres días (8, 10 y 13) a la hormona, por lo tanto es posible que su respuesta sea modulada por factores autocrinos o paracrinos, o por la cantidad de receptores.

- La hFSH estimula la proliferación celular en el testículo en todas las edades estudiadas, por lo que es importante hacer una caracterización morfológica de las células efectoras a esta hormona gonadotropa.

- A pesar de que no se ha establecido el eje hipotálamo-hipófisis-gónada (HHG), nuestros resultados indican la presencia temprana de receptores para la hFSH en las membranas celulares del ovario y del testículo, evidenciado por el incremento en la incorporación de Timidina en el presente modelo.



## BIBLIOGRAFIA.

- Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. y Watson, J. D. (1994). *Molecular Biology of the Cell*. Garland Publishing, Inc. New York. 1146 pag.
- Baird, A y Hsueh, J.W. (1981). Fibroblast growth factor as an intraovarian hormone: diferencial regulation of steroidogenesis by an angiogenic factor. *Regulatory Peptides*. 16, 243-250.
- Balinsky, B.I. y Fabian, B.C. (1983). *Introducción a la embriología*. Editorial Omega. Barcelona. España. 727 pag.
- Carlton, N. Pizant, J. y Stahl, A. (1983). Mesonephric origin of the gonadal primitive medulla in chick embryos. *Anat. Embriol.* 166: 399-414.
- Carlton, N. y Stahl, A. (1985). Origin of the somatic components in chick embryonic gonads. *Archiv. Anat. micr. Morphol. exper.* 1: 52-59.
- Csaba, G., Shahin, M. A., y Dobozy, O. (1980). The overlapping effect of gonadotropin and TSH and embryonic chicken gonads. *Arch. Anat. Histol. Embriol. (Strasbourg)* 63, 31-38.
- Dorrington, H. J. y Armstrong, D. T. (1979). Effects of FSH on gonadal functions. *Recent Progress in Hormone Research*; 35, 300 - 333.
- Dorrington, H. J., Chuma, A.V. y Bendell, J. J. (1988). Transforming Growth Factor  $\beta$  and Follicle-Stimulating Hormone Promote Rat Granulosa Cell Proliferation. *Endocrinology*. 123, 353-359.
- Dorrington, J. H., Bendell, J.J. y Khan, S.A. (1993). Interactions between FSH, Estradiol-17 $\beta$  and Growth and Differentiation in the rat gonad. *Steroid Biochem. Molec. Biol.* 44 (4-6) 441 - 447.
- Gilbert, A. B. (1979). In *Form and Function in Birds*. Vol. I. (Edit. A.S. King and J. McClelland). Academic Press. London. 237 pag.
- Gilbert, S. F. (1991). *Developmental Biology*. Sinauer Associates, Inc. Sunderland, Massachusetts. 891 pag.

- Gilbert, A. B. (1971). The ovary. In physiology and biochemistry of the domestic fowl. Vol. III (Edit. Bell, D. J. y Freman, B. M.) New York. Academic Press. 1163 - 1207 pp.
  
- González del Piiego, M., González Moran, G. y Pedemera, E. (1988). Ultrastructure of the ovarian medulla in the newly hatched chick trested with human chorionic gonadotropic. Cell Tissue Res. 253, 665-670.
  
- Gospodarowick, D. y Bialecki, H. (1979). Fibrablast and epidermal grown factors are mitogenic agenis for cultured granulosa cell of rodent, porcine and human origin. Endocrinology. 104, 757.
  
- Guichard, A., Cedard, L., Mignot, Th. M. Scheid, D. y Affen, K. (1977). Radioimmunoassay of steroids produced by cultured chick embryonic gonads: differences according to age, sex, and side. General and comparative endocrinology. 32, 255 - 265.
  
- Hammond, J. M., Mondschehn, J.S., Samaras, S. E. y Canning, S.F. (1991). The ovarian Insulin-like Growth factors a local amplification mechanism for steroidogenesis and hormone action. J. Steroid Biochem. Molec. 40 (1-3) 411-416.
  
- Hall, F. P. (1988). Testicular steroid synthesis: organization and regulation. The physiology of reproduction. (Edit. Knobil, E. and Neil D. J.) Raven Press. New York. 975-995 pag.
  
- Hamburger, V., y Hamilton, H. L. (1951). A series of normal stages in the development of the chick embryo. J. Morph; 88:49 - 92.
  
- Hiroaki, N., Yoshio, O. y Janice, M. B. (1991). Multiple steroidogenic cell populations in the thecal layer of preovulatory follicle of the chicken ovary. Endocrinology. 129: 2033 - 2040.
  
- Hsueh, W. A. y Adashi, Y. E. (1984). Hormonal regulation of the differentiation of culture ovarian granulosa cells. Endocrine Reviews. 5: 76 - 127.

- Jones, R. E. (1978). *The vertebrate ovary*. Plenum Press. New York. 833 pag.
- Johnson, A. L. (1986). *Reproduction in the Male*. In *Avian Physiology* (Sturkie, P.D.). Springer - Verlag. New York. 480 pag
- Krishnan, K. A., Proudman, J. A. y Bahr, J. M. (1992). Purification and caracterization of chicken follicle- stimulating hormone. *Comp. Biochem. Physiol.* 102-B, 67 -75.
- Lake, P. E. (1971). *The Male in Reproduction*. In *Physiology and Biochemistry of the domestic fowl*. Vol III (Edit. Bell, D. J. and Freman B. M. ) New York. Academic press. 1469 - 1488 pp.
- Lewin, B. (1994). *Genes V*. Oxford University Press, Inc. New York. 1272 pag.
- Means, A. R., Dedman, J. S., Tash, J. S., Tindall, D. J., Sickle van, M. y Welsh, M. J. (1980). Regulation of the testis Sertoli cell by follicle stimulating hormone. *Annual Reviews Inn.* 42: 59 -70.
- Norman, A. W. y Litwack, G. (1987). *Hormones*. Academic Press, Inc. San Diego. 719 - 748 pag.
- Orth, J. (1982) . Proliferation of Sertoli cell in fetal and postnatal rats: A quantitative autoradiographic study. *The Anatomical record.* 203, 485-492.
- Orth, J. M. (1984). The role of Follicle-Stimulating Hormone in controlling Sertoli cell proliferation in testes of fetal rats. *Endocrinology.* 127, 1248 -1255.
- Peralta, D. I. (1994). Efecto de gonadotropinas sobre la división celular en cultivos primarios de ovarios de embriones de pollo. Tesis profesional. Facultad de Ciencias. UNAM, México.
- Pierce, J. G. y Parsons, F.T. (1981). Glicoprotein Hormones: structure and function. *Ann. Rev. Biochem.* 50: 465-95.

- Richards, J. S. (1994). Hormonal control of gene expression in the ovary. *Endocrine Reviews*, 15, 725 - 751.
  
- Ritzhaupt, L.K. y Bahr, J.M. (1987). A decrease in FSH receptors of granulosa cells during follicular maturation in the domestic hen. *Journal of Endocrinology*, 115, 303-310.
  
- Ritzén, E. M., Hansson, V. y French, S. F. (1989) The Sertoli cell. The testis. (Burger, H. and Dekretser, D.) Raven Press. 591 pp.
  
- Stites, P. D. Stobo, D. J. y Wells, V. J. (1988). *Inmunología básica y clínica. El manual moderno.* México D.F. 756 p g.
  
- Sturkie, P.D. (1968). *Fisiología Aviar.* Zaragoza, España. 607 pág.
  
- Tanabe, Y., Nakamura, T., Fujioka, K. y Doi, O. (1979). Production and secretion of sex steroid hormones by the testes, the ovary and adrenal glands of embryonic and young chickens (*Gallus domesticus*). *General and comparative endocrinology*. 39, 26 - 33.
  
- Tennant, J. R. (1960). Evaluation of trypan blue technique for the determination of cell viability. *Transplantation*. 2, 685 - 694.
  
- Teng, T.C. y Teng, S.C. (1977). The hormonal regulation of steroidogenesis and adenosine 3:5 - cyclic monophosphate in embryonic chick ovary. *J. Biochem*; 162:123 - 134.
  
- Teng, C.T., Teng, C. S., Bousfield, G. R. Lui, W. K., y Ward, D. N. (1982). Differential response of growing and regressing chicken ovaries to gonadotropic hormones. *General and Comparative Endocrinology* 48, 325 - 332.
  
- Velázquez, P. N., Peralta, D. I. y Pedernera, E. (1996). Proliferative effect in vitro of follicle-stimulating hormone on the left ovary of the chick embryo. *Gen. Comp. Endocrinol.* (artículo en prensa).

- Well, W.J. y Gilbert, A.B. (1984). Steroid hormone production by the ovary. *Physiol. Biochem. Domestic Fowl*. 5:323 - 342.
- Woods, E.J. (1987). Maturation of the Hypothalamo - Adenohypophyseal - Gonada (HAG) axes in the chick embryo. *The Journal of Experimental Zoology Supplement*. 1:265-271.
- Woods, E.J. Damianides, K.M. y Thommes, C.R. (1991). FSH- and TSH- binding cell in the ovary of the developing chick embryo. *General and Comparative Endocrinology*. 82:487-494.
- Woods, E.J. y 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. y Podczaski, E. S. (1974). Androgen synthesis in the gonads of the chick embryo. *General and Comparative Endocrinology*. 24, 413 - 423.
- Woods, J. E. y Weeks, R. L. (1969). Ontogenesis of the Pituitary - Gonadal axis in the chick embryo. *General and Comparative Endocrinology*. 13, 242 - 254.
- Yen, S. C. y Jaffe, R. B. (1991). *Reproductive Endocrinology*. W. B. Saunders Company. Phyladelphia. 940 pag.
- Yoshimura, Y. y Tamura. T. (1988). Effects of gonadotrophins, steroid hormones and epidermal grown factor on the In Vitro proliferation of chicken granulosa cells. *Poultry Science*. 67: 814 - 818.
- Zentella, A. (1993). Factores de crecimiento: un balance entre acelerar y frenar la proliferación celular. *Mensaje Bioquímico*. Vol. XVII UNAM 1 - 30 pág.

## APENDICE.

### Medio de Cultivo.

DMEM..... 10.0 g.  
Albúmina..... 1.0 g  
NaHCO<sub>3</sub>..... 3.7 g.  
Agua bidestilada..... 1000 ml.  
Rojo Fenol..... 4 - 5 gotas

### Solución Salina Balanceada (SSB) libre de Ca<sup>++</sup> y Mg<sup>++</sup>

NaCl..... 8.0 g.  
KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>..... 0.2 g.  
KCl..... 0.2 g.  
Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>..... 1.15 g.  
Agua bidestilada..... 1000 ml.

### Solución de Azul Tripano.

Azul tripano ..... 400 mg  
NaCl..... 0.81 g.  
K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>..... 0.60 g.  
Metil p-hidroxibenzoato..... 0.50 g  
Agua bidestilada..... 90 ml

### Tripsina.

0.025 g. disuelta en 10 ml de SSB libre de Ca<sup>++</sup> y Mg<sup>++</sup>

### Inhibidor de tripsina.

0.050 g. disuelto en 10 ml de DMEM.

### Metanol - Acido Acético (3 : 1)

75 ml de metanol.  
25 ml de ácido acético.

### Acido tricloroacetico (TCA)

10 g. de TCA en 100 ml de agua bidestilada.

### Dodesil Sulfato de Sodio (SDS)

2 g. de SDS en 100 ml de agua bidestilada.