

166  
2ej



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO**

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**EFFECTO DE LA HORMONA FOLICULO ESTIMULANTE  
SOBRE LAS POBLACIONES CELULARES DEL OVARIO DE  
POLLO PREFOLICULAR**

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

**B I O L O G A**

P R E S E N T A

**ESTELA TRILLO VAZQUEZ**



DIRECTOR DE TESIS: **DNA. MA. GENOVEVA GONZALEZ MORAN**



1997

FACULTAD DE CIENCIAS  
SECRETARÍA DE CIENCIAS

**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.

**EFECTO DE LA HORMONA FOLÍCULO  
ESTIMULANTE SOBRE LAS POBLACIONES  
CELULARES DEL OVARIO DE POLLO  
PREFOLICULAR**

**Estela Trillo Vázquez**

**Laboratorio de Biología de la Reproducción Animal**

**Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México**

**1997**



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

M. en C. Virginia Abrín Baule  
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 FOLICULO ESTIMULANTE SOBRE LAS POBLACIONES  
CELULARES DEL OVARIO DE POLLO PREFOLICULAR"  
realizado por ESTELA TRILLO VAZQUEZ

con número de cuenta 8129746-3 , pasante de la carrera de Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis  
Propietario  
Propietario  
Propietario  
Suplente  
Suplente

Dra. Ma. Genoveva González Morán  
Dra. Marcela Esperanza Aguilar Morales  
Biól. Miguel Angel Palomino Garibay  
M. en IBB Saul Cano Colín  
Biól. Víctor Coffe Ramírez

*[Signature]*

*[Signature]*

*[Signature]*  
*[Signature]*

FACULTAD DE CIENCIAS

*[Signature]*  
Cofundador y Director General de Biología  
M. EN C. ALEJANDRO MARTINEZ MENA

SECRETARÍA  
DE BIOLÓGICAS

# CONTENIDO

---

<b>Agradecimientos .....</b>	<b>III</b>
<b>Resumen.....</b>	<b>1</b>
<b>Introducción.....</b>	<b>3</b>
◆ <b>Sistema Endócrino.....</b>	<b>3</b>
◆ <b>Clasificación de las hormonas .....</b>	<b>6</b>
◆ <b>Mecanismo de acción de las hormonas.....</b>	<b>10</b>
- <b>Señalización a través de receptores intracelulares .....</b>	<b>10</b>
- <b>Señalización mediada por receptores de membrana .....</b>	<b>10</b>
◆ <b>Desarrollo Gonadal .....</b>	<b>13</b>
◆ <b>Morfología del Ovario .....</b>	<b>15</b>
◆ <b>Células esteroideogénicas en el ovario .....</b>	<b>20</b>
◆ <b>Esteroidogénesis ovárica en aves .....</b>	<b>22</b>
◆ <b>Biosíntesis de hormonas esteroides .....</b>	<b>24</b>
◆ <b>Bioquímica de la hormona folículo estimulante .....</b>	<b>29</b>
<b>Antecedentes .....</b>	<b>32</b>
<b>Objetivos .....</b>	<b>36</b>
<b>Hipótesis .....</b>	<b>37</b>
<b>Materiales y Métodos .....</b>	<b>38</b>
<b>Resultados .....</b>	<b>41</b>
<b>Discusión .....</b>	<b>45</b>
<b>Conclusiones .....</b>	<b>47</b>
<b>Bibliografía .....</b>	<b>48</b>

**A mis padres:**

**Dr. Augusto Trillo.**

**Gracias pa' por tu cariño, apoyo y paciencia, porque sé que me quieres.**

**Estela Vázquez.**

**Mami porque tu mejor que nadie sabe lo que este logro significa para mí. Gracias por quererme como soy y gracias también por estar conmigo siempre que te necesito. Te quiero mucho.**

**A mis hermanas.**

**Sandra y Adriana.**

**Gracias por quererme y apoyarme en tiempos difíciles. Porque su cariño y compañía estén siempre conmigo y porque pronto se cumplan todos sus deseos.**

**A ti Ana Laura, que has compartido tantos momentos importantes en mi vida. Porque a pesar de todos los obstáculos seguimos adelante en este camino.**

**A mis tías que siempre se han preocupado por las Trillo.**

**A tí Armando, porque este sea el principio de logros compartidos.**

## **AGRADECIMIENTOS**

---

**A mi directora de tesis Dra. Ma. Genoveva González Morán: Genov, gracias por tu confianza, y el gran apoyo prestado para la realización de este trabajo, pero sobre todo gracias por tu paciencia en los momentos más difíciles. ¡Lo logramos!**

**A mis sinodales:**

**Dra. Marcela Esperanza Aguilar Morales: Marce, gracias por tu amistad de tantos años.**

**Biól. Miguel Angel Palomino: gracias Miguel por tu amistad y cariño , tu sabes el esfuerzo que esto ha significado para mí.**

**Biól. Víctor Coffe Ramírez: gracias por tu amistad.**

**M en IBB Saúl Cano Colín: gracias por tu apoyo en la revisión de este trabajo.**

**A la Biól. Yuriri Bernal Cosío: Yuri gracias por tu cariño incondicional durante todo este tiempo.**

**Al Biól. Iván Proaño, gracias por tu asesoría en la computadora.**

## **RESUMEN**

---

En el presente estudio se describe el efecto que ejerce la hormona foliculo estimulante sobre las diferentes poblaciones celulares, así como en la secreción de hormonas esteroides en el ovario prefolicular de pollo.

Existen muy pocos trabajos en los que se describe el efecto de las hormonas gonadotropinas sobre el ovario prefolicular, así como sobre la síntesis de hormonas esteroides, ya que los trabajos que conciernen a este tema se han realizado básicamente en ovarios de pollos adultos y en ensayos *in vitro*.

Para la realización de este estudio se utilizaron huevos fértiles de la raza White Leghorn, los cuales se mantuvieron a 37 °C en una incubadora con humedad y temperatura constantes. Se trataron con 1 µg de hormona foliculo estimulante, los días 13, 15 y 17 de incubación. Por otra parte el grupo control se inyectó unicamente con Dulbeco el cual se empleó como medio de dilución de la hormona.

Los animales fueron sacrificados por decapitación dentro de las primeras 24 hrs. siguientes a la eclosión, la sangre fue colectada y se disecó el ovario izquierdo para realizar la disgregación celular y de esa manera cuantificar las distintas poblaciones celulares: células con inclusiones lipídicas, células sin inclusiones lipídicas y células germinales.

Mediante la prueba de "t" de Student se demostró la existencia de diferencias significativas en los parámetros evaluados (incremento en el número de las poblaciones celulares somáticas y germinales, así como el aumento de los niveles de estradiol) en los animales tratados con respecto a los controles.

Los resultados mostraron que en los ovarios de los animales tratados con FSH, se observó un aumento en las poblaciones de células con lípidos y sin lípidos, así como en las poblaciones de células germinales, lo cual se vió reflejado en un

**aumento en la síntesis de testosterona y estradiol, hormonas secretadas por las dos primeras poblaciones celulares antes mencionadas.**

**Con base en estos resultados podemos concluir que el ovario prefolicular de pollo presenta la capacidad de responder a la FSH aumentando las distintas poblaciones celulares del ovario, e incrementándose también la secreción de hormonas esteroideas.**

# **INTRODUCCIÓN**

---

## **SISTEMA ENDOCRINO**

Los organismos complejos requieren, para la regulación de sus distintas funciones de una serie de hormonas secretadas por glándulas especializadas que integran el sistema endócrino y cuya acción se manifiesta a distancia sobre otros órganos cuando son vertidas al torrente circulatorio (Ondarza, 1984).

El hipotálamo es el centro de coordinación del sistema endócrino el cual recibe e integra mensajes desde el Sistema Nervioso Central (Harvey *et al.*, 1987). En respuesta a estos mensajes el hipotálamo produce las hormonas reguladoras hipotalámicas que, a su vez, son enviadas a la glándula pituitaria, la cual se localiza por debajo del hipotálamo. Cada hormona hipotalámica regula la secreción de una hormona específica, ya sea de la región anterior o posterior de la pituitaria (Lenhinger, 1972).

En las aves el hipotálamo es una estructura pequeña que ocupa aproximadamente el 3% del volumen total del cerebro. Se localiza en la base del diencefalo por debajo del tálamo, del cual se encuentra separado dorsalmente por el surco hipotalámico. Rostral y caudalmente limita con el quiasma óptico y ventralmente limita con la eminencia media y el infundibulo (Stockell y Cunningham, 1971). Está dividido por el tercer ventrículo en dos porciones: la región anterior formada por los núcleos celulares preóptico, supraóptico y paraventricular; y la región posterior o tuberal, formada por los núcleos celulares medio posterior e infundibular (Sturkie, 1986).

En el hipotálamo se encuentran varias conexiones entre los núcleos celulares, y conexiones entre éstos con otros órganos. En las aves se han observado dos importantes nervios eferentes hipotalámicos, el tracto supraóptico-hipofisial y el

tracto tubero-hipofisial. El primero está formado por axones neurosecretores del núcleo supraóptico y del núcleo paraventricular. El tracto tubero-hipofisial está formado por fibras del núcleo infundibular y del núcleo ventromedial. El hipotálamo se conecta mediante fibras nerviosas al tracto olfatorio, al tálamo y al cerebro anterior. Recibe impulsos de diversas partes del cuerpo a través de la médula oblonga y la médula espinal (Sturkie, 1986).

La hipófisis o pituitaria ocupa una posición única dentro de los órganos endócrinos, ya que muchas de sus hormonas funcionan principalmente para regular la actividad de las glándulas endócrinas. En las aves esta glándula es una estructura pequeña, usualmente redonda y lobulada adherida por un tallo de tejido nervioso (el infundíbulo o tallo pituitario) al piso del cerebro. Está contenida en una saculación ósea en el paladar duro (Bolsa de Rathke) y está rodeada por una densa estructura de pequeños vasos sanguíneos y capilares, estos a su vez están encerrados en una fuerte cápsula de tejido fibroso que se adhiere íntimamente a los bordes de la Bolsa de Rathke y a la base del cuerpo pituitario (Sturkie, 1986). Esta glándula neuroendócrina se divide en dos partes principales, el lóbulo anterior o adenohipófisis de origen endodérmico, y la neurohipófisis o lóbulo posterior, de origen ectodérmico. En las aves no se encuentra presente el lóbulo intermedio que se observa en mamíferos, estas dos zonas se encuentran separadas por una capa de tejido conjuntivo (Stockell y Cunningham, 1971; Sturkie, 1986; Chester Jones, *et al.*, 1987).

En las aves la adenohipófisis está constituida por la pars distalis y la pars tuberalis, y como ya se ha mencionado no está presente la pars intermedia. La pars distalis constituye la mayor parte de la adenohipófisis y se sitúa ventralmente respecto a la neurohipófisis. Histológicamente la pars distalis se ha diferenciado en dos zonas: el lóbulo caudal y el lóbulo cefálico. De acuerdo a las investigaciones se considera que las células secretoras de la prolactina y de la hormona adrenocorticotrópica se encuentran situadas en el lóbulo cefálico, mientras que las células secretoras de la hormona del crecimiento se localizan en el lóbulo caudal. Se considera que las células secretoras de la hormona tirotrópica se localizan principalmente en el lóbulo cefálico, mientras que las

células secretoras de la LH se localizan en el lóbulo caudal (Chester Jones, *et al.*, 1987).

La neurohipófisis está dividida en lóbulo neural distal, tallo neural y eminencia media, estas dos últimas regiones constituyen el infundíbulo. El lóbulo neural está compuesto por fibras nerviosas que provienen de los núcleos supraóptico, paraventricular e infundibular del hipotálamo (Duncan, 1956). La eminencia media está formada por un sistema de vasos portales por donde la sangre llega a la hipófisis para transportar hormonas y nutrientes (Scanes, 1986).

La adenohipófisis se origina a partir de la Bolsa de Rathke, probablemente de ectodermo del techo de la boca, y la neurohipófisis deriva del infundíbulo (Scanes, 1986). En etapas tempranas del desarrollo (al sexto día de incubación en pollos), se produce una subdivisión de tejidos, la proliferación de éstos conlleva a la formación de diferentes zonas en la adenohipófisis del adulto: el lóbulo aboral que dará origen al lóbulo caudal y el lóbulo oral que dará origen al lóbulo cefálico. De acuerdo con datos obtenidos mediante microscopía electrónica los primeros gránulos secretores en el lóbulo cefálico aparecen al octavo día de incubación (Guedenet *et al.*, 1970).

El hipotálamo y la hipófisis forman parte del **eje hipotálamo-hipófisis-gónada**, los cuales en estadios tempranos de desarrollo embrionario en las aves son autónomos en crecimiento, diferenciación y actividad y sólo hasta después hay una integración de los mismos (Woods, 1987). El hipotálamo es autónomo al inicio del desarrollo ya que sintetiza factores liberadores (Woods *et al.*, 1985). Por otra parte, la hipófisis es capaz de sintetizar gonadotropinas antes de comunicarse vascularmente con el hipotálamo. Estudios realizados mediante técnicas de inmunohistoquímica demostraron la presencia, en hipófisis, de LH y de FSH (Gasc y Sar, 1981; Woods, *et al.*, 1985) antes de la formación del plexo porta vascular definitivo entre el hipotálamo y la hipófisis, el cual ocurre en el día 12 de incubación (Daskocil, 1970; Stritesky y Richter, 1977).

# CLASIFICACIÓN DE LAS HORMONAS

La palabra hormona deriva de un vocablo griego que significa excitar o remover. Una hormona es un mensajero químico primario que es transportado por el torrente sanguíneo hasta el tejido blanco a fin de estimular una actividad bioquímica o fisiológica específica (Lenhinger, 1972). Algunas de estas hormonas pueden ser transportadas a través del torrente sanguíneo hacia otras glándulas endócrinas como el testículo y el ovario. Estos son estimulados para que segreguen sus hormonas específicas que a su vez serán transportadas por la sangre hasta los receptores hormonales situados sobre las células o en su interior. Existe un mensajero intracelular secundario que traduce el mensaje desde el receptor de la hormona a la estructura celular específica o enzima que constituyen el último blanco (Lenhinger, 1972).

De acuerdo a su naturaleza química las hormonas se clasifican en tres grupos:

- ◆ Hormonas de naturaleza peptídica
- ◆ Hormonas derivadas de aminoácidos
- ◆ Hormonas de naturaleza esteroidea

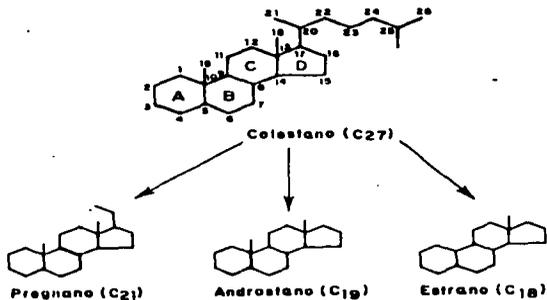
Las hormonas peptídicas pueden poseer de 3 a 200 restos aminoácidos, se incluyen a todas las hormonas del hipotálamo y las de la pituitaria así como a la insulina y el glucagon (Ondarza, 1984).

Las hormonas con función amina son compuestos pequeños solubles en agua, comprenden a la adrenalina y las hormonas tiroideas (Ondarza, 1984).

Las hormonas esteroideas son uno de los componentes fundamentales del sistema endócrino, la importancia de las mismas puede inferirse de su amplia distribución en los seres vivos. Todos los esteroides pertenecen a un grupo de sustancias químicas conocidas como terpenos o terpenoides. El núcleo básico de los esteroides son cuatro anillos aromáticos, tres ciclo hexanos (A,B,C,) y un ciclo-

pentano, toda la molécula es conocida como ciclo-pentanoperhidrofenantreno. Sobre este núcleo se agregan cadenas laterales que determinan las distintas clases de esteroides.

El compuesto de 27 carbonos ( $C_{27}$ ), con núcleo colestano y grupos metilo en posición  $C_{10}$  y  $C_{13}$  y una cadena de 8 carbonos en  $C_{17}$  corresponde al colesterol metabolito básico partir del cual se forman todas las hormonas esteroideas (Fig. 1).



**Fig. 1** Muestra la estructura del colesterol con sus cuatro anillos denominados A, B, C y D, así como la cadena de 8 carbonos en  $C_{17}$ , así como los núcleos básicos de los diferentes tipos de hormonas esteroideas (Stryer, 1988).

El colesterol se obtiene a partir de ésteres de colesterol, de colesterol almacenado intracelularmente, de lipoproteínas de baja densidad (LDL) o lipoproteínas de alta densidad (HDL), o bien sintetizado *de novo* a partir de acetato.

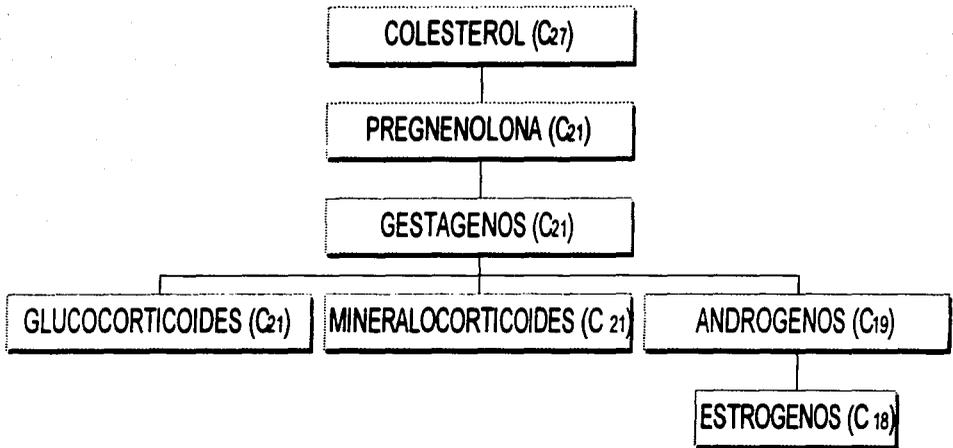
Cada tipo celular puede usar en forma preferencial una de estas fuentes, pero en general, las células esteroideogénicas del ovario obtienen el colesterol de las lipoproteínas circulantes (Gwynne y Strauss III, 1982; Rajendran *et al.*, 1983).

Hay evidencias de que las lipoproteínas tanto de baja (LDL) como de alta densidad (HDL) se unen a un receptor en la membrana celular, el complejo lipoproteína-receptor es internalizado y degradado en los complejos lisosómicos liberándose colesterol libre. El colesterol obtenido de la sangre se almacena en el citoplasma como ésteres de colesterol (Henricks, 1991).

Partiendo del colesterol se forman los compuestos de 21 átomos de carbono correspondientes al núcleo pregnano (Fig. 1), por pérdida de un segmento de la cadena lateral entre  $C_{20}$  y  $C_{22}$ . Estos compuestos por su actividad biológica se llaman progestágenos, como por ejemplo la pregnenolona, progesterona, etc. Los progestágenos dan origen a los andrógenos por pérdida de la cadena en  $C_{17}$  lo que origina los compuestos con núcleo androstano ( $C_{19}$ ) (Fig. 1). Los estrógenos pierden el grupo metilo del  $C_{10}$ , tienen 18 carbonos y su anillo A está aromatizado y su núcleo básico es el estrano (Fig. 1).

Las hormonas esteroideas se clasifican en cinco grupos: (Fig.2).

- ◆ Gestágenos: como la progesterona
- ◆ Andrógenos: como la testosterona
- ◆ Estrógenos: como la estrona y el estradiol
- ◆ Glucocorticoides: como el cortisol
- ◆ Mineralocorticoides: como la aldosterona



**Fig. 2** Representación de las principales relaciones biosintéticas de las hormonas esteroideas a partir del colesterol (Stryer, 1988).

# MECANISMOS DE ACCIÓN DE LAS HORMONAS

- **Señalización a través de receptores intracelulares:**

Como ya se ha mencionado anteriormente el sistema endócrino y el sistema nervioso central están unidos física y funcionalmente a través del hipotálamo. Esta función de puente del hipotálamo está mediada por células que tienen propiedades de células nerviosas y de células endócrinas, ya que presentan prolongaciones nerviosas y liberan a la sangre moléculas de señalización; por ello reciben el nombre de **células neuroendocrinas**.

Las hormonas esteroides así como la hormona tiroidea, por ser moléculas hidrofóbicas penetran a la célula por simple difusión a través de la membrana celular. Una vez dentro de la célula se unen a una proteína receptora del citoplasma, esta unión provoca en el receptor un cambio alostérico de mayor afinidad de unión al ADN, regulando así la transcripción de determinados genes.

Cuando los niveles de hormona son altos, la mayoría de los receptores se encuentran unidos a las moléculas de hormona, activándose la unión del **complejo hormona-receptor** con la cromatina del núcleo. Cuando los niveles de hormona son bajos la mayoría de los receptores están libres en el citoplasma.

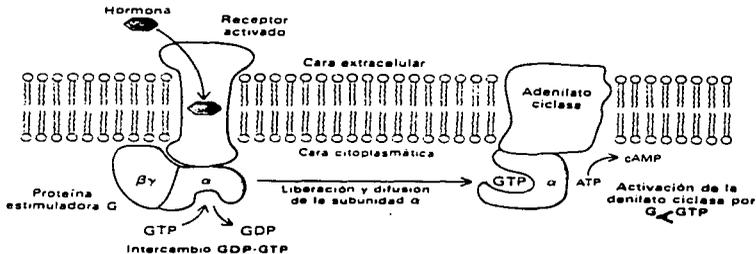
- **Señalización mediada por receptores de membrana:**

Muchas hormonas polipeptídicas como el glucagón, las hormonas FSH, LH, etc. son moléculas hidrosolubles que se unen a receptores específicos de la superficie de la membrana celular de sus células blanco. Esta señalización extracelular aumenta los niveles intracelulares de **AMP cíclico (AMP<sub>c</sub>)** obtenido a partir de ATP en una reacción catalizada por la enzima **adenilato ciclasa**. Este **AMP<sub>c</sub>** actúa dentro de la célula modificando la velocidad de uno o más procesos. Así

pues, el **AMP<sub>c</sub>** actúa como segundo mensajero en la acción de muchas hormonas, siendo el mismo ligando extracelular el primer mensajero.

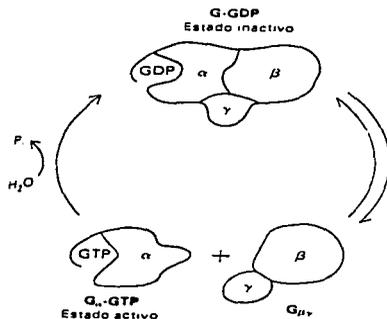
En la superficie de la membrana celular se encuentra una proteína que une nucleótidos de guanina, la cual acopla el **complejo hormona-receptor** a la **adenilato ciclasa**. Esta proteína transmisora de la señal se denomina **proteína G**. El receptor activado no estimula directamente a la **adenilato ciclasa** sino que el receptor activado estimula a la **proteína G**, la cual transmite la señal de excitación a la **adenilato ciclasa**.

La **proteína G** es una proteína de membrana periférica con tres subunidades la  $\alpha$  (45 kd), la  $\beta$  (35 kd) y la  $\gamma$  (7 kd). Esta proteína se encuentra en dos formas interconvertibles: la forma **GTP** activa a la **adenilato ciclasa**, mientras que la forma **GDP** bloquea esta activación. Cuando no hay hormona casi toda la proteína se encuentra en su forma inactiva de **GDP**, la unión hormona-receptor provoca el cambio de **GDP** a **GTP**. La subunidad  $\alpha$  que contiene **GTP** (**G $\alpha$ -GTP**) se separa de las subunidades  $\beta$  y  $\gamma$ , así la **adenilato ciclasa** se activa por medio de **G $\alpha$ -GTP**. (Fig. 3)



**Fig. 3** Esquema que muestra el proceso mediante el cual la hormona se une a un receptor de membrana que activa a la proteína G provocando el cambio de GDP a GTP unido a la subunidad  $\alpha$ , que al separarse de las otras dos subunidades, activa a la enzima adenilato ciclasa (Alberts *et al.*, 1989).

La **proteína G** actúa entonces como un intermediario para la transmisión de información entre los receptores hormonales y la **adenilato ciclasa**. El **GTP** unido a la subunidad  $\alpha$  se hidroliza lentamente a **GDP**. La velocidad de intercambio **GDP-GTP** en ausencia de hormona es muy bajo por lo que casi toda la **proteína G** se encuentra en la forma inactiva **GDP** (Fig. 4) y por lo tanto la **adenilato ciclasa** también está desactivada (Alberts *et al.*, 1989).



**Fig. 4.** Muestra la forma inactiva de la proteína G con sus tres subunidades  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$  unidas a GDP. La Forma activa de la proteína g se presenta cuando el GDP se convierte en GTP unido a la subunidad  $\alpha$ .(Alberts *et al.*, 1989).

El **AMP<sub>c</sub>** sintetizado a partir de ATP puede destruirse rápidamente en las células a través de varias enzimas llamadas fosfodiesterasas las cuales hidrolizan al **AMP<sub>c</sub>** a adenosin 5-monofosfato (5'-AMP). Estas fosfodiesterasas requieren la presencia de  $Mg^{2+}$  intracelular y es activada en algunos casos por  $Ca^{2+}$  intracelular en niveles micromolares (Alberts *et al.*, 1989).

# DESARROLLO GONADAL

Desde el punto de vista embriológico la gónada se forma por dos tipos celulares; las células somáticas de origen mesodérmico y las células germinales primordiales (**CGPs**). La localización de las **CGPs** fue estudiada por Swift (1915) a las 18 horas de incubación. En esta etapa las células se distribuyen en el endoblasto extraembrionario en forma de cresta germinal anterior y lateral al embrión. Las **CGPs** pueden diferenciarse por su forma, tamaño y bioquímica (presentan una alta actividad de la fosfatasa alcalina y son ricas en glicógeno), desempeñan un papel muy importante en la formación de las futuras gónadas. En general se acepta que las **CPGs** en los vertebrados tienen un origen extragonadal.

En las aves estas células provienen del endodermo y de la pared vitelina en la etapa de blástula (Van Thienoven A., 1983). En la mayoría de los mamíferos estas células migran hacia la futura región gonadal mediante movimientos ameboides a través de los tejidos, sin embargo, en el caso de las aves la ruta primaria para la migración se produce también vía sistema vascular (Baker, 1970) en donde las **CGPs** entran a los vasos sanguíneos por diapédesis (Gilbert, 1988), y por movimientos morfogenéticos del endófilo (Dubois, 1969; Dubois y Croiselle, 1970). En los pollos las **CPGs** están libres en el espacio entre endodermo y ectodermo, cerca de los vasos sanguíneos vitelinos. El desplazamiento de las **CGPs** se lleva a cabo alrededor de las 33 horas de incubación desde el epitelio celómico hasta la región de las futuras gónadas.

Es posible observar **CGPs** intraembrionarias antes del establecimiento de la circulación alrededor de las 33 hrs. de incubación (Schwartz y Domm, 1972), lo que indica que el movimiento vía sanguínea es secundario al que se realiza por el endófilo hacia áreas anteriores del blastodermo (Dubois y Croiselle, 1970; Hardisty, 1978). Aproximadamente a los tres días de incubación, la mayoría de las **CGPs** han dejado los vasos sanguíneos probablemente mediante movimientos ameboides (Fujimoto *et al.*, 1976), y han poblado ya el sitio gonadal. No se sabe

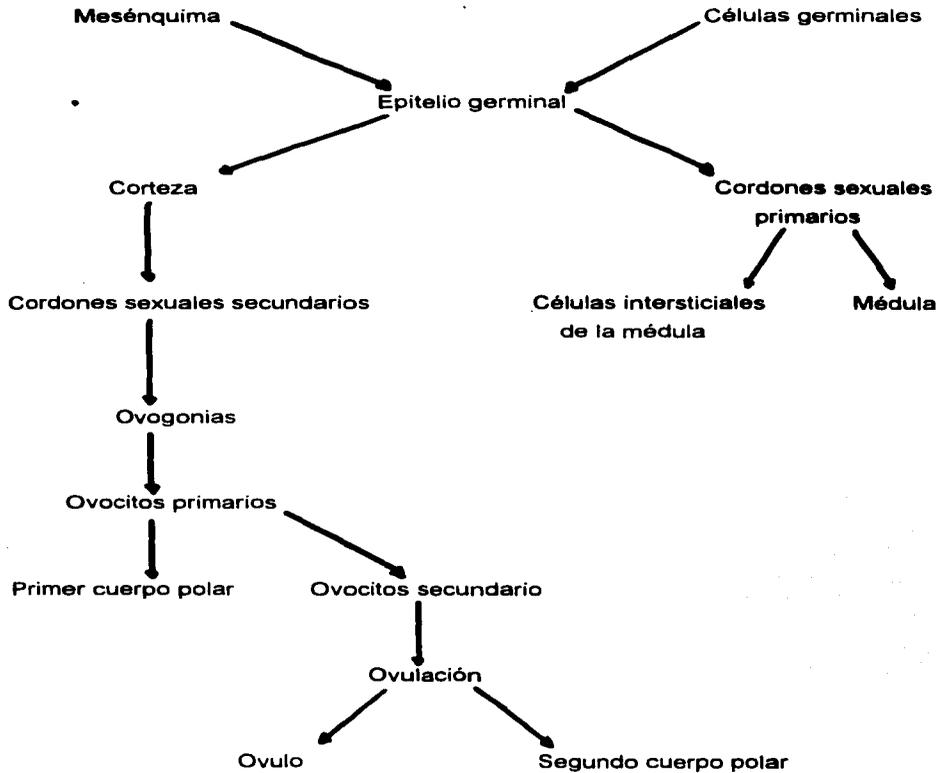
con certeza que origina que las **CGPs** abandonen los vasos sanguíneos, pero se cree que la gónada en desarrollo produce una sustancia que atraiga a las **CPGs** y las detenga en los capilares que rodean a las gónadas (Rogulska,1969). Otra posibilidad es que las células endoteliales de los capilares gonádicos tengan un componente de superficie celular que haga que las **CGPs** se adhieran a ellas específicamente. Hacia las 48 hrs. de incubación las **CGPs** llegan al mesenterio dorsal y a las crestas genitales. El transporte vascular termina entre las 90 y 120 horas de incubación (Hardisty, 1978).

## MORFOLOGÍA DEL OVARIO

En las gallinas, aunque no en todas las aves, sólo el ovario y el oviducto izquierdo son funcionales, los órganos derechos permanecen vestigiales. Aunque se han reportado ovarios y oviductos derechos, éstos rara vez son funcionales. En el embrión ambos ovarios y oviductos se desarrollan inicialmente (Bahr y Johnson, 1991); sin embargo, la hormona inhibidora de las estructuras Mülllerianas (HIM) provoca la regresión del conducto derecho. El conducto izquierdo se mantiene debido a que al parecer tiene un mayor número de receptores a estrógenos y estos a su vez parecen suprimir la acción de la HIM.

El ovario izquierdo es un órgano de color amarillento, oval y aplanado que se encuentra unido a la cavidad dorsal de la región lumbar por un ligamento mesovárico. Se encuentra por debajo y delante de los riñones, cerca de las glándulas adrenales y cubierto por una cápsula de tejido conjuntivo (Gilbert, 1971b).

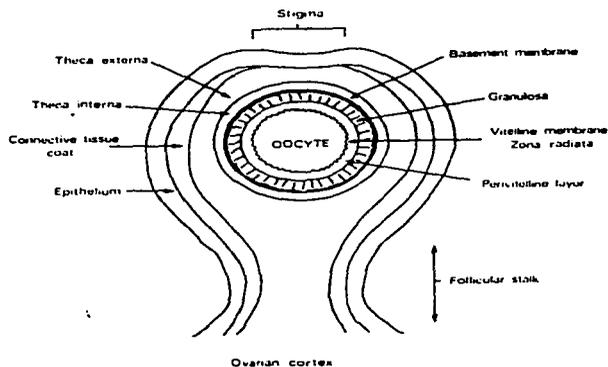
Esencialmente el desarrollo del ovario comienza en el tercer día de incubación, cuando las células primordiales germinales y las células mesenquimatosas se incorporan al epitelio germinal. Durante el 6° y 7° día de incubación se forman los cordones sexuales primarios que dan origen a la médula y a las células intersticiales de la médula. Entre los días 8 y 11 de incubación, el epitelio germinal prolifera formando la corteza y los cordones sexuales secundarios. Posteriormente se forman las ovogonias que por divisiones mitóticas originan a los ovocitos primarios. La maduración nuclear del ovocito se inicia en el folículo y se termina en el oviducto, mediante dos divisiones sucesivas. La primera división meiótica da origen al ovocito secundario y al primer cuerpo polar, y se llevan a cabo dos horas antes de la ovulación. La segunda división ocurre en el oviducto, posterior a la ovulación (Gilbert, 1971b) (Fig. 5).



**Fig. 5** Muestra la formación del ovario y la ovogénesis (Gilbert, 1971b).

Al tercer día de incubación se observa una distribución asimétrica de las células germinales, lo que origina que el ovario izquierdo sea más grande que el derecho ( Van Limborgh, 1968). Así mismo se produce una mayor colonización de la gónada izquierda, además de que existe una migración activa desde la gónada derecha a la izquierda en ambos sexos (Van Limborgh, 1968; Gilbert, 1971b).

El ovario está constituido por la médula y la corteza, separadas por una densa capa de tejido conjuntivo llamada túnica albugínea (Gilbert, 1971b). La médula se forma a partir de los cordones sexuales primarios derivados del epitelio germinal; está constituida por tejido conjuntivo, nervios y músculo liso, y al parecer es la zona de mayor vascularización del ovario. La corteza se encuentra rodeando completamente a la médula, excepto en la zona del hilio. Esta contiene a las ovogonias y a los ovocitos, y su superficie está cubierta por epitelio de tipo cuboidal (Gilbert, 1971b) (Fig. 6).



**Fig.6** Muestra un esquema de la morfología del folículo en aves, en donde en particular se observa la ausencia de antrum (Gilbert, 1971b).

Existe una proliferación secundaria del epitelio gonadal que provee de células germinales primordiales a la corteza, estas células inician una intensa actividad mitótica que se prolonga hasta el nacimiento, formando las ovogonias. Estas son células germinales grandes y redondas, más pequeñas que las células germinales primordiales, pero más grandes que las células somáticas (Hughes, 1963). Se encuentra también un tejido estromático formado por la segunda túnica albugínea que se forma en el día 14 de incubación y que aísla los cordones corticales, formando zonas separadas: el epitelio gonadal o corteza, y la médula. Posteriormente la túnica albugínea entra en regresión (Van Tienhoven, A., 1983). Así queda entonces formado el ovario inmaduro que es amarillo, plano y de forma irregular (Gilbert, 1971b).

En el ovario adulto es fácil reconocer varios grupos de folículos, los cuales pueden ser clasificados por su tamaño. El grupo más grande está formado por numerosos folículos pequeños que consisten en un ovocito cubierto por las primeras etapas de la granulosa y la teca. El siguiente grupo consiste en folículos de mayor tamaño de 1 a 3 mm. de diámetro en donde se forman los primordios de la yema. Siguen los folículos que miden entre 4 y 8 mm, que presentan mayor cantidad de yema.

Los folículos más evidentes son un grupo de 5 a 8 folículos de color amarillo que miden aproximadamente 35 mm. de diámetro. En este último grupo los folículos se clasifican de acuerdo a los días faltantes para su ovulación. Se designan como F<sub>1</sub>, F<sub>2</sub>...F<sub>5</sub>. El más grande y próximo a ovular es el F<sub>1</sub> (Wells y Gilbert, 1984).

Existe una considerable diferencia entre la estructura del folículo de mamíferos y de aves. En mamíferos el oocito es más pequeño con respecto al ovocito de aves y además se encuentra cubierta por una teca bien definida. Al momento de formación del *antrum* existe una diferenciación entre la teca interna y la teca externa. La teca interna contribuye a la síntesis de estrógenos. La granulosa es una capa multicelular y durante su crecimiento el *antrum* se desarrolla entre la masa de células, dejando la capa de la granulosa adyacente al ovocito (Wells y Gilbert, 1984).

En las aves los folículos son grandes y tienen una capa delgada de tejido conjuntivo que cubre la teca. Existe una diferenciación entre teca interna y externa, aunque las células de la teca interna no son esteroideogénicas. En su lugar las células intersticiales al parecer son las que tienen capacidad esteroideogénica. En las aves el ovocito crece masivamente. Las células de la granulosa forman una sola lámina y no se forma *antrum* (Wells y Gilbert, 1984).

# CÉLULAS ESTEROIDOGÉNICAS EN EL OVARIO

Se han publicado numerosos estudios que han apoyado la idea de la capacidad esteroideogénica de las células de la granulosa y de la teca en ovario de aves (Huang *et al.*, 1979; Hammond *et al.*, 1980; Scanes y Faglioli, 1980). En comparación con mamíferos, el folículo del pollo representa un sistema simple de esteroideogénesis, en donde la granulosa parece ser la fuente principal en la producción de progesterona (Hammond *et al.* 1980; Wells *et al.*, 1981), ya que se ha demostrado que presenta enzimas hidroxisteroide deshidrogenasas (Boucek y Savard, 1970) y la teca se considera que produce tanto andrógenos como estrógenos en folículos preovulatorios (Huang *et al.*, 1979; Marrone y Hertelendy, 1985)

Porter *et al.*, 1989 y Pedernera *et al.*, 1989, demostraron que la teca interna presenta una alta actividad secretora de testosterona dada por células típicamente esteroideogénicas (con un alto contenido de lípidos en citoplasma).

Asimismo existe una fuerte evidencia de que la teca externa de folículos preovulatorios de aves, secreta  $17\beta$  estradiol y se sabe que las células responsables de dicha secreción son células sin inclusiones lipídicas (Onagbesan y Peddie, 1989; Pedernera *et al.*, 1989). En 1965 Chieffi y Botte, mediante técnicas histoquímicas determinaron la actividad positiva de la  $17\beta$  dihidroxisteroide deshidrogenasa tanto en teca interna como en teca externa.

De lo anterior se desprende la idea de que existen dos subpoblaciones esteroideogénicas en la teca de folículos preovulatorios en ovario de pollo recién nacido (Pedernera *et al.*, 1989).

Por otra parte estudios ultraestructurales han demostrado la presencia de células esteroideogénicas en los cordones medulares del ovario embrionario de pollo a partir del octavo día de desarrollo (Narbaitz y Adler, 1966; Jordanov *et al.*, 1978). Otros investigadores afirman que las células intersticiales medulares forman

cordones de células con abundantes inclusiones lipídicas en el citoplasma (González-Morán, 1985) y presentan la ultraestructura y las características histoenzimológicas de las células esteroideogénicas (Sheib y Haffen, 1969; Jordanov *et al.*, 1978;). Las células esteroideogénicas muestran una reacción inmunohistoquímica positiva para andrógenos (Woods y Podezasky, 1974).

Utilizando precursores radiactivos *in vitro* se ha demostrado que el ovario de pollo puede producir  $17\beta$  estradiol y estrona a partir del día 7 de desarrollo embrionario (Haffen y Cedar, 1968; Weniger y Zeis, 1971; Guichard *et al.*, 1973). Utilizando métodos citoquímicos Woods y Erton, 1978, demostraron la presencia de  $17\beta$  estradiol y estrona en gónadas indiferenciadas de embriones de 3.5 días cultivadas *in vitro*.

Por otra parte Jordanov *et al.*, (1978) describen en células de la médula de ovario de 7 días de desarrollo, la presencia de células con numerosos ribosomas, escaso retículo endoplásmico rugoso, numerosas gotas lipídicas y mitocondrias con crestas tubulares, las cuales se consideran células precursoras de las células intersticiales.

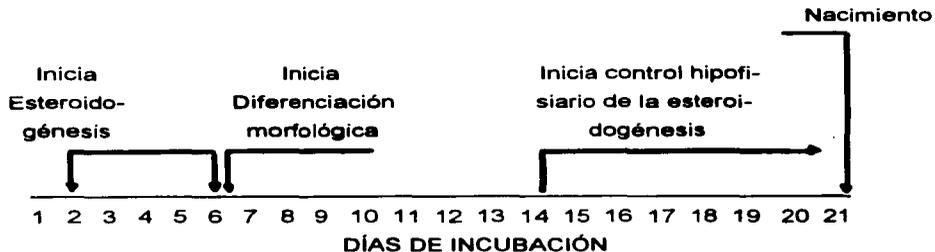
# ESTEROIDOGÉNESIS OVARICA EN AVES

Existe una amplia evidencia de que la esteroidogénesis se inicia tempranamente en las gónadas embrionarias tanto femeninas como masculinas, aunque el periodo exacto no se conoce aún (Gilbert, 1971a; Lofts y Morton, 1973). Weniger y Zeis (1971) demostraron que las gónadas producen estrógenos *in vitro* hacia el sexto día de incubación.

En el embrión la producción de hormonas en etapas tempranas del desarrollo al parecer se lleva a cabo sin intervención de la hipófisis, ya que el establecimiento del **eje hipotálamo-hipófisis-gónada** se efectúa entre el día 13 de incubación (Fugo, 1940). De esta forma el ovario es capaz de sintetizar por sí solo las hormonas esteroideas necesarias para su desarrollo. Estos datos posteriormente fueron comprobados por Woods y Weeks (1969) que haciendo estudios de trasplantes de adenohipófisis determinaron que la regulación de la esteroidogénesis gonadal por esta glándula se lleva a cabo el día 13 en machos, y el día 14 en hembras.

Mediante técnicas histoquímicas Scheib y Haffen (1969) determinaron la presencia de colesterol y sus ésteres en el tejido esteroidogénico de las aves. Así mismo se ha determinado que la enzima  $\Delta 5-3\beta$  HSD se encuentra en embriones de 2 días de incubación (Woods y Weeks, 1969; Scheib y Haffen, 1969; Narbaitz y Kolodny, 1964). Esto implica que las gónadas pueden potencialmente producir hormonas sexuales antes de que ocurra una diferenciación morfológica. Así, las hormonas producidas en etapas tempranas de desarrollo podrían desempeñar un papel importante en la diferenciación y desarrollo de las gónadas.

Se ha sugerido que la síntesis de hormonas esteroideas durante los primeros estadios de desarrollo (entre los días 2 y 6 de incubación), es importante para el desarrollo del ovario. Posteriormente la hipófisis es importante ya que regula la embriogénesis del ovario (Fig. 7).



**Fig. 7** Muestra la relación de los eventos más importantes durante la etapa embrionaria de las aves (Gübert, 1971b).

En el ovario de las aves se ha demostrado la presencia de cordones medulares bien delimitados por una lámina basal. Hacia el octavo día de desarrollo estos cordones epiteliales presentan ya una actividad esteroidogénica (Jordanov *et al.*, 1978). Entre estos cordones medulares se encuentra un sistema de conductos denominados lacunares, los cuales están delineados por una delgada lámina basal (Callebaut, 1979).

Las estructuras epiteliales se encuentran distribuidas de forma irregular en la médula del ovario de tal manera que en la región medular cercana a la corteza, llamada médula subcortical, se localizan cordones de células esteroidogénicas (células con inclusiones lipídicas en su citoplasma) rodeados de células pobremente diferenciadas (células sin inclusiones lipídicas en su citoplasma) así como vasos sanguíneos y sistema lacunar.

Se ha demostrado que las células esteroidogénicas secretan testosterona, y las células pobremente diferenciadas (sin lípidos) presentan actividad de aromatasas y producen estradiol y estrona (Alvarez-Fernández *et al.*, 1995).

# BIOSÍNTESIS DE HORMONAS ESTEROIDES

Las hormonas esteroideas son sintetizadas en un proceso en donde intervienen diversas reacciones enzimáticas que se llevan a cabo en la mitocondria y el retículo endoplásmico liso de las células de la corteza adrenal, del ovario, testículo y placenta. Las enzimas que intervienen en la síntesis de esteroides actúan sobre sustratos lipídicos solubles en la membrana interna de la mitocondria y en la membrana del retículo endoplásmico liso (Stryer, 1988).

## ◆ Biosíntesis de la pregnenolona:

Partiendo del colesterol ( $C_{27}$ ) se forman los compuestos de 21 átomos de carbono ( $C_{21}$ ). La primera etapa en la síntesis de las hormonas esteroideas es la eliminación de una unidad de  $C_6$  de la cadena lateral del colesterol para formar **pregnenolona**. La cadena lateral del colesterol se hidroxila en  $C_{20}$  y  $C_{22}$  seguido de la ruptura del enlace entre  $C_{20}$  y  $C_{22}$ , esta última reacción es catalizada por la desmolasa (Stryer, 1988). Se requieren de tres moles de  $O_2$  y de NADPH para formar un mol de **pregnenolona** (Fig. 8).

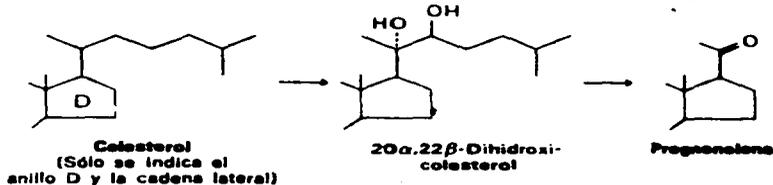


Fig. 8 Muestra la transformación del colesterol a pregnenolona pasando por 20 $\alpha$ ,22 $\beta$  dihidroxicolesterol (Stryer, 1988).

Este proceso se lleva a cabo en la membrana interna de las crestas mitocondriales en donde se incluye la participación de tres componentes:

1. Un citocromo P-450, proteína de tipo hemo que hidroxila y puede cortar las uniones C-C (P-450<sub>scc</sub>).
2. Una flavoproteína, flavina adenina dinucleótido (FAD) como transportadora de electrones.
3. Una proteína de tipo hemo, conocida como adrenoxina en la suprarrenal, que actúa como intermediario entre 1 y 2.

#### ◆ **Metabolismo de la pregnenolona:**

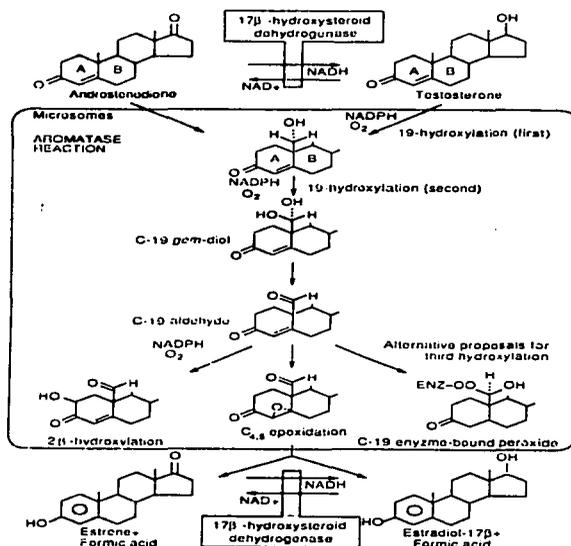
La pregnenolona puede transformarse en dos compuestos, por dos diferentes vías de biosíntesis. Una alternativa es ser transformada a progesterona, este paso requiere la participación de un complejo enzimático microsomal, la **3 $\beta$  hidroxisteroide deshidrogenasa,  $\Delta$  5-4 isomerasa ( 3 $\beta$ -HSD) .**

La otra alternativa es ser metabolizado por el complejo 17 $\alpha$  hidroxilasa, C17-20 liasa. Este complejo está en el **citocromo P-450 (P-450 C<sub>17</sub>)** que tiene la función de hidroxilar y cortar la unión C-C, como en el caso del colesterol, pero en este caso la hidroxilación es en posición C<sub>17</sub> y el corte en la unión 17-20. Los sustratos de esta enzima pueden ser **pregnenolona** y **progesterona** y los productos serán **deshidroepiandrosterona (DHEA)** o **androstenediona** respectivamente. La **DHEA** puede ser transformada a **androstenediona** por acción de la **3 $\beta$ -HSD**. La vía metabólica que va desde **pregnenolona** a **DHEA** se le conoce como  **$\Delta$ 5**, mientras que la secuencia que pasa por **progesterona** para terminar en **androstenediona** se le conoce como  **$\Delta$ 4**.

## ◆ Biosíntesis de estrógenos:

Los andrógenos ( $C_{19}$ ) pueden ser transformados a estrógenos ( $C_{18}$ ). El complejo enzimático **aromatasa** es un citocromo P-450 microsomal, que hidroxila en  $C_{19}$ , elimina el grupo metilo en  $C_{10}$  y le da la estructura aromática al anillo A.

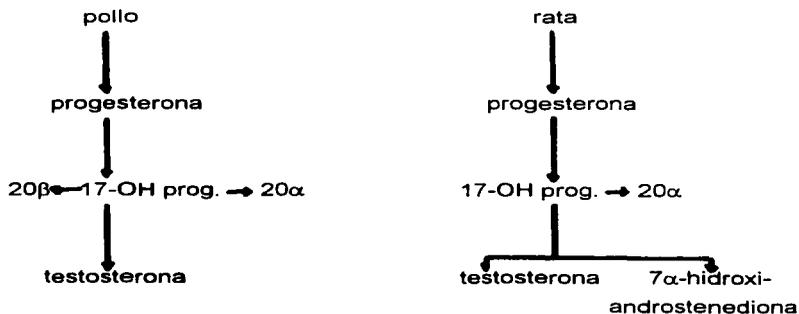
Se requieren de tres moles de  $O_2$  y de NADPH. Se observa que la enzima **17 $\beta$  hidroxisteroide deshidrogenasa** es reversible dependiendo de la presencia de sustrato o de la acumulación de producto, puede interconvertir androstenediona en testosterona o estrona en 17 $\beta$  estradiol (Fig. 9).



**Fig. 9** Muestra la síntesis de estrógenos partir de andrógenos. Se observa que la enzima 17 $\beta$  hidroxisteroide deshidrogenasa es reversible y puede interconvertir androstenediona en testosterona o bien estrona en 17 $\beta$  estradiol (Bahr y Johnson, 1991).

## • Biosíntesis de andrógenos:

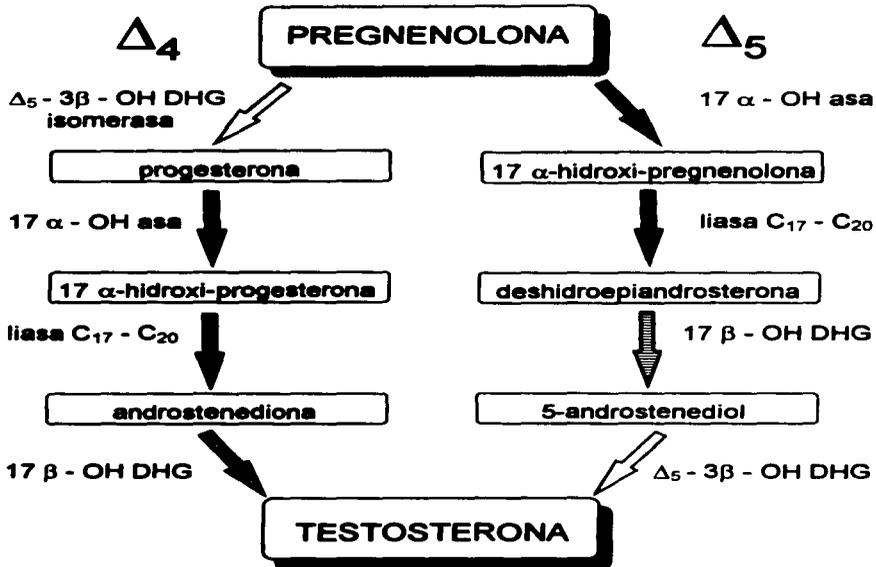
La síntesis de testosterona en *Gallus domesticus* fue estudiada por Tamaoki, (1980). En este estudio se determinó que el grupo 20-oxo de la 17 $\alpha$ -hidroxiprogestero se reduce tanto al grupo hidroxilo 20 $\alpha$  como al grupo hidroxilo 20 $\beta$  (Fig. 10). Así mismo debido a la marcada actividad de la 5 $\beta$  reductasa y la 3 $\alpha$  hidroxisteroide deshidrogenasa en testículo, la testosterona es convertida posteriormente en 5 $\beta$ -androstano-3 $\beta$ ,17 $\beta$ -diol (Tamaoki, 1980).



**Fig. 10** Muestra en diferentes especies la reducción de los grupos 20-oxo de la progesterona (Bahr y Johnson, 1991).

De acuerdo también con los estudios de Tamaoki, (1980) la testosterona se sintetiza vía  $\Delta 5$  y  $\Delta 4$  dependiendo de los cofactores de incubación (Fig. 11). Se reporta que en rata se sigue la vía  $\Delta 4$  preferentemente para la síntesis de testosterona, mientras que en humanos la vía más utilizada es la  $\Delta 5$ .

El sustrato y el producto final son los mismos entre las vías  $\Delta 5$  y  $\Delta 4$ , son los intermediarios los que resultan diferentes para cada vía.



**Fig.11** Muestra en resumen la biosíntesis de testosterona siguiendo las vías  $\Delta 5$  y  $\Delta 4$  en testículo de pollo (Stryer,1988).

# BIOQUÍMICA DE LA HORMONA FOLÍCULO ESTIMULANTE

La adenohipófisis sintetiza y secreta tres hormonas glicoprotéicas dos gonadotropinas la FSH y la LH, y la TSH.

Las hormonas gonadotropinas actúan manteniendo los procesos reproductivos como la gametogénesis, esteroidogénesis, y la ovulación (Chappel *et al.*, 1983).

La FSH es una glicoproteína sintetizada por los gonadotropos de la glándula pituitaria anterior. Está constituida por dos cadenas semejantes, una polipeptídica y una glicosilada unidas por enlaces no covalentes (Clifton, 1989). Estas cadenas llamadas  $\alpha$  y  $\beta$  se encuentran unidas por puentes que estabilizan la estructura terciaria de la molécula (Reichert y Ward, 1974; Rathnam y Saxena, 1975;) la cual es necesaria para la interacción hormona-receptor (Pierce y Parsons, 1981).

Se sugiere que la subunidad  $\alpha$  actúa estimulando a la enzima adenilato ciclasa, mientras que la subunidad  $\beta$  identifica al órgano blanco apropiado para su unión con los receptores. Así, posterior a la unión, la subunidad  $\alpha$  actúa activando a las ciclasas (Chappel *et al.*, 1983, Steiner y Cameron, 1989).

La estructura de la subunidad  $\alpha$  de las tres glicoproteínas secretadas por la pituitaria tiene básicamente la misma secuencia de aminoácidos (Rathnam y Saxena, 1975), mientras que la subunidad  $\beta$  tiene diferente secuencia para cada una de las hormonas, lo que implica una especificidad (Pierce y Parsons, 1981). En cada subunidad se encuentran diferentes grupos de carbohidratos en lugares específicos los cuales son importantes para la actividad biológica de la hormona.

Se ha comprobado que la síntesis de la subunidad  $\beta$  está regulada por moléculas

de  $\text{RNA}_m$  independientes (Chin *et al.*, 1978; Godine *et al.*, 1980, 1982) para cada una de las hormonas glicoprotéicas, mientras que las moléculas de  $\text{RNA}_m$  con la misma secuencia de bases regulan la síntesis de la subunidad  $\beta$  (Chin *et al.*, 1978; Godine *et al.*, 1980, 1982), siendo la producción de las subunidades  $7\beta$  el paso limitante en la biosíntesis de las hormonas (Godine *et al.*, 1980; Pierce y Parsons, 1981; Larrea *et al.*, 1988).

La cadena protéica de cada unidad se sintetiza de la forma clásica, es decir que el  $\text{RNA}_t$  lleva los aminoácidos a los ribosomas y el  $\text{RNA}_m$  dirige la síntesis protéica. La glicosilación requiere de la actividad de enzimas intracelulares específicas como la glicosil transferasa. Esta enzima se encuentra unida a la membrana del retículo endoplásmico rugoso.

Los primeros aislamientos de la FSH en pollo se realizaron en 1969 por Stockell y Cunningham. Posteriormente fue aislada por otros investigadores como Follet *et al.*, 1972; Scanes y Follet, 1972; Furuya e Ishii, 1974; Sakai e Ishii, 1980. La molécula está constituida por 17 aminoácidos claves para su funcionamiento (Lys, Hist, Arg, Asp, Thr, Ser, Glu, Pro, Gly, Ala, Cys, Val, Met, Ile, Leu, Tyr, Phe). La molécula es rica en ácido aspártico y ácido glutámico a diferencia de la cisteína y la metionina que se encuentran en cantidades bajas.

Sakai e Ishii (1980) determinaron el peso molecular de la FSH de pollo siendo este de 37000, Krishnan *et al.*, (1992) lo estimó en 38000. Estos resultados se ubican en los niveles determinados para el peso molecular de mamíferos estimado entre 31000 y 47900 (Hashimoto *et al.*, 1965; Reichert *et al.*, 1968; Braselton y McShan, 1970; Sakai e Ishii, 1980). La molécula de FSH es una proteína ácida cuyo punto isoeléctrico es de 4.65 (Krishnan *et al.*, 1992).

De acuerdo a Moszkowski (1949) tanto la FSH como la LH, se observan en embriones de pollo de 18 días, sin embargo otros investigadores (Fugo, 1940; Woods *et al.*, 1981; Woods, 1987;) demostraron que el establecimiento del **eje hipotálamo-hipófisis-gónada** se lleva a cabo durante los días 13.5 y 14 en machos y hembras respectivamente. Al ocurrir un estímulo externo que pueda

provocar la síntesis de factores liberadores, se lleva a cabo la regulación de la síntesis y liberación de gonadotropinas como la FSH.

## **ANTECEDENTES**

---

Estudios morfológicos e inmunohistoquímicos han demostrado que las células responsables de la producción de hormonas esteroideas hasta antes del día 13 de incubación, son al parecer las células intersticiales de la gónada situadas en la médula del ovario (Fugo, 1940; Narbaitz y Adler 1966; Jordanov *et al.*, 1978). Estas células esteroidogénicas se identifican claramente en las últimas semanas del desarrollo de los pollos; se caracterizan ultraestructuralmente porque tienen en su citoplasma mitocondrias con crestas tubulares, retículo endoplásmico liso, polirribosomas, abundantes gotas de lípidos (Jordanov *et al.*, 1978; González del Pliego *et al.*, 1988), colesterol y más específicamente presentan una reacción positiva a la  $\Delta 5\text{-}3\beta\text{-HSDH}$  (Narbaitz y De Robertis, 1968).

Las células de la granulosa de los folículos pequeños preovulatorios (F5-F2) son células blanco de la FSH ya que presentan un mayor número de receptores a dicha hormona, produciendo más progesterona que la producida por folículos preovulatorios más grandes del tipo F2 F1 (Calvo *et al.*, 1981).

Aunque existen algunos reportes referentes a las funciones de la FSH en ovarios foliculares, los trabajos concernientes al papel de dicha hormona en ovarios prefoliculares requiere aún de mayores estudios.

Con base en trabajos realizados en gallinas adultas tratadas con FSH, se ha podido observar que el número de folículos atrésicos disminuye y que aumentan los folículos en desarrollo (Bahr y Johnson, 1991). Es posible afirmar que los folículos que entran en desarrollo se ven disminuidos con la edad, debido a que también disminuyen los receptores de FSH en las células de la granulosa (Palmer, 1989).

Asimismo se han observado cuerpos celulares de FSH y LH en hipotálamo de embriones de pollo de 5.5 días de incubación (Woods *et al.*, 1981). Tanabe *et*

*al.*, 1986, han reportado altas concentraciones de LH en ovarios de pollo de entre 10 y 16 días de incubación, reportando una caída significativa en etapas cercanas al nacimiento aproximadamente al día 18; esto debido al parecer por una disminución en la actividad de la  $17\beta$  hidroxilasa por lo que se ve afectada la secreción de testosterona.

En estudios realizados por Teng *et al.*, 1982 utilizando gonadotropinas en embriones de pollo cultivados *in vitro*, reportan la respuesta tanto de ovario derecho como de ovario izquierdo en la secreción de hormonas esteroides, con un incremento en los niveles de AMPc, sin embargo observaron que el ovario izquierdo es 5 veces más sensible a las gonadotropinas con respecto al ovario derecho en regresión.

En otra serie de estudios se determinó que el ovario derecho respondía más eficientemente en la producción de testosterona respecto al ovario izquierdo al estimularse con hCG y aunque como ya se ha mencionado ambos ovarios incrementan sus niveles de AMPc, este aumenta hasta en un 80% en ovario derecho (Teng y Teng, 1977). Con base en estas observaciones concluyen que durante el desarrollo embrionario ambas gónadas responden a la hCG con un incremento en la síntesis de hormonas esteroides y por lo tanto en una acumulación de AMPc, lo que indica que el sistema adenilato ciclasa está presente y es funcional tan tempranamente como a los 8 días de incubación.

Asimismo en investigaciones realizadas por Teng y Teng, 1979, trabajando con ovarios embrionarios de pollo cultivados *in vitro*, en los que se hizo la separación de los componentes celulares del ovario en células germinales, fibroblastos y células epiteliales cultivadas por separado y con el estímulo de hCG, se evidenció que las hormonas esteroides fueron básicamente secretadas por la fracción epitelial. Estas células presentaron la misma capacidad esteroiogénica en respuesta a la hCG tanto en ovario derecho como izquierdo de 12 días de incubación, ya que produjeron aproximadamente la misma cantidad de estradiol y testosterona. De igual forma se observó que estas mismas células aunque de 15 días de incubación, redujeron su capacidad esteroiogénica, siendo este efecto

más significativo en el ovario derecho. Esto puede justificarse por el hecho de que la población de células secretoras decrece al entrar el ovario en regresión.

Por otra parte en estudios realizados utilizando eLH, oLH, oFSH, eFSH, en ovarios embrionarios de pollo cultivados *in vitro*, Teng *et al.*, 1982, observaron una mayor sensibilidad al estímulo de eLH en ambos ovarios con respecto a la FSH equina y ovina. En otros estudios realizados por Huang *et al.*, 1979 y Scanes y Faglioli, 1980, se establece que tanto la LH de mamíferos como la de aves, estimula la producción de progesterona en células de la granulosa cultivadas *in vitro*, de aquí que se sugiera que los receptores en el ovario de pollo son más sensibles a LH que a FSH. Esta habilidad de poder discriminar los receptores para FSH permanece también en el ovario derecho en regresión..

De aquí se podría desprender la idea de que en las diferentes especies de vertebrados existe una diferencia filogenética en el control de la esteroidogénesis (Licht *et al.*, 1977).; por ejemplo se puede decir que la FSH es la principal hormona esteroidogénica en reptiles (Callard y Ryan, 1977) . Al parecer la LH presenta una mayor estimulación en anfibios (Teng *et al.*, 1982). Anteriormente Maung y Follet, 1977, afirmaron que la LH era la hormona más importante para la producción de andrógenos en aves. Se ha observado también que la LH de mamíferos incrementa los niveles de progesterona y testosterona en plasma y en paredes foliculares en ovarios de aves adultas ( Teng *et al.*, 1982).

Mediante técnicas de RIA Weniger y Chouraqui, (1988), determinaron cuantitativamente niveles de estradiol en un cultivo celular de ovarios embrionarios de 7 a 18 días de incubación, en presencia y ausencia de LH bovina. De acuerdo a sus resultados determinaron que la LH estimula la secreción de estradiol en todos los estadios de desarrollo, aunque observaron un mayor aumento de hormona secretada en etapas tempranas, alcanzando su máximo nivel a los 7 días de incubación. Sugieren entonces que el número de receptores a LH decrece en etapas más avanzadas de desarrollo. Esta idea concuerda con Woods y Thommes, 1984, que reportaron la existencia de receptores en ovarios de pollo de 8.5 días de incubación.

Con base en la información anterior, se puede decir que no existen investigaciones acerca del efecto de la FSH en ovarios prefolículos realizados *in vivo*. Es por ello que se requieren de un mayor número de estudios que conlleven al conocimiento de la función de la FSH en ovarios embrionarios de pollo cultivados *in vivo*.

## **OBJETIVOS**

---

**Observar el efecto de la hormona foliculo estimulante exógena sobre la síntesis de hormonas esteroides y la variación de las distintas subpoblaciones celulares en el ovario de pollo recién nacido, tratado en etapa embrionaria.**

## **HIPÓTESIS**

---

Conociendo que el ovario de pollo sintetiza hormonas esteroideas en etapa embrionaria y que la regulación está determinada por las hormonas gonadotropinas hacia el día trece de incubación, suponemos que el ovario del embrión de pollo tratado con hormona foliculo estimulante responderá al tratamiento con cambios en la producción de hormonas esteroideas, así como con variaciones en el número de las distintas subpoblación celulares del ovario

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

Para la realización de este estudio se utilizaron embriones de pollo de la raza White Leghorn, los cuales se incubaron a 37 °C en incubadora con humedad y temperatura constantes.

Se realizó ovoscopia en el décimo día de incubación y los embriones viables se dividieron en dos grupos:

- ◆ Grupo testigo (Dulbeco)
- ◆ Grupo experimental (tratado con 1 µg de FSH)

La manipulación de los embriones siempre se llevó a cabo con material estéril y en un área también estéril.

Se limpiaron los huevos superficialmente con alcohol al 70%. Se realizó una pequeña punción con una aguja de disección en la cámara de aire de los huevos; posteriormente con una segueta se trazó una pequeña abertura triangular sobre la cáscara en posición ventral y se retiró el cascarón con extremo cuidado. Se colocó una gota de suero fisiológico estéril sobre la membrana externa y con un bulbo de goma se succionó en el orificio de la cámara de aire para bajar la membrana corioalantoidea y así poder quitar con unas pinzas la membrana externa sin dañar al embrión y a la zona vascularizada. Quedó entonces una pequeña ventana por la que se aplicaron la dosis de hormona. Tanto el orificio de la cámara de aire como el orificio triangular se sellaron con cinta adhesiva, y de nuevo se llevaron los embriones a la incubadora.

Durante los días 13,15 y 17 se aplicó 1 µl de FSH (Fertinorm HP, Laboratorios Serono México) diluida en 100 µl de Dulbeco sobre la membrana corioalantoidea, mientras que el grupo testigo fue tratado con 100 µl de Dulbeco.

La metodología se dividió en dos etapas de trabajo para la obtención de sueros y la obtención de tejido ovárico para la cuantificación celular.

Los animales fueron sacrificados por decapitación dentro de las 24 horas siguientes al nacimiento.

#### ◆ **Obtención de sueros:**

La sangre fue colectada en tubos estériles para centrifuga. Se hizo la separación del suero mediante centrifugación a 2250 rpm durante 15 minutos. La cuantificación de estradiol y testosterona en el suero sanguíneo se realizó mediante la técnica de Radioinmunoensayo RIA (Tanabe *et al*, 1979).

#### ◆ **Disgregación Celular:**

La disección de los organismos se realizó mediante una incisión medio ventral a fin de extraer el ovario izquierdo, el cuál se colocó en una solución salina de fosfatos (libre de  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$ ).

Posteriormente los ovarios se depositaron en viales individuales con 1.5 ml. de tripsina al 0.25% diluida en solución salina de fosfatos (libre de  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$ ). Se incubaron en baño de agitación (90 ciclos/ minuto) a 37°C durante 30 minutos. Con el fin de facilitar la disgregación se utilizaron pipetas Pasteur siliconizadas, con las cuáles mediante movimientos de succión se disgregó totalmente el tejido. Para detener la acción enzimática de la tripsina se añadieron 2 ml. de inhibidor de tripsina al 0.5% diluido en Dulbecco.

Se tomó una alicuota de la suspensión ovárica y se colocó en un hemocitómetro para realizar la cuantificación de las diferentes poblaciones celulares por ovario. De acuerdo a la morfología de las poblaciones celulares, éstas se dividieron en:

- ◆ Células somáticas con inclusiones lipídicas (células intersticiales diferenciadas)
- ◆ Células somáticas sin inclusiones lipídicas (células pobremente diferenciadas)
- ◆ Células germinales

Se realizó la prueba de "t" de Student para validar los resultados.

## **RESULTADOS**

---

Por el método de disgregación celular se pudieron observar tres poblaciones celulares en el ovario de pollo recién nacido: células con inclusiones lipídicas, células sin inclusiones lipídicas y células germinales. Cada una de estas poblaciones celulares puede diferenciarse de acuerdo a sus características morfológicas. Las células somáticas presentan un diámetro aproximado de 20  $\mu\text{m}$ , algunas tienen en su citoplasma inclusiones lipídicas y otras no las presentan. Las células germinales son de forma regular con un diámetro de 30  $\mu\text{m}$  o más y con un núcleo excéntrico.

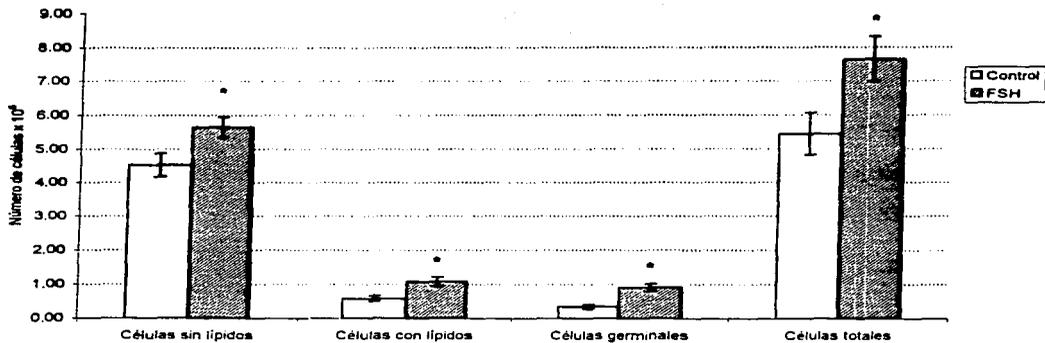
Los datos obtenidos de la cuantificación celular por ovario muestran lo siguiente:

- 1) Aumento significativo de las células con lípidos y de las células sin lípidos, en los ovarios tratados con FSH en relación con los ovarios de los animales control (Gráfica 1)
- 2) Aumento significativo en el número de células germinales en los ovarios tratados con FSH en relación con los ovarios de los animales del grupo control (Gráfica 1)

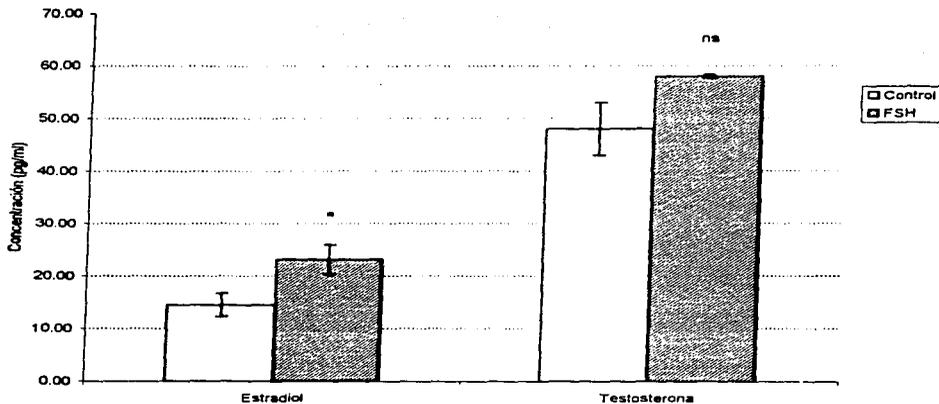
En la Gráfica 1 se puede observar que el aumento en el número de células indiferenciadas medulares (sin lípidos), es menor que el aumento de células con lípidos. Estas células sin lípidos parecen también ser estimuladas por la FSH, ya que se observan pequeñas gotas lipídicas en formación por lo que podrían convertirse en células diferenciadas típicamente esteroideogénicas.

En la Gráfica 2 se presentan los resultados obtenidos en la cuantificación de hormonas esteroideas (estradiol y testosterona) en suero. Se muestra que la concentración de estradiol en el suero de los animales tratados con FSH fue más

alta que en los controles, a diferencia de la concentración de testosterona en donde no hay variación.



**Gráfica 1. Número de células de las distintas poblaciones celulares de los ovarios de pollo recién nacidos tratados con FSH en etapa embrionaria. Los datos se representan como la media  $\pm$  error estándar. Diferencia significativa control vs FSH. \* $p < 0.05$**



**Gráfica 2. Concentraciones de estradiol y testosterona en el suero de pollos recién nacidos tratados con FSH. Los datos están representados como la media  $\pm$  error estándar. Diferencia significativa control vs FSH \* $p=0.05$ , ns = no significativa.**

## DISCUSIÓN

---

Con base en los resultados obtenidos en este estudio se demostró que el ovario de pollo prefolicular responde a la estimulación de la hormona Folículo Estimulante durante el desarrollo embrionario *in vivo*.

Se dice que en etapas tempranas del desarrollo la adenohipófisis no ejerce ninguna influencia en la secreción de hormonas esteroides (Fugo, 1940; Wolff y Haffen, 1952). Las gonadotropinas inician la estimulación de las gónadas hasta el día 13, ya que es en ese momento cuando se establece en forma funcional el eje hipotálamo-hipófisis-gónada (Woods y Weeks, 1969).

Existen trabajos previos realizados *in vitro* que demuestran que tanto el ovario izquierdo como el derecho responden al tratamiento con hormonas gonadotropinas, secretando hormonas esteroides e incrementando los niveles de AMPc, de  $17\beta$  estradiol y de testosterona (Cedar, *et al.*, 1968; Teng y Teng, 1977, 1979; Teng, *et al.*, 1982; Guichard, *et al.*, 1977, Woods, *et al.*, 1981).

Sin embargo los trabajos realizados *in vivo* en donde se ha estudiado el efecto de las gonadotropinas sobre el ovario de pollo resultan ser escasos.

Después del tratamiento con FSH se observó que existe un aumento significativo en la secreción de estradiol, hecho que se ha reportado anteriormente aunque en estudios realizados *in vitro* (Teng, *et al.*, 1982).

Los resultados muestran un incremento de las células somáticas medulares, las células con inclusiones lipídicas y las células sin inclusiones lipídicas, después del tratamiento con FSH. Posiblemente ambas poblaciones son células blanco de la FSH, para corroborar esta hipótesis sería necesario realizar estudios de inmunohistoquímica con el fin de marcar los receptores a FSH.

También se encuentra un incremento en la población de células germinales, es posible que este incremento no se deba a la acción directa de la FSH , sino a los cambios en el microambiente causado por la elevación de estradiol y de otros metabolitos por el efecto de la FSH sobre las células somáticas del ovario.

Por otra parte de acuerdo con estudios realizados por Byskov (1979), se dice que existen especies en donde en el ovario la meiosis se inicia simultáneamente con la diferenciación sexual, por lo tanto se les considera especies con meiosis inmediata, es el caso de el ratón, el cobayo y el hombre. En otras especies la meiosis puede ocurrir tiempo después de la diferenciación sexual, por lo que se dice tienen una meiosis retardada, como en el cerdo, y el conejo. Se considera además que las especies con meiosis retardada sintetizan cantidades considerables de estradiol antes de que se inicie la meiosis. Los resultados presentados en este estudio muestran un incremento significativo en las cantidades de estradiol como ocurre en las especies con meiosis retardada, lo que coincide con los estudios de Byskov (1979).

## **CONCLUSIONES**

---

- ◆ La hormona foliculo estimulante produce un incremento en el número de células somáticas medulares y células germinales en ovario de pollo prefolicular.
- ◆ El incremento en el número de células sin inclusiones lipídicas se ve reflejado así mismo en el aumento de la secreción de estradiol.
- ◆ El aumento en el número de células con inclusiones lipídicas fue significartivo sin embargo la cantidad de testosterona secretada por estas células no tuvo un incremento importante.

## BIBLIOGRAFÍA

---

- Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raft, M., Roberts, K., & Watson, J. 1989. **Molecular Biology of the Cell** 2nd ed. Garland Publishing Inc., New York- London, pp 721-752.
- Alvarez-Fernández, G., Juárez-Oropeza, M.A. & Velázquez, P. 1995. Newly hatched ovarian cell subpopulations metabolize distinctively progesterin and androgen precursors. **Gen. Comp. Endocrinol.** 97: 31-34.
- Bahr, J.M. & Johnson, P.A. 1991. Reproduction in Poultry. In **Reproduction in Domestic Animals**. 4th. edition. (Cupps, P. ed.) Academic Press, San Diego California, pp 555-575.
- Baker, T.G. 1970. Primordial Germ Cells. In **Reproduction in Mammals I. Germ Cells and Fertilization**. (Austin-Shorts eds.) Cambridge University Press, Cambridge, pp 1-13.
- Boucek, R.J., & Savard, K. 1970. Steroid formation by the avian ovary *in vitro*. **Gen. Comp. Endocr.** 15: 6-11.
- Braselton, W.E., & McShan, W.H. 1970. Purification and properties of FSH and LH from horse pituitary glands. **Arch. Biochem. Biophys.** 139: 45-58.
- Byskov, A.G. 1979. Regulation of meiosis in mammals. **Annales de Biologie Animale, Biochimie et Biophysique**. 19: 1251-1261.
- Callard, G.V. & Ryan, K.J. 1977. Gonadotropin action and androgen synthesis in enzyme dispersed testicular cells of turtle (*Chysemys picta*). **Gen. Comp. Endocrinol.** 31: 414-421.

ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA

- Callebaut, M. 1979. The avian ovary is an open organ. **Anat. Embriol.** 158:103- 119.
- Calvo, F.O., Wang, S.C., & Bahr, J.M. 1981. LH stimuable adenylyl cyclase activity follicles and the postovulatory follicle of the domestic hen during the ovulatory cycle in granulosa cells of the three largest follicles and the post-ovulatory follicle of the domestic hen (*Gallus domesticus*). **Biol. Reprod.** 25: 805-812
- Cedar, L., Haffen, K., & Guichard, A. 1968. Influence de l'hormone gonadotrope corionique sur la production d'oestrogènes á partir d'acetato de Na et de dehydroepiandrosterone radioactifs par les gonades embryonnaires de poulet, cultives *in vitro*. **C. R. Acad. Sci. Ser. D.** 267: 118-120.
- Chappel, S.C., Ulloa, A.A., & Coutiforis, C.H. 1983. Biosynthesis and secretion of Follicle Stimulating Hormone. **End. Rev.** 4(2): 179-211
- Chester-Jones, Ingleton, P.M., & Phillips, J.G. 1987. The structure and function of the hypothalamus and pituitary gland. In **Fundamentals of Comparative Vertebrate Endocrinology**. (Chester-Jones, Ingleton & Phillips. eds.) Academic Press, New York, pp 281-361.
- Chieffi, G. & Botte, V. 1965. The distribution of some enzymes involved in the steroidogenesis of hen's ovary. **Experientia.** 21:16-17.
- Chin, W.W., Habener, J.F., Keiffer, J.D. & Maloof, F. 1978. Cell free translation of the messenger RNA coding for the  $\alpha$  subunit of TSH. **J. Biol. Chem.** 255: 8780-8786.
- Clifton, D.K. 1989. The anterior pituitary. In **Text Book of Physiology Chapter 63**. (Patton, Fuchs & Hille eds.). Vol 2 .21st. edition. WB Saunders Company, Philadelphia, pp 1202-1214.

- Doskocil, M. 1970. Development of the chick hypophysis. **Acta. Univ. Carol. Med. (Praha)**. 40: 1-13.
- Dubois, R. 1969. Le mécanisme d'entrée des cellules germinales primordiales dans le réseau vasculaire chez l'embryon de poulet. **J. Embryol. Exp. Morphol.** 21: 255-270.
- Dubois, R. & Croiselle, Y. 1970. Germ cell line and sexual differentiation in birds. **Phil. Trans. R. Soc. London Ser. B**. 259: 73-89.
- Duncan, D. 1956. An electron microscope study of the neurohypophysis of a bird, *Gallus domesticus*. **Anat. Rec.** 125: 457-471.
- Follett, B.K., Scanes, C.G. & Cunningham, F.J. 1972. A radioimmunoassay for avian Luteinizing Hormone. **J. Endocrinol.** 52: 359-378.
- Fugo, N.W. 1940. Effects of hypophysectomy in the chick embryo. **J. Exp. Zool.** 85: 271-297.
- Fujimoto, T.; Keshima, A. & Kiyofuji, R. 1976. The origin migration and Morphology of the Primordial Germ Cells in the chick embryo. **Embriology. Anat. Rec.** 185: 139-154.
- Furuya, T. & Ishii, S. 1974. Separation of chicken adenohipophysial gonadotropins. **Endocrinol. Japan.** 21: 329-334.
- Gasc, J.M. & Sar, M. 1981. Appearance of LH immunoreactive cells in the Rathke's pouch of the chicken embryo. **Differentiation.** 20: 77-80.
- Gilbert, A.B. 1971a. The endocrine ovary in reproduction. In **Physiology and Biochemistry in the Domestic Fowl.** (Bell-Freeman eds.) Vol. 3. Academic Press, London, pp. 1449-1464.

- Gilbert, A.B. 1971b. The ovary in reproduction . In **Physiology and Biochemistry in the Domestic Fowl.** (Bell-Freeman eds.) Vol. 3. Academic Press, London, pp. 1163-1202.
- Gilbert, S.F. 1988. **Biología del Desarrollo.** Omega S.A., Barcelona, pp 664-701.
- Godine, J.E.; Chin, W.W. & Habener, J. F. 1980. Lutinizng and follicle stimulating hormones, cell free translations of mesangers RNA's coding for subunit precursors. **J. Biol. Chem.** 255: 8780-8788.
- Godine, J. E.; Chin, W. W. & Habener, J. F. 1982.  $\alpha$  subunit of rat pituitary glucoprotein hormones. Primary structure of the precursor determined from the nucleotid sequence of cloned cDNA's. **J. Biol. Chem.** 257: 8368-8373.
- González del Pliego; González-Morán, G. & Pedernera, E. 1988. Ultrastructure of the ovarian medulla in the newly hatched chick treated with human chorionic gonadotropin. **Cell Tiss. Res.** 253: 665-670.
- González-Morán, M., González del Pliego, Pedernera, E. 1985. Morphological changes in the ovary of newly hatched chickens treated with chorionic gonadotropin during embryonic development. **Gen. Comp. Endocrinol.** 59: 162-167.
- Guedenet, J.C.; Grignon, G. & Franco, N. 1970. Etude eritique de la mise en evidence des cellules a grains glycoprotediques de l'adénohypophyse chez le poulet au cours de la vie embryonnaire et de a période postnatale. **Electron Microsc. Prog. Int. Congr III**,565.
- Guichard, A.; Cedar, L. & Haffen, K. 1973. Aspect comparatif de la synthèse de steroïdes sexuels par les gonades embryonnaires de poulet á différents stades du développement (étude en culture organotypique á partir de pré-curseurs radioactifs). **Gen. Comp. Endocrinol.** 20: 16-28.

- Guichard, A.; Cedar, L. ; Mignot, T.M. ; Sheib, D. & Haffen, K. 1977. Radioimmunoassay of steroids produced by cultered chick embryonic gonads: Difference acording to age, sex and side. **Gen. Comp. Endocrinol.** 32: 255-265.
- Gwynne, J.T. & Strauss III, J.F. 1982. The role of lipoproteins in steroidogenesis glands. **Endocrine Rev.** 3: 299-329.
- Haffen, K. & Cedar, L. 1968. Etude, en culture organotypique *in vitro*, du métabolisme de la déhydroépiandrostérone et de la testostérone radioactives, par les gonades normales et intersexuées de l'embryon de poulett **Gen. Comp. Endocrinol.** 11: 220-234.
- Hammond, R.W.; Tod, T. & Hertelendy, F. 1980. Effects of mammalian gonadotropins on progesterone release and cyclic nucleotide production by isolated avian granulosa cells. **Gen. Comp. Endocrinol.** 41: 467-476.
- Hardisty, M.W. 1978. Primordial germ cells and the Vertebrate germ line. In **The Vertebrate Ovary.** (Jones, R.E. ed.) Plenum Press, New York/London, pp 1-37.
- Harvey, S.; Scanes, C. & Phillips, J. 1987. Avian Reproduction. In **Fundamentals of Comparative Vertebrate Endocrinology.** (Chester-Jones; Ingleton & Phillips eds.). Academic Press, New York, pp.125-185.
- Hashimoto, C.; McShan, W.A. & Meyer, R.K. 1965. Preparation of follicle-stimulating hormone from sheep pituitary glands. **Biochem. Biophys. Acta.** 21: 120-125.
- Henricks, D.M. 1991. Biochemistry and Physiologie of the gonadal hormones. In **Reproduction in Domestic Animals.** 4th. edition (Cupps, P. ed.) Academic Press, San Diego California, pp 576-590.

- Huang, E.S.; Kao, K.J. & Nalbandov, A.V. 1979. Synthesis of sex steroids by cellular components of chick follicles. **Biol. Repr.** 20: 454-461.
- Hughes, G.C. 1963. The population of germ cells in the developing female chick. **J. Embriol. Exp. Morphol.** 11: 513-536.
- Jordanov, J.; Angelova, P.; Boyadjieva, A. & Bakalska, M. 1978. Ultrastructure of developing interstitial cells in chick embryonic gonad in relation to their genesis and steroidogenic function. **Z Mikrosk. Anat. Forsh.** 92: 449-464.
- Krishnan, K.A.; Proudman, J.A. & Bahr, J.M. 1992. Purification and characterization of chicken follicle-stimulating hormone. **Comp. Biochem. Physiol.** 103B: 67-75.
- Larrea, F., Oliart, R., Escorza, A., Valencia, X. y Ulloa-Aguirre, A. 1988. Mecanismo de acción de las gonadotropinas hipofisarias y regulación hormonal de la esteroidogénesis. **La Rev. Invest. Clín. (México)** 40: 33-45.
- Licht, P., Papkoff, H., Farmer, S.W., Muller, C.H., Tsuii, H.W. & Crew, D. 1977. Evolution in gonadotropin structure and function. **Rec. Progr. Horm. Res.** 33: 169-248.
- Lenhninger, A.L. 1972. **Bioquímica. Las bases moleculares de la estructura y función celular.** Omega, Barcelona, pp 580-595.
- Lofts, B. & Morton, R.K. 1973. Reproduction in birds. In **Avian Biology.** Vol. 3 (Farner-King eds.) Academic Press, New York, pp 1-107.
- Marrone, B.L. & Hertelendy, F. 1985. Decreased androstenedione production with increased follicular maturation in theca cells from the domestic hen (*Gallus domesticus*). **J. Reprod. Fert.** 74: 543-550.

- Maung, Z.W. & Follet, B.K. 1977. Effects of chicken and ovine luteinizing hormone on androgen release and cyclic AMP production by isolated cells from the quail testes. **Gen. Comp. Endocrinol.** 33: 242-253.
- Moszkowski, A. 1949. Pouvoir corticotrope et gonadotrope de l'hypophyse de l'embryon de poulet. **Comp.Rend. Soc. Biol.** 143: 1332-1338.
- Narbaitz, R. & Kolodny, L. 1964.  $\Delta 5-3\beta$  hidroxisteroid dehydrogenase in differentiating chick gonads. **Z. Zellforsch.** 63: 612-617.
- Narbaitz, R. & Adler, R. 1966. Submicroscopical observations on the differentiation of chick gonads. **J. Embryol. Exp. Morph.** 16: 41-47.
- Narbaitz, R. & De Robertis, E.M. 1968. Postnatal evolution of steroidogenic cell in the chick ovary. **Histochemie.** 15: 187-193.
- Onagbesan, O.M. & Peddie, M.J. 1989. Calcium-dependent stimulation of estrogen secretion by FSH from theca cells of the domestic hen (*Gallus domesticus*). **Gen. Comp. Endocrinol.** 75: 177-186.
- Ondarza, R.N. 1983. **Biología Moderna.** Octava Edición. Trillas, México, pp 235-250.
- Palmer, S.S. 1989. Follicle stimulating hormone and steroidogenesis in ovarian granulosa cells during aging in the domestic hen. Ph. D. dissertation. University of Illinois.
- Pedernera, E., Velázquez, P., Gómez, Y. & González del Pliego. 1989. Isolation of steroidogenic cell subpopulations in the follicular theca of the ovary in the domestic fowl. In **Growth Factors and the Ovary** (Hirshfield, A.N. ed.) Plenum, New York, pp 351-355.

- Pierce, J.G. & Parsons, T.F. 1981. Glicoprotein hormones structure and function. **Ann. Rev. Biochem.** 50: 465-495.
- Porter, T.E., Hargis, B.M., Silsby, J.L. & El Halawani, M.E. 1989. Differential steroid production between theca interna and theca externa cells: A three-cell model for follicular steroidogenesis in avian species. **Endocrinology.** 125: 109-116.
- Rajendran, K.C., Hwang, J. & Menoir, K. 1983. Binding degradation and utilization of plasma high density and low density lipoproteins for production in cultured rat luteal cells. **Endocrinology.** 112: 1746-1753.
- Rathnam, P. & Saxena, B. 1975. Primary aminoacid sequence of FSH from human pituitary glands. I.  $\alpha$  Subunit. **J. Biol. Chem.** 250: 6735-6740.
- Reichert, L. E. Kathan, R. H. & Ryan, R.J. 1968. Studies on the composition and properties of immunochemical grade human pituitary follicle-stimulating-hormone, comparison with LH. **Endocrinology.** 82: 109-114.
- Reichert, L.E. & Ward, D.N 1974. On the Isolation. and characterization of the  $\alpha$  and  $\beta$  subunits of human pituitary FSH. **Endocrinology.** 94: 655-659.
- Rogulska, T. 1969. Primordial germ cells in normal and transected duck blastoderms. **J. Embryol Exp. Morphol.** 20: 247-260.
- Sakai, H. & Ishii, J. 1980. Isolation and characterization of chicken follicle-stimulating hormone. **Gen. Comp. Endocrinol:** 42: 1-8.
- Scanes, C.G. & Follet, B.K. 1972. Fractionation and assay of chicken pituitary hormones. **Brit. Poult. Sci.** 13: 603-610.

- Scanes, C.G. & Faglioli, J.H. 1980. Effects of mammalian and avian gonadotropins on *in vitro* progesterone production by avian ovarian granulosa cells. **Gen. Comp. Endocrinol.** 41: 1-17.
- Scanes, C.G. 1986. Pituitary Gland. In **Avian Physiology** 4th. Edition (Sturkie, P. D. ed.) Springer-Verlag, New York, pp 383-401.
- Sheib, D. & Haffen, K. 1969. Apparition et localisation des hydroxystéroïde deshydrogénases ( $\Delta^5-3\beta$  et  $17\beta$ ) dans les gonades de l'embryon et du poussin de la caille. Etude histoenzymologique et comparaison le poulet. **Gen. Comp Endocrinol.** 12: 586-597.
- Schwartz, W.J. & Domm, L.V. 1972. A study on division of primordial germ cells in the early chick embryo. **Am. J. Anat.** 135: 51-70.
- Steiner, R. A. & Cameron, J. L. 1989. Endocrine Control of Reproduction. In **Textbook of Physiology Vol. 2.** (Patton -Fuchs-Hille eds.) 21st. Edition W.B. Saunders Company, Philadelphia, pp 1289-1342.
- Stockell, H. & Cunningham, F.J. 1971. The Pituitary gland. In **Avian Physiology** (Sturkie, P.D. ed.) 4th edition. Springer-Verlag, New York, pp 383-401.
- Stockell, H. & Cunningham, F.J. 1969. Purification of chicken pituitary follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone. **J. Endocrinol.** 43:609-619.
- Stritesky, J. & Richter, Z. 1977. Contribution to the problem of the vascularization of the hypophysis cerebri in the chick embryo. **Morphol. Cong. Folia.** XXV: 324-328.
- Stryer, L. 1988. **Bioquímica.** 3a. Edición Reverté, Barcelona, pp 553-580.
- Sturkie, P.D. 1986. **Avian Physiology.** 4th ed. Springer-Verlag. New York, pp 403-431.

- Swift, C.H. 1915. Origin of the definitive sex-cells in the female chick and their relation to the primordial germ cells. **Amer. J. Anat.** 18: 441-470.
- Tamaoki, B. 1980. Biosynthesis and conversion of androgens in nonmammalian vertebrates in steroids and their mechanism of action. In **Nonmammalian vertebrates** ( Del Rio-Brachet eds.) Raven Press, New York, pp 1-15.
- Tanabe, Y., Takao, N., Fuyiokak, Y. & Doi, O. 1979. Production and secretion of sex steroids hormones by the testes, the ovary, and adrenal glands of embrionic and young chicken (*Gallus Domesticus*). **Gen. Comp. Endocrinol.** 39: 26-33.
- Tanabe, Y., Saito, N. & Nakamura, T. 1986. Ontogenetic steroidogenesis by testes, ovary and adrenals of embryonic and postembryonic chickens (*Gallus domesticus*). **Gen. Comp. Endocrinol.** 63: 456-463.
- Teng, C.T.; & Teng, C.S. 1977. Studies on sex organ development: The hormonal regulation of steroidogenesis and adenosine 3'5' cyclic monophosphate in embryonic chick ovary. **Biochem. J.** 162: 123-134.
- Teng, C.T. & Teng, C.S. 1979. Studies on sex organ development: The hormonal regulation of steroidogeneis and adenosin 3'5' cyclic monophosphate in embryonic chick ovary. **Biochem. J.** 162: 1223-134.
- Teng, C.T., Teng, C.S., Bousfield, G.R., Liu, W.K. & Ward, D.N. 1982. Differential response of growing and regressing chicken ovaries to gonadotropic hormones. **Gen. Comp. Endocrinol.** 48: 325-332.
- Van Limborgh, J. 1968. Le premier indice de la différenciation sexuelle des gonades chez l'embryon de poulet. **Arch. Anat. Microsc. Morphol. Exp.** 57: 79-90.

- Van, Tienhoven, A. 1983. **Reproductive Physiology of Vertebrates**. Cornell University Press, New York, pp 495-510.
- Wells, J.W., Dick, H.R. & Gilbert, A.B. 1981. The biosynthesis of progesterone by fowl granulosa cells *in vitro* from C<sub>14</sub> labelled substrates. **J. Steroid. Biochem.** 14: 651-656.
- Wells, J.W. & Gilbert, A.B. 1984. Steroid hormone production by the ovary. In **Physiology and Biochemistry of the domestic fowl. Vol 5** (Freeman ed.) Academic Press, New York, pp 323-341.
- Weniger, J.P. & Zeis, A. 1971. Biosynthese d'œstrogènes par les ébauches gonadiques de poulett. **Gen. Comp. Endocrinol.** 16: 391-395.
- Weniger, J.P. & Chouraqui, J. 1988. Action de LH sur la sécrétion d'œstradiol pour l'ovaire embryonnaire de poulet en culture *in vitro*. **Reprod. Nutr. Dev.** 28: 1473-1477.
- Woods, J.E. & Weeks, R.L. 1969. Ontogenesis of the pituitary-gonadal axis in the chick embryo. **Gen. Comp. Endocrinol.** 13: 242-254.
- Woods, J.E. & Podczasky, E.S. 1974. Androgen synthesis in the gonads of the chick embryo. **Gen Comp. Endocrinol.** 24: 413-423.
- Woods, J.E. & Erton, L.H. 1978. The synthesis of estrogens in the gonads of the chick embryo. **Gen. Comp. Endocrinol.** 36: 360-370.
- Woods, J.E., Menella, J.A. & Thommes, R.C. 1981. The hypothalamic-adenohypophyseal-gonadal axis in the developing chick embryo. **Gen. Comp. Endocrinol.** 45: 66-73.

Woods, J.E. & Thommes, R.C. 1984. Ontogeny of hypothalamo-adenohypophyseal-gonadal interrelationships in the chick embryo. **J. Exp. Zool.** 232: 435-441.

Woods, J.E., Hopkins, W.L. Caliendo, J., Sorrentino, M.J., Martens, J.B. & Thommes, R.C. 1985. Ontogenesis of the pars distalis of the chick embryo. In **Current Trends in Comparative Endocrinology.**(Lofts, B. & Holmes, W.K.) University Press, Hong Kong, pp 131-134.

Woods, J.E. 1987. Maturation of the hypothalamo-adenohypophyseal-gonadal axis in the chick embryo. **J. Exp. Zool. Suppl.** 1: 265-271.

Wolf, E.T. & Haffen, K. 1952. Sur le développement et la différenciation sexuelle des gonades embryonnaires d'oiseau en culture *in vitro*. **J. Exp. Zool.** 119: 381-386.