

06
2c1



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

INTERACCION ENTRE SUBPOBLACIONES CELULARES
EN LA DIVISION CELULAR INDUCIDA POR
FSH EN EL EMBRION DE POLLO

T E S I S

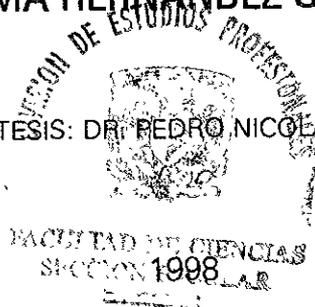
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

B I O L O G A

P R E S E N T A :

MARIA ELMA HERNANDEZ GUTIERREZ

DIRECTOR DE TESIS: DR. PEDRO NICOLAS VELAZQUE



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

26 6165



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



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:

"Interacción entre subpoblaciones celulares en la división celular
inducida por FSH en el ovario del embrión de pollo"

realizado por María Elma Hernández Gutiérrez

con número de cuenta 8553952-7 , pasante de la carrera de Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis
Propietario

Dr. Pedro Nicolás Velázquez *[Signature]*

Propietario

Dr. Enrique Antonio Pedernera Astegiano *[Signature]*

Propietario

M. en C. Patricia Rivas Manzano *[Signature]*

Suplente

M. en C. Julio Prieto Sagredo *[Signature]*

Suplente

Dra. Marcela Esperanza Aguilar Morales *[Signature]*

FACULTAD DE CIENCIAS
UNAM

Consejo Departamental de Biología
Edna M. Suárez Díaz
DRA. EDNA MARIA SUAREZ DIAZ



DEPARTAMENTO
DE BIOLOGIA

R E C O N O C I M I E N T O :

Este trabajo se realizó 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 Biol. Irma Peralta Delgado.

A G R A D E C I M I E N T O S :

A los miembros que forman este jurado:

Dr. Pedro Nicolás Velázquez

Dr. Enrique Antonio Pedernera Astegiano

M. en C. Patricia Rivas Manzano

M. en C. Julio Prieto Sagredo

Dra. Marcela Esperanza Aguilar Morales

Por la revisión del manuscrito y las aportaciones realizadas para mejorar este trabajo.

A tí, que me proporcionaste el privilegio de vivir, de gozar, de apreciar y sentir todo lo que me rodea. A tí, que físicamente no te encuentras junto a mí para poder disfrutar juntas de este logro, pero que de alguna forma durante estos años haz estado presente y cerca de mí...

¡GRACIAS MAMÁ!

Y a quienes desafortunadamente se nos han adelantado en largo camino, que gracias a la oportunidad y al apoyo que me otorgaron logré concluir esta meta:

Doña Julia, Doña Eva, Don Adrian y a Doña Angelina.

A quienes forman parte de mi familia, Paty, por la
paciencia que me has tenido, a mis primas, tias.

A Ana, Elsa (Las Tres Gracias), Oscar, Yola, Emma,
Margarita gracias por su amistad, su apoyo, sus
consejos, su apoyo técnico y sus palabras de aliento.

A la banda integrada por: Alicia, Magali, Jorge M.,
Lulu F., Lulu B., Olimpia M.

¡Por fin terminé!

GRACIAS A TODOS POR COINCIDIR EN ESTE MUNDO.

I N D I C E

	Páginas
RESUMEN	ii
INTRODUCCION	
*GENERALIDADES OVARIO ADULTO	1
*DIFERENCIACION Y DESARROLLO GONADAL.....	4
*GENERALIDADES DE HORMONAS	8
*EJE HIPOTALAMO-HIPOFISIARIO-GONADAL	13
*HORMONAS SEXUALES	15
*CICLO CELULAR	18
*FACTORES DE CRECIMIENTO	21
JUSTIFICACION	26
OBJETIVOS	27
MATERIAL Y METODOS	
*OBTENCION DE SUBPOBLACIONES	28
*CULTIVOS CELULARES	29
*TECNICA DE INCORPORACION DE [³ H]-timidina...	31
RESULTADOS	33
DISCUSION	41
CONCLUSIONES	45
APENDICE	46
BIBLIOGRAFIA	47

R E S U M E N

Se sabe que la hormona folículo estimulante (FSH) promueve la división celular y la esteroidogénesis en cultivos celulares primarios de ovarios prefoliculares de embriones de pollo de 18 días de incubación (Pedrera y cols, 1988, Velázquez y cols, 1997). En este trabajo se determinó si el estímulo de la división celular producido para la FSH se modifica al asociar diferentes subpoblaciones de células somáticas y germinales del ovario embrionario; por lo cual se emplearon ovarios izquierdos de embriones de pollo de 18 días de incubación, los cuales se disociaron con tripsina al 0.25% durante 20 minutos; la reacción se detuvo con inhibidor de tripsina y la suspensión celular obtenida se separó a través de dos gradientes de densidad con Metrizamida del 0-20% a partir de los cuales se obtuvieron cuatro subpoblaciones celulares:

- a) células esteroidogénicas típicas (F1),
- b) ovocitos primarios (F2),
- c) y d) principalmente células prefoliculares y somáticas epiteliales poco diferenciadas (F3 y F4).

Después de esto se realizaron cultivos con las subpoblaciones para ver cómo respondían en condiciones basales y tratadas con hFSH. Los cultivos se realizaron sobre membranas de policarbonato incubándolos durante 60 horas en una atmósfera de 95-5% aire-CO₂ a 37°C en Medio Mínimo Esencial modificado por Dulbecco (DMEM)

adicionando además a los grupos tratados (a las subpoblaciones por separado y a las mezclas de éstas) 0.5 U.I./ml de hFSH (Fertinorm) y 0.1 μ Ci de [3 H]-timidina a todos los grupos (tanto basales como tratados). Posteriormente se cuantificó la timidina incorporada a las células cultivadas. De los resultados obtenidos se observó que la fracción F4 es la única que responde a un estímulo de hFSH con una mayor incorporación de [3 H]-timidina; basándonos en esto se empleó dicha fracción en combinación con las demás fracciones (F1, F2 y F3), las cuales fueron sembradas bajo las mismas condiciones que los cultivos anteriores. Los resultados muestran que no hubo una modificación en la incorporación de [3 H]timidina por la asociación de F4 con F1 o con F3, en cambio, al asociar los ovocitos primarios (F2) con la subpoblación F4 se observó una inhibición en la incorporación de [3 H]-timidina, tanto en condiciones basales como estimuladas por hFSH. Estos resultados sugieren que los ovocitos primarios (F2) están liberando un factor que inhibe la división celular de la fracción F4, que son las células que más responden ante el estímulo de la hFSH.

I N T R O D U C C I O N .

GENERALIDADES DEL OVARIO ADULTO DE AVES.

El ovario es el órgano principal del aparato reproductor femenino, es una estructura par en la mayor parte de los vertebrados; presenta dos funciones esenciales que son la producción de gametos y la producción de hormonas esteroides sexuales.

Durante el desarrollo embrionario, las aves presentan dos ovarios con sus respectivos conductos de Müller, que desembocan en una cloaca (Weichert, 1981). Pero en la mayor parte de las aves se da un fenómeno particular, el cual consiste en que únicamente el ovario y oviducto izquierdos son funcionales en condiciones normales, aunque como refiere Gilbert (1971), "existen algunas especies salvajes, como las aves de presa y el Kiwi, que presentan ambos ovarios funcionales; en estos casos sólo el oviducto izquierdo es funcional".

El ovario de las gallinas es un órgano que va de redondeado a poligonal, de aspecto arracimado y de consistencia frágil. Está localizado en el extremo cefálico de los riñones y unido a la pared somática por el mesovario; su tamaño depende del estado funcional, variando entre el de una avellana hasta el de un huevo. El color dominante es amarillento con matices rosados o grisáceos oscuros. En el ovario de la gallina se distingue una región cortical o externa plagada de folículos en diferentes etapas de desarrollo embebidos en el estroma y otra medular o interna la cual contiene vasos sanguíneos, nervios y músculo liso; están separadas por una

densa capa de tejido conectivo (Hoffmann, 1969).

Al hacerse el corte de un folículo maduro (Fig. 1) se distinguen las siguientes estructuras:

- a) Ovocito
- b) Membrana vitelina, limita al vitelo contenido en el ovocito
- c) Zona radiada, región de contacto entre el ovocito y el folículo formada por finas prolongaciones de las células de la granulosa
- d) Membrana perivitelina, zona acelular posiblemente secretada por las células de la granulosa
- e) Capa granulosa, células que rodean al ovocito, inicialmente durante el desarrollo están presentes varias capas, después, cuando el ovocito ha crecido, es una sola capa de células aplanadas
- f) Membrana basal, separa la capa granulosa de la teca interna, formada por glucoproteína y fibronectina
- g) Teca interna, es una cápsula compacta que contiene una región interna de células fusiformes con núcleo oval y fibras de colágena, una zona media de fibroblastos y una externa de células vacuoladas (Dahl, 1971)
- h) Teca externa, es más ancha y más laxa que la anterior y consiste de varias capas de fibroblastos interdispersos con las fibras de colágena, músculo liso y células epiteliales indiferenciadas (Hernández-Vertiz y cols, 1993)
- i) Tejido conectivo, que junto con músculo liso cubren al folículo

Un epitelio germinal rodea a la masa folicular. Cada folículo presenta un tallo folicular que lo une a la pared corporal. A diferencia de los mamíferos, en aves no se forma el cuerpo lúteo y no existe un antro folicular (Tienhoven, 1983).

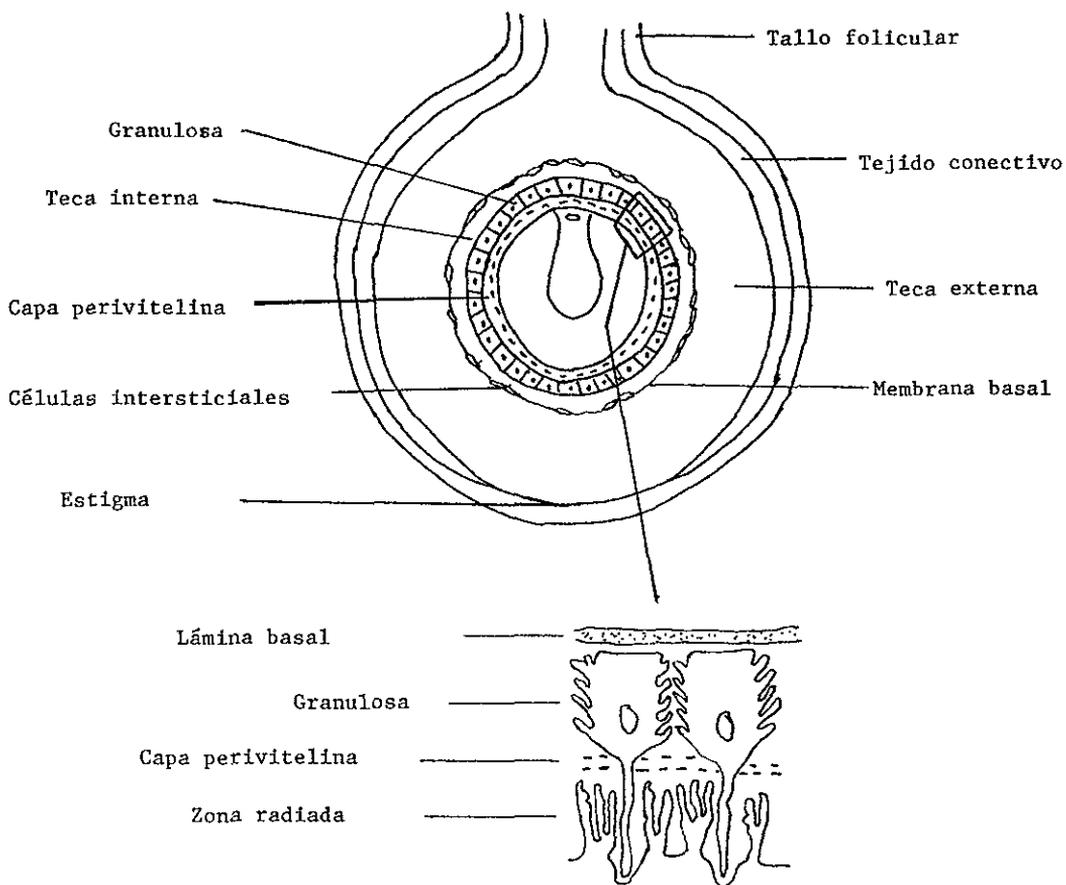


Fig. 1. Representación esquemática de un folículo de ovario adulto de ave (tomado de Gilbert, 1971)

Además se distinguen de los mamíferos, por la jerarquización en el tamaño de los folículos; los más pequeños son de color blanco y su tamaño está entre 2-5 mm de diámetro, los que van de 6-35 mm de diámetro son de color amarillo y se clasifican en orden creciente de tamaño siendo la numeración decreciente (folículos preovulatorios) F6, F5, F4, F3, F2 y F1 (Gilbert, 1971).

Entre las principales hormonas que produce el ovario están los esteroides. Se ha determinado a través de una serie de estudios realizados en aves, qué hormonas esteroides se secretan en las capas de la granulosa y de la teca. Las células de la granulosa secretan progesterona (Huang y cols., 1979), las de la teca interna producen testosterona, y la teca externa estradiol, proponiéndose un modelo tricelular para la esteroidogénesis folicular en aves (Pedrera y cols., 1988, Porter. y cols., 1989 y Nitta y cols., 1991).

DIFERENCIACION Y DESARROLLO GONADAL

Witschi (1956), propuso que el establecimiento de una gónada indiferenciada en el embrión de pollo, es un proceso que incluye un doble desplazamiento de células en diferentes direcciones, las que forman la médula bajan del blastema mesonéfrico, las de la corteza suben del epitelio celómico. Otros autores proponen que este fenómeno es resultado de proliferaciones consecutivas del epitelio celómico, que primero originan la médula y después la corteza. En cambio, Merchant-Larios (1978) propone que las gónadas se forman a partir de un blastema gonadal, el cual es una condensación de

mesénquima (originará tejido conectivo, vasos sanguíneos y tejido intersticial esteroideogénico) y células del epitelio celómico (contiene a las CGP rodeadas por células somáticas precursoras de las células de la granulosa o Sertoli).

En el embrión de pollo, al 3er día de vida embrionaria, las células germinales primordiales (CGP) provienen del endodermo extraembrionario y migran hacia la cresta gonadal a través del torrente sanguíneo (diapedesis); se acumulan simétricamente en cada gónada (derecha e izquierda) del embrión, conforme continúa el desarrollo embrionario; el número de células aumenta de 2 a 5 veces más rápidamente del lado izquierdo que del derecho. Al séptimo día, la diferenciación sexual de la gónada es definitiva (Sauveur, 1992).

En los estadios tempranos del desarrollo, el embrión de la hembra presenta dos ovarios, el derecho crece lentamente desde el 8° al 10° día de desarrollo y conforme transcurre el tiempo sufre una regresión hasta permanecer en un estado rudimentario alrededor del día 15 sin función alguna en el nacimiento (Brode, 1928); mientras que el ovario izquierdo, a partir del 3er día de incubación, sigue su desarrollo normal. Las CGP están dispuestas en cordones sexuales entre el estroma; conforme avanza el desarrollo, su disposición va cambiando hasta presentar dos capas: una corteza, en la cual se localizan nidos de ovogonias y una médula que está compuesta por células que contienen gotas de lípidos, células que carecen de éstas, conductos lacunares y vasos sanguíneos (Jones, 1978, Gilbert, 1971). Este ovario prefolicular es capaz de secretar

hormonas esteroides a muy temprana edad. Por medio del empleo de precursores radiactivos, se ha demostrado que en el ovario de embrión de pollo a los 6 días de incubación, ya hay biosíntesis de 17β -estradiol, estrona y entre los 7.5 a 18 días de incubación la secreción de otras hormonas (testosterona, dehidroepiandrosterona [DHEA] y progesterona) (Weniger y Zeis, 1971, Guichard y cols. 1973, 1977b y 1979, Galli y Wassermann, 1972); otros estudios han mostrado que la síntesis de andrógenos y estrógenos ocurre durante el 8° y 10° días (Gilbert, 1971). La presencia de andrógenos, estrona y 17β -estradiol se ha demostrado por medio de técnicas inmunohistoquímicas, inmunofluorescencia, cultivo de tejidos, cultivo de órganos y homogeneizado de gónadas en embriones de pollo de 7.5-18.5 días de incubación (Woods y Brazzil, 1981, Guichard y cols., 1977a, Woods y Erton, 1978; Woods y Podczaski, 1974 y Woods y cols., 1975). Además, las gónadas tienen la capacidad de responder ante el estímulo de hormonas exógenas (LH y hCG) y como consecuencia, aumentar la secreción de 17β -estradiol, fenómeno que se observa en embriones de pollo de 7.5-18 días de incubación (Weniger y Chouraqui, 1988). Al final del desarrollo embrionario, las células que producen esteroides son abundantes y al nacimiento representan un 18% de la médula (González-Morán y cols., 1985)

En trabajos recientes, se han demostrado, por medio de estudios morfológicos, los tipos celulares que existen en el ovario de pollos recién nacidos (González del Pliego y cols., 1988). Estas subpoblaciones celulares pueden separarse a través de gradientes de densidad; tres de ellas, secretoras de hormonas esteroides, y una

que corresponde a los ovocitos (Pedernera y cols., 1988, Alvarez y cols., 1995) (Fig 2). Las características de las células obtenidas en cada fracción pueden resumirse de la siguiente manera:

Fracción 1:

- *Una densidad de 1.012 g/ml
- *Células típicamente esteroidogénicas, bien diferenciadas
- *Encargadas de secretar andrógenos (testosterona)
- *Además, presentan los complejos enzimáticos: 17α -hidroxilasa/C17-20 liasa y la 3β -hidroxiesteroide deshidrogenasa/ Δ^{5-4} isomerasa (3β -HDS)
- *Presentan en su citoplasma gotas de lípidos, retículo endoplásmico liso bien desarrollado y mitocondrias grandes con crestas tubulares

Fracción 2:

- *Una densidad de 1.037 g/ml
- *Corresponde a ovocitos primarios
- *Un diámetro de 25 μm o más
- *De forma ovoide, con núcleo excéntrico
- *Su participación en la actividad esteroidogénica es nula

Fracciones 3 y 4:

- *Una densidad de 1.055 g/ml (F3) y 1.071 g/ml (F4)
- *Células somáticas poco diferenciadas
- *Presumiblemente, las fracciones F3 y F4 corresponden a distintas poblaciones o a células en diferente estado funcional, ya que tienen diferente actividad enzimática; la enzima aromatasa es mayor en F4 que en F3 y la 5β -reductasa

está distribuida en forma homogénea, mientras que la F3 presenta la actividad de 17β -hidroxiesteroide deshidrogenasa (17β -HDS) en forma predominante (Alvarez y cols, 1995)

*Carecen de inclusiones lipídicas en el citoplasma

*Se caracterizan por contener 3 diferentes subpoblaciones:

(a) **Células pregranulosas** que tienen retículo endoplásmico rugoso, mitocondrias con crestas tubulares y núcleo grande

(b) **Células poco diferenciadas** con citoplasma escaso, núcleo grande, a veces presencia de retículo endoplásmico rugoso y de mitocondrias con crestas lamelares, con nucléolo evidente, y

(c) **Fibroblastos** con citoplasma escaso y pocos organelos

GENERALIDADES DE HORMONAS.

La palabra hormona proviene del griego anquino (excitar o remover), se trata de un mensajero químico que es secretado en concentraciones muy pequeñas (micromolar [$\mu\text{M}=10^{-6}$ M] a picomolar [$\text{pM}=10^{-12}$ M]) por un tejido en especial y es transportado por la sangre por medio de proteínas transportadoras, con el propósito de estimular una actividad bioquímica o fisiológica específica (Alberts y cols., 1989).

Las hormonas son una forma importante de comunicación intercelular que actúan modulando la función de tipos celulares específicos. El mecanismo de comunicación se basa en la estructura y naturaleza de la hormona y sus receptores. También se puede tener en cuenta su distancia de acción. A este respecto se consideran tres variantes:

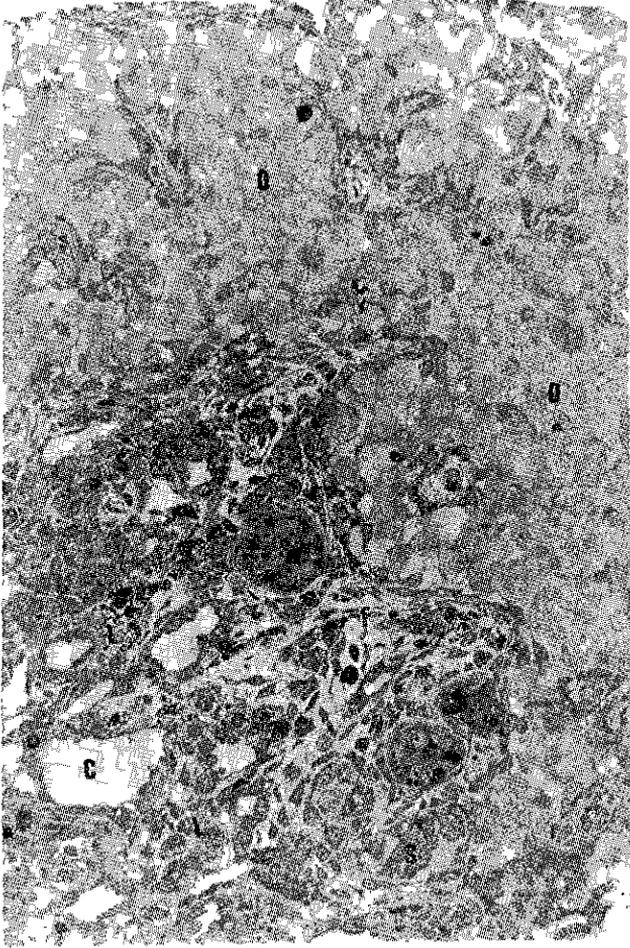


Fig. 2. Fotografía de un ovario prefolicular donde se observa la corteza con nidos de ovogonias (o), en la médula la presencia de células con lípidos (l) y sin lípidos (s), fibroblastos (f), vasos sanguíneos (v) y conductos lacunares (c) (360x).

a) **COMUNICACION ENDOCRINA:** Cuando la molécula mensajera es conducida a través del torrente circulatorio hacia tejidos distantes para ejercer su acción (corresponde al concepto clásico de hormona).

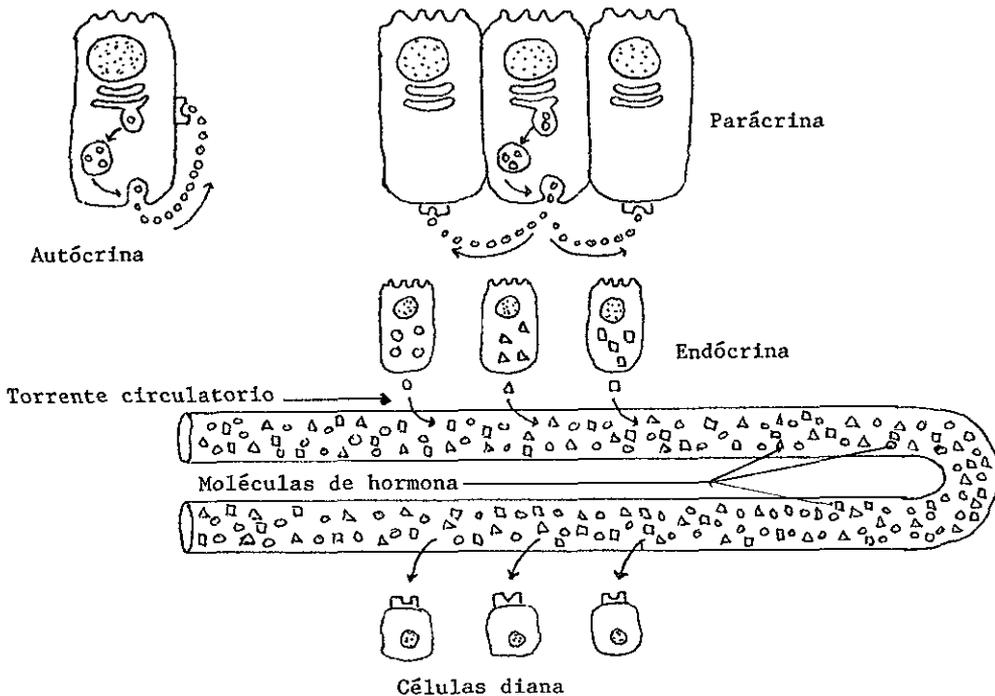


Fig. 3. Representación esquemática de los diferentes tipos de comunicación hormonal a) endócrino, b) parácrino y c) autócrino (tomado de Eckert y Randall, 1990)

b) **COMUNICACION PARACRINA:** Cuando el agente secretado influye directamente sobre la función de las células blanco adyacentes.

c) **COMUNICACION AUTOCRINA:** Cuando las células secretan agentes que ejercen acciones específicas sobre la propia célula secretora (Eckert y Randall, 1992) (Fig. 3).

Un ejemplo de estos tipos de comunicación son la serie de experimentos con los cuales se ha tratado de dilucidar cómo la comunicación parácrina y autócrina regulan el crecimiento celular de los folículos en mamíferos. En estos experimentos, realizados por Kotsuji y Tominaga en 1994, en donde cultivaron células de la granulosa y de la teca de rata por separado y juntas, encontraron que existe una modulación recíproca en cuanto a su morfología, estructura, crecimiento y función, y además que al tratarlas con FSH y LH el efecto causado sobre las células es modificado por la comunicación entre ellas.

La hormona folículo estimulante (FSH) y la hormona luteinizante (LH), son hormonas GONADOTROPICAS polipeptídicas que son secretadas por la adenohipófisis y su liberación está gobernada por la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH). Se caracterizan por presentar una subunidad α similar, pero diferente subunidad β , la cual determina la especificidad a nivel del receptor de membrana; estas subunidades, al encontrarse disociadas, son biológicamente inactivas (Litch y cols., 1977; Pierce and Parsons, 1981).

Ambas gonadotropinas ejercen funciones a nivel reproductivo; la FSH actúa principalmente sobre las células de la granulosa en el ovario, induciendo la aparición de receptores para ella misma, para la LH, el EGF, la prolactina y las lipoproteínas (Dahl y Hsueh, 1988). La LH interactúa con las células de la teca y de la

granulosa que junto con la FSH, controlan la diferenciación de los folículos, la ovulación y la esteroidogénesis.

La capacidad que tiene una célula para responder ante una molécula de señalización extracelular determinada, depende de la presencia o no de unas proteínas específicas conocidas como **RECEPTORES**. La forma en que responde la célula diana ante el estímulo es alterando las propiedades o velocidades de síntesis de sus proteínas ya existentes o nuevas. Las moléculas de señalización, al unirse con su ligando o receptor, forman el complejo hormona-receptor, el cual se divide en dos clases:

a) **Receptores de clase I**, los cuales producen cambios en el metabolismo celular; su acción es lenta y duradera. Presentan alta afinidad por la hormona, y su localización es intracelular (citosol o núcleo). El complejo hormona-receptor activado presenta afinidad por varios sitios de unión en el núcleo influyendo sobre la expresión génica; a esta clase pertenecen los receptores de las hormonas esteroides y tiroideas (tiroxina [T4] y triiodotironina [T3]).

b) **Receptores de clase II**, se localizan en la membrana plasmática, se caracterizan por internalizar el complejo hormona-receptor, su acción es rápida; presentan alta afinidad y especificidad. El receptor sufre cambios conformacionales para interactuar con otras moléculas que transmitirán la señal al interior de la célula, que desencadenará procesos metabólicos intracelulares por medio de la presencia de segundos mensajeros (Ca^{2+} , AMPc, fosfatidilinosítidos) (Norman, 1987). Pertenecen a

esta clase las hormonas polipeptídicas FSH, LH y la hormona estimulante de la tiroides (TSH), la mayoría de los mediadores químicos y los neurotransmisores.

EJE HIPOTALAMO-HIPOFISIARIO-GONADAL

En el embrión de pollo, los componentes del eje hipotálamo-adenohipófisis-gónada (HAG) funcionan de forma independiente durante su crecimiento, dándose una integración posterior entre ellos. Se ha visto que la instalación del eje H.A.G. se presenta entre los días 12 y 13 de incubación ya que a esa edad se establece el plexo vascular hipotálamo-hipofisiario, y se detecta además, inmunocitoquímicamente, la presencia de la GnRH (Woods, 1987).

La secreción de gonadotropinas está controlada por el cerebro, quien recibe la información del ambiente para regular la secreción de la GnRH. Los cuerpos celulares nerviosos y las fibras que contienen a la GnRH están localizados en el hipotálamo; este decapeptido es transportado a la eminencia media del hipotálamo ventral en donde es liberada al espacio perivascular de capilares sanguíneos, que drenan hacia la adenohipófisis a través del sistema porta (Fig 4) para estimular finalmente la liberación de hormonas gonadotrópicas de la adenohipófisis. Estas gonadotropinas llegan por vía sistémica a su órgano blanco, interactúan con sus receptores de membrana estimulando así el crecimiento gonadal y la esteroidogénesis.

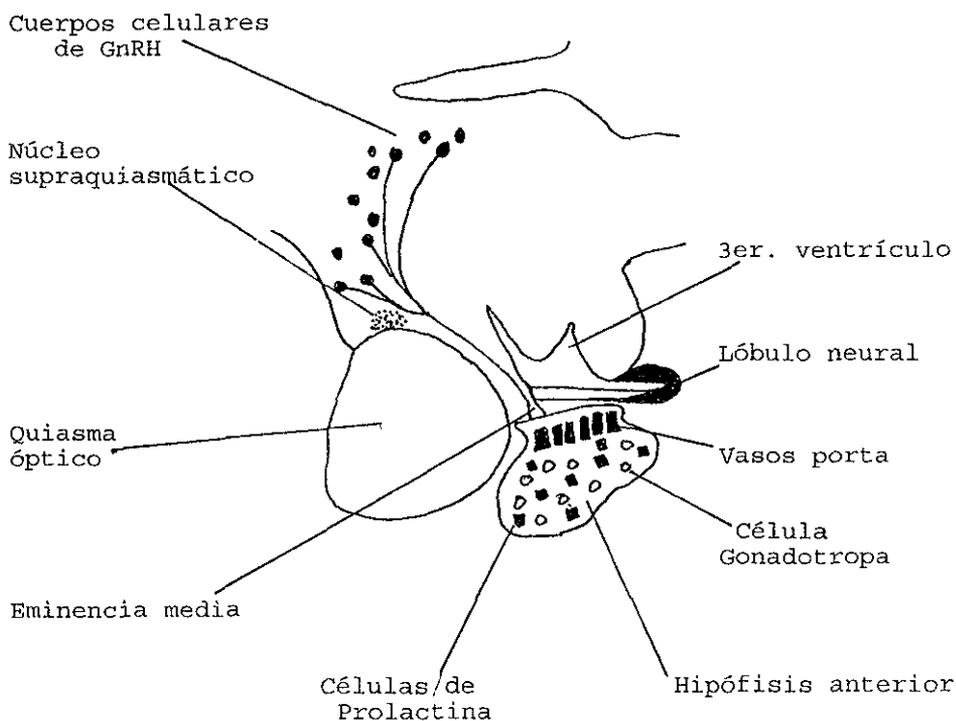


Fig 4. Esquema del posible sitio de regulación de la secreción de la GnRH a nivel hipotalámico (tomado de Gilbert, 1971).

Además de la LH y la FSH hay otros factores que estimulan el desarrollo del folículo y la síntesis de hormonas, entre los cuales se encuentran el 17β -estradiol in vivo, el TGF- β (Bendell y Dorrington, 1991, Dorrington y cols., 1993), el IGF-I y el EGF (Olsson y cols., 1990, Bley y cols., 1992, Roy y Greenwald, 1991). Estos factores de crecimiento, por lo general, potencian el efecto de la FSH en cultivos in vitro de células de la granulosa, ya sea

de folículos pequeños o grandes, detectándose lo anterior por medio de la incorporación de timidina tritiada en la síntesis de DNA.

HORMONAS SEXUALES

Dentro del amplio conjunto de las hormonas comentaremos brevemente que las hormonas esteroides (que comprenden a las hormonas sexuales) cuyo nombre deriva del griego estereos (sólido), y representa la fracción sólida residual que permanece después de la saponificación de las grasas animales, son lípidos no saponificables, poco solubles en agua, solubles en solventes orgánicos. Tienen como papel esencial la regulación de variados procesos biológicos en los mamíferos, como son la presencia de los caracteres sexuales secundarios, el crecimiento folicular; la mayoría de estas hormonas se biosintetizan en el ovario, el testículo y en la glándula adrenal, también en placenta e hígado fetal empleando al colesterol como intermediario.

Su composición química comprende una estructura compleja, conformada por 3 anillos de ciclohexano (A, B, C) y un anillo de ciclopentano (D) (Ciclopentanoperhidrofenantreno). Por su estructura química básica las hormonas esteroides (Fig. 5) se dividen en 5 grupos con base en su actividad biológica:

Estrógenos -----	C18
Andrógenos -----	C19
Progestinas naturales -----	C21
Glucorticoides -----	C21
Mineralocorticoides -----	C21

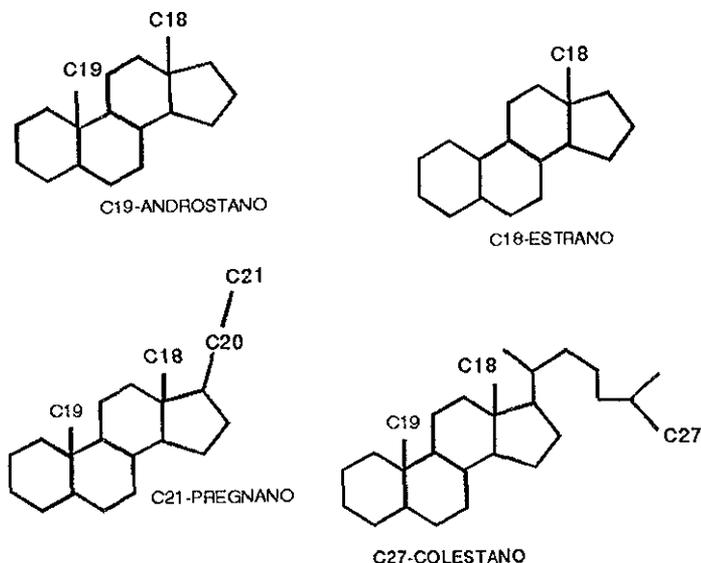


Fig 5. Estructuras básicas de las hormonas esteroides: estrano, androstano, pregnano y colestano (tomado de Hicks y Diaz-Zagoya, 1988)

Mencionaremos a continuación algunas de las funciones de las hormonas esteroides gonadales:

Entre los principales **ESTROGENOS** naturales encontramos a la Estrona (E1), el 17β -Estradiol (E2) y el Estriol (E3), que se biosintetizan en el ovario, la placenta y en menor proporción en el testículo. En mamíferos contribuyen al crecimiento y desarrollo folicular y uterino; desarrollo de genitales internos y externos y caracteres sexuales secundarios. En aves interviene en la síntesis

de precursores de vitelo, movilización de calcio, crecimiento folicular, del oviducto y síntesis de los componentes de la albúmina.

Los ANDROGENOS (su nombre proviene del griego andros=varón y gennao=producir), son producidos en el ovario, en las células de la teca y en las células intersticiales del testículo. Ejercen una variedad de acciones inhibitorias y/o estimuladoras al interaccionar con sus receptores o sitios de enlace, localizados en el citoplasma de las células diana. En aves intervienen en la secreción de albúmina en el lumen, actividad y maduración de espermatozoides.

Dentro del grupo de las progestinas está la **PROGESTERONA**. cuyo nombre deriva del latín "pro" (a favor) y de "gestare" (llevar), que junto con los estrógenos, modulan efectos primordiales en el SNC y en órganos periféricos. En mamíferos, mantiene la gestación, induce la relajación del músculo uterino y disminuye la excitabilidad del miometrio. En aves, promueve la síntesis de avidina, secreción de albúmina, liberación de GnRH y liberación de gonadotropinas.

CICLO CELULAR

Se define como el período activo de biosíntesis y crecimiento celular durante el cual se forman dos células hijas a partir de la división de una célula madre, teniendo éstas la misma capacidad para llevar a cabo las mismas funciones metabólicas de la célula madre y de dividirse. Generalmente el proceso se divide en cuatro

etapas:

- i) **Presintético o gap 1 (G1).**- intervalo entre la mitosis y la síntesis de DNA.
- ii) **Síntesis de DNA (S).**- incorporación de precursores del DNA y su posterior replicación.
- iii) **Postsintético o gap 2 (G2).**- intervalo entre el fin de la fase S y la iniciación de la mitosis.
- iv) **Mitosis (M).**- período durante el cual los cromosomas se condensan y se completa la citocinesis.

Las etapas G1, S y G2 generalmente abarcan un 90% del ciclo celular y el 10% restante corresponde a la fase M (Fig. 6).

El tiempo de duración del ciclo celular entre las células de un mismo tejido varía, incluso en la misma célula al pasar de un ciclo a otro. Estas variaciones radican en el tiempo que tarda la célula en permanecer en G1 (horas o años), en donde una célula postmitótica entra a un estado de restricción (G0), a la cual, si le llegase el impulso adecuado, la célula saldría de este descanso y regresaría al ciclo proliferativo (Alberts y cols., 1989).

Por experimentos realizados con cultivo de fibroblastos empleando como factores la disminución de suero, la deficiencia de nutrientes, el aumento de AMPc y el aumento en la densidad celular, se observó que las células que están en etapa G0 disminuyen su tasa de crecimiento celular y la síntesis de DNA, además de la síntesis de RNA y proteínas. Se detectó que las células en etapa G0 son fisiológicamente diferentes de las que se encuentran en fase G1, pero la etapa de quiescencia no es un estado gradual de deterioro,

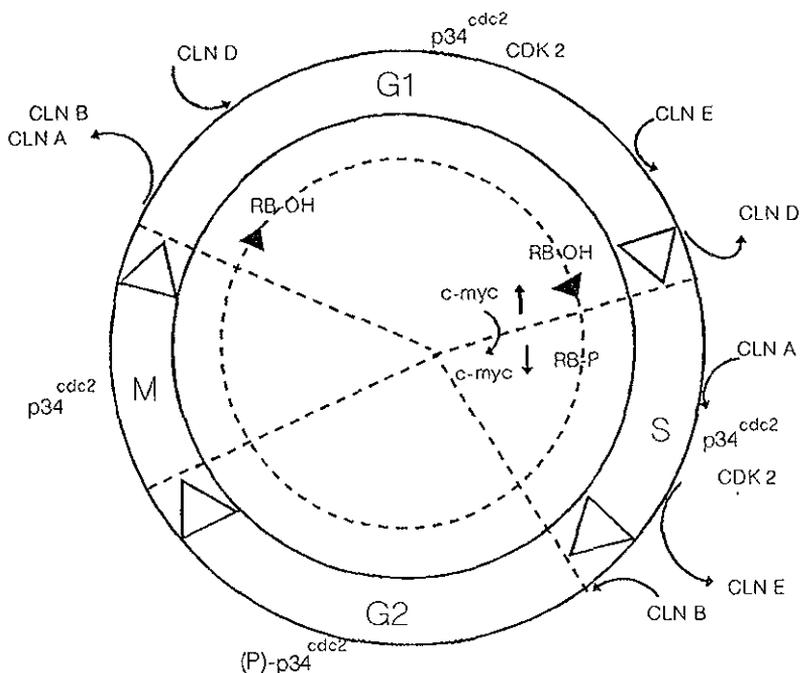


Fig. 6. Representación de los diferentes factores promotores del ciclo celular entre los que se encuentran diferentes tipos de ciclinas (tomado de Zentella, 1993)

es decir, que estas células en etapa G0 son metabólicamente activas mostrando aumento o disminución en un número de procesos bioquímicos específicos. Al recibir la señal apropiada, hay una reactivación en la transcripción del RNA, seguido de un incremento en la síntesis de nuevas moléculas necesarias para la salida de la etapa G0 y el avance hacia la G1 (Stein y Lian, 1992).

Dentro del ciclo celular, existen otros sistemas de regulación los cuales se encuentran restringidos a ciertas etapas del ciclo. Entre éstos encontramos complejos formados a través de la

asociación de las ciclinas y de las proteínas cinasas dependientes de ciclinas (Cdk). Las ciclinas son proteínas activadoras que se sintetizan y degradan de forma cíclica en cada división celular, además se enlazan a las Cdk controlando su capacidad para agregar grupos fosfato a ciertas proteínas en una etapa específica del ciclo. Las Cdk se encargan de fosforilar proteínas que contengan residuos de serina y treonina.

Existen 6 tipos de ciclinas (A a la F), las cuales se combinan por lo menos con 5 Cdk (1 al 5), que son codificados por genes de la familia CDC2, siendo la Cdk2 la más activa en las principales etapas del ciclo celular (G1 y S). Las Ciclinas A y B, se expresan durante G2 y M, la Ciclina D, responde al estímulo de factores de crecimiento proliferativo (EGF, PDGF, FGF e IGF) durante la fase temprana de G1, y Ciclina E, marca la transición de G1 a S.

Existe un factor formado por 2 proteínas con actividad cinasa una $cdc2$ ($p34^{cdc2}$), que presenta un estado de fosforilación transitorio ($p34^{cdc2}$ -P durante G2 y una ciclina, la cual es una proteína que se acumula por síntesis continua durante la interfase y es destruida durante la fase M (Zentella, 1993) (Fig. 6). Entre estas proteínas reguladoras se encuentran dos genes asociados a tumores, *c-myc* y *RB*, la primera se transcribe antes de iniciar S aumentando transitoriamente entre G1 y S; además se han identificado cambios en el estado de fosforilación de *RB*, que pasa de un estado menos fosforilado (*RB-OH*), el cual es capaz de retener a la célula en G1, a uno de fosforilación (*RB-P*) en donde está inactivo, permitiéndole a la célula pasar a S (Fig. 6).

FACTORES DE CRECIMIENTO

Los factores de crecimiento polipeptídicos (FCP) forman parte de una gran clase de moléculas hidrofílicas de señalización extracelular que constituyen una parte importante del sistema endócrino; al unirse a receptores específicos en la superficie celular, regulan una diversidad de funciones celulares (activación de genes, duplicación de DNA, síntesis de proteínas) desencadenadas por la activación de señales intracelulares (AMPC). Individualmente pueden expresarse en una gran variedad de células manifestando actividad en un rango considerable de células y tejidos blanco (Stein y Lian, 1992).

Los FCP pueden ser considerados como una mezcla de los tres tipos de comunicación hormonal: endócrina, parácrina y autócrina.

Los FCP actúan de manera sinérgica y secuencial para promover la proliferación de las células en cultivo no transformadas e iniciar la respuesta mitógena. Los FCP interactúan con los receptores de enlace específicos de la membrana; estos receptores se han identificado con actividad de tirosina-cinasas, conteniendo cada uno tres diferentes regiones estructurales:

- i) un dominio enlace-ligando extracelular
- ii) un dominio hidrofóbico transmembranal,
- iii) un dominio intracelular hidrofílico, que contiene un dominio cinasa altamente conservado en el cual reside la actividad tirosina-cinasa.

La importancia de este último dominio radica en que es indispensable tanto para la actividad mitogénica de los receptores

como para los eventos celulares tempranos inducidos por el enlace de ligandos a receptores (Stein y Lian, 1992).

Al interactuar el FCP con su receptor y activarse este último, opera por medio de la señal de transducción proteína tirosinasa, estimulándose la formación de segundos mensajeros, quienes traducen la señal mitógena de la membrana celular al interior de la célula. Al interactuar el FCP con su receptor, pueden activarse dos vías (Stein y Lian, 1992 y Roskoski, 1996):

- 1) Se da la fosforilación de proteína cinasa que activa el ciclo de la proteína activadora de la GTPasa ras.
- 2) Hay cambios alostéricos por fosforilación de la fosfolipasa C, que activará el ciclo de la proteína activadora de la GTPasa ras, Ambas favorecerán la operación de factores de transcripción que modularán el metabolismo intracelular.

La proliferación celular (la diferenciación y la expansión clonal) de las poblaciones celulares y las respuestas fisiológicas, no están reguladas sólo por un FCP, sino por la acción de múltiples FCP que actúan en puntos discretos durante la expansión de los linajes celulares resultantes, además la acción de estos FCP depende del estado de diferenciación de las células blanco (Stein y Lian, 1992).

Las células son susceptibles al estímulo de factores que se han dividido en dos tipos (Fig. 7):

- a) De Competencia: permiten a la célula alcanzar una etapa de competencia, en la cual se reinicia su entrada al ciclo celular, G1; pero son incapaces de hacer que la célula

continúe con el ciclo, (EGF, PDGF y FGF)

b) De Progresión: son aquellos que inducen a la célula para que continúe de G1 a S (Insulina e IGF-I)

En cambio existen factores antiproliferativos los cuales inducen un bloqueo en la fase G1 tardía provocando que las células se detengan y no continúen con el ciclo celular [factor de crecimiento transformante (TGF- β), interferón γ (INF- γ), particularmente el factor de necrosis tumoral- α (TNF- α) y la interleucina 1 (IL-1) está restringida a la parte tardía de G1].

A continuación se presentan algunas características de algunos de los factores de crecimiento que posiblemente intervengan en al proliferación de las células ováricas:

1.- FACTOR DE CRECIMIENTO EPIDERMICO (EGF). Es un mitógeno en gran variedad de tejidos epidérmicos y no epidérmicos (granulosa) Suprime la inducción de receptores a LH dependientes de FSH en cultivos de células granulosas libres de suero. Puede modular el crecimiento ovárico por disminución de la biosíntesis de estrógenos en la granulosa (Hsueh y cols., 1984).

2.- FACTOR DE CRECIMIENTO DERIVADO DE PLAQUETAS (PDGF). Aumenta el estímulo de FSH en la formación de receptores para LH in vitro, para la producción de progesterona, tal vez por el incremento en la sensibilidad de las células granulosas ante FSH y AMPc (Hsueh y cols., 1984).

3.- FACTORES DE CRECIMIENTO INSULINICO (IGF-I, IGF-II). Los receptores del IGF-I se han encontrado en la granulosa, por lo cual el IGF-I ejerce un efecto estimulador en la esteroidogénesis de

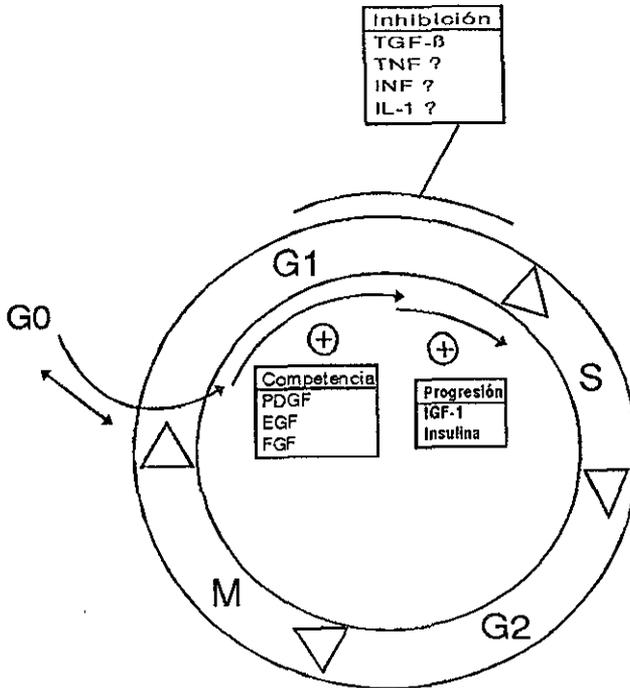


Fig. 7 Esquema del ciclo celular con sus diferentes fases M, G1, G2 y S. Y los FCP que permiten o inhiben la continuación del ciclo celular (tomado de Zentella, 1993)

dichas células; la demostración de la acción del IGF-I a nivel de teca y granulosa sugiere posiblemente una regulación parácrina o autócrina (Hsu y Hammond, 1987). Pueden promover el crecimiento y/o diferenciación de células ováricas, y el que su acción predomine depende de la naturaleza de las células y la presencia de factores moduladores.

El sistema IGF ovárico integra una respuesta en la hormona ante

la producción local de las IGF. Las gonadotropinas, esteroides gonadales y factores de crecimiento producidos localmente, pueden regular el sistema de IGF a este nivel (Hammond y cols., 1991).

4.- FACTOR DE CRECIMIENTO TRANSFORMANTE (TGF). El TGF- α junto con el EGF parecen ser inhibidores con respecto a muchas funciones de la granulosa, incluyendo la producción de estrógenos y la síntesis de receptores para LH; en cambio, actúa sinérgicamente con la FSH para aumentar la diferenciación de la granulosa, además de aumentar la actividad aromatasa estimulada por la FSH, la producción de progesterona, la formación de receptores para LH y EGF. Al ser producido por la teca, puede actuar como factor autócrino para controlar su propio crecimiento y diferenciación, y como un factor parácrino para regular el crecimiento y diferenciación de la granulosa. La poca cantidad producida por la granulosa también puede actuar como factor autócrino. Además, su producción por la teca y la granulosa puede influir en el crecimiento y diferenciación celular del ovario como un factor parácrino y/o autócrino (Skinner y cols., 1987)

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

Se sabe que la gónada de aves tiene la capacidad de secretar, desde edades muy tempranas, tanto estrógenos como andrógenos, y que esta capacidad es continua hasta después del nacimiento (Guichard y cols., 1977a, Woods, 1973, Woods y Brazzil, 1981).

La secreción de estradiol y testosterona se encuentra regulada por la FSH y la LH. En estudios donde se ha empleado el cultivo de células de la granulosa de mamíferos y aves, se ha comprobado que la FSH se encuentra involucrada en la síntesis de proteínas, inducción de receptores para FSH y LH, en la esteroidogénesis y en la división celular (Hsueh y cols., 1984).

Se ha demostrado que el ovario prefolicular está integrado por cuatro diferentes subpoblaciones celulares (Pedernera y cols., 1988 y Alvarez y cols., 1995), de las cuales tres presentan actividad esteroidogénica, y que el ovario prefolicular tiene la capacidad de responder al estímulo de la FSH aumentando la densidad celular y la secreción de estradiol y testosterona. Por todo lo antes mencionado no propusimos investigar si existe regulación sobre la proliferación celular entre las subpoblaciones, y si esta regulación se ve modificada por la acción de la FSH.

O B J E T I V O S.

El OBJETIVO GENERAL del presente trabajo fue determinar la influencia de la hFSH sobre la proliferación celular de las diferentes células ováricas y al asociar diferentes subpoblaciones celulares del ovario de embriones de pollo de 18 días de incubación.

Del anterior se desprenden los siguientes OBJETIVOS PARTICULARES:

- a) Estudiar el efecto de la hFSH sobre la proliferación en cultivos primarios de células ováricas disociadas (Población Mixta)
- b) Definir el efecto de la hFSH sobre la proliferación de subpoblaciones celulares obtenidas a través de gradiente de densidad.
- c) Determinar el efecto de la hFSH en la proliferación de cultivos primarios por la asociación de subpoblaciones celulares de ovario de embriones de pollo

MATERIALES Y METODOS.

MATERIAL QUIMICO:

El medio mínimo esencial modificado por Dulbecco (DMEM) y Tripsina (1:250) fueron obtenidos de Grand Island Biological Co. (Grand Island, N.Y.). El inhibidor de tripsina, la albúmina sérica bovina (BSA), la Metrizamida, el dodecil sulfato de sodio y la gonadotropina coriónica humana (hCG) se obtuvieron de Sigma Chemical CO. (St. Louis, Mo). La hormona folículo estimulante humana (hFSH) de orina de mujeres postmenopáusicas (Fertinorm HP) se obtuvo de Serono de México (México, D.F.). Las cajas de cultivo y las membranas de policarbonato con poro de 1.0 μm y 35 mm de diámetro se obtuvieron de Costar (Cambridge, MA), la timidina [methyl- ^3H] (2.0 Ci/mmol) y el líquido de centelleo (Aquasol II) se obtuvieron de NEN DU PONT (Boston, MA).

MATERIAL BIOLÓGICO:

Los embriones de pollo de 18 días de incubación (Babcock B300) fueron obtenidos de huevo fértil ALPES-II (Tehuacan, Pue.).

OBTENCION DE SUBPOBLACIONES.

Los ovarios izquierdos de embriones de pollo de 18 días de incubación fueron disecados en condiciones estériles, se lavaron dos veces con solución salina balanceada (SSB) libre de Ca^{2+} y Mg^{2+} ; posteriormente se disociaron mecánico-enzimáticamente con solución de tripsina (0.25%), en un baño con agitación constante (90 ciclos/min) durante 20 minutos a 37°C. Para detener el efecto

enzimático, se les agregó inhibidor de tripsina (0.50 %) resuspendiendo con una pipeta de 10 ml. Se filtró a través de una malla de nylon colocándose en un tubo cónico y centrifugándose a 1000 rpm a 24°C durante 10 minutos (Centrífuga refrigerada Sorvall RT6000, Du Pont). Se decantó el sobrenadante y el botón celular se resuspendió con DMEM + 0.1% BSA. Se repitió el procedimiento 2 veces más, obteniéndose una población mixta (PM) la cual contiene células con y sin lípidos, ovocitos, células somáticas indiferenciadas, fibroblastos y células sanguíneas.

La suspensión celular resultante se sembró en un gradiente continuo de metrizamida (0-20%); se centrifugó a 3200 rpm durante 22 minutos. Posteriormente, se colectaron las subpoblaciones desde la parte superior del gradiente, obteniéndose 4 bandas:

- a) células típicamente esteroidogénicas (F1),
- b) ovocitos primarios (F2),
- c) células prefoliculares (F3), y,
- d) células somáticas indiferenciadas (F4) (Fig. 8),

las cuales se lavaron y se resuspendió cada fracción con DMEM + 0.1% BSA . Por separado las fracciones F2 y F4 se sembraron en un segundo gradiente (0-20%) para obtenerlas con mayor pureza. Se colectaron y lavaron como se describió anteriormente. Después se hizo el conteo celular en una cámara de Neubauer, la viabilidad celular de las poblaciones obtenidas (PM, F1, F2, F3 y F4) se evaluó con azul tripano (Tennant, 1964).

CULTIVOS CELULARES.

Una vez realizado el conteo, se prepararon las cajas de Petri

para cultivo (35x10 mm), colocando en cada caja DMEM + 0.1% BSA y 2 membranas de policarbonato, formándose los siguientes grupos:

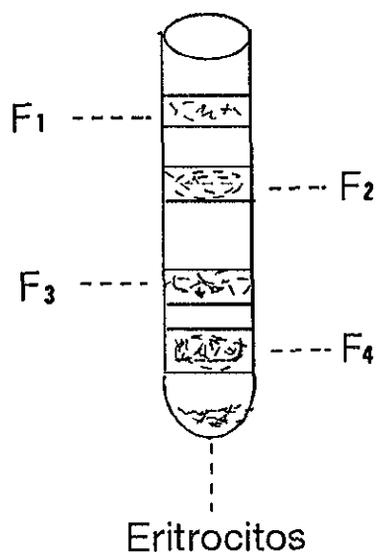


Fig. 8. Esquema de la localización de cada fracción dentro del gradiente de densidad de metrizamida (0-20%)

Para los grupos testigo se colocaron 600,000 células de PM y las subpoblaciones F1, F2, F3 y F4 por separado adicionando al medio 0.1 μCi [^3H]-timidina.

Para los grupos tratados se empleó el mismo procedimiento agregando al medio hFSH (1.0 UI/ml) y 0.1 μCi [^3H]-timidina.

Se cultivaron 600,000 células de PM agregándose al medio cuando fue necesario las siguientes hormonas 17- β -estradiol (disuelta en 10 μ l de etanol), hCG, hFSH y rhFSH (1.0 UI/ml).

Se hizo una curva dosis-respuesta de hFSH de la subpoblación F4. Habiendo obtenido la dosis media efectiva ($DE_{50} = 0.06$ UI/ml), se realizaron cultivos con las mezclas de las siguientes subpoblaciones:

Para los grupos testigo F1+F4, F2+F4 y F3+F4 200,000 céls. + 400,000 céls. respectivamente adicionando al medio 0.1 μ Ci [3 H]-timidina.

En los grupos tratados se utilizaron las mismas proporciones celulares agregando hFSH (1.0 UI/ml) y 0.1 μ Ci [3 H]-timidina al medio

Se incubaron durante 60 horas a 37°C en una atmósfera de 95 % de aire y 5% de CO₂. Una vez transcurrido este tiempo se cuantificó la incorporación de [3 H]-timidina.

TECNICA DE INCORPORACION DE [3 H]-TIMIDINA.

a) Se desechó cuidadosamente el medio de cultivo con una micropipeta de 5000 μ l hasta donde fue posible y se procuró no mover la membrana con el botón celular. Se tomó la membrana con mucho cuidado y se colocó en un vial perfectamente limpio.

b) Se agregaron cuidadosamente, por las paredes del vial 2 ml del fijador Metanol (Merck)-Acido acético (Merck) (3:1) de tal manera que cubriera la membrana y se dejó reposar durante 15 minutos a temperatura ambiente.

c) Se eliminó el fijador y se agregaron 2 ml de ácido tricloroacético (TCA) (Merck) frío al 10%, colocándose una hora a 4°C sin mover; se descartó el TCA, y

d) Se agregaron 400 μ l de dodecil sulfato de sodio (SDS) al 2%, se taparon los viales y se incubaron durante 30 minutos a 60°C.

e) Al transcurrir el tiempo de incubación, se sacaron los viales del baño, se dejaron a que alcanzaran la temperatura ambiente. A cada vial se le agregaron 5 ml de líquido de centelleo, se taparon, se agitaron en el vórtex durante 15 seg., se limpiaron con alcohol y se colocaron en el contador de centelleo líquido LS 6000 para cuantificar la radiactividad.

ANALISIS ESTADISTICO

Para determinar las diferencias significativas entre los grupos basales respecto a los tratados con FSH se empleó la prueba de análisis de varianza (ANOVA) completamente aleatoria con dos criterios de clasificación aceptando como significativo a $p < 0.005$, seguida de la prueba de Tukey con una $p < 0.01$.

RESULTADOS.

Los resultados se evaluaron en función de la incorporación de timidina tritiada ($[^3\text{H}]$ -timidina) por los grupos control y los tratados con hFSH, comparando entre sí a los diferentes grupos celulares: PM, las subpoblaciones F1, F2, F3 y F4, así como a las mezclas de estas subpoblaciones.

CURVA DOSIS-RESPUESTA

Se realizó una curva dosis-respuesta de hFSH en la fracción 4 (concentraciones: 0.007, 0.015, 0.03, 0.06, 0.12, 0.25, 0.5 y 1.0 UI/ml) para determinar la mejor dosis de respuesta de esta fracción para la hFSH, encontrándose que el mejor rango de respuesta está entre las concentraciones 0.03 a 0.12 UI/ml, por lo cual se tomó a la dosis 0.06 UI/ml como la dosis efectiva media (DE_{50}) de hFSH. (Fig. 9). Al realizar la prueba de regresión lineal se obtuvo un coeficiente de correlación de 0.967.

TRATAMIENTOS HORMONALES

En la figura 10, se observa el comportamiento de los cultivos de la población mixta ante diferentes tratamientos hormonales, detectándose que las células tratadas tanto con hFSH y rhFSH son las que tienen una mejor respuesta ante esta hormona, ya que las otras dos hormonas (hCG, E2) no superaron la incorporación que presentó el grupo control. En la gráfica los asteriscos indican las diferencias estadísticas significativas en los tratamientos con FSH.

CURVA TEMPORAL

La curva temporal (Fig. 11) muestra el comportamiento de los cultivos celulares al cuantificar la incorporación de [^3H]-timidina frente al estímulo de la FSH, detectándose un incremento paulatino en la curva, a las 36 horas se observa un incremento importante que se mantiene hasta las 60 horas. Observamos que hay diferencias estadísticas significativas (marcadas por asteriscos) en los grupos tratados de las 36 a las 60 horas.

SUBPOBLACIONES CELULARES

De los resultados obtenidos observamos que en los grupos testigo, la incorporación más importante de [^3H]-timidina se detectó en las subpoblaciones 3 y 4 siguiéndole, la población mixta (PM). Por otra parte las subpoblaciones 1 y 2 fueron las que incorporaron menor cantidad de [^3H]-timidina durante el cultivo (Fig. 12).

En los grupos tratados el comportamiento fue diferente; la subpoblación que presentó una mayor incorporación fué F4 seguida por PM y F3. En cambio, las subpoblaciones F1 y F2 fueron las que menor cantidad de [^3H]-timidina incorporaron, presentándose diferencias estadística significativa en la PM y en la subpoblación F4 (marcadas por asteriscos) (Fig. 12).

MEZCLA DE SUBPOBLACIONES CELULARES

Al comparar los resultados de la incorporación de [^3H]-timidina en condiciones basales, de las mezclas de F4 con las subpoblaciones F1, F2 y F3 respectivamente, se observó que la incorporación de [^3H]-timidina en condiciones basales por la PM fue mayor a la

incorporación de las mezclas de las subpoblaciones (Fig.13), siendo la mezcla F2+F4 la que quedó por abajo de las demás mezclas. Al comparar los resultados de las mezclas bajo tratamiento vemos un resultado interesante en la mezcla de F2+F4, la cual incorporó menor cantidad de [³H]-timidina, siendo la mezcla F1+F4 la que incluso quedó por arriba de PM.

ANALISIS ESTADISTICO

La prueba de análisis de varianza y la de Tukey mostraron que el análisis realizado a las subpoblaciones celulares F1, F2, F3 y F4 no tratadas presentaron una diferencia significativa con una $p < 0.0001$ al igual que los grupos tratados. Con respecto a las mezclas de las subpoblaciones F1+F4, F2+F4 y F3+F4 las no tratadas no presentaron diferencias, en cambio, en los tratados sí se encontró una diferencia significativa ($p < 0.0001$).

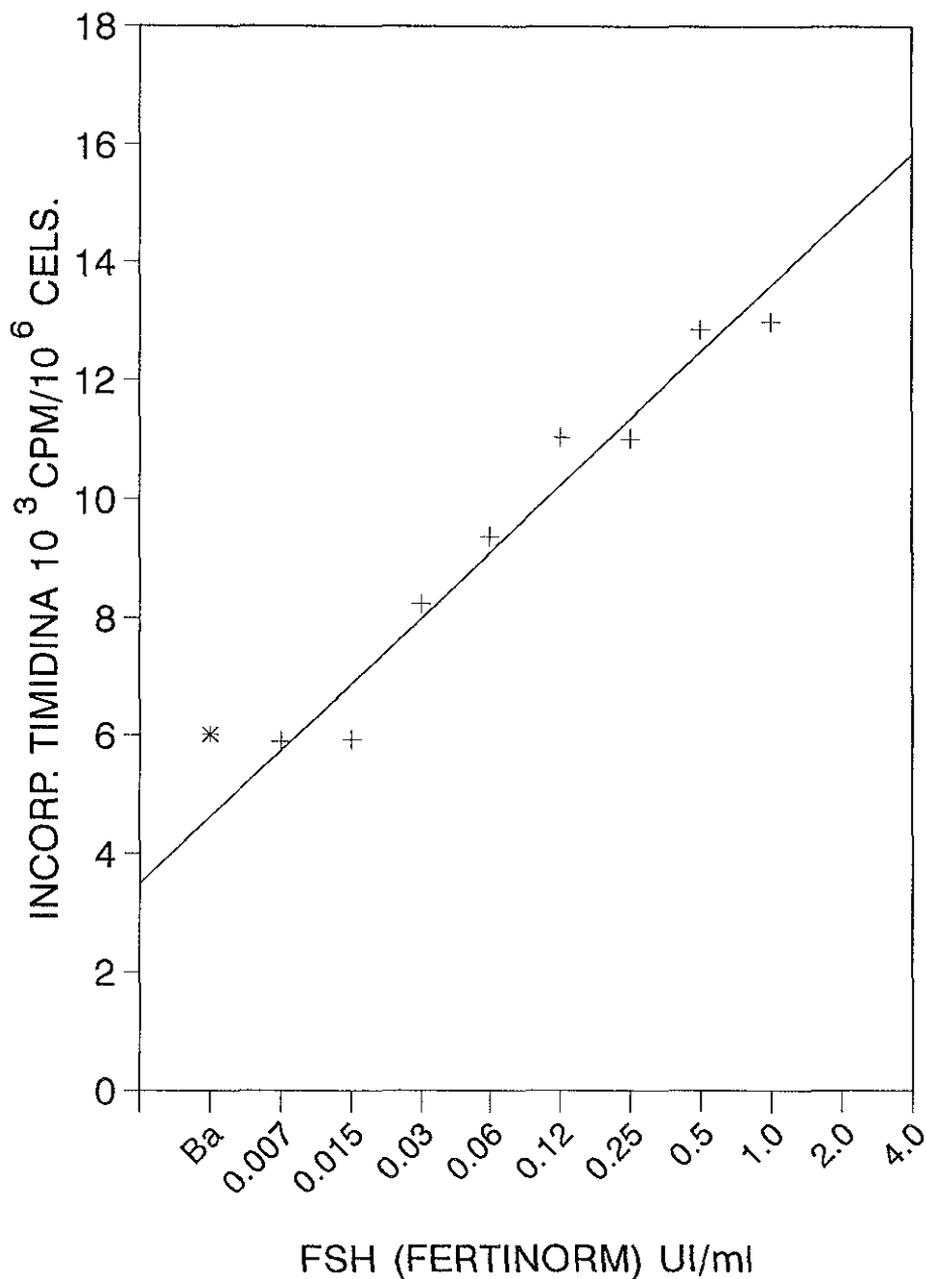


Figura 9. Gráfica dosis-respuesta que muestra la dosis efectiva (DE 50) de 0.006 UI/ml de hFSH para F4

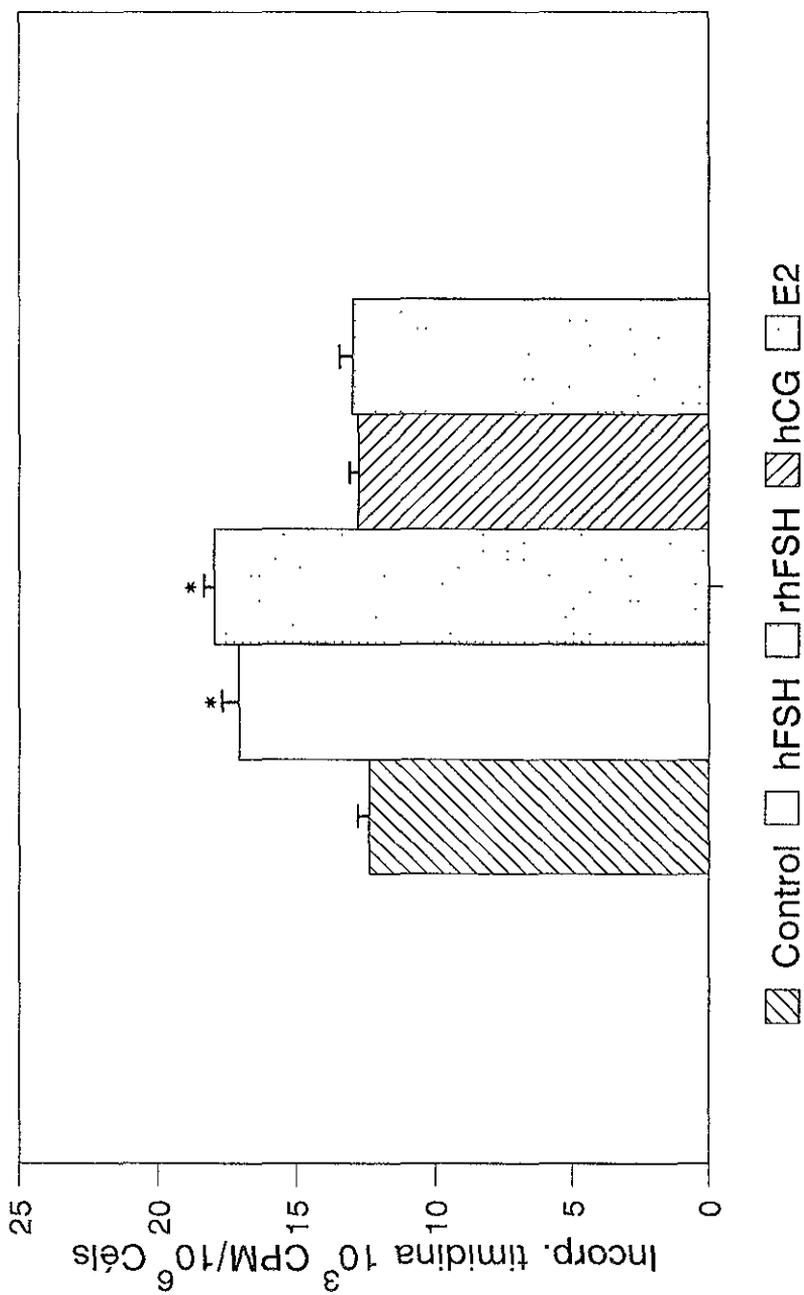


Fig. 10. Incorporación de [3H]-T por la población mixta (PM) después de cultivarla con diferentes tratamientos hormonales. Las barras representan la media \pm error estándar. Los asteriscos indican la diferencia estadística significativa ($F=69.86$, $p<0.001$)

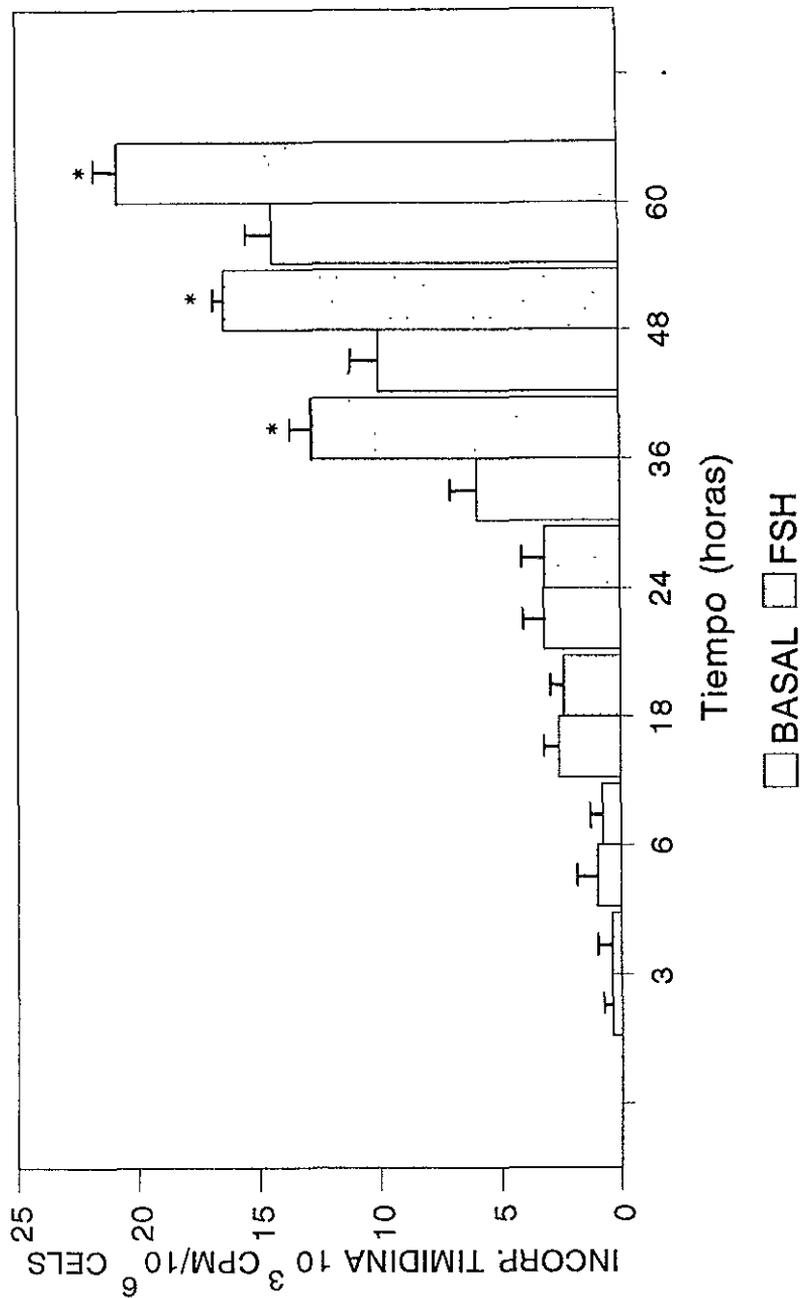


Fig. 11. Curva temporal de la incorporación de [3H]-T de la población mixta. Las barras representan la media \pm error estándar. Los asteriscos indican la diferencia estadística significativa ($p < 0.05$).

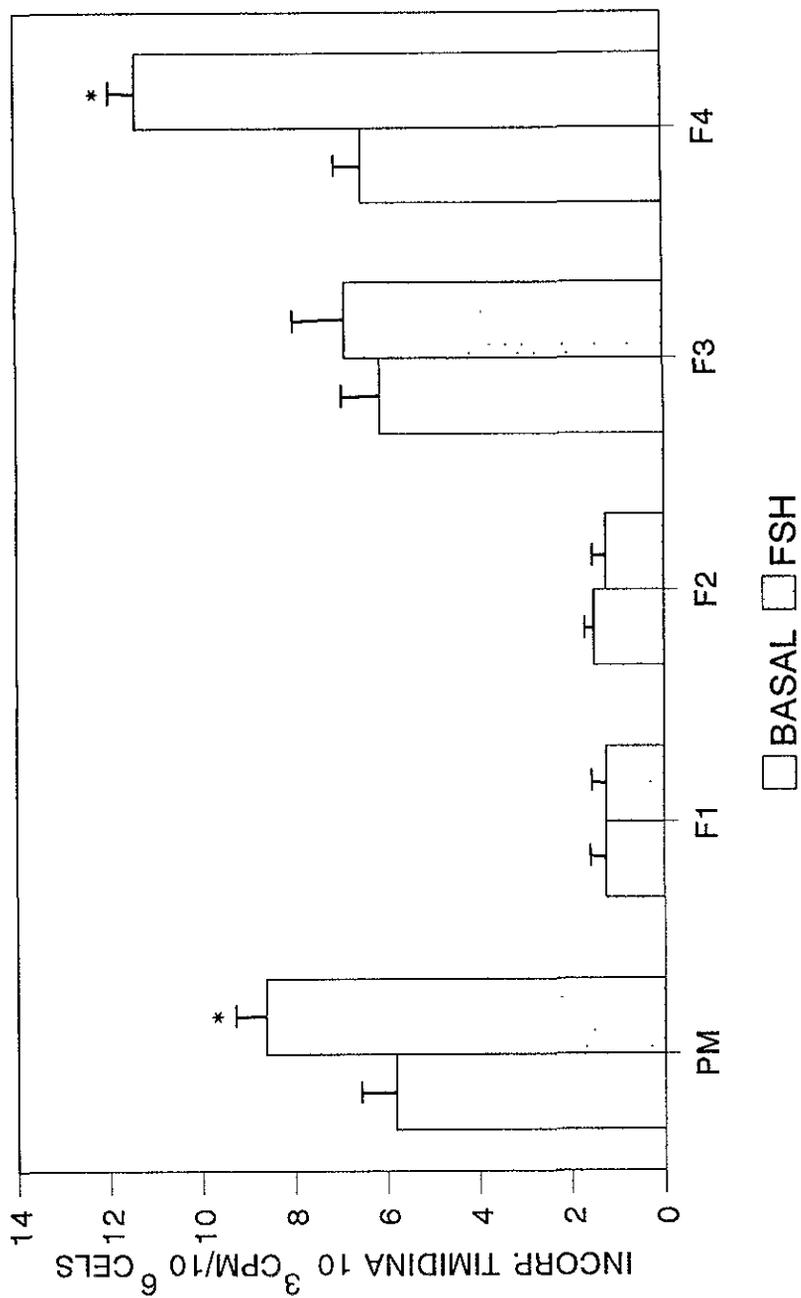


Fig. 12. Comportamiento de cada subpoblación en condiciones basales y estimuladas, después de 60 horas de cultivo. Las barras representan la media \pm error estándar. Los asteriscos indican la diferencia estadística significativa ($p < 0.05$).

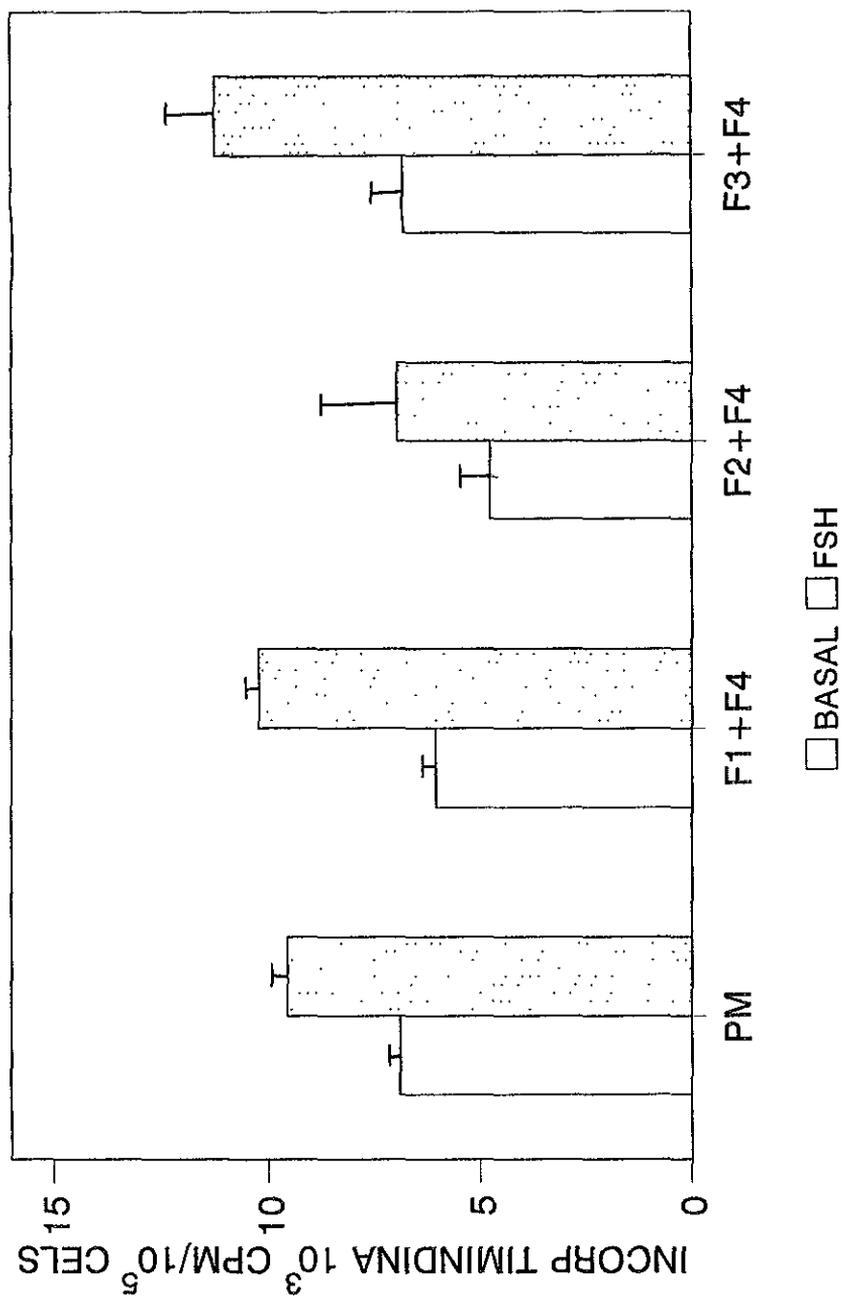


Fig. 13. Representación del comportamiento de la mezcla de las subpoblaciones. Las barras representan la media \pm error estándar.

DISCUSION

Para este trabajo se utilizó la técnica de incorporación de [³H]-timidina es un indicador apropiado de la división celular, debido a que la [³H]-timidina se integra a la cadena de DNA al realizarse la síntesis de ésta (Alberts y cols., 1989). Esta técnica no se considera inespecífica en este trabajo, debido a que sirve como un indicador de la duplicación de material genético o de la división celular.

Por otra parte, al cultivar gónadas indiferenciadas sobre membranas de policarbonato permitió la formación de acúmulos celulares, que equivale a un cultivo de órganos, ya que se favorece la interacción celular entre las diferentes subpoblaciones que forman a la población mixta (PM) o a las subpoblaciones por separado.

El empleo de los gradientes de densidad nos permitió obtener a las subpoblaciones celulares que integran al ovario izquierdo del embrión de pollo con un alto grado de pureza.

De los resultados obtenidos con este modelo, observamos que la hFSH favorece la proliferación celular en las subpoblaciones, siendo su respuesta diferente en cada una de ellas.

Los resultados de la incorporación de [³H]-timidina obtenidos del cultivo de la PM y de las diferentes subpoblaciones (F1, F2, F3 y F4) por separado tanto en los grupos basales y tratados concuerdan con lo obtenido por Velázquez y cols (1997), que la PM y F4 son las que mejor responden ante este estímulo de la FSH.

Al comparar los resultados de las mezclas de las subpoblaciones,

observamos que el resultado más interesante fue el obtenido por F2+F4 en donde se observa un decremento de la incorporación de [³H]-timidina, de donde suponemos que esta disminución en F4 fue debida a que posiblemente F2 esté secretando alguna(s) sustancia(s) desconocida(s) hasta el momento la(s) cual(es) están inhibiendo la división celular.

Al comparar nuestros resultados con experimentos similares realizados en distintas especies de mamíferos (rata, ratón y cerdo), los nuestros muestran un comportamiento diferente, ya que en mamíferos se empleó el complejo celular cumulus-ovocito y se encontró que el ovocito in vitro secreta un factor facilitador del desarrollo (FFD) de las células del cumulus. Se han realizado experimentos en donde se ha empleado este complejo intacto y sin el ovocito (ovocitotomizado), se ha tratado con FSH, EGF y medio condicionado de ovocitos en diferentes etapas de desarrollo, observándose que este FFD promueve el desarrollo y diferenciación del complejo cumulus-ovocito, además también interviene en la esteroidogénesis inhibiendo la producción de progesterona y estimulando la secreción de estradiol y progesterona, empleando un mecanismo independiente (Buccione y cols., 1990, Vanderhyden y cols., 1990, Vanderhyden y cols., 1992, Vanderhyden y cols., 1993a, Vanderhyden y cols., 1993b, Vanderhyden y cols., 1995).

Tomando en cuenta que F1 secreta testosterona y muy poco estradiol y F3 y F4 secretan estradiol y muy poca testosterona (Pedernera y cols., 1988 y Fernández y cols., 1995), para completar este trabajo es importante saber qué tanto se vería afectada la

secreción de hormonas por la mezcla de las subpoblaciones F2+F4, para así determinar hasta que grado está regulando la subpoblación F2 a la F4.

La(s) sustancia(s) que esté(n) secretando F2, está(n) inhibiendo la división celular de F4; es posible que esté(n) actuando a nivel parácrino. Entre estas sustancias secretadas está el TGF- β que como refiere Skinner y cols. (1987) inhibe la proliferación de las células epiteliales, el EGF estimula la incorporación de [3 H]-timidina por la granulosa, pero este efecto se ve inhibido por el TGF- β . Por otro lado, el TGF- β +FSH promueven la actividad de la aromatasa, la regulación en la formación de receptores para EGF y la expresión del receptor para LH en la granulosa.

Por otra parte, el IGF-I, actúa como regulador intraovárico (Hsu y Hammond, 1987), potenciándose su efecto con la FSH o el AMPc, sugiriendo esto que la interacción de estas sustancias interviene en la regulación de la proliferación de la granulosa (Hammond y cols., 1991). Otra sustancia que hay que tomar en cuenta es el EGF que aparentemente actúa como un factor autócrino (Roy y cols., 1991). Si tomamos en cuenta estos factores que modulan al ovario, nos dan la pauta para tratar de dilucidar en nuestro modelo qué sustancias están involucradas y a qué nivel del ciclo celular posiblemente estén actuando y si existe algún tipo de regulación, ya sea parácrina o autócrina.

En este trabajo no se cuantificó el número de células obtenidas al final de cada cultivo; de haberse hecho hubiéramos podido reafirmar que hubo división celular de cada una de las

subpoblaciones ante el estímulo de la hFSH como suponemos que ocurrió con los datos obtenidos a través de la incorporación de [³H]-timidina. Al mismo tiempo haber corroborado la inhibición de la división celular en F4 provocada por F2. Posteriormente, se mejorará la técnica para la obtención de las células a partir de los cultivos.

Quizás se trate del simple contacto entre los dos tipos celulares (F2 y F4), que induzca que dentro de la "maquinaria" interna de F4 se inicie posiblemente una actividad de tipo autócrino. Este tipo de interacción celular se ha estudiado in vitro en las células de la granulosa y de la teca de mamíferos, encontrándose que las células de la teca secretan TGF- α , EGF y TGF- β , los dos primeros promueven la proliferación de las células de la granulosa (regulación parácrina) y posiblemente regulen el crecimiento de la teca (regulación autócrina); en cambio, el TGF- β inhibe el crecimiento de las células de la granulosa, pero promueve su esteroidogénesis (Skinner y cols., 1989 y Kotsuji y Tominaga, 1988).

Con este trabajo corroboramos que el modelo empleado es muy apropiado para el estudio de los diferentes tipos celulares, esteroidogénicos en el ovario de aves y su respuesta al estimularlos con hFSH, además que es fácilmente manipulable, de un costo bajo y así mismo de que se trata de un sistema cerrado e independiente del ambiente materno.

CONCLUSIONES

De este trabajo concluimos que:

- 1.- Las subpoblaciones F1 y F2 se encuentran en menor proporción en relación a F3 y F4 en el ovario prefolicular siendo las primeras subpoblaciones las que menor respuesta proliferativa proporcionan ante el estímulo de hFSH.
- 2.- La población mixta, F3 y F4 presenta una respuesta proliferativa similar ante el estímulo de la hFSH.
- 3.- F4 presenta una mayor respuesta proliferativa con y sin estímulo de la hFSH en comparación con las otras subpoblaciones
- 4.- F2 inhibe la incorporación de [³H]-timidina en la división celular de F4, posiblemente debido a que F2 esté secretando alguna sustancia.

A P E N D I C E

MEDIO DE CULTIVO:

DMEM	10.0 gr
Albúmina bovina.....	0.1 gr
NaHCO ₃	3.7 gr
Agua bidestilada	1000 ml

SOLUCION SALINA BALANCEADA (SSB) LIBRE DE Ca²⁺ Y Mg²⁺:

NaCl	8.0 gr
KH ₂ PO ₄	0.2 gr
KCl	0.2 gr
Na ₂ HPO ₄	1.15 gr
Agua bidestilada	1000 ml
Rojó fenol	2-5 gotas

SOLUCION DE TRIPSINA:

0.025 gr disueltos en 10 ml de SSB libre de Ca²⁺ y Mg²⁺

SOLUCION DE INHIBIDOR DE TRIPSINA:

0.050 gr disueltos en 10 ml de DMEM

SOLUCION DE TCA 10%:

TCA	10.0 gr
Agua Bidestilada	100 ml

SOLUCION DE SDS 2%:

SDS	2.0 gr
Agua bidestilada	100 ml

SOLUCION DE METANOL-ACIDO ACETICO (3:1)

SOLUCION DE METRIZAMIDA (0-20%):

Metrizamida	1.4 gr
DMEM	7.0 ml

SOLUCION DE AZUL TRIPANO:

Azul tripano	0.4 gr
Agua bidestilada	90.0 ml
NaCl	0.81 gr
K ₂ HPO ₄	0.06 gr
Metil-pOH benzoato	0.05 gr

B I B L I O G R A F I A.

- Alberts, B, Bray, D, Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. y Watson, J. D. (1989). *Biología Molecular de la Célula*. Ed. Omega. Barcelona. 1264 pp.
- Alvarez, F.G., Juárez-Oropeza, M.A., Velázquez, P.N., González del Pliego, M., Méndez-Herrera, C y Pedernera, E. (1995). Newly hatched chick ovarian cell subpopulations metabolize distinctively progesterin and androgen precursors. *Gen Comp Endocrinol.* 97, 31-41.
- Bendell, J.J. and Dorrington, J. (1991). Estradiol-17 beta stimulates DNA synthesis in rat granulosa cells: action mediated by transforming growth factor-beta. *Endocrinology.* 128(5):2663-2665.
- Bley, M.A., Simon, J.C., Estevez, A.G., de Asua, L.J. and Baranao, J.L. (1992). Effect of follicle-stimulating hormone on insulin-like growth factor-I-stimulated rat granulosa cell deoxyribonucleic acid synthesis. *Endocrinology.* 131(3):1223-1229.
- Brode, M.D. (1928). The significance of the asymetry of the ovaries of the fowl. *J. Morphol. Physiol.* 46, 1-57.
- Buccione, R., Vandehyden, B.C., Caron, P.J. and Eppig, J.J. (1990). FSH-induced expansion of the mouse cumulus oophorus in vitro is dependent upon a specific factors secreted by the oocyte. *Dev. Biol.* 138(1): 16-25.
- Dahl, E. (1971). Studies on the structure of ovarian interstitial tissue. A comparative study of the fine structure of the ovarian interstitial tissue in the rat and domestic fowl. *Z. Zellforsch Mikrosk. Anat.* 108(2):275-290
- Dahl, K.D. and Hsueh, A.J.W. (1988). Mechanism of action of FSH in the ovary. En: *Hormones and their actions, Part II*. Elsevier Science Publishers BV. 181-192 pp.
- Dorrington, J.H., Bendell, J.J. and Khan, S.A. (1993). Interactions between FSH, estradiol-17 beta and transforming growth factor-beta regulate growth and differentiation in the rat gonad. *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.* 44(4-6):441-447.
- Eckert, R., Randall, D. y Augustine, G. (1990) *Fisiología animal*. Interamericana. McGraw-Hill. España. 1159 pp.
- Endo, Y. Tetsumoto, Nagasaki, H., Kashiwal, T., Tamaki, H., Amino, N. and Miyai, K. (1990). The distinct roles of alfa and beta-subunits of human thyrotropin in the receptor-binding and postreceptor events. *Endocrinology.* 127, 149-154.
- Galli, F. and Wassermann. (1972). Steroid biosynthesis by testes and ovaries of 15-day-old chick embryos. *Gen. Comp. endocrinol.* 19,

509-514.

Gilbert, A.B. (1971). **The ovary**. En: **Physiology and biochemistry of the domestic fowl**. (Ed) Bell, D.J. and Freeman, B.M. Academic Press. London. Vol. 3: 1163-1208, 1449-1468 p.

González del Pliego, M, González-Morán, G and Pedernera, E. (1988). Ultrastructure of the ovarian medulla in the newly hatched chick treated with human chorionic gonadotropin. **Cell Tissue Res.** 253, 665-670

González-Morán, G, González del Pliego, M and 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

Guichard, A., Cedard, L. and Haffen, K. (1973). Aspect comparatif de la synthese de steroides sexueles par les gonades embryonnaires de poulet a differents stades du development (etude en culture organotypique a partir de precurseurs radioactifs). **Gen. Comp. Endocrinol.** 20(1):16-28

Guichard, A., Cedard, L., Mignot, Th-M, Scheib, D. and Haffen, K. (1977a). Radioimmunoassay of steroids produced by culture chick embryonic gonads: Differences according to age, sex and side. **Gen. Comp. Endocrinol.** 32, 255-265.

Guichard, A., Scheib, D, Haffen, K and Cedard, L. (1977b). Radioimmunoassay of steroid hormones produced by embryonic chick gonads during organ culture. **J. Steroid. Biochem.** 8(5):599-602

Guichard, A., Cedard, L., Mignot, Th-M, Scheib, D. and Haffen, K. (1979). Radioimmunoassay of steroids produced by chick embryo gonads cultured in the presence of some exogenous steroids precursors. **Gen. Comp. Endocrinol.** 39, 9-19.

Hammond, J. M., Mondschein, J. S. and Canning, S. F. (1989). Insulin-like growth factors (IGF's) as autocrine/paracrine regulators in the porcine ovarian follicle. **Growth Factors and the Ovary**. Serono Symposia, USA, N. Y., Plenum Press. 107-120 pp.

Hernández-Vértiz, A., González del Pliego, M., Velázquez, P and Pedernera, E. (1993). Morphological changes in the thecal layer during the maturation of the preovulatory ovarian follicle of the domestic fowl (Gallus domesticus). **Gen. Comp. Endocrinol.** 92, 80-87.

Hicks, G.J.J y Díaz-Zagoya, J.C. (1988). **Bioquímica e Inmunología**. Facultad de Medicina. U.N.A.M. México. Vol II: 569 pp.

Hoffman, G. y Völker, H. (1969). **Anatomía y fisiología de las aves domésticas**. Ed Acribia. España. 141-143 pp.

Hsueh, A.J.W., Adashi, E.Y., Jones, P.B.C. and Welsh, T.H. (1984). Hormonal regulation of the differentiation of cultured ovarian granulosa cells. *Endocr. Rev.* 5, 76-127.

Hsu, C. -J. and Hammond, J. M. (1987). Gonadotropins and estradiol stimulate immunoreactive insuline-like growth factor-I production by porcine granulosa cells in vitro. *Endocrinology.* 120, 198-207.

Huang ES, Kao KJ and Nalbandov AV. (1979). Synthesis of sex steroids by cellular components of chicken follicles. *Biol. Reprod.* 20, 454-461.

Jones, R.E. (1978). *The vertebrate ovary.* Plenum Press. N. Y. 833 pp.

Kotsuji, F. and Tominaga, T. (1994). The role of granulosa and theca cell interactions in ovarian structure and function. *Microsc. Res. Tech.* 27, 97-107.

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

Merchant-Larios, H. (1978). Ovarian differentiation. En: *The vertebrate ovary.* Ed. Richard E. Jones. Plenum Press, N.Y., 48-81 pp.

Nitta, H., Osawa, Y. and Bahr, J.M. (1991). Multiple steroidogenic cell populations in the thecal layer of preovulatory follicles of the chicken ovary. *Endocrinology.* 129, 2033-2040

Norman, A.W and Litwack, G. (1987). *Hormones.* Academic Press, Inc. San Diego. 987 pp.

Olsson, J.H., Carlson, B. and Hillensjo, T. (1990). Effect of insulin-like growth factor I on deoxyribonucleic acid synthesis in cultured human granulosa cells. *Fertil. Steril.* 54(6):1052-1057

Pedernera E, Gómez Y, Velázquez P, Juárez-Oropeza MA, and González del Pliego M. (1988). Identification of steroidogenic subpopulations in the ovary of the newly hatched chicken. *Gen. Comp. Endocrinol.* 71, 153-162 .

Peralta, D.I. Efecto de gonadotropinas sobre la división celular en cultivos primarios de ovario de embriones de pollo. Tesis de Licenciatura en Biología. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional Autónoma de México. 1994.

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

Porter, T.M., Hargis, B.M., Silsby, J.L. and 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(1): 109-116.

Roskoski, R. (1996). *Biochemistry*. W. B. Saunders Co. USA. 419-435 pp.

Roy, S.K. and Greenwald, G.S. (1991). Mediation of follicle-stimulating hormone action on follicular deoxyribonucleic acid synthesis by epidermal growth factor. *Endocrinology*. 129(4):1903-1908.

Sauveur, B. (1992). *Reproducción de las aves*. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid. 350 pp.

Skinner, M. K., Keski-oja, J., Osteen, K. G. and Moses, H. L. (1987). Ovarian thecal cells produce transforming growth factor- β which can regulate granulosa cell growth. *Endocrinology*. 121, 786-792.

Stein, G.H and Yanishevsky, R. (1979). *Autorradiography*. En: William, B.J. and Ira, H.P. (Eds). *Methods in Enzymology* Academic Press, San Diego. Vol. LVIII:279-292 pp.

Stein, G.S. and Lian, J.B. (1992). *Molecular and Cellular Approaches to the Control of Proliferation and differentiation*. Academic Press, Inc. San Diego. 426 pp.

Tennant, J. R. (1964). Evaluation of the tripan blue technique for the determination of cell viability. *Transplantation*. 2, 685-694.

Tienhoven, A.V. (1983). *Reproductive physiology of vertebrates*. Cornell University Press, London. 1274 pp.

Vanderhyden, B.C and Armstrong, D.T. (1990). Developmental pattern of the secretion of cumulus expansion-enabling factor by mouse oocytes and the role of oocytes in promoting granulosa cell. *Dev. Biol.* 140(2):307-317.

Vanderhyden, B.C., Telfer, E.E and Eppig, J.J. (1992). Mouse oocytes promote proliferation of granulosa cells from preantral and antral follicles in vitro. *Biol Reprod.* 46(6):1196-1204.

Vanderhyden, B.C. (1993a). Species differences in the regulation of cumulus expansion by an oocyte-secreted factor (s). *J. Reprod. Fertil.* 98(1):219-227.

Vanderhyden, B.C., Cohen, J.N. and Morley, P. (1993b). Mouse oocytes regulate granulosa cell steroidogenesis. *Endocrinology*. 133(1):423-426.

Vanderhyden, B.C. and Tonary, A.M. (1995). Differential regulation

of progesterone and estradiol production by mouse cummulus and mural granulosa cells by A factor (s) secreted by oocyte. *Biol Reprod.* 53(6):1243-1250.

Velázquez P, Gómez Y, González del Pliego M, and Pedernera E. (1991). Steroidogenic cell subpopulations obtained from the theca of the preovulatory follicles in the ovary of the domestic fowl. *Gen Comp Endocrinol.* 83, 243-248.

Velázquez, P.N, Peralta, D.I. y Pedernera, E. (1997). Proliferative effect in vitro of follicle-stimulating hormone on the left ovary of the chick embryo. *Gen. Comp. Endocrinol.* 105(1):40-49.

Weichert, C.K. y Presch, W. (1981). *Elementos de anatomia de los cordados.* McGraw-Hill. México. 303 pp.

Weniger, J.P. and Zeis, A. (1971). Biosynthèse d'oestrogènes par les ébauches gonadiques de poulet. *Gen. Comp. Endocrinol.* 16(2):391-397.

Weniger, J.P. and Chouraqui, J. (1988). Action de LH sur la secretion d'oestradiol par l'ovarie embryonnaire de poulet en culture in vitro. *Reprod. Nutr. Dev.* 28(6A):1473-1477.

Witschi, E. (1956). Development of vertebrates. En *The vertebrate ovary.* Editado por Richard E. Jones. Plenum Press, N.Y. 1567 p.

Woods, J.E. and Podczaski, E.S. (1974). Androgen synthesis in the gonads of the chick embryo. *Gen. Comp. Endocrinol.* 24(4):413-423

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

Woods, J.E. and Erton, L.H. (1978). The synthesis of estrogens in the gonads of the chick embryo. *Gen. Comp. Endocrinol.* 36(31):360-370.

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

Woods, J.E. (1987). Maturation of the hipothalamo-Adenohypophiseal-gonadal (HAG) axes in the chick embryo. *The J. Exp. Zool. Suppl.* 1, 265-271.

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