



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

“Inducción de la proliferación celular por la hormona folículo estimulante durante el desarrollo del ovario”

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 :

ALMA ROSA VARELA VEGA



DIRECTORA DE TESIS: DRA. MARÍA DEL CARMEN MÉNDEZ HERRERA.

MEXICO, D.F.

2000



201438



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

MAT. MARGARITA ELVIRA CHÁVEZ CANO
Jefa de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo de Tesis:
"Inducción de la proliferación celular por la hormona folículo
estimulante durante el desarrollo del ovario".

realizado por Alma Rosa Varela Vega

con número de cuenta 9040190-5 , pasante de la carrera de Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis
Propietario

Dra. María del Carmen Méndez Herrera *Carmina Méndez Herrera*

Propietario

Med. Cirj. María Marcela Ramírez Escoto *María Marcela Ramírez Escoto*

Propietario

Dra. Patricia Rivas Manzano *Patricia Rivas Manzano*

Suplente

Dra. Guadalupe Zavala Padilla *Guadalupe Zavala Padilla*

Suplente

Dr. Luis Felipe Jiménez García *Luis Felipe Jiménez García*

FACULTAD DE CIENCIAS
U. N. A. M.

Consejo Departamental de Biología

Edna María Suárez Díaz

Dra. Edna María Suárez Díaz



A MI MADRE:

*Por la vida que me diste, por el amor y
Paciencia que siempre me haz tenido, por
Enseñarme lo que debo y puedo.
Gracias mamá.*

*“El estudio de la naturaleza nos enseñará
cómo ha llenado Dios de cosas bellas y maravillosas
de este mundo, para que podamos gozarlas...”*

Radom Powell of Gilwell

AGRADECIMIENTOS.

A la Dra. Carmen Méndez por su apoyo y paciencia en la realización de esta tesis.

A la Med. Cir. Marcela Ramírez por su asesoría y enseñanza.

Al Dr. Enrique Pedernera por toda la ayuda y la asesoría brindada.

A la maestra Conchita por sus consejos y amistad.

A Verónica Rodríguez Mata por la realización de los cortes histológicos de los ovarios, que fueron la base de mi trabajo.

Al departamento de Embriología donde se realizó la parte experimental del presente trabajo.

Al departamento de Biología Celular y Tisular en donde se llevó a cabo el procesamiento de las muestras y la parte de morfometría de la presente tesis.

AGRADECIMIENTOS.

A mi familia por todo el apoyo, el cariño y la paciencia que me brindaron siempre, ya que sin ustedes no hubiese podido alcanzar esta meta.

A Iliana por ser mi cómplice y confidente, pero sobre todo mi amiga.

A mi amiga Mali, por ser eso mi amiga ante todo y sobre todo.

A Pech por tu amistad y respaldo incondicional.

A Sergio por el tiempo compartido.

A Dante por su tiempo, ayuda y paciencia.

A Laura por tu apoyo y amistad.

A los Scouts que me han ayuda a ser lo que soy UNA MUJER FELIZ.

INDICE

I.	RESUMEN.....	1
II.	INTRODUCCION	
	II. 1 Determinación del sexo en Mamíferos.....	2
	II. 2 Desarrollo Gonadal.....	3
	II. 3 Diferenciación Gonadal en Aves.....	5
	II. 4 Hormonas Gonadotropinas.....	7
	II. 5 Funciones de la Hormona Folículo Estimulante.....	8
	II. 6 Receptor de la Hormona Folículo Estimulante.....	8
	II. 7 Ciclo Celular.....	10
	II. 8 Hormonas Esteroides en Relación con el Ciclo Celular.....	13
III.	PLANTAMIENTO DEL PROBLEMA.	15
IV	HIPOTESIS.....	15
V	OBJETIVOS.....	16
VI.	MATERIALES Y METODOS.....	17
VII.	RESULTADOS.....	20
VIII.	DISCUSION.....	31
IX.	CONCLUSIONES.....	39
X.	BIBLIOGRAFIA.....	40
XI.	APENDICE 1.....	45

I. RESUMEN.

La reproducción de los mamíferos es un proceso complejo regulado por el sistema neuroendócrino, el hipotálamo a través de neuropéptidos estimula la liberación de las hormonas gonadotrópicas, éstas a su vez intervienen directamente en el funcionamiento de las gónadas, las cuales tienen una doble función de formar y madurar los gametos, así como de sintetizar las hormonas esteroides. En el ovario maduro es bien conocido el papel de la hormona folículo estimulante (FSH) sobre el crecimiento y la maduración folicular, su principal acción es promover la proliferación y la diferenciación de las células de la capa granulosa, sin embargo se tiene poca información sobre el efecto de esta hormona en el ovario prefolicular. El objetivo de este trabajo es identificar las subpoblaciones celulares del ovario embrionario que proliferan por efecto de la FSH, a través de la evaluación de su índice mitótico que lo definimos como el número de mitosis por unidad de área, para la corteza y la médula ($20,000\mu^2$), en el caso del epitelio superficial éste se reporta en un perímetro de 2000μ , se contaron las mitosis de las células epiteliales, las ovogonias, las células somáticas y las células perilacunares en los animales testigo y tratados con FSH. Los embriones de pollo tratados recibieron 2UI de FSH humana (Fertinorm HP), el efecto de la gonadotropina se estudió por períodos de 3 horas entre las 12-24 horas y a las 36 horas posteriores a la aplicación de la hormona. Todos los embriones fueron sacrificados a los 14 días de incubación, dos horas antes del sacrificio se trataron con $10\mu\text{g}$ de Colcemid. Los resultados muestran que la hormona folículo estimulante aumenta el índice mitótico de las células del epitelio superficial, de las ovogonias y de las células somáticas de la médula subcortical; mientras que las células perilacunares no presentan cambio en su índice mitótico. Cada tipo celular mostró un tiempo propio para su división, las células epiteliales lo hacen entre 15 y 18 horas posteriores al tratamiento con FSH, las células somáticas de la médula subcortical se dividen entre las 15 y 21 horas post-tratamiento mientras que las ovogonias lo hacen a las 24 horas. Podemos concluir que la FSH induce proliferación en las células del epitelio superficial, así como en las células somáticas y las ovogonias en el ovario del embrión de pollo de 14 días de incubación.

I. INTRODUCCIÓN.

El mecanismo por el cual se determina el sexo de los individuos ha sido objeto de especulaciones científicas desde los tiempos de Aristóteles, éstas consideraban en primera instancia a los factores ambientales como el calor, la nutrición, la constitución física de los organismos y la edad. Estas ideas prevalecieron hasta principios de este siglo, y gracias al redescubrimiento de las leyes de Mendel y los trabajos de McClung (1902) acerca del cromosoma sexual, se establecieron las bases para la correlación entre la determinación del sexo y la información genética; es hasta 1923, cuando Painter demuestra citológicamente la existencia de los cromosomas X y Y (Page y col., 1987).

Actualmente, se sabe que tanto los factores ambientales como los genéticos pueden intervenir en la diferenciación sexual en diferentes especies, por ejemplo en los insectos, el sexo se determina mediante el número de cromosomas presentes, y en algunas especies de cocodrilos y tortugas, el sexo se establece de acuerdo a la temperatura a que están expuestos los huevos durante un período determinado del desarrollo embrionario. En los vertebrados amniotas el sexo se establece genéticamente y no está influido por cambios medioambientales (Gilbert, 1997).

II.1 Determinación del Sexo en Mamíferos.

La determinación del sexo en mamíferos se establece a nivel cromosómico, en el momento de la fertilización y no está influenciada por cambios medioambientales. El cromosoma Y induce la formación del testículo, desarrollándose el fenotipo masculino; en la ausencia de dicho cromosoma la gónada se diferencia a ovario, y como consecuencia se establece el fenotipo femenino (Schafer y Goodfellow, 1996).

En el cromosoma Y se produce el factor determinante del testículo (Testis-Determining Factor ó TDF) el cual organiza el desarrollo de la gónada indiferenciada hacia testículo, este gen que codifica para el TDF se encuentra en el brazo corto del cromosoma Y, específicamente se localiza en la región sexual del mismo (Gilbert, 1997). Estudios de genética molecular han identificado este gen como el SRY (Sexual Region of Y), que actúa sobre las células somáticas de la cresta genital. La expresión transitoria del gen SRY sugiere la activación rápida del destino de una célula en otra. El SRY inicia la diferenciación de las células de Sertoli, las cuales son el primer tipo celular de los futuros testículos. Dos genes que son importantes también en la diferenciación y función de las células de Sertoli son el gen SOX9 y el SF-1, factor esteroideogénico-1. El gen SOX9 se expresa en las células de Sertoli durante el desarrollo del embrión de ratón y la

inactivación de este gen por mutación en humanos da como resultado mujeres XY. El gen SF-1 también se expresa en las células de Sertoli y se piensa que activa la expresión del gen de la hormona anti-Mülleriana (AMH). Esto demuestra que la determinación del sexo en el macho esta controlada por un complejo mecanismo de expresión génica (Werner y col., 1996).

La diferenciación del ovario en mamíferos se pensaba que era de forma pasiva, según Jost (1953) el fenotipo femenino era independiente del sexo genético, ya que en ausencia de gónadas los embriones de conejo presentaban este fenotipo. Así, el desarrollo en mamíferos se realiza en la dirección femenina a menos que la presencia del cromosoma Y, específicamente el gen SRY, induzca la formación del testículo. Actualmente se especula que el gen Dax1 -miembro de la superfamilia de receptores nucleares de huérfanos-, interviene en la determinación del sexo hacia la formación del ovario, este gen se encuentra en la región del cromosoma X (Xp21), la duplicación de esta región del cromosoma X en humanos da como resultado a una mujer XY. La expresión de este gen durante el desarrollo gonadal del ratón está asociado con la formación del ovario y tiene una regulación negativa en la diferenciación del testículo. La mutación en el gen Dax1 en humanos muestra que no es necesario para el desarrollo del testículo. Las propiedades del gen Dax1 sugieren que es importante en la determinación del ovario y podría ser por lo tanto, antagonista de la acción del SRY (Swain y Lovell-Badge, 1997). Sin embargo en estudios recientes realizados en ratones mutantes con deficiencia del gen Dax1, se observó que no afecta el desarrollo del ovario y la fertilidad en las hembras pero en machos se observa un daño severo en la espermatogénesis, lo que sugiere que en mamíferos el Dax1 podría regular la función de las células de Leydig y Sertoli durante el desarrollo testicular (Yu y col., 1998).

II.2 Desarrollo Gonadal.

El establecimiento de la línea germinal es uno de los primeros procesos que suceden a la activación del huevo. En los vertebrados superiores, las células germinales primordiales (CGP's) migran desde su sitio de diferenciación inicial, hasta la región urogenital donde se formarán las gónadas (Gilbert, 1997). Hahnel y Eddy (1986) mostraron por inmunohistoquímica que las CGP's se encuentran al inicio del desarrollo embrionario en el epiblasto, Ginsburg y col. (1990) localizaron esta región en el mesodermo extraembrionario justo por detrás de la línea primitiva en embriones de ratón de 7 días. Las CGP's migran del mesodermo extraembrionario hacia el embrión, primero al mesodermo de la línea primitiva y posteriormente hacia el endodermo a través de la

alantoides. Una vez que las CGP's alcanzan la región de la cresta genital, son rodeadas por las células del mesénquima que forman el primordio gonadal, en la región ventral del mesonefros.

Las células mesenquimáticas y mesoteliales incrementan su actividad proliferativa cuando las CGP's colonizan el primordio gonadal, posteriormente se inicia el depósito de la lámina basal y éstas se agrupan para formar los cordones sexuales. La gónada indiferenciada, en este momento se compone de tres tipos celulares: las células germinales, las células aportadas por el epitelio celómico que recubren las crestas gonadales, y las células intersticiales derivadas del mesénquima de las mismas. El primordio gonadal tiene dos opciones de desarrollo, puede formar ovario o testículo, está diferenciación determina el desarrollo sexual del individuo (Georges y Wilson, 1994 y Merchant, 1991).

En el humano el primordio gonadal aparece durante la 4ª. semana de gestación y permanece indiferente hasta la 7ª. semana; durante este estado indiferente, el epitelio de la cresta genital prolifera y se introduce en el tejido conectivo. Las células epiteliales forman los cordones sexuales que rodearán a las CGP's que migraron durante la 6ª. semana de gestación hacia la gónada. Si el sexo cromosómico del individuo es XY, los cordones sexuales continúan su proliferación hasta la 8ª. semana de gestación extendiéndose a través del tejido conectivo. Los cordones se unen unos con otros, formando una red que en su porción distal, recibe el nombre de "rete testis". Los cordones testiculares pierden contacto con el epitelio superficial y están separados de éste por una matriz extracelular, la túnica albugínea. Durante el desarrollo fetal, algunas células del mesénquima del testículo se diferencian a células intersticiales o de Leydig, las cuales sintetizan testosterona y las células de los cordones testiculares se diferencian a células de Sertoli, que secretarán AMH (Gilbert, 1997).

Si la diferenciación es hacia ovario, el primordio gonadal no presenta cambios estructurales evidentes entre la 6ª. y 14ª. semanas de gestación, excepto por un incremento en el número de células somáticas y de células germinales. En la 7ª. semana de gestación, se observa una proliferación acentuada de las células germinales en la porción distal de los cordones sexuales primordiales, que se ubican contiguos al mesonefros, más estrechamente en la parte basal del ovario (Satoh, 1991). Durante la 8ª. semana de gestación, los cordones sexuales primordiales degeneran; sin embargo, el epitelio celómico produce nuevamente una serie de cordones sexuales, los cuales no penetran profundamente en el mesénquima, sino permanecen cerca de la superficie del ovario, por lo que se les denomina cordones sexuales corticales, estos cordones rodean a

las CGP's formando las células de la capa granulosa, las células del mesénquima se diferencian para formar las células de la teca (Gilbert, 1997).

Durante la 13ª. semana de gestación, se observa un crecimiento del ovario, formando en la porción basal tejido intersticial, llamado médula. Los cordones sexuales primordiales se fragmentan en pequeños racimos celulares, formando una "rete ovarii". Los cordones sexuales corticales corren por debajo del epitelio superficial, que esta casi completamente rodeado por la lámina basal (Sato, 1991).

Las primeras células en diferenciarse en el ovario son las ovogonias que se transforman en ovocitos primarios al iniciarse la meiosis, éstos inducen la fragmentación de los cordones sexuales corticales y la formación de los folículos, en torno a los cuales se diferencian las células esteroideogénicas de la teca interna (Gilbert, 1997).

En la 14ª. semana de gestación, las ovogonias detienen su proliferación al iniciar la profase de la primera división meiótica. El número de las células germinales del ovario queda limitado en la vida fetal, en contraposición con las espermatogonias que mantienen su capacidad proliferativa durante toda la vida reproductiva del individuo.

Los ovocitos y ovogonias que se encuentran en el ovario fetal humano son aproximadamente siete millones y pasan por un proceso de muerte celular programada (apoptosis), de manera que al momento de nacer, la niña tendrá alrededor de 2 millones de ovocitos en sus ovarios y al llegar a la adolescencia contará con 400 mil ovocitos. Entre el quinto y sexto mes de gestación, en los ovarios se inicia el proceso de foliculogénesis. El número de folículos se reduce a la mitad aproximadamente entre la infancia y la pubertad por el proceso de atresia folicular; de manera que los ovocitos que llegan a ser ovulados en la vida reproductiva de una mujer son alrededor de 400 (Larsen, 1997).

II.3 Diferenciación Gonadal en Aves.

Las aves han sido ampliamente usadas en investigación, ya que presentan la capacidad de revertir de sexo si se manipulan con hormonas esteroides o se inhibe la síntesis de estrógenos, es por esta razón que se consideran buenos modelos experimentales en la investigación de la diferenciación sexual en vertebrados, sin embargo no es el único grupo que presenta esta capacidad de revertir el sexo por acción de las hormonas esteroides (Nakabayashi y col., 1998; Elbrecht y Smith, 1992). Desde 1935 ya se consideraba que los tratamientos hormonales administrados a los embriones de pollo ejercían una marcada influencia en la diferenciación de las gónadas (Wolf y Ginglinger, 1935); esta idea dio origen a una serie de trabajos posteriores que plantearon como

hipótesis que la diferenciación hacia la formación del ovario se debía a la secreción temprana de estrógenos por la gónada indiferenciada (Weniger, 1991).

Algunos de los genes que intervienen en la determinación y diferenciación de la gónada en mamíferos (AMH, SOX9, SOX3, WT1, SF1 y Dax1) se presentan también en aves; en embriones de pollo la expresión algunos de estos genes mostraron dimorfismo sexual durante el desarrollo gonadal, mientras que otros se expresan de forma similar en ambos sexos. El gen que codifica para la AMH se expresa en ambos sexos, previo a la diferenciación gonadal y durante ésta, con niveles más altos en machos que en hembras. La expresión del gen SOX9 es específica en machos, su regulación está modulada a la alta por los transcritos de la AMH. La expresión del SOX3 es previa a la expresión del SOX9, y su regulación a la alta se observa en ambos sexos al comienzo de la diferenciación sexual, y disminuyen durante el desarrollo. El gen WT1 se expresa en ambos sexos, mientras que la expresión del SF1 es alta durante el desarrollo de ovario en comparación con la del testículo. Los transcritos del Dax1 se observan en ambos sexos, pero con una expresión ligeramente más alta en el desarrollo de ovario (Smith y col., 1999).

La gónada esta compuesta por células del epitelio celómico, células mesenquimatosas del primordio gonadal y células germinales primordiales (CGP's). En los reptiles y en las aves, las CGP's se derivan de las células del epiblasto que migran hacia la creciete germinal, en este lugar se multiplican las CGP's. Desde el intestino primitivo son llevadas por el torrente sanguíneo y salen de la circulación por diapédesis para colonizar la cresta genital (Gilbert, 1997).

Las gónadas en las aves se forman mediante cordones sexuales primarios cubiertos con un epitelio superficial. Después del 3½ día de incubación (d.i.), la mayoría de las CGP's han alcanzado el epitelio de la cresta genital. A lo largo de la región dorsal se distribuyen en grupos irregulares y son rodeadas por células mesenquimáticas. La cresta genital se encuentra claramente aislada del área del mesonefros por medio de vasos sanguíneos y células mesenquimáticas. Al cuarto día de incubación, la cresta genital se observa como una protuberancia de la cavidad celómica, el epitelio superficial tiene un grosor de 3 a 4 células y es continuo en muchos puntos con las células epiteliales interiores. Las fotomicrografías obtenidas en este momento del desarrollo sugieren que, el tejido epitelial crece por la proliferación de las células del epitelio superficial y por la incorporación de células mesenquimáticas localizadas en la proximidad del epitelio superficial (Merchant, 1991). Este patrón de desarrollo toma nuevas direcciones dependiendo del sexo genético y la posición lateral de la gónada en las hembras. La diferenciación gonadal en las hembras es morfológicamente asimétrica, mientras que en los machos, se desarrolla en forma simétrica con dos testículos funcionales (Scheib, 1983).

En el embrión de pollo, las hembras presentan asimetría gonadal, sólo el ovario izquierdo es funcional mientras que el derecho involuciona después del día 10 de incubación. La diferenciación del ovario comienza en el 6½ d.i., el ovario izquierdo tiene una corteza bien desarrollada derivada del epitelio superficial (conteniendo las células germinales y células epiteliales alargadas) y la médula, en la cual se desarrollan estructuras con apariencia de cordones compuestos de fibroblastos, algunas células germinales y un gran número de células intersticiales. Al tiempo de la eclosión, el ovario contiene un millón o más de ovocitos; sin embargo, hay una considerable reducción en el número de ovocitos dentro de las primeras semanas posteriores al nacimiento. Los ovocitos se localizan predominantemente dentro de la corteza ovárica, pero hay remanentes en la médula (Johnson, 1990).

II.4 Hormonas Gonadotrópicas

La reproducción de los mamíferos y por lo tanto la función gonadal están controladas por las hormonas hipofisarias, que se unen con sus receptores específicos en el ovario y en el testículo para regular la esteroidogénesis y la gametogénesis.

La hipófisis, debido a su interrelación con el sistema nervioso central, regula el funcionamiento de la gónada y sincroniza los eventos del proceso reproductivo en respuesta a señales del medio externo e interno. El hipotálamo, a través de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH), controla la síntesis y secreción de las hormonas hipofisarias gonadotrópicas: la Hormona Estimulante del Folículo (FSH) y la Hormona Luteinizante (LH); éstas a su vez regulan directamente el funcionamiento de la gónada. Además durante la gestación de los primates y los equinos, se sintetiza en la placenta otra gonadotropina indispensable para el mantenimiento del embarazo llamada Hormona Gonadotropina Coriónica (CG) (Hsueh y col., 1984).

Las gonadotropinas LH, FSH, CG junto con la Hormona Estimulante de la Tiroides (TSH), constituyen una familia conocida como hormonas glucoproteicas. Estructuralmente estas hormonas son complejas, tienen un peso molecular entre 28 y 38 kDa y están formadas por dos subunidades de cadenas polipeptídicas α y β , unidas de manera no covalente. Ambas cadenas son sometidas a modificaciones pos-traduccionales mediante la adición de oligosacáridos; mientras que la subunidad α es idéntica en las 4 glucoproteínas y es codificada por un sólo gen, la cadena β proviene de genes diferentes y es la que le confiere la especificidad tanto biológica como inmunológica a la hormona. La subunidad α humana está compuesta de 92 residuos de aminoácidos con una homología entre las diferentes especies del 80-85%. Las subunidades β varían en tamaño; la FSH, LH, CG y

TSH humanas tienen 111, 114, 145 y 112 residuos aminoácidos, respectivamente. La asociación entre la subunidad α y β es indispensable para la expresión de la actividad biológica de las hormonas glucoproteicas, ya que cuando se encuentran separadas no presentan ninguna actividad biológica (Para una revisión, ver: Ulloa-Aguirre y Timossi, 1998).

II.5 Funciones de la Hormona Folículo Estimulante.

La principal función de la FSH es la regulación del crecimiento y maduración folicular en las hembras y la espermatogénesis en los machos adultos.

La FSH está involucrada en varios procesos como la maduración folicular, prevención de la atresia folicular, aromatización de andrógenos, producción de inhibina y activina (hormonas proteicas que suprimen o estimulan, respectivamente, la secreción de la FSH), proliferación de células de la granulosa y la inducción de síntesis de receptores de LH entre otros (Scheele y Schoemaker, 1996).

La FSH promueve la proliferación y diferenciación de las células de la granulosa, lo cual conlleva al desarrollo del folículo ovárico y a la síntesis de estrógenos, asimismo, incrementa la producción y acumulación del líquido folicular y aumenta el número de receptores de LH (Yen y Jaffe, 1993). La LH potencia el efecto de la FSH en la promoción del desarrollo de los folículos, particularmente durante sus estadios finales. La FSH induce la expresión del gen que codifica para la enzima P450_{aro}, lo cual da como resultado la síntesis de estrógenos a partir de los andrógenos producidos en las células de la teca interna bajo el estímulo de la LH, por lo que conforme el folículo madura, se produce una cantidad cada vez mayor de estrógenos. Ambos, la FSH y el estradiol, ejercen una acción mitogénica estimulando aún más la proliferación de las células de la granulosa y promoviendo el incremento del número de receptores de FSH en las células blancas (Yen y Jaffe, 1993).

II.6 Receptor de la Hormona Folículo Estimulante.

El receptor de la FSH se expresa en las células de la granulosa del ovario y en las células de Sertoli en el testículo, en donde estimula la foliculogénesis y la espermatogénesis (O'Shaughnessy y col., 1996). Este receptor junto con el de la LH y el de la TSH, pertenecen a la familia de receptores acoplados a proteínas que se unen a nucleótidos de guanina, llamadas proteínas G. Al suceder esta acción, estimula la

activación de la adenilato ciclasa e incrementa el AMP_C. Los receptores acoplados a proteína G se caracterizan por tener una región extracelular amino-terminal muy extensa, una porción con 7 dominios transmembranales, y una región intracelular carboxilo-terminal (Johnson y Dhanasekaran, 1989). El dominio extracelular es responsable de la unión de la hormona y esta región puede funcionar como antena que une la hormona; mientras que la activación del receptor y la generación de la señal intracelular dependerán de los elementos estructurales presentes en los dominios transmembranales e intracelulares (Misrahi y col., 1993). Los 7 dominios transmembranales están conectados entre sí por tres asas intracelulares y tres extracelulares. La región intracelular es la porción encargada de activar la señal de transducción en estos receptores de glucoproteínas. Las asas intracelulares, en especial la tercera asa y la región carboxilo-terminal, son las porciones responsables del acoplamiento del receptor con las proteínas G, y por lo tanto están involucradas en la estimulación de distintas vías de activación (Para una revisión, ver: Ulloa-Aguirre y Timossi, 1998).

La proteína G es una estructura heterotrimérica formada por 3 subunidades la α , la β y la γ . En su forma no activa, la subunidad α está unida al difosfato de guanina (GDP). El cambio de GDP por una molécula de trifosfato de guanina (GTP) promueve la disociación de la subunidad α del complejo β - γ . La subunidad α activa (unida al GTP) así como el complejo β - γ , son los responsables de la modulación de la actividad de distintos efectores intracelulares, como las adenilatociclasas, las fosfolipasas y los canales membranales para diferentes iones. La hidrólisis del GTP por una GTPasa provoca la reasociación de la subunidad α con el complejo β - γ y la subsecuente inactivación de la proteína G (Gudermann y col, 1995).

El principal mecanismo de acción de las hormonas glucoproteicas es a través de la vía del AMP_C-PKA (cinasa de proteínas A). Cuando la LH/CG, la FSH y la TSH se unen a su receptor específico se activa la proteína G estimuladora, que tiene como consecuencia la activación de la adenilato ciclasa; cada molécula de ciclasa, cataliza la conversión de un número elevado de moléculas de ATP en AMP_C el cual funciona como un efector alostérico que activa a las proteínas cinasas, dependientes de AMP_C, éstas a su vez fosforilan y activan a varias proteínas endógenas las cuales regulan una gran diversidad de procesos celulares (Richards, 1994).

Los receptores de las hormonas glucoproteicas también pueden estar acoplados a proteínas Gq/11 que activan a la fosfolipasa C- β (PLC- β), enzima que cataliza la hidrólisis de polifosfoinositoles a inositol trifosfato y diacilglicerol; éstos son mensajeros intracelulares

que inducen la activación de cinasas de proteínas C (PKC), la liberación del calcio intracelular y probablemente también la entrada del calcio extracelular, lo que origina la activación de enzimas cinasas dependientes de calcio. También el receptor puede regular directamente los canales de iones, modulando el tránsito de éstos a través de la membrana celular. Para la FSH, algunos estudios recientes comprueban que la activación del receptor de FSH recombinante de rata también origina el incremento de la hidrólisis de los fosfoinositoles (Para una revisión, ver: Ulloa-Aguirre y Timossi, 1998).

La unión de la FSH a su receptor ocasiona la activación de la adenilato ciclasa con la subsecuente activación de la PKA, pero también ocasiona un incremento de calcio, lo cual es un efecto independiente de la PKA.

El gen del receptor de FSH ha sido secuenciado en algunas especies, incluyendo al humano, y se ha encontrado que consiste de 10 exones y 9 intrones; los primeros nueve exones codifican la región extracelular del amino-terminal y el exon 10 codifica para la región transmembranal y la carboxilo terminal. La región amino-terminal extracelular para las hormonas glucoproteicas tienen un tamaño de 348, 333 y 398 residuos de aminoácidos para los receptores FSH, LH/CG y TSH de humano respectivamente (Heckert y col., 1992).

El receptor a FSH se ha encontrado en baja concentración en otros tejidos que no son gonadales, pero esta expresión aún no es clara por lo que se continúa investigando su significado biológico (Luboshitzki y col., 1997; Beau y col., 1998).

II.7 Ciclo Celular.

El ciclo de división celular es el medio fundamental a través del cual todos los seres vivos se reproducen; éste comprende un conjunto ordenado de eventos que culmina con el crecimiento de la célula y su división en dos células hijas.

En eucariontes el ciclo celular se divide en cuatro etapas: G1, S, G2 y M; la fase G1, quiere decir "Gap 1" (intervalo), en G1 las células se preparan para el proceso de la replicación del ADN y es en esta etapa donde las señales mitogénicas inhibitorias del crecimiento pueden marcar una pausa dentro del ciclo celular o bien salir de este (Johnson y Walker, 1999). La fase G1 tanto en levaduras como en las células de mamíferos, es punto importante de control; en las primeras se llama *inicio*, y en las células de mamíferos se llama punto de control G1 (Alberts, 1996).

La fase S (Síntesis) es la etapa en la cual ocurre la síntesis del ADN nuclear. El intervalo entre el final de la síntesis del ADN y el principio de la mitosis se denomina G2, durante el cual la célula se prepara para el proceso de mitosis; G2 es otro punto de control del

ciclo celular. La fase M representa la Mitosis, en la cual los cromosomas replicados son segregados y ocurre la citocinesis formando dos células hijas. Además de las fases G1, S, G2 y M, encontramos el término G0 el cual es utilizado para describir a las células que han salido del ciclo celular y entran en un estado de reposo especial, donde pueden permanecer durante días, semanas o incluso años antes de volver a proliferar (Johnson y Walker, 1999).

La duración del ciclo celular cambia mucho de un tipo de célula a otro, por ejemplo los embriones de mosca tienen los ciclos celulares más cortos que se conocen, cada uno dura solamente 8 minutos, mientras que el ciclo celular de las células del hígado de un mamífero puede durar más de un año; sin embargo, el ciclo celular típico de una célula de mamífero dura aproximadamente 24 horas. En la mayoría de las células, toda la fase M dura 1 hora aproximadamente, lo cual es una pequeña fracción comparada con la duración total del ciclo celular. La duración de las fases del ciclo celular varían en tiempo, en la mayoría de los casos estudiados la variación más grande ocurre durante G1 (Alberts, 1996).

Mucho de lo que se conoce acerca de la regulación de la transición de una célula a través del ciclo celular, ha sido aportado por estudios de genética y bioquímica, teniendo como modelo experimental a las levaduras; uno de los primeros genes que se identificaron en levaduras como regulador del ciclo celular fue *cdc2/cdc28*. La activación de este gen requiere la asociación de una subunidad reguladora, llamada ciclina, la cual recibe este nombre ya que sufre un ciclo de síntesis y degradación en cada ciclo de división celular. Las ciclinas son el principal medio de la regulación del ciclo celular (Schaefer, 1998).

En las levaduras el gen *cdc2/cdc28* genera una o dos *cdks*, en contraste con las células de mamíferos se han identificado nueve *cdks* (referidas como *cdks1-9*) y por lo menos 16 ciclinas, llamadas ciclina A, B1, B2, C, D1, D2, D3, E, F, G1, G2, H, I, K, T1 y T2 (Johnson y Walker, 1999). Recientemente se descubrió una nueva ciclina N, que tiene semejanza con la ciclina E, por lo que se sugiere que el nombre que reciba sea el de ciclina E2 (Cuadro 1) (Para una revisión, ver: Hinds, 1999).

No todas las ciclinas y las *cdks* funcionan como reguladores del ciclo celular, ya que se han identificado otras funciones para ambas como la regulación de la transcripción, la reparación del ADN, la diferenciación y la apoptosis (Johnson y Walker, 1999).

Cuadro 1. Ciclinas y asociación con CDK's descritas en mamíferos *.

Ciclinas	Asociación CDK	Función
A	Cdk1 (cdc2), cdk2	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Entrada y transición a la fase "S". ➤ Anclaje dependiente del crecimiento
B1, B2	Cdk2	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Salida de la fase G2 y M
C	Cdk8	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Regulación transcripcional. ➤ Transición de la fase G0 a S.
D1, D2, D3	Cdk4, cdk6	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Transición de la fase G0 a S.
E, E2	Cdk2	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Transición de la fase G1 a S.
F	No se conoce	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Transición de la fase G2 a M
G1, G2	Cdk5	<ul style="list-style-type: none"> ➤ En respuesta a DNA dañado.
H	Ck7	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Activación de cdk. ➤ Regulación transcripcional. ➤ Reparación DNA.
I	No se conoce	No se conoce
K	No se conoce	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Regulación transcripcional ➤ Activación Cdk's.
T1, T2	Cdk9	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Regulación transcripcional

*Johnson y Walker, 1999; Hinds, 1999

En todos los seres vivos las ciclinas se multiplican por medio de un proceso finamente coordinado, este proceso depende de una combinación específica de factores de crecimiento para regular selectivamente la proliferación de cada uno de los diferentes tipos de células que conforman a un organismo. Además de la regulación del crecimiento y división celular estos factores pueden controlar la proliferación, la sobrevivencia, la migración o el funcionamiento de las células, como es el caso del *factor de crecimiento semejante a la insulina 1* (IGF-I), que estimula la sobrevivencia celular, el metabolismo y colabora con otros factores de crecimiento estimulando la proliferación celular (Alberts, 1996).

La regulación del ciclo celular puede ser a nivel de la actividad de las cdk's por medio de moléculas inhibitoras de cdk (CKI), estas moléculas son reguladores negativos que detienen el ciclo celular en G1, mediante la unión del complejo ciclina-cdk o inhibiendo la actividad de dicho complejo. Existen dos familias:

- 1) La familia CIP/KIP actúa sobre muchos complejos ciclina/cdk y hasta sobre algunas cinasas sin relación alguna con las cdk's. Los miembros de esta familia son: el p21^{Cip1/WAF1/SD11/CAP20/PIC1/mda6} (p21), que se piensa juega un papel importante en la progresión normal del ciclo celular. Otros miembros de esta familia son el p27^{kip1} (p27) y el p57^{kip2} (p57). El p27 ha sido implicado como mediador de algunas señales inhibitorias de crecimiento, mientras que el gen del p57 es asociado con cáncer.
- 2) La familia INK4, sus miembros son: p16^{INK4a} (p16), p15^{INK4b} (p15), p18^{INK4c} (p18), y el p19^{INK4d} (p19); estas proteínas de interacción específica con cdk4 y cdk6, pero no con otras, la unión de INK4 impide la asociación de estas cdk's con la ciclina de tipo D (Johnson y Walker, 1999).

La proliferación celular depende de la regulación de unas células con otras y con la matriz extracelular, de tal forma que se mantengan el número de células y su organización espacial.

Una de las técnicas más empleadas para medir la proliferación celular que ejercen los factores de crecimiento y algunas sustancias sobre las poblaciones celulares es la del marcaje del DNA cuando se está sintetizando, la marca puede ser radioactiva en forma de timidina-³H, o química generalmente en forma de bromodeoxiuridina (BrdU), un análogo artificial de la timidina. Los núcleos celulares que han incorporado estos compuestos en la fase S, se reconocen mediante autorradiografía o añadiendo anticuerpos anti-BrdU. Otra técnica es la del citofluorímetro de flujo, basada en la cantidad de DNA contenido en las células; estas células se tiñen con etidio, el cual al unirse al DNA fluoresce, por lo tanto la cantidad de fluorescencia es directamente proporcional a la cantidad de DNA de cada célula (Baserga, 1990).

Además de los factores de crecimiento existen otras sustancias que tienen efectos proliferativos como es el caso de las hormonas (Rao y col., 1978).

II.8 Hormonas Esteroides con Relación al Ciclo Celular.

Las hormonas esteroides son fundamentales en el desarrollo del ovario, regulan la expresión génica y el ciclo celular actuando de manera independiente o en colaboración con otros factores de crecimiento y ciclina que afectan la proliferación y diferenciación celular. En el ovario adulto el estradiol, la FSH y la LH son esenciales para el crecimiento de los folículos y su diferenciación a cuerpo lúteo. Estas hormonas actúan a través de una vía específica de receptores intracelulares. El estradiol tiene un efecto mitogénico sobre

las células de la granulosa de mamíferos (para una revisión, ver: Robker y Richards, 1998b).

El estradiol incrementa la transcripción de las ciclinas E y D2 y produce una regulación a la baja del p27, ambos eventos simultáneos resultan en un aumento de la proliferación celular. Además la FSH también se eleva la transcripción del ARNm de la ciclina D2 (Sicinski y col., 1996; para una revisión, ver: Robker y Richards, 1998b).

En los tumores mamarios dependientes de estradiol se ha observado la sobreexpresión de la ciclina D1, que conlleva a un incremento en la actividad de la cdk4 y cdk2, así como una disminución en los inhibidores de ciclinas. La ciclina D1 parece unirse directamente al receptor de estradiol para la activación de genes específicos. En neoplasias uterinas el estradiol induce la expresión de las ciclinas D1, D3, E y A. En el ovario humano la ciclina D1 tiene una expresión muy baja no así la ciclina D2, la cual presenta una sobreexpresión del ARNm de la ciclina D2 de hasta 20 veces más que en el ovario normal y una muy baja expresión de la ciclina D1 en estos tumores. Los efectos individuales del estradiol y la FSH indican que cada hormona puede regular diferentes puntos en el ciclo celular y pueden utilizar mecanismos paralelos (Sicinski y col., 1996; Robker y Richards, 1998a).

II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En el ovario adulto la hormona foliculo estimulante actúa sobre el crecimiento y la maduración folicular, promoviendo la proliferación y diferenciación de las células de la capa granulosa. Sin embargo, en el ovario embrionario prefolicular se tiene poca información del efecto de esta hormona. El objetivo de este trabajo es estudiar el efecto proliferativo de la FSH sobre las diferentes subpoblaciones celulares que conforman el ovario embrionario a través de la evaluación de su índice mitótico. El embrión de pollo es un modelo que permite abordar este problema.

III. HIPOTESIS

Si la FSH participa en la embriogénesis del ovario estimulando el ciclo celular, una exposición temprana del embrión de pollo a la FSH favorecerá la proliferación de las células ováricas.

II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En el ovario adulto la hormona foliculo estimulante actúa sobre el crecimiento y la maduración folicular, promoviendo la proliferación y diferenciación de las células de la capa granulosa. Sin embargo, en el ovario embrionario prefolicular se tiene poca información del efecto de esta hormona. El objetivo de este trabajo es estudiar el efecto proliferativo de la FSH sobre las diferentes subpoblaciones celulares que conforman el ovario embrionario a través de la evaluación de su índice mitótico. El embrión de pollo es un modelo que permite abordar este problema.

III. HIPOTESIS

Si la FSH participa en la embriogénesis del ovario estimulando el ciclo celular, una exposición temprana del embrión de pollo a la FSH favorecerá la proliferación de las células ováricas.

IV. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Estudiar el efecto proliferativo de la administración de la hFSH en las subpoblaciones celulares del ovario del embrión de pollo de 14 días de incubación.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

1. Evaluar el índice mitótico de las células del epitelio superficial y de las ovogonias en la corteza ovárica del embrión de pollo de 14 días de incubación, expuesto previamente por 12, 15, 18, 21, 24 y 36 horas a la hFSH en los grupos testigo y tratado.
2. Evaluar el índice mitótico de las células somáticas y perilacunares en la médula yuxtacortical del ovario embrionario de pollo de 14 días de incubación, en grupos testigo y previamente expuesto a hFSH por 12, 15, 18, 21, 24 y 36 horas.
3. Comparar el índice mitótico de las subpoblaciones de las células ováricas del embrión de pollo de los grupos testigo y tratados con hFSH a las 12, 15, 18, 21, 24 y 36 horas pos-aplicación de la hormona.

V. MATERIALES Y MÉTODOS.

Animales

Los embriones de pollo se obtuvieron a partir de huevos fértiles de gallina raza White Leghorn, BabCock B-300 adquiridos en ALPES, S. A., (Aves Libres de Patógenos Específicos, Tehuacán, Puebla). Los huevos se colocaron en incubadora Jamesway dentro de los primeros 5 días posteriores a la postura a 37.8 °C con circulación de aire forzado y un 80% de humedad relativa. Se seleccionaron los huevos embrionados por ovoscopia; 100 embriones por experimento.

Metodología

La administración de la hormona se realizó mediante la técnica de cámara falsa que permite mover la cámara de aire hacia la parte media del huevo para poner al embrión en contacto con la soluciones que se van a aplicar. La técnica consiste en hacer una perforación en la cámara de aire y cortar un pequeño triángulo en la parte media lateral del huevo; la porción expuesta de la membrana papirácea se humedece con agua estéril para facilitar la separación de la membrana corioalantoidea. Posteriormente con un bulbo de látex se succiona en el orificio de la cámara de aire para que descienda el embrión, separándose de la membrana corioalantoidea. Una vez que el embrión descendió, se retira la membrana papirácea con pinzas de punta fina, y ambos orificios son sellados con cinta adhesiva transparente. Se seleccionaron los embriones en los que descendió correctamente la membrana corioalantoidea, y se dividieron en dos grupos:

1) Grupo experimental: embriones que recibieron 2UI de FSH humana (hFSH, Fertinorm HP, Serono), en 27 μ l de solución fisiológica sobre la membrana corioalantoidea a las 12, 15, 18, 21, 24 y 36 horas antes del día 14 de incubación que es cuando se llevó a cabo la disección.

2) Grupo testigo: embriones que recibieron 27 μ l del vehículo, sobre la membrana corioalantoidea a las mismas horas que el grupo experimental.

Después de la administración de las soluciones se continuó con la incubación.

Con el objetivo de detener el ciclo celular en metafase y después de la aplicación de la hFSH, se suministraron 5 μ g de Colcemid a cada embrión de 14 d.i. en 50 μ l de solución estéril dejando actuar esta sustancia por dos horas más, hasta el momento del sacrificio. El colcemid se une a las moléculas de tubulina evitando su polimerización, impidiendo la formación del huso mitótico. Los animales se sacrificaron por decapitación; el ovario izquierdo fue disecado y procesado con la técnica histológica de rutina, se tiñó con hematoxilina y eosina de acuerdo al apéndice 1.

Morfometría

La morfometría se realizó en los cortes del ovario de 115 animales, un corte por embrión. Se utilizó el objetivo de 6.3x de un microscopio óptico Zeiss en el estudio morfométrico. Con una cámara de video adaptada al ocular se captó la imagen del ovario; la señal se envió a un monitor de alta resolución conectado a una microcomputadora. Para la realización de las mediciones se utilizó el software de digitalización de imágenes IMAGE PRO PLUS II.

El índice mitótico se determinó relacionando el número de figuras mitóticas en metafase por unidad de área; las zonas medidas fueron:

- a) El epitelio superficial.
- b) La corteza.
- c) La médula yuxtacortical.

En el epitelio superficial, se midió el perímetro total del ovario, la medición del área ocupada por la corteza y la médula yuxtacortical se hizo mediante el trazado manual de contornos, y fue calculada en forma automática por el paquete. Para determinar el límite entre la corteza y la médula yuxtacortical se tomó como base una línea imaginaria entre ambas zonas, que se localiza por debajo de los macizos celulares que conforman los cordones de ovogonias conocidos como "nidos". Para establecer el límite entre la médula yuxtacortical y la profunda, los parámetros considerados fueron para la primera zona, la presencia de un tejido más densamente poblado y escasos espacios lacunares, los cuales generalmente son de tamaño pequeño. En contraste, la médula profunda se caracteriza por presentar una menor densidad celular y espacios lacunares de mayor tamaño y más abundantes en número, características que nos permiten diferenciar ambas zonas. Cabe aclarar que para el cálculo del área de la médula, se restó el área ocupada por los espacios lacunares presentes.

El número de figuras mitóticas se cuantificó en los cortes con el objetivo de 40x. Las subpoblaciones ováricas estudiadas fueron:

- a) Células del epitelio superficial.
- b) En la corteza, los nidos de ovogonias.
- d) En la médula se tomaron en cuenta dos subpoblaciones celulares: las células somáticas y las células que se encuentran alrededor de los espacios lacunares, llamadas células perilacunares

Las células en mitosis se determinaron de acuerdo a los siguientes criterios:

- 1) Ausencia de la membrana nuclear.
- 2) Forma estrellada de los cromosomas, que alcanzan en la metafase el máximo grado de condensación.
- 3) Forma redondeada y mayor tamaño de las células en mitosis.

Para la corteza y la médula el índice mitótico (IM) se reporta en una área correspondiente a $20,000\mu^2$, como el número de figuras mitóticas que se pueden encontrar en dicha área.

Para el epitelio superficial se reporta el IM en un perímetro de 2000μ .

A n á l i s i s E s t a d í s t i c o

El índice mitótico promedio obtenido para las células epiteliales, germinales (ovogonias), somáticas y perilacunares, fue sometido a un análisis de varianza utilizando la prueba de Duncan, con el programa SAS (Statistical Analysis System).

VI. RESULTADOS

El ovario del embrión de pollo de 14 d.i., ya está organizado en compartimentos celulares bien diferenciados que permiten distinguir el epitelio superficial, la corteza y la médula (Figura 5A). El epitelio superficial es de tipo cúbico simple y cubre la superficie ovárica; en algunas zonas se aprecian ligeras depresiones de éste hacia la corteza, dándole una apariencia plegada. Delimitando el epitelio y la corteza se encuentra una membrana basal entre ellos.

Por debajo del epitelio superficial se encuentra la corteza formada principalmente por ovogonias, las cuales se distinguen fácilmente por ser las células de mayor tamaño en este compartimento, son redondeadas, con membrana plasmática bien definida, su núcleo es generalmente central, redondo de cara abierta y en su interior se observan uno o dos nucleolos (Figura 6B y 6C). Las ovogonias se encuentran en cordones de células llamados "nidos de ovogonias" delimitados por una membrana basal; dentro de estos nidos las ovogonias están muy juntas, entre ellas no se observan espacios de tejido conectivo (Figura 6B y 6C). También en la corteza se observa otro tipo celular menos abundante que el anterior, llamadas células pregranulosas, estas células se encuentran rodeando a los nidos de ovogonias generalmente presentan forma fusiforme, con un citoplasma más claro que el de las ovogonias. Entre los nidos de ovogonias se distinguen otros componentes de tejido conjuntivo laxo, escasos elementos fibrilares, fibroblastos y matriz extracelular así como vasos sanguíneos de pequeño calibre que en su interior llevan los eritrocitos nucleados de forma ovoide, típicos de las aves.

La porción más interna del ovario está ocupada por la médula en la que se distinguen dos zonas: la médula yuxtacortical y la médula profunda; la primera se caracteriza por presentar mayor cantidad de elementos celulares que corresponden a células somáticas, ésta presentan una forma redondeada, son de gran tamaño, tienen un citoplasma de apariencia esponjosa probablemente debido a la presencia de organelos implicados en la síntesis de hormonas esteroideogénicas y sus precursores, presentan un sólo núcleo de posición central y de cara abierta. Entre estas células poco diferenciadas y principalmente cerca de la médula profunda, se encuentran unos espacios de tamaño variable llamados espacios lacunares, rodeados por un epitelio de células perilacunares que va de tipo plano a cúbico simple en los espacios de menor tamaño, en los lacunares de mayor tamaño se observa un epitelio cúbico, estas células perilacunares tienen un citoplasma ácido-filo con un solo núcleo de posición central en el cual se evidencian generalmente un nucleolo. Dando sostén a estos elementos hay escaso tejido conectivo laxo, formado por fibroblastos, y sus productos fibrilares, matriz extracelular y elementos vasculares (Figura 5A y 5C).

La médula profunda se caracteriza por presentar abundantes espacios lacunares de mayor tamaño que los presentes en la médula yuxtacortical, limitados por el mismo tipo de epitelio lacunar y escasas células somáticas entre estos espacios, los cuales son muy evidentes en etapas embrionarias y se reducen al nacimiento.

Dentro de los compartimentos descritos se seleccionaron las células del epitelio superficial, las ovogonias, las células somáticas y las perilacunares para evaluar el efecto proliferativo de la FSH, considerando como parámetro de evaluación el índice mitótico.

Epitelio Superficial

Como se observa en la tabla 1, las células del epitelio superficial del ovario de embriones de pollo de 14 d.i. previamente expuestos por 12 h a la acción de la FSH no modifican significativamente el valor del IM. Sin embargo si los embriones se exponen por 15 h a la hormona, el IM de las células del epitelio superficial casi se duplica con respecto al grupo testigo. Este tipo celular presenta su máximo aumento a las 18h de exposición a la hormona en el grupo tratado (Figura 5B). Después de este tiempo, no se observaron cambios significativos en el IM en los tiempos estudiados (Figura 1).

Ovogonias

En las ovogonias el valor del IM no varía significativamente en los animales testigo y tratados con hFSH entre las 12-21 h ni a las 36 horas posteriores a la aplicación de esta hormona (Tabla 1). Como se puede apreciar en la Figura 2, el máximo número de ovogonias en mitosis se da sólo a las 24 horas de exposición a hFSH y la diferencia es estadísticamente significativa comparada con el grupo tratado. En la Figura 6B, se pueden apreciar la gran cantidad de mitosis presentes en los nidos de ovogonias en la corteza ovárica.

Células Somáticas

En la Tabla 2 se condensan los resultados obtenidos para las células somáticas de la médula yuxtacortical entre las 12 y 36 horas de exposición a la hFSH; desde las 15 horas y hasta las 21 horas, el IM de las células somáticas está significativamente aumentado en los embriones tratados con FSH; como se aprecia en la Figura 3, el máximo incremento del IM se obtuvo a las 21 horas, y en la Figura 5C se puede observar la gran cantidad de mitosis en las células somáticas de los cordones medulares.

Células Perilacunares

Como ya se mencionó, el segundo tipo celular estudiado en la médula yuxtacortical fue el de las células perilacunares, en las que el valor del índice mitótico no se modificó significativamente en ninguno de los tiempos estudiados, como se observa en la Figura 4.

Tabla 1. Índice Mitótico^{1,2} de las subpoblaciones celulares del ovario embrionario de pollo en la corteza ovárica.

Exposición a FSH (horas)	Epitelio Superficial ¹				Ovogonias ²			
	Testigos	n	FSH	n	Testigos	n	FSH	n
12	5.01 ± 0.37	4	6.99 ± 1.36	7	1.28 ± 0.29	4	1.42 ± 0.27	7
15	5.44 ± 1.90	6	10.29 ± 3.17 *	8	1.10 ± 0.35	6	1.30 ± 0.29	3
18	6.76 ± 1.89	6	11.48 ± 3.96 *	10	0.97 ± 0.45	6	1.14 ± 0.25	10
21	6.88 ± 2.55	11	7.35 ± 2.46	9	1.14 ± 0.59	11	0.95 ± 0.36	9
24	8.34 ± 5.07	22	7.01 ± 4.14	20	1.59 ± 0.83	22	2.36 ± 1.21 *	20
36	8.91 ± 4.52	6	10.51 ± 4.90	6	1.23 ± 0.29	6	1.24 ± 0.36	6

* P<0.05% con la prueba de Duncan. Se reporta el IM de cada grupo como la media ± d.e.

¹Índice mitótico = No. de figuras mitóticas en 2000 μ .

²Índice mitótico = No. de figuras mitóticas en 20,000 μ ².

Tabla 2. Índice Mitótico¹ de las subpoblaciones celulares del ovario embrionario de pollo en la médula yuxtacortical.

Exposición a FSH (horas)	Células Somáticas				Células Perilacunares			
	Testigos	n	FSH	n	Testigos	n	FSH	n
12	1.69 ± 0.40	4	2.34 ± 0.57	7	0.60 ± 0.18	4	0.51 ± 0.25	7
15	1.65 ± 0.66	6	3.71 ± 0.57 *	8	0.53 ± 0.23	6	0.99 ± 0.57	8
18	2.01 ± 1.34	6	3.48 ± 0.57 *	10	0.64 ± 0.32	6	0.92 ± 0.38	10
21	2.68 ± 1.26	11	4.64 ± 1.92 *	9	0.53 ± 0.25	11	0.83 ± 0.18	9
24	3.23 ± 1.34	22	3.91 ± 1.41	20	0.80 ± 0.59	22	1.33 ± 1.03	20
36	2.83 ± 0.61	6	2.99 ± 1.12	6	0.61 ± 0.13	6	0.74 ± 0.31	6

* P<0.05% con la prueba de Duncan. Se reporta el IM de cada grupo como la media ± d.e.

¹Índice mitótico = No. de figuras mitóticas en 20,000 μ².

Índice Mitótico de las Células del Epitelio Superficial.

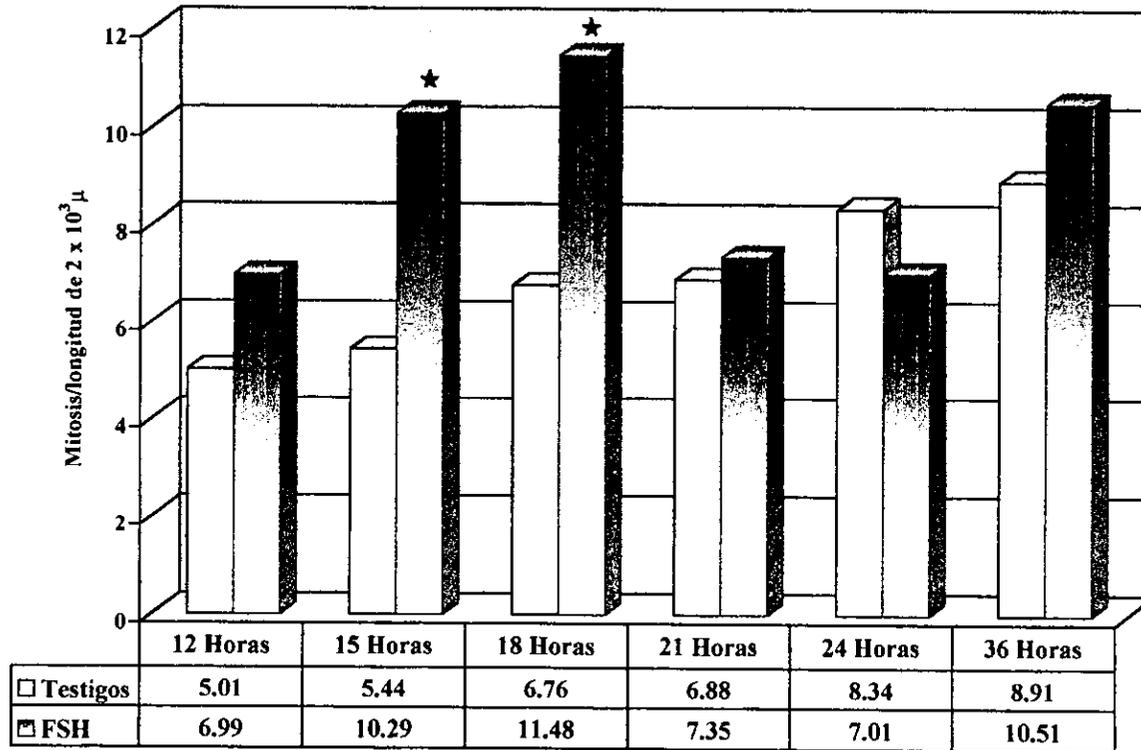


Figura 1. Las células del epitelio superficial incrementan su proliferación por efecto de la hFSH a las 15 h teniendo su efecto máximo a las 18 h posteriores a la aplicación de la hormona. $P < 0.05\%$.

Índice Mitótico de las Ovogonias en la Corteza Ovárica

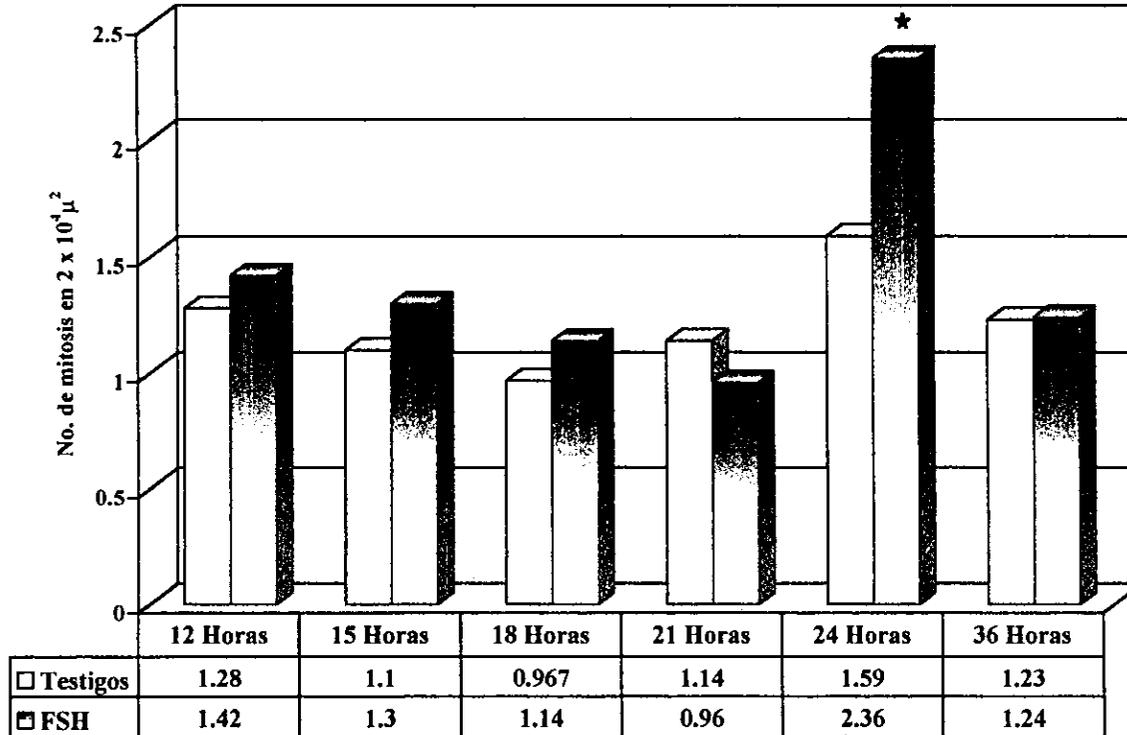


Figura 2. La hFSH incrementa significativamente la proliferación de las ovogonias de la corteza a las 24 h posteriores a la aplicación de esta hormona. $P < 0.05\%$.

Índice Mitótico de las Células Somáticas en la Médula Ovárica

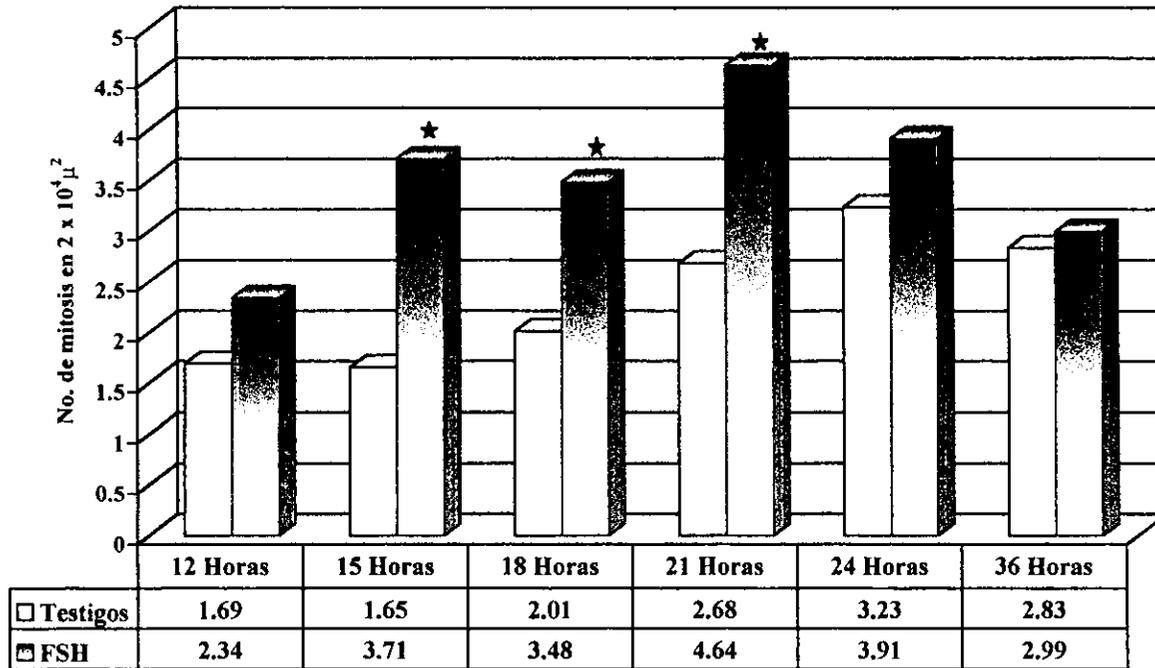


Figura 3. Las células somáticas de la médula ovárica presentan un incremento en la proliferación a las 15 h, 18 h y 21 h posteriores a la aplicación de la hFSH. $P < 0.05$

Índice Mitótico de las Células Perilacunares en la Médula Ovárica

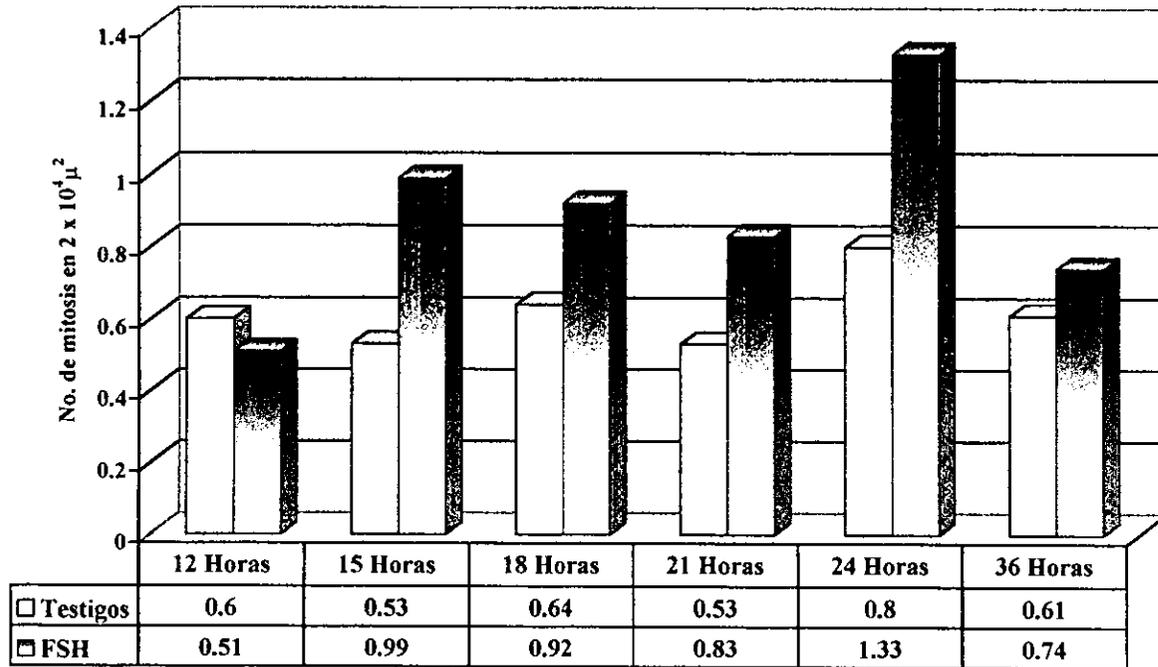


Figura 4. En las células perilacunares de la médula ovárica no se observa el efecto proliferativo de hFSH.

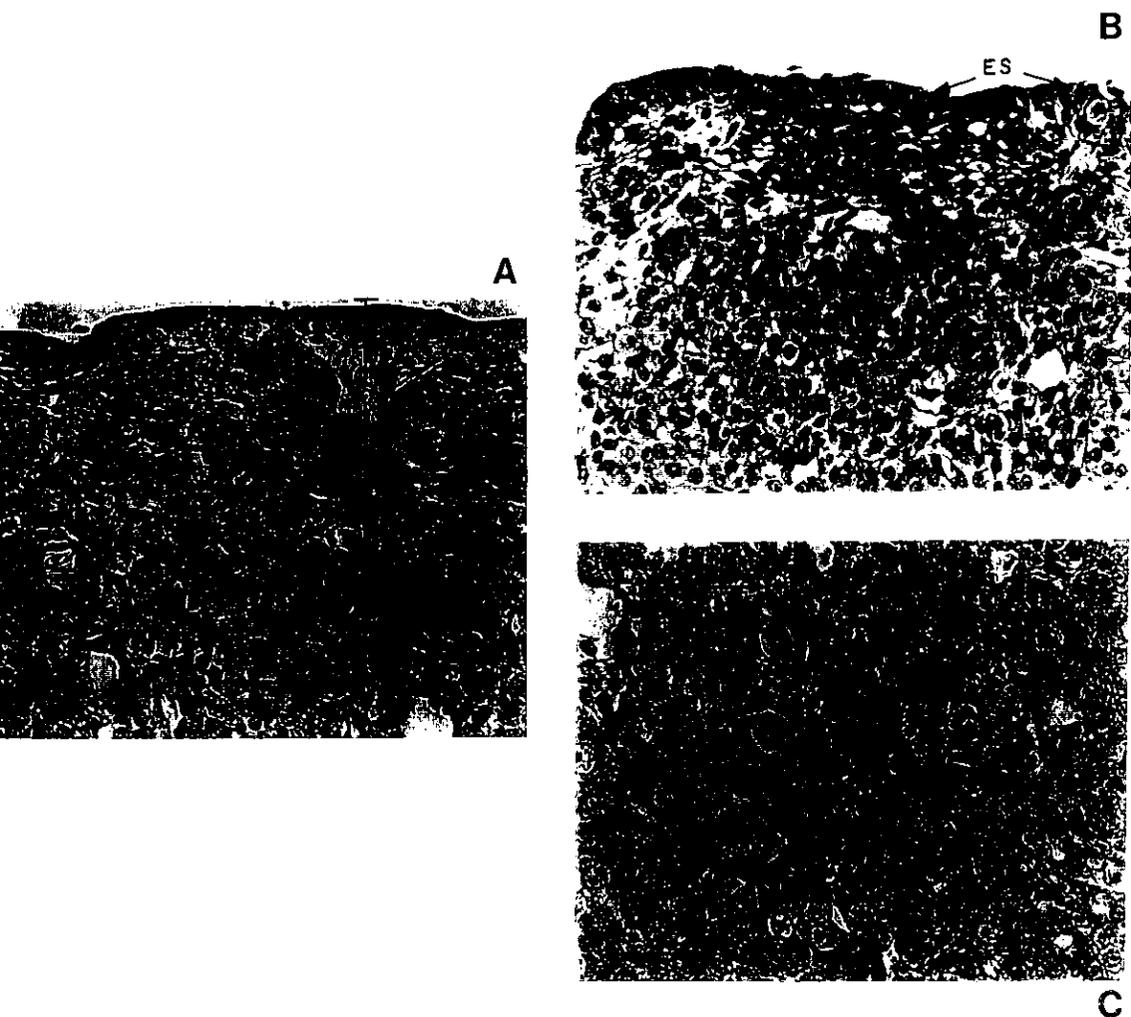


Figura 3. Cortes histológicos del ovario de embrión de pollo de 14 días de incubación. A) Ovario de un embrión testigo, se observa la región cortical (C) y la médula yuxtacortical (M). B) Figuras mitóticas en el epitelio superficial (ES) del ovario de un animal tratado con FSH durante 18 horas (↗). C) Imágenes de mitosis en las células somáticas medulares del ovario de un embrión expuesto a FSH durante 21 horas (↗) (400x).

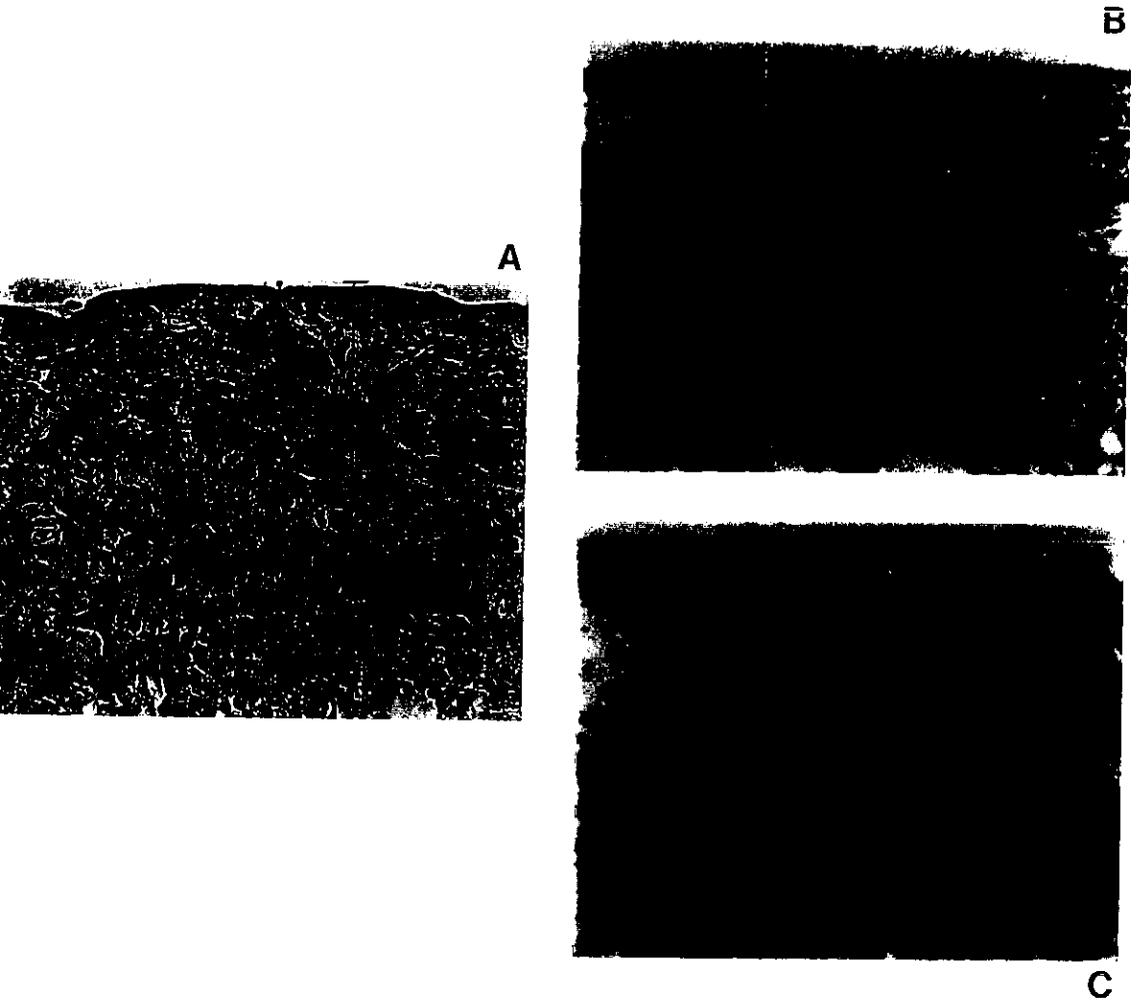


Figura 6. A) Microfotografía del ovario de embrión de pollo de 14 días del grupo testigo. B) A nivel cortical, se observan imágenes de mitosis en los nidos de ovogonias (ov), 24 horas después de la aplicación de la hormona (↗) (400x). C) Amplificación de la región cortical donde se muestran las figuras mitóticas en las ovogonias (↗) (1000x).

VII. DISCUSION.

En el presente trabajo se evaluó el índice mitótico como indicador de la proliferación celular inducida por la hormona foliculo estimulante. Entre las poblaciones celulares del ovario del embrión de pollo que respondieron al tratamiento con FSH con un aumento en su índice mitótico, encontramos a las células del epitelio superficial, que aumentaron su índice mitótico 15 horas después de la aplicación de la gonadotropina, teniendo su efecto máximo a las 18 horas. Otra población celular del ovario que incrementó su índice mitótico fue la de las células somáticas de la médula yuxtacortical, éste se observó entre las 15 y 21 horas posteriores a la aplicación de la FSH. En la corteza, las células que mostraron un incremento en su índice mitótico fueron las ovogonias, las cuales respondieron 24 horas después de la aplicación de la FSH. Finalmente las células que no mostraron ningún cambio fueron las células perilacunares que rodean a los espacios lacunares de la médula yuxtacortical.

El índice mitótico se evaluó sobre cortes histológicos obtenidos de ovarios incluidos en parafina, en donde se contaron el número de figuras mitóticas por unidad de área de cada población, lo que nos permitió estimar la densidad numérica de este evento. Para no sobrestimar el número de núcleos por unidad de área se tomo en cuenta el grosor de los cortes que fue de $5 \pm 2\mu$. Los cortes fueron hechos aproximadamente al mismo nivel del ovario, con la finalidad de medir una superficie representativa del mismo. Se midió un área suficiente como para observar por lo menos un promedio de 25 de mitosis por compartimento celular en cada individuo. El índice mitótico se estimó sin una previa sincronización de las células ováricas, ésta se realiza en el caso de cultivos celulares y por tratarse de un estudio *in vivo* se trabajó con células no sincronizadas.

El índice mitótico se usa fundamentalmente en cultivos celulares para evaluar el efecto de algún compuesto por medio del conteo del número de células en mitosis en un promedio de 1000 células (Baserga, 1989). Este método se ha aplicado en cortes histológicos en donde, al igual que en los cultivos celulares, se realiza el conteo celular para observar en un área determinada el incremento en el índice mitótico durante el desarrollo embrionario (Hughes, 1963; Hess y col.,1999). Otros métodos con los que puede ser evaluada la

proliferación celular con la autoradiografía con timidina tritiada, la incorporación de Bromodeoxiuridina (BrdU) y la evaluación de las células en fase S del ciclo celular utilizando la citometría de flujo, estos métodos han sido aplicados en nuestro laboratorio como complemento de este estudio, pero escapan al alcance de esta tesis.

El efecto proliferativo que observamos con el tratamiento con FSH coincide con lo descrito por otros autores en ovarios embrionarios y adultos. En embriones de pollo tratados con FSH a los 13 días de incubación se observó en el ovario izquierdo un incremento en el número de células somáticas y germinales, cuatro días después del tratamiento con la hormona, este efecto proliferativo de hFSH sobre las células ováricas fue confirmado por el aumento en el porcentaje de células en fase S del ciclo celular (Méndez-Herrera y col., 1998). Efectos similares fueron obtenidos en cultivo de células ováricas de embriones de pollo de 8-18 d.i., en donde la hFSH recombinante estimuló la síntesis de ADN, activando la proliferación celular y la esteroidogénesis (Velázquez y col., 1997, Pedernera y col. 1999). Sin embargo en los trabajos arriba mencionados no se pudo diferenciar el tipo celular que proliferaba por efecto de la FSH, por esta razón el aporte de este estudio es el de identificar los tipos celulares que responden a la hormona foliculo estimulante en el ovario embrionario.

En el ovario adulto la FSH estimula la proliferación celular, esta hormona actúa sobre las células de la granulosa induciendo su mitosis en etapas tempranas del desarrollo folicular (Richards, 1994; Scheele y Schoemaker, 1996). Las gonadotropinas inducen la expresión de genes específicos, los cuales permiten el inicio o la detención del ciclo celular, así como la diferenciación de la célula. En el caso de la FSH se ha demostrado que aumenta la expresión de la ciclina D2 en las células de la granulosa de ovarios prefolículos de ratas, permitiendo el inicio del ciclo celular; la FSH puede estar involucrada en diferentes vías de activación de éste (Sicinski y col., 1996; Robker y Richards, 1998a).

En nuestro modelo experimental en embriones de pollo tratados con FSH a los 14 días de incubación encontramos que la proliferación celular del epitelio superficial del ovario se incrementa por efecto de esta hormona, mostrando un aumento en su índice mitótico a casi el doble del presentado en los testigos. En ovarios de ratas inmaduras se observó el mismo efecto de esta hormona sobre las células del epitelio superficial (Davies y col.,

1999). Aún más, en ovarios de humano adulto se ha detectado la expresión del receptor de la FSH en las células del epitelio superficial por hibridación *in situ* (Zheng y col., 1996), así que es posible que dicho receptor se encuentre presente en las células del epitelio superficial del embrión de pollo. Este efecto proliferativo también podría ser mediado por el 17β -estradiol, ya que se conoce que el crecimiento y la diferenciación del epitelio superficial depende de esteroides. En experimentos realizados en ovarios inmaduros de ratas, se observó que el 17β -estradiol regula los niveles de la caderina epitelial (E-cad), la cual es una glucoproteína transmembranal que une a las células epiteliales, en los ovarios tratados con el 17β -estradiol se observó que los niveles de RNAm de la E-cad aumentan, al decrecer los niveles del esteroide o los receptores de este, se presenta un descenso en los niveles del RNAm de la E-cad, lo que nos indica que la E-cad puede ser regulada por el 17β -estradiol en el ovario inmaduro de rata (MacCalman y col., 1994). Dado que la FSH estimula la secreción del 17β -estradiol en el embrión de pollo (Velázquez y col., 1997, Pedernera y col. 1999), podría ser que éste medie el efecto de la FSH en las células del epitelio superficial promoviendo su proliferación.

En humanos se ha observado que el desarrollo de la gónada está relacionado con la proliferación y la extensión de los cordones sexuales, así como la proliferación paralela del epitelio superficial (Motta y Makabe, 1982). Se ha observado que existe una invaginación del epitelio superficial para formar dichos cordones, además se advierte una lamina basal común entre estas dos estructuras, lo que nos permite inferir que las células del epitelio superficial contribuyen a la formación de los cordones sexuales (Jones, 1978). Las células del epitelio superficial contribuyen con elementos somáticos, algunos de los cuales se transforman en las células foliculares (Motta y Makabe, 1982); en aves también se ha propuesto que las células foliculares derivan del epitelio superficial (Callebaut, 1976). Durante la foliculogénesis es notable la proliferación de las células del epitelio superficial, ya que éstas aportan elementos celulares para el empaquetamiento de los ovocitos, formando los folículos primarios (Duke, 1978).

Experimentos realizados en ratas inmaduras para comprobar cual es el papel de las gonadotropinas en la proliferación del epitelio superficial, demostraron que la LH estimula la secreción del Factor de Crecimiento de Hepatocitos (HGF), el cual promueve la mitosis

en las células del epitelio superficial; con ese modelo experimental no se detectó el receptor a LH en dichas células, pero el receptor para el HGF se encontró expresado en las células epiteliales, por lo que estos datos sugieren que las gonadotropinas estimulan la expresión del HGF y a través de éste la proliferación de las células del epitelio superficial (Hess y col., 1999). Las células del epitelio superficial producen el Factor de Crecimiento Transformante β (TGF β), el cual normalmente actúa como un inhibidor de crecimiento en forma autocrina, pero en ciertas condiciones puede actuar de una forma sinérgica con el Factor de Crecimiento Epidérmico (EGF). En células normales del epitelio superficial se expresa el receptor del EGF que es un potente agente mitogénico en cultivos celulares (Para una revisión, ver: Auersperg y col., 1998). Se sabe muy poco sobre los factores que regulan la proliferación celular en el epitelio superficial, se ha demostrado que las gonadotropinas estimulan la proliferación celular, pero no se ha determinado si éstas actúan de una forma directa sobre ese tipo celular estimulando su mitosis, por lo que se especula que pueden existir otros mecanismos para promover la mitosis, que involucran la síntesis o secreción de uno o varios factores de crecimiento.

Los resultados que obtuvimos en el epitelio superficial apoyan el hecho de que las gonadotropinas pueden actuar sobre la proliferación celular del epitelio superficial del ovario, incluso apoyando la teoría de la participación de las gonadotropinas en la tumorigénesis ovárica (Davies y col., 1999). En cultivos celulares de tumores ováricos se ha observado que la esteroidogénesis está controlada por la FSH y LH, en estudios de inmunohistoquímica en cultivos de células epiteliales de ovarios cancerosos se encontraron células positivas a FSH, las células cancerosas respondieron al estímulo con FSH incrementando la secreción de 17β -estradiol y aumentando su proliferación celular. Se han encontrado evidencias de que hay una actividad significativa de aromatasa en las células cancerosas del ovario, la mayoría de las células derivadas de adenocarcinomas quísticos tienen la capacidad de convertir la androstenediona en estradiol, en algunos cultivos frescos se ha observado que estas células pueden convertir la progesterona en andrógenos (Wimalasena y col., 1991).

Otro tipo celular que respondió al estímulo con FSH fueron las ovogonias, las cuales aumentaron su índice mitótico 24 horas después de la aplicación de la hormona. Se han

realizado algunos estudios para conocer cómo y cuándo sucede la proliferación de las células germinales. Hughes (1963) reportó que en embriones de pollo la población total de las células germinales en la corteza del ovario izquierdo se incrementa cerca de 25 veces entre el día 9 y 17 de incubación, este aumento en el número de células germinales está asociado con la actividad mitótica, el número máximo de células germinales se detectó al día 17 de incubación (Méndez-Herrera y col., 1993). En nuestro modelo experimental observamos un incremento significativo del índice mitótico de las ovogonias, Hughes (1963) observó que las células germinales aumentan su proliferación entre el día 13 y 14 de incubación, nuestros resultados muestran un incremento mayor que el presentado en condiciones normales por efecto de la FSH en la proliferación de las ovogonias. El aumento de las células epiteliales podría contribuir a la sobrevivencia de las células germinales durante su desarrollo, produciendo algún factor de crecimiento que ayude a su sobrevivencia, además de cooperar a la formación de los folículos primordiales (Motta y Makabe, 1982). En estudios realizados en embriones de pollo de 17 d.i. tratados con 17β -estradiol, mostraron que las células germinales no presentaron ningún aumento en su número (Méndez-Herrera y col., 1993), también se han realizado estudios con progesterona en los cuales no se encontró ningún efecto significativo sobre número de las células germinales (Figueroa, 1992).

Por lo tanto podríamos proponer que nuestros resultados muestran un efecto específico de la FSH sobre las ovogonias por el cual incrementan su índice mitótico; este estímulo podría ser de una forma directa ó bien mediado por factores de crecimiento. En folículos primordiales de humano se demostró que no expresan el receptor a la FSH y a pesar de la ausencia del receptor los ovocitos continuaban su crecimiento, no es sino hasta la etapa de ovocito primario cuando se detecta la presencia del receptor a la FSH en las células de la granulosa (Oktay y col., 1997). El efecto proliferativo de la FSH que observamos puede ser mediado por factores de crecimiento, como el Factor de Crecimiento de los Mastocitos (*Steel*), el cual es requerido para la sobrevivencia de las CGP's tanto *in vivo* como *in vitro* (Godin, 1991), estimulando la mitosis de las células germinales. Este factor junto con el Factor Inhibitorio de la Leucemia (LIF) estimulan la proliferación de las CGP's *in vitro* (Resnick y col., 1992), ayudando a la sobrevivencia en los cultivos celulares. El *Steel* es

un factor de crecimiento, expresado en las células del estroma de la piel, en la médula espinal y en la gónada; en esta última se encuentra en grandes cantidades, presenta una asociación con el receptor *c-kit*, el cual por hibridación *in situ* se ha demostrado que se expresa en las células germinales. La citocina LIF inhibe la diferenciación de las células madre embrionarias; aún se desconoce el efecto de esta citocina sobre las CGP's, pero se sabe que actúa como agente mitogénico e inhibe la diferenciación celular, además que ayuda a la sobrevivencia de las CGP's. Otro factor que promueve la sobrevivencia y la proliferación de las CGP's en cultivos celulares es el ácido retinoico (Revisado en: Buehr, 1997).

Existen evidencias de que el AMPc puede actuar como agente mitogénico en cultivos de células germinales (Revisado en: Buehr, 1997), y dado el que mecanismo de acción del receptor de la FSH esta ligado a proteínas G, es posible que la activación de la adenilato ciclasa por la FSH, incremente el AMPc por lo que podríamos plantear que el aumento del índice mitótico de las células germinales podría deberse al incremento de este segundo mensajero, que induce la expresión de componentes del ciclo celular, como la ciclina D2 (Sicinski y col., 1996).

Por último podríamos considerar que el incremento del índice mitótico de las ovogonias por efecto de la FSH puede estar parcialmente mediado a través del 17β -estradiol, ya que recientemente se ha descubierto que el receptor de estrógeno se encuentra expresado en las células germinales en ovarios de pollos recién nacidos (Méndez-Herrera y col., 1999).

Las células somáticas también respondieron al tratamiento con FSH aumentando su índice mitótico a partir de las 15 horas, continuando este efecto hasta las 21 horas. Por técnicas de inmunohistoquímica en embriones de pollo entre el día 6.5 y 19.5 de incubación se han detectado células positivas a FSH en el ovario izquierdo. El número de células positivas a FSH se incrementa durante el desarrollo embrionario del ovario, a partir del día 6.5 y hasta el 11.5 éstas se identifican en los cordones medulares y después del día 6.5, se observan también en la corteza ovárica (Woods y col., 1991). En nuestro modelo experimental en embriones de 14 d.i. observamos que las células que se encuentran en los cordones medulares, a las que llamamos células somáticas, incrementaron su índice mitótico por efecto de la FSH, lo que coincide con el hecho de que estas células se unen

específicamente a la FSH. Al igual que en nuestro modelo experimental, en embriones de pollo tratados al día 13 de incubación se observa en el ovario izquierdo un aumento en el número de células somáticas por efecto proliferativo inducido por la FSH (Méndez-Herrera y col., 1998). Podemos plantear que el efecto que observamos en las células somáticas en respuesta al tratamiento con FSH puede ser de forma directa o mediado por el 17β -estradiol. En ovarios inmaduros de pollo se observó que las células poco diferenciadas de los cordones medulares son productoras del 17β -estradiol (Pedernera y col., 1988), estas incrementan la secreción del 17β -estradiol, así como la actividad de la aromatasas después del tratamiento con FSH en los ovarios de pollo de 17 d.i. (Méndez-Herrera y col., 1998).

Se ha descrito que los cordones medulares se insinúan alrededor de la capa de la granulosa para formar la teca de los folículos ováricos. Aún cuando no se puede concluir sobre el destino de estas células somáticas se puede postular que esta subpoblación celular de la médula ovárica participará en la integración de los folículos (González del Pliego, 1991). En consecuencia el incremento del índice mitótico de las células somáticas observado en nuestro modelo experimental podría favorecer la foliculogénesis.

Las células que rodean a los cordones perilacunares no presentaron ningún cambio en su índice mitótico, es difícil discutir la falta de respuesta ante el tratamiento con FSH ya que el papel que juegan dentro del ovario, no es claro aún (Callebaut, 1979); se ha estudiado el origen de estos espacios lacunares encontrándose que algunos de los cordones de la médula ovárica se vacuolizan, dando como resultado la formación del sistema de conductos lacunares (González del Pliego, 1991). El hecho de que no respondan a la FSH como las células de los cordones medulares que les dan origen nos permite suponer que han sufrido un proceso de diferenciación que las hace refractarias al estímulo gonadotrópico. Una alternativa que no podemos descartar es que en nuestras condiciones experimentales (dosis, tiempo, edad, etc.), el efecto de la FSH sobre estas células no pudo ser observado.

Como ya mencionamos la duración del ciclo celular varía de un tipo celular a otro, en la mayoría de las células, toda la fase M dura 1 hora aproximadamente, lo cual es una pequeña fracción de tiempo comparada con la duración total del ciclo celular (Alberts,

1996). En este trabajo experimental observamos que las diferentes poblaciones celulares del ovario del embrión de pollo, presentaron diferentes tiempos en su ciclo celular por efecto de la FSH, lo que podría interpretarse como que cada tipo celular presenta su propio tiempo de división celular o bien que posiblemente esta proliferación diferencial entre las poblaciones celulares del ovario sea debida a que es necesario que proliferen primero algún tipo celular para que induzca la proliferación de los otros tipos celulares por medio de la secreción de factores de crecimiento que promuevan la entrada al ciclo celular. Las fases del ciclo celular varían en tiempo, en la mayoría de los casos estudiados la variación más grande ocurre durante G1 (Alberts, 1996).

En embriones de pollo hembras ha sido detectada FSH plasmática al 8 d.i., y se observó un incremento al día 10 (Rombauts y col., 1993). Además se han identificado células positivas a FSH en ovarios de embriones de pollo entre el día 6.5 y 19.5 de incubación (Woods y col., 1991), y se ha demostrado que la FSH tiene un efecto proliferativo sobre las poblaciones celulares ováricas tanto en estudios *in vivo* como *in vitro* (Velázquez y col., 1997; Méndez-Herrera y col., 1998; Pedernera y col. 1999), por lo que nuestros resultados coinciden con lo antes mencionado demostrando que la FSH podría jugar un papel importante en la embriogénesis del ovario, ya sea actuando de forma directa sobre las poblaciones celulares del ovario, mediada por 17β -estradiol o tal vez por medio de la acción de uno o varios de los factores de crecimiento antes mencionados.

Para saber cual es el papel que desempeña la hormona folículo estimulante en el desarrollo del ovario embrionario se requiere identificar la presencia del receptor de esta hormona en las subpoblaciones celulares del ovario, estudiar el papel que juegan algunos factores de crecimiento, como el HGF, TGF β , Steel, EGF, en la proliferación celular y su relación con la hormona folículo estimulante, así como la regulación de las ciclinas por la FSH en el ciclo celular en etapas embrionarias.

VIII. CONCLUSIONES

La Hormona Folículo Estimulante incrementa el índice mitótico de las células ováricas del embrión de pollo de 14 días de incubación.

El epitelio superficial del ovario del embrión pollo de 14 d.i. expuesto a FSH, mostró un incremento significativo en el número de figuras mitóticas a las 15 y 18 horas posteriores a la aplicación de esta hormona.

Las ovogonias del ovario del embrión de pollo de 14 d.i. aumentan el valor de su índice mitótico 24 h después de recibir el estímulo con FSH.

En la médula yuxtacortical del ovario del embrión de pollo de 14 d.i. el número de mitosis en las células somáticas de los cordones medulares, aumenta significativamente a las 15 y 18 horas, alcanzando el incremento máximo a las 21 horas después de la administración de la FSH.

Las células perilacunares del ovario embrionario de pollo de 14 d.i. no modificaron el valor de su índice mitótico en respuesta a la administración de FSH, en los tiempos analizados.

**ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

IX. BIBLIOGRAFIA

- Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson DJ. 1996. El ciclo de división celular. En: *Biología Molecular de la Célula, Ed. Omega*, pp 925-967.
- Auersperg N, Edelson MI, Mok SC, Johnson SW, Hamilton TC. 1998. The biology of ovarian cancer. *Semin Oncol*, **25** (3):281-304.
- Baserga, R. 1990. Measuring parameters of growth. En : *Cell growth and division* (Rickwood D, Hames BD, Eds), *Ed IRL Press*, pp 1-16.
- Beau I, Groyer-Picard MT, Le Bivic A, Vannier B, Loosfelt H, Milgrom E, Misrahi M. 1998. The basolateral localization signal of the follicle-stimulating hormone receptor. *J Biol Chem*, **273** (29): 18610-6.
- Buehr M. 1997. The primordial germ cells of mammals: some current perspectives. *Exp Cell Res*, **232** (2):194-207.
- Callebaut M. 1976. Origin of ovarian follicle cells in birds. *Experientia* **32**: 1337-1339.
- Callebaut M. 1979. The avian ovary is an open organ. *Anat Embryol*, **158**: 103-119.
- Davies BR, Finnigan DS, Smith SK, Ponder BA. 1999. Administration of gonadotropins stimulates proliferation of normal mouse ovarian surface epithelium. *Gynecol Endocrinol*, **13**(2):75-81.
- Duke LR. 1978. Nonfollicular ovarian components. En: *The vertebrate ovary: Comparative biology and evolution. Plenum press*, New York, 563-582.
- Elbrecht A, Smith RG. 1992. Aromatase enzyme activity and sex determination in chickens. *Science*, **255** (5043): 467-70.
- Figuroa AH. 1992. Efecto de la progesterona en el desarrollo del ovario de embriones de pollo. Tesis de licenciatura en biología, *Facultad de Ciencias, UNAM*, Distrito Federal (Mex).
- Georges FW, Wilson JD. 1994. Sex determination and differentiation. En: *The physiology of reproduction, Raven Press*, 2a ed, New York, pp 3-26,
- Gilbert SF. 1997. *Developmental biology. Sinauer Associates, Inc.* 5ª. ed. USA, pp. 773-804, 843-881.
- Ginsburg M, Snow MHL, McLaren A. 1990. Primordial germ cells in the mouse embryo during gastrulation. *Development*, **110**: 521-528.
- Godin I, Deed R, Cooke J, Zsebo K, Dexter M, Wylie CC. 1991. Effects of the steel gene product on mouse primordial germ cells in culture. *Nature*, **352** (6338): 807-9.
- González del Pliego MV. 1991. Estudio ultraestructural de las poblaciones esteroidogénicas durante el desarrollo del ovario de las aves. Tesis de doctorado en ciencias, *Facultad de Ciencias, UNAM*, Distrito Federal (MEX).

- Gudermann T, Nürnberg B, Schultz G. 1995. Receptor and G proteins as primary components of transduction. I G-protein coupled receptors: structure and function. *J Mol Med*, **73**: 51-63.
- Hahnel AC, Eddy EM. 1986. Cell surface markers of mouse primordial germ cells defined by two monoclonal antibodies. *Gametes Res*, **15**: 25-34.
- Heckert LL, Daley IJ, Griswold MD. 1992. Structural organization of the follicle-stimulating hormone receptor gene. *Mol Endocrinol*, **6** (1): 70-80.
- Hess S, Gulati R, Peluso JJ. 1999. Hepatocyte growth factor induces rat ovarian surface epithelial cell mitosis or apoptosis depending on the presence or absence of an extracellular matrix. *Endocrinology*, **140**(6):2908-16.
- Hinds P. 1999. The cell cycle. Cold Spring Harbor, 20-24 May 1998. *Biochim Biophys Acta*, **1423** (2): R63-7.
- Hsueh AJW, Adashi EY, Jones PBC, Weslh TH. 1984. Hormonal regulation of the differentiation of cultured ovarian granulosa cells. *Endocr Rev*, **5**: 76-128.
- Hughes GC. 1963. The population of germ cells in the developing female chick. *J Embryol Exp Morph*, **11**: 513-536.
- Jones ER. 1978. Nonfollicular ovarian components. En: *The vertebrate ovary*. Ed Plenum press, N.Y., 563-586 pp.
- Johnson AL. 1990. Steroidogenesis and actions of steroids in the hen ovary. *Critical Reviews in Poultry Biology*, **2** (4): 319-346.
- Johnson DG, Walker CL. 1999. Cyclins and cell cycle checkpoints. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, **39**: 295-312.
- Johnson GL, Dhanasekaran N. 1989. The G-protein family and their interaction with receptors. *Endocr Rev*, **10** (3): 317-31.
- Jost A. 1953. Problems of fetal endocrinology: the gonadal and hypophyseal hormones. *Rec Progr Horm Res*, **8**: 379-418.
- Larsen JW. 1997. Gametogenesis, fertilization, and first week. En: *Human Embriology*. Ed. Churchill Livingstone, 1-31 pp.
- Luboshitzky R, Dharan M, Goldman D, Hiss Y, Herer P, Lavie P. 1997. Immunohistochemical localization of gonadotropin and gonadal steroid receptors in human pineal glands. *J Clin Endocrinol Metab*, **82** (3): 977-81.
- MacCalman CD, Farookhi R, Blaschuk OW. 1994. Estradiol regulates E-cadherin mRNA levels in the surface epithelium of the mouse ovary. *Clin Exp Metastasis*, **12**(4):276-82.
- McClung CE. 1902. The accessory chromosome-sex determinant?. *Biol Bull*, **3**: 43-84.

- Méndez-Herrera C, Hofmann P, Pedernera E. 1993. Effect of 17 beta-estradiol on somatic and germ cell subpopulations in the ovary of the newly hatched chick. *Gen Comp Endocrinol*, **182**: 89-2.
- Méndez-Herrera MC, Tamez L, Candido A, Reyes-Esparza JA, Pedernera E. 1998. Follicle stimulating hormone increases somatic and germ cell number in the ovary during chick embryo development. *Gen Comp Endocrinol*, **111** (2): 207-15.
- Méndez MC, Chavez B, Echeverría O, Vilchis F, Vazquez Nin GH, Pedernera E. 1999. Evidence for estrogen receptor expression in germ cell and somatic cell subpopulations in the ovary of the newly hatched chicken. *Cell Tissue Res*, **298** (1): 145-52.
- Merchant H. 1991. Gametogénesis. En: Tópicos Selectos de Biología de la Reproducción. Coordinación de la Investigación Científica. UNAM. *Ed. Porrúa*, 1a. ed. México, pp 5-37.
- Misrahi M, Hau MTV, Ghinea N, Loosfeld H, Meduri G, Atger M, Jolivet A, Gross B, Savouret JF, Dessen P, Milgrom E. 1993. Molecular and cellular biology of gonadotropin receptors. En: The Ovary (Adashi EY, Leung, PCK Edts.), *Raven Press*, New York, pp 57-92.
- Motta PM, Makabe S. 1982. Development of the ovarian surface and associated germ cells in the human fetus. A correlated study by scanning and transmission electron microscopy. *Cell Tissue Res*, **226** (3): 493-510.
- Nakabayashi O, Kikuchi H, Kikuchi T, Mizuno S. 1998. Differential expression of genes for aromatase and estrogen receptor during the gonadal development in chicken embryos. *J Mol Endocrinol*, **20** (2): 193-202.
- Oktay K, Briggs D, Gosden RG. 1997. Ontogeny of follicle-stimulating hormone receptor gene expression in isolated human ovarian follicles. *J Clin Endocrinol Metab*, **82** (11): 3748-51.
- O'Shaughnessy PJ, Dudley K, Rajapaksha WR. 1996. Expression of follicle stimulating hormone-receptor mRNA during gonadal development. *Mol Cell Endocrinol*, **125** (1-2): 169-75.
- Page DC, Mosher R, Simpson EM, Fisher EM, Mardon G, Pollack J, McGillivray B, de la Chapelle A, Brown LG. 1987. The sex-determining region of the human Y chromosome encodes a finger protein. *Cell*, **51** (6): 1091-104.
- Pedernera E, Gomez Y, Velazquez P, Juarez-Oropeza MA, Gonzalez del Pliego M. 1988. Identification of steroidogenic cell subpopulations in the ovary of the newly hatched chicken. *Gen Comp Endocrinol*, **71** (1): 153-62.

- Pedernera E, Solis L, Peralta I, Velazquez PN. 1999. Proliferative and steroidogenic effects of follicle-stimulating hormone during chick embryo gonadal development. *Gen Comp Endocrinol*, **116** (2): 213-20.
- Rao MC, Midgley AR Jr, Richards JS. 1978. Hormonal regulation of ovarian cellular proliferation. *Cell*, **14** (1): 71-8.
- Resnick JL, Bixler LS, Cheng L, Donovan PJ. 1992. Long-term proliferation of mouse primordial germ cells in culture. *Nature*, **359** (6395):550-1.
- Richards JS. 1994. Hormonal control of gene expression in the ovary. *Endocr Rev*, **15**: 725-751.
- Robker RL, Richards JS. 1998a. Hormone-induced proliferation and differentiation of granulosa cells: a coordinated balance of the cell cycle regulators cyclin D2 and p27Kip1. *Mol Endocrinol*, **12** (7): 924-40.
- Robker RL, Richards JS. 1998b. Hormonal control of the cell cycle in ovarian cells: proliferation versus differentiation. *Biol Reprod*, **59** (3):476-82.
- Rombauts L, Berghman LR, Vanmontfort D, Decuypere E, Verhoeven G. 1993. Changes in immunoreactive FSH and inhibin in developing chicken embryos and the effects of estradiol and the aromatase inhibitor R76713. *Biol Reprod* **49** (3):549-54
- Satoh M. 1991. Histogenesis and organogenesis of gonad in human embryos. *J Ant*, **177**: 85-107.
- Schafer AJ, Goodfellow PN. 1996. Sex determination in humans. *Bioessay*, **18** (12): 955-963.
- Schafer KA. 1998. The cell cycle: a review. *Vet Pathol*; **35** (6): 461-78
- Scheele F, Schoemaker J. 1996. The role of follicle-stimulating hormone in the selection of follicles in human ovaries: a survey of the literature and a proposed model, *Gynecological Endocrinology*, **10** (1): 55-66
- Scheib D. 1983. Effects and role of estrogens in avian gonadal differentiation. *Differentiation Suppl*, **23**: 87-92.
- Sicinski P, Donaher JL, Geng Y, Parker SB, Gardner H, Park MY, Robker RL, Richards JS, McGinnis LK, Biggers JD, Eppig JJ, Bronson RT, Elledge SJ, Weinberg RA. 1996. Cyclin D2 is an FSH-responsive gene involved in gonadal cell proliferation and oncogenesis. *Nature*, **384** (6608) :470-4.
- Smith CA, Smith MJ, Sinclair AH. 1999. Gene expression during gonadogenesis in the chicken embryo. *Gene*, **234** (2): 395-402.
- Swain A, Lovell-Badge R. 1997. A molecular approach to sex determination in mammals. *Acta Paediatr Suppl*, **423**: 46-9.

- Ulloa-Aguirre A, Timossi C. 1998. Structure-function relationship of follicle-stimulating hormone and its receptor. *Human Reproduction*, **4** (3): 260-83.
- Velazquez PN, Peralta I, Pedernera E. 1997. Proliferative effect in vitro of follicle-stimulating hormone on the left ovary of the chick embryo. *Gen Comp Endocrinol*, **105** (1): 40-9.
- Werner MH, Huth JR, Gronenborn AM, Clore GM. 1996. Molecular determinants of mammalian sex. *Trends Biochem Sci*; **21** (8): 302-8.
- Weniger JP. 1991. Estrogen secretion by the chick embryo ovary. *Exp Clin Endocrinol*, **98** (1): 9-14
- Wimalasena J, Meehan D, Cavallo C. 1991. Human epithelial ovarian cancer cell steroid secretion and its control by gonadotropins. *Gynecol Oncol*, **41** (1): 56-63,
- Wolf ME, Ginglinger, A. 1935. Sur transformation des poulets males en intersexues par injection d'hormone female (folliculine) aux embryons. *Arch d'Anat d'Hist et d'Embryol*, **20**.
- Woods JE, Damianides-Keenan M, Thommes RC. 1991. FSH- and TSH-binding cells in the ovary of the developing chick embryo. *Gen Comp Endocrinol*, **82** (3): 487-94
- Yen SSC, Jaffe R. 1993. Reproductive endocrinology: physiology, pathophysiology and clinical management. *W B Saunders Co*. 4a ed. USA.
- Yu RN, Ito M, Saunders TL, Camper SA, Jameson JL. 1998. Role of Ahch in gonadal development and gametogenesis. *Nat Genet*, **20** (4): 353-7.
- Zheng W, Magid MS, Kramer EE, Chen YT. 1996 Follicle-stimulating hormone receptor is expressed in human ovarian surface epithelium and fallopian tube. *Am J Pathol*, **148** (1): 47-53.

X. APENDICE 1

El ovario izquierdo disectado fue fijado en Bouin por dos horas, pasado este tiempo se realizaron 3 lavados en alcohol al 30% para eliminar el fijador, posteriormente se efectuó la deshidratación del tejido en alcoholes graduales concluyendo con la inclusión en parafina para obtener cortes de 5 μ de grosor.

Los ovarios fueron procesados con la técnica de Hematoxilina-Eosina, para cortes de parafina , que consiste en los siguientes pasos:

1. Xilol 10 min.
2. Xilol 10 baños rápidos.
3. Alcohol Absoluto 10 baños rápidos
4. Alcohol Absoluto 10 baños rápidos.
5. Alcohol 96° 10 baños rápidos.
6. Alcohol 96° 10 baños rápidos.
7. Lavar en agua corriente 2 min.
8. Teñir con Hematoxilina..... 3-5 min
9. Lavar en agua corriente 2 min.
10. Alcohol ácido 1 baño rápido.
11. Lavar en agua corriente 2 min.
12. Agua amoniacal 3 baños.
13. Lavar con agua corriente..... 2 min.
14. Teñir con Eosina 0.5-1 min
15. Alcohol 96° 10 baños rápidos.
16. Alcohol 96° 10 baños rápidos.
17. Alcohol Absoluto 10 baños rápidos
18. Alcohol Absoluto 10 baños rápidos.
19. Xilol 10 baños rápidos.
20. Xilol 10 baños rápidos.
21. Montar con resina sintética.