



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

" PROLIFERACIÓN CELULAR EN EL
TESTÍCULO EMBRIONARIO INDUCIDA POR LA
HORMONA ESTIMULANTE DEL FOLÍCULO "

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
B I Ó L O G A
P R E S E N T A:
LAURA PADIERNA MOTA

DIRECTORA DE TESIS:
Med. Cirj. MARÍA MARCELA RAMÍREZ
ESCOTO



MÉXICO, D.F.

2001

FACULTAD DE CIENCIAS
SECCION ESCOLAR



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: "Proliferación Celular en el testículo embrionario inducida por la hormona Estimulante del Folículo".

realizado por Laura Padierna Mota

con número de cuenta 9040600-3 , pasante de la carrera de Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis
Propietario

Med. Cirj. María Marcela Ramírez Escoto

Propietario

Dra. en C. María del Carmen Méndez Herrera

Propietario

Dra. en C. Patricia Rivas Manzano

Suplente

Dra. en C. María Guadalupe Zavala Padilla

Suplente

M. en C. Marco Antonio González Jiménez

FACULTAD DE CIENCIAS
U.N.A.M.

Consejo Departamental de Biología

Dra. Edna María Suárez Díaz



DEPARTAMENTO
DE BIOLOGIA

El presente trabajo contó con el apoyo de DGAPA clave IN212900, CONACYT clave 27857-N y una beca otorgada por Laboratorios de Especialidades Inmunológicas S. A. de C. V. a la P. de Biol. Laura Padierna Mota durante la realización de esta tesis de licenciatura.

DEDICATORIAS

◆ **A mi Dios.**

Entendiendo a la Madre Naturaleza como la gran creadora de vida sobre la Tierra, y al ser humano como el gran creador de Dioses. "Thank you for the sun the one that shines on everyone who feels love. Now there's a million years between my fantasies and fears: I feel love".

◆ **A mis padres.**

Dra. en C. Lydia Mota de la Garza.

Por darme un extraordinario cromosoma X, amor, comprensión, apoyo, un ejemplo a seguir y sobre todo...por ser una mujer en la que puedo confiar. "You could say I lost my faith in science and progress, you could say I lost my belief in the holy church, you could say all of this and worse but...If I ever lose my faith in you, there'd be nothing left for me to do"

M. en C. Juan Padierna Olivos.

Por darme la otra extraordinaria mitad de mi complemento genético, por enseñarme que debo luchar por las cosas que quiero, y por el respaldo que siempre me has dado. "Algunas cosas me dejaste ver, algunas cosas las descubrí yo, lo suficiente para comprender el poder de los deseos".

◆ **A mi amor.**

Gustavo Alonso.

Al llegar a mi vida has sanado mi corazón, mi mente, mi alma y mis sueños. Porque somos y seremos uno, en cualquier tiempo y forma de materia...tu aliento es mi respiración. "Tender is the night lying by your side, tender is the touch of someone that you love too much".

◆ **A mis hermanos.**

Cecilia y Alberto.

"Tarda en llegar y al final, y al final hay recompensa...en la Zona de Promesas".

◆ **A mis sobrinos.**

Gabriela y Jesús Alberto.

"The dreams that you keep is where I live"

◆ **A mis abuelos Padierna.**

Con cariño especial a Inés y Juan.

◆ **A mis abuelos Mota.**

Con admiración particular a Lydia y David.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

◆ **Gustavo Alonso Martínez Blanco.**

Por tu ayuda en la realización del análisis estadístico, del procesamiento de las imágenes, por tu apoyo constante, tu paciencia y tu gran amor. "See your face every place that I walk in, hear your voice every time I am talking".

◆ **Biol. Alma Rosa Varela Vega.**

Por compartir conmigo el valor de la amistad a través del tiempo, por tu ayuda con las fotografías de los cortes histológicos y lo más importante: por estar conmigo en los momentos difíciles.

◆ **Familia Padierna (por orden alfabético).**

Amalia, Ana Margarita, Arcelia, Beatriz Inés, Beatriz Libertad, Benito, Claudia Inés, Daniel, Fernando M., Fernando, Jorge Luis, Juan, Luis, Luis Alberto y Margarita.

◆ **Familia Mota (por orden alfabético).**

Alejandro, Alejandro, David, Diana Rosalba, José David, Rosalba †, Teresa Alejandra y Teresa.

◆ **Familia Blanco-Martínez.**

Por permitirme escanear las imágenes que están incluidas en este trabajo. Con cariño especial para Karla, Daniel y Eduardo.

◆ **Sra. Lucía Hernández Ávila.**

Por todos los cuidados y atenciones que me tuviste mientras estuve en la escuela, y durante la realización de este trabajo. Nana: Muchas gracias.

◆ **A mis amigos y compañeros (por orden alfabético).**

Alma Rosa, Elma, Elsa Liliana, Eréndira, Germán Arturo ("Mereces lo que sueñas"), Gustavo Alonso ("All roads lead to where you are"), Héctor, Irma y Marco Antonio ("Te pondré en un altar de veladoras y cuidaré de tu alma... Amén").

AGRADECIMIENTOS ACADÉMICOS

◆ **Dr. en C. Enrique A. Pedernera Astegiano.**

Por la excelente dirección del "Gran Proyecto" y por compartir conmigo su enorme genialidad.

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

Por la dirección de la tesis, por su paciencia y por compartir conmigo "Su Experiencia Histológica".

◆ **Dra. en C. María del Carmen Méndez Herrera.**

Por enseñarme a trabajar exitosamente a pesar de los obstáculos que se presenten en mi camino.

◆ **Tec. Verónica Rodríguez Mata.**

Por la dedicación y realización de los cortes histológicos de los testículos.

◆ **Q.B.P. Concepción Rugerío Vargas.**

Por el ejemplo de amor a la vida académica, por los consejos y el apoyo que siempre me ofreció.

◆ **A mis sinodales:**

M. en C. Marco Antonio González Jiménez.

Dra. en C. María del Carmen Méndez Herrera.

Med. Cirj. María Marcela Ramírez Escoto.

Dra. en C. Patricia Rivas Manzano.

Dra. en C. María Guadalupe Zavala Padilla.

Por las sugerencias constructivas, el tiempo dedicado a la revisión de esta tesis y porque al igual que yo, siempre tuvimos como objetivo que este trabajo tuviera una enorme calidad.

◆ **A los Profesores Lydia de la Garza González y David Mota Hernández.**

Por compartir conmigo sus conocimientos, por la asesoría y revisión de este trabajo. Para mí sus consejos y ayuda son, como siempre, de mucho valor.
Abuelos: MUCHAS GRACIAS.

◆ Dra. en C. Lydia Mota de la Garza.

Experto de la FAO para la Evaluación de Riesgos Microbianos.

A lo largo de tu vida académica has revisado infinidad de trabajos, pero ésta fué la primera vez que revisaste la tesis de uno de tus hijos. Muchas Gracias.

◆ M. en C. Juan Padierna Olivos.

Miembro del Comité de Expertos en Hemoderivados de la FARMACOPEA Mexicana.

Por ser en extremo crítico con mi trabajo, porque eso me obligó a esforzarme cada día más, tal vez fuiste el "sinodal externo" más difícil, pero al fin lo logramos.

◆ Al Laboratorio de Biología de la Reproducción del Departamento de Embriología.

Donde se llevó a cabo el trabajo experimental de esta investigación.

◆ Al Laboratorio de Técnica Histológica del Departamento de Biología Celular y Tisular.

Donde se realizaron el procesamiento histológico de las muestras y la morfometría de los cortes.

◆ A los Laboratorios de Especialidades Inmunológicas S.A. de C.V.

Muchas gracias por la beca otorgada durante la realización de esta tesis de licenciatura y por la gentileza que implicó la impresión de los ejemplares escritos. ¡Mil gracias!

◆ Al personal del Departamento de Embriología (Por orden alfabético).

Profesores: Elma, Elsa, Dra. en C. Margarita González del Pliego, Pablo, Patricia, Rosalba y Yolanda.

Secretarias: Beatriz, Esther y Susana.

Sexto Piso: Sra. Celia, Sr. Ledesma y Sr. Pretel.

Planta Baja: Sr. Alfredo, Sra. Domi y Sra. Guillermina.

◆ A la Universidad Nacional Autónoma de México.

"La Máxima Casa de Estudios".

*“Forming an embryo is the hardest thing you will ever have to do.
To become an embryo you had to build yourself from a single cell.
You had to respire before you had lungs,
digest before you had a gut,
build bones when you were pulpy,
and form orderly arrays of neurons ... before you knew how to
think ”.*

Scott F. Gilbert.

**“ PROLIFERACIÓN CELULAR EN EL
TESTÍCULO EMBRIONARIO INDUCIDA POR LA
HORMONA ESTIMULANTE DEL FOLÍCULO ”**

ÍNDICE

I.	Resumen	1
II.	Introducción	
II.1	Determinación del Sexo en Mamíferos	2
II.2	Diferenciación Gonadal en Mamíferos	4
II.3	Diferenciación Gonadal en Aves	8
II.4	Hormonas Gonadotrópicas	11
II.5	Ciclo Celular	17
III.	Justificación	20
IV.	Hipótesis	20
V.	Objetivos	21
VI.	Materiales y Métodos	22
VII.	Resultados	25
VIII.	Discusión	33
IX.	Conclusiones	38
X.	Bibliografía	39
XI.	Apéndice	45

I. RESUMEN

En el testículo de rata prepúber la Hormona Estimulante del Folículo participa en la maduración de las células de Sertoli, en una rata adulta la ausencia de esta hormona provoca alteraciones en la espermatogénesis, también se sabe que esta gonadotropina tiene un efecto mitogénico sobre las células de Sertoli. El objetivo de esta investigación fué estudiar el efecto proliferativo de la Hormona Estimulante del Folículo en las células del testículo embrionario de pollo de 14 días de incubación, mediante la evaluación del Índice Mitótico (IM), mismo que se estableció como el número de metafases observadas en $10,000 \mu^2$ en las células de los cordones testiculares y en las del tejido intersticial del testículo embrionario después de la aplicación de la Hormona Estimulante del Folículo. El grupo tratado recibió 2 UI de la Hormona Estimulante del Folículo y el grupo control recibió solamente solución salina. Dos horas antes de la disección de la gónada, ambos grupos experimentales recibieron $5 \mu\text{g}$ por embrión de Colcemid. Las gónadas se procesaron con la técnica histológica de rutina y se tiñeron con Hematoxilina-Eosina. El IM se evaluó en intervalos de 3 horas, desde las 15 hasta las 30 horas de exposición a esta gonadotropina. La evaluación del IM muestra que la FSH estimula la proliferación de las células intracordonaes y del tejido intersticial del testículo embrionario de pollo a las 18, 21 y 24 horas de exposición a la hormona. No se observó incremento estadísticamente significativo en el IM de las células intracordonaes y del tejido intersticial a las 15, 27 y 30 horas de exposición a la hormona. Podemos hablar de un efecto mitogénico en las células intracordonaes y en tejido intersticial del testículo, pero no es posible discriminar entre las células de Sertoli y las espermatogonias dentro del cordón, ya que las células en mitosis pierden su morfología típica. Se concluye que la Hormona Estimulante del Folículo tiene un efecto proliferativo en las células intracordonaes y del tejido intersticial del testículo del embrión de pollo de 14 días de incubación.

II. INTRODUCCIÓN

El desarrollo embrionario ha sido objeto de múltiples acercamientos del pensamiento humano, incluyendo en un principio el punto de vista mitológico hasta llegar al conocimiento científico. En el inicio del siglo XXI, entendemos que la Biología del Desarrollo es una disciplina científica que integra diversas áreas del conocimiento como la biología celular, la biología molecular y la genética; en ella encontramos la explicación y muchas veces, más cuestionamientos respecto a los patrones que rigen el desarrollo de un nuevo individuo.

II.1 Determinación del Sexo en Mamíferos.

La determinación del sexo en mamíferos incluye tres etapas: primero la determinación cromosómica, después la diferenciación gonadal y por último el establecimiento del fenotipo, es decir, los caracteres sexuales que son determinados por las hormonas secretadas por las gónadas. En los humanos la determinación del sexo es cromosómica, en el momento de la fecundación se determina genéticamente si el nuevo individuo ha de ser femenino o masculino, cuando el ovocito es fecundado por un espermatozoide que contenga un cromosoma X o Y. El genotipo femenino tiene un arreglo cromosómico 46 XX, mientras que el masculino queda establecido por un arreglo cromosómico 46 XY. El cromosoma Y es crucial para determinar el sexo en los humanos, ya que en él se localiza el gen SRY, llamado así porque se ubica en la Región Sexual del Cromosoma Y. El gen SRY tiene un solo exón, que codifica para una proteína de 223 aminoácidos que recibe el nombre de Factor Determinante del Testículo (TDF₁) (Sinclair y col., 1990), y determina que en la gónada se lleve a cabo la diferenciación testicular (Koopman y col., 1991). En el tejido gonadal de los embriones masculinos de ratón se ha identificado la expresión del TDF antes de la diferenciación sexual, al 10.5 día postcoito (dpc); esta expresión es independiente de la presencia de las células germinales primordiales (PGC's). La expresión del TDF se ha descrito como una onda que va desde la parte anterior hasta la posterior de las crestas genitales, esta onda tiene una duración de un día y medio, las evidencias sugieren que la acción del TDF es establecer la

1. Todas las abreviaturas se refieren a los nombres que se asignan en Inglés.

diferenciación del linaje de las células de Sertoli en el testículo embrionario. Una vez que este tipo celular se ha establecido, desencadena la diferenciación de los demás tipos celulares del testículo en desarrollo (Para una revisión ver: Swain y Lovell-Badge, 1999).

El TDF regula la expresión de genes autosómicos que están involucrados en la diferenciación testicular, ya que se une a la región promotora del gen de la Hormona Anti Mülleriana (AMH) y probablemente induce su expresión en las futuras células de Sertoli, que en el testículo en desarrollo ya secretan la AMH; ésta es una glucoproteína compuesta por dos subunidades de 70 Kda cada una, codificada en el brazo corto del cromosoma 19. La secreción de la AMH impide el desarrollo de los derivados del conducto Mülleriano (Para una revisión ver: Gustafson y Donahoe, 1994). En el ratón la AMH se secreta aún después de la diferenciación sexual masculina, en el ovario postnatal y adulto, por lo que se describen otras funciones para esta hormona como son la maduración de las células germinales, la morfogénesis gonadal y la inducción de la fase abdominal del descenso de los testículos (Para una revisión ver: Huhtaniemi, 1994).

Se sabe también que el TDF regula la expresión del gen SOX9, que pertenece a la familia de proteínas del Grupo de Alta Movilidad y codifica para proteínas que actúan como factores de transcripción de genes que intervienen en la diferenciación testicular de los mamíferos. En el embrión de ratón, se localizó una baja expresión del gen Sox9 en las porciones laterales de la cresta urogenital durante el 10.5 dpc tanto en embriones masculinos como femeninos, sin embargo al 11.5 dpc la expresión fue muy evidente en el primordio gonadal masculino. A los 12.5 – 13.5 dpc se ubicó la expresión del gen Sox9 en las células de Sertoli de los cordones testiculares en la gónada masculina, la presencia del Sox9 fué evidente también en el testículo de ratón adulto. (Kent y col., 1996). Se ha sugerido que este gen está implicado en la determinación de las células de Sertoli, y se ha visto que individuos XY con mutaciones en un alelo en el gen que codifica para SOX9 presentan reversión sexual. Figura 1. (Para una revisión ver: Swain y Lovell-Badge, 1999).

El gen DAX1 se localiza en el cromosoma X, su producto está implicado en la diferenciación del ovario y el testículo, así como en el desarrollo de las glándulas

suprarrenales. La expresión este gen es reprimida por el TDF durante el desarrollo testicular, por lo que se ha propuesto que el DAX1 actúa de manera antagónica al TDF, sin embargo si ocurriera una duplicación de la región Xp21 en un individuo XY, la formación testicular se vería gravemente afectada; si por el contrario, se presentara una mutación que disminuyera la función del DAX1 se observaría la falta de desarrollo de las glándulas suprarrenales. Por otro lado, en el cromosoma 9 se han identificado los genes DMRT1 y DMRT2, cuyas mutaciones heterocigóticas en ambos genes se asocian con reversión sexual de la gónada XY, así como con retraso en el desarrollo (Para una revisión ver: Hiort y Holterhus, 2000).

II.2 Diferenciación Gonadal en Mamíferos.

En la formación de la gónada bipotencial se han caracterizado tres genes cuya acción es independiente del sexo genético, a saber: el gen del Tumor de Wilms 1 (WT-1), que también interviene en la formación de los riñones; el gen del Factor Esteroidogénico 1 (SF-1), que igualmente participa en el desarrollo gonadal, de glándulas suprarrenales y en la transcripción de la AMH; por último, el gen LIM 1 que actúa en la formación de la gónada indiferente y en el desarrollo de los riñones. Figura 1. (Para una revisión ver: Hiort y Holterhus, 2000).

El desarrollo de la gónada es un evento biológico particular, ya que tiene dos vías normales de diferenciación y esto determina el desarrollo sexual del individuo con la formación de un ovario o de un testículo. El primordio gonadal está constituido por PGC's, células del epitelio celómico que dan origen a las células de Sertoli, y células del mesénquima que se diferencian hacia células de Leydig, en el caso de un individuo masculino.

Una característica principal de las PGC's es su capacidad de desplazarse y para ello desarrollan pseudópodos, que les permiten llevar a cabo movimientos ameboides, mientras tienen lugar los movimientos morfogénicos del embrión. Durante la fase de migración activa que se lleva a cabo sobre tejido sólido, se ha propuesto que la cresta genital produce el Factor de Crecimiento Transformante β_1 (TGF β_1) y el Stem Cell Factor (SCF), que son moléculas que podrían funcionar

como agentes quimiotácticos para guiar a las PGC's a su destino, aunque aún no se sabe si estas células expresan el receptor para el $TGF\beta_1$. La matriz extracelular y las células que rodean a las PGC's durante su desplazamiento pueden influenciar la dirección de la migración, ya que el alineamiento de estas células sobre el sustrato en el que se encuentran la laminina y la fibronectina es muy importante en el patrón normal de migración de estas células en el embrión de ratón. Se ha demostrado que las PGC's desarrollan puentes citoplasmáticos que las mantienen unidas durante la fase de migración (Para una revisión ver: Buehr, 1997). Recientemente se ha descrito que el producto del gen *wunen* que se expresa en el epitelio del intestino, actúa de alguna manera como un factor que repele a las PGC's contribuyendo de esta forma en su proceso de migración (Para una revisión ver: Wylie, 1999).

En el embrión de ratón antes de la etapa de gástrula, es decir, al 6° día postcoito (dpc) las células que originarán a las PCG's aparecen por primera vez distribuidas en forma de cinturón alrededor del epiblasto adyacente a la región extraembrionaria. Al 6.5 dpc se localizan en la parte posterior del epiblasto, luego migran hacia el mesodermo extraembrionario cerca de la alantoides. Se ha sugerido que las PGC's se salen de los tejidos embrionarios para evadir la metilación tejido específica que se lleva a cabo en muchos genes durante la gastrulación. Usando la fosfatasa alcalina como marcador celular se ha establecido la ruta de migración de las PGC's en el embrión de ratón de la siguiente manera, en el día 8.5 postcoito la mayoría de las PGC's se localizan en la base de la alantoides en el extremo posterior de la línea primitiva, desde esta posición se incorporan al intestino conforme éste se va formando, al 9.5 dpc las PGC's se incorporan a la pared del intestino posterior, en el 10.5 dpc empiezan a migrar hacia afuera del intestino posterior y a través del mesenterio dorsal para alcanzar los primordios gonadales, al 11.5 dpc la mayoría de las PGC's han llegado al primordio gonadal y la gónada se observa completamente colonizada en los 12 y 13 dpc, en donde las PGC's proliferan y comienzan su diferenciación hacia gametos femeninos o masculinos (Para una revisión ver: Buehr, 1997).

En el embrión humano, a la cuarta y media semana las PGC's migran desde el saco vitelino a lo largo del intestino posterior y a través del mesenterio dorsal hasta

alcanzar la región del primordio gonadal y cuando han llegado a su destino, su comportamiento migratorio se detiene. Los mecanismos que hacen posible esta migración son similares a los que se describen en el embrión de ratón.

En la quinta semana del desarrollo, las crestas genitales se forman a partir del mesodermo intermedio que se sitúa en el borde ventromedial del mesonefros, en ellas se encuentran dos poblaciones celulares: una que deriva del epitelio celómico y que da origen a los cordones sexuales y la otra población proveniente del mesénquima subyacente y que da origen a las células de Leydig, las cuales entre las semanas 17 y 18 de gestación, sufren una regresión gradual y reanudan su función en la pubertad.

En el hombre, el primordio gonadal permanece sexualmente indiferente hasta la séptima semana del desarrollo embrionario, durante este periodo, se ha visto que el epitelio celómico prolifera y se introduce en el mesénquima. A la semana seis, se forman los cordones sexuales primarios que rodean a las células germinales, las cuales migran al interior de la gónada. Aunque las PGC's están distribuidas de manera aislada directamente por debajo del epitelio celómico, no se observa proliferación de estas células (Satoh, 1991).

Durante la octava semana de gestación en la gónada masculina, los cordones sexuales primarios continúan proliferando y darán origen a las precursoras de las células de Sertoli. A la par que se diferencian los cordones, también se separan del epitelio superficial por medio de la túnica albugínea; las zonas periféricas dan lugar a los túbulos seminíferos y en la porción más distal del testículo se desarrolla una red que da lugar a la *rete testis*, la cual se une a los conductos eferentes, derivados de los túbulos mesonéfricos. En presencia de testosterona, los conductos de Wolff se diferenciarán hacia epidídimo, conductos eferentes y vesículas seminales (En: Gilbert, 1997).

En el embrión humano las células de Leydig se identifican a partir de la octava semana, a esta edad ya sintetizan testosterona. En el embrión de ratón se han propuesto dos hipótesis para explicar el inicio de la esteroidogénesis en las células de Leydig, una sugiere la existencia de un factor no gonadotrópico que inicia y mantiene la esteroidogénesis en el testículo fetal, la otra propone que la actividad esteroidogénica puede ser completamente autónoma en el testículo fetal. Es

importante mencionar que la capacidad esteroidogénica de estas células es mucho mayor que en el testículo adulto. (Para una revisión ver: Huhtaniemi, 1994). La síntesis de testosterona en el testículo fetal es importante para la diferenciación del sistema de conductos sexuales masculinos y de los genitales externos.

Al final de la vida embrionaria y en los períodos fetal y postnatal temprano, las espermatogonias se dividen lentamente por mitosis; sin embargo, el testículo embrionario segrega un Factor Inhibidor de la Meiosis que impide que las células sexuales entren en meiosis, es decir, el ambiente hormonal del testículo se vuelve favorable a la meiosis y a la espermatogénesis sólo después de la pubertad (En: Veldhuis, 1993).

En el caso de la formación del ovario, las células germinales residen cerca de la superficie de la gónada y los cordones sexuales primarios degeneran; el epitelio celómico produce una nueva generación de cordones sexuales llamados cordones corticales. Estos cordones rodean a las células germinales, que se diferenciarán hacia ovocito primario y los cordones epiteliales hacia células foliculares; las células del mesénquima ovárico darán origen a las células de la teca. Estos tipos celulares conforman el folículo que produce las hormonas ováricas. En este caso, el conducto Müllleriano se diferenciará hacia oviductos, útero, cervix y la parte superior de la vagina (En: Gilbert, 1997).

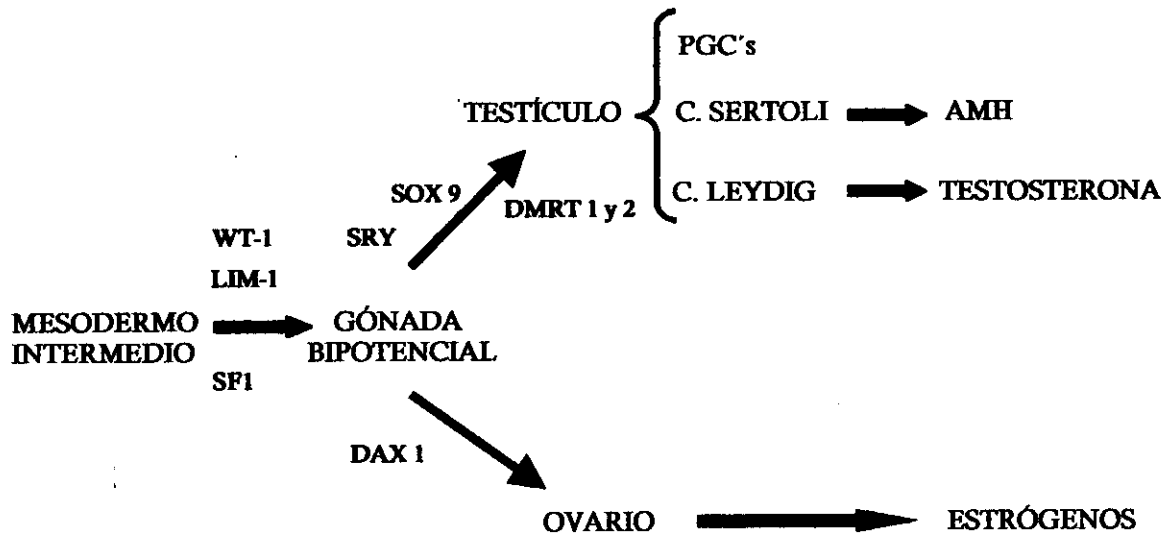


Figura 1. Genes involucrados en la determinación y diferenciación gonadal en mamíferos (Modificado de Hiort y Holterhus, 2000).

II.3 Diferenciación Gonadal en Aves.

En las aves la fórmula cromosómica de la hembra es ZW y la del macho es ZZ, en estos organismos la determinación sexual es cromosómica aunque se han puntualizado diferencias con respecto a los mecanismos que se presentan en los mamíferos durante la diferenciación gonadal, la primera de ellas es que en las aves no se ha caracterizado un homólogo del SRY, la segunda es que en las aves se observa una asimetría gonadal desde el desarrollo embrionario y la tercera es el papel que desempeñan las hormonas esteroides en el desarrollo gonadal.

Aunque no se ha identificado la existencia de un homólogo al SRY, se ha confirmado la expresión de genes que se sabe participan en la regulación del desarrollo gonadal, entre ellos se encuentra el cSOX9 (la "c" es de chicken), el cual es autosómico y comparte homología estructural y funcional con el SRY, lo que ha llevado a pensar que el control genético del desarrollo gonadal está conservado a través de las distintas clases de vertebrados (Clinton, 1998). En las aves el Ácido Ribonucléico mensajero (ARNm) para la AMH se expresa antes de la diferenciación sexual en ambos sexos, aún antes de que se exprese el gen cSOX9 y se ha encontrado que este patrón de expresión es una característica de su diferenciación gonadal (Oreal

y col., 1998). Durante la diferenciación sexual se observó que la expresión del ARNm para la AMH fue mayor en los embriones masculinos que en los femeninos, sin embargo fue muy baja la expresión del ARNm para el cSOX9 en las gónadas de los embriones masculinos y ésta fue localizada en la misma área que el ARNm para la AMH. En la gónada de embrión de pollo de 6.5 - 7.5 días de incubación (di) se ha observado la expresión del gen cSOX9 y se ha identificado en las células de Sertoli en el testículo de embriones de pollo (Kent y col., 1996).

Las PGC's de las aves tienen mecanismos de migración similares a las de mamíferos, y además se desplazan por vía sanguínea hasta alcanzar las crestas gonadales; esto implica dos mecanismos de migración adicionales a los ya mencionados para mamíferos, que son la entrada de PGC's a los capilares sanguíneos y la salida de éstas en la cercanía de la cresta gonadal; esto último sugiere que las PGC's son atraídas por algún factor liberado por la cresta gonadal durante la fase de migración, aún cuando no se ha caracterizado la naturaleza molecular de dicho factor quimioatrayente. En las aves de 20 a 40 PGC's migran del epiblasto al hipoblasto y llegan a la creciente germinal del disco embrionario en la zona cefálica del embrión, donde proliferan y penetran al mesoblasto y luego por vía vascular se desplazan hacia las crestas gonadales, abandonando los vasos sanguíneos por diapedesis; las PGC's penetran a la gónada en desarrollo aproximadamente en el día 2.5 de incubación. (Para una revisión ver: Kuwana, 1993). Las PGC's siguen proliferando y se introducen en el epitelio germinal y de ahí al mesénquima gonadal, luego se lleva a cabo la diferenciación morfológica de las gónadas, que en el embrión de pollo empieza a los 6.5 di y está influenciada por hormonas esteroides presentes en las gónadas antes del cuarto día de incubación (Smith y col., 1997).

Con respecto al desarrollo gonadal, se observa una asimetría que es evidente desde la etapa embrionaria en ambos sexos, ya que a partir del quinto día de incubación las PCG's son más abundantes en la gónada izquierda y conforme avanza el desarrollo en la hembra, el ovario y el oviducto derecho degeneran quedando solamente el ovario y el oviducto izquierdo como órganos funcionales (En: Huetther, 1958). En el caso de los machos el testículo izquierdo es más grande

que el derecho y se observa una distribución inequitativa de las células germinales en las gónadas de ambos sexos (Clinton, 1998).

En los machos a partir del epitelio celómico de las crestas gonadales surge una generación de cordones sexuales, que son precursores de los túbulos seminíferos, los cuales contienen células de Sertoli y gonocitos provenientes de las PGC's, estos emigran hacia la membrana basal de los cordones sexuales donde comienzan su diferenciación hacia espermatogonias, los cordones se diferencian hacia túbulos seminíferos. En las hembras después del décimo día de incubación se produce una segunda generación de cordones sexuales que originan células foliculares (En: Sauveur y Reviere, 1992).

La hipófisis y las gónadas inician sus funciones biológicas independientemente y se coordinan posteriormente con el hipotálamo durante el desarrollo embrionario. En los machos, la regulación hipofisiaria de la esteroidogénesis gonadal empieza en el día 13 de la incubación, y el eje hipotálamo-hipófisis-testículo queda establecido a los 13.5 di (Woods, 1987). La tercera diferencia con respecto al patrón que se observa en los mamíferos es el papel que desempeñan las hormonas esteroideas en el desarrollo gonadal de las aves, ya que el comienzo de la expresión del receptor de estrógeno (cER) y de la aromatasa (cAROM) en las gónadas embrionarias de pollo no se lleva a cabo al mismo tiempo (Smith y col., 1997). La expresión del ARNm del cER se observó en etapas muy tempranas del desarrollo embrionario en ambos sexos, a los 4.5, 5.5 y 6.5 di, es decir, antes y durante la diferenciación morfológica de las gónadas, en la hembra el ARNm para el cER se detectó desde el 3.5 di. Sin embargo el inicio de la expresión de cAROM se confirmó en el día 6.5 de incubación y se observó exclusivamente en gónadas femeninas. Los embriones de pollo de ambos sexos pueden responder a la administración de estrógenos exógenos antes de la diferenciación morfológica de las gónadas, pero la capacidad de sintetizar estrógenos es específica de las gónadas femeninas y se inicia en el momento de la diferenciación gonadal (Smith y col., 1997). Esto es importante, porque implica que las hormonas esteroideas intervienen en la diferenciación gonadal de las aves y como ya se sabe los gonocitos dado su entorno hormonal se diferencian hacia células germinales masculinas o femeninas;

en los mamíferos se piensa que estas hormonas son producto de secreción de las gónadas como resultado de la diferenciación gonadal, por lo que se considera que participan en el establecimiento del fenotipo, pero no en los estadios iniciales de la diferenciación (Clinton, 1998).

II.4 Hormonas Gonadotrópicas.

Las hormonas gonadotrópicas son la Hormona Estimulante del Folículo (FSH), la Hormona Luteinizante (LH) y la Gonadotropina Coriónica Humana (hCG); como su nombre lo indica la actividad fisiológica de estas hormonas se localiza en el aparato reproductor. El hipotálamo secreta la Hormona Liberadora de Gonadotropinas (GnRH) a la circulación porta-hipofisiaria, que estimula a la hipófisis anterior para que secrete la FSH y la LH. La hCG es secretada por la placenta durante el embarazo. Además de la regulación hipotalámica de la FSH por medio de la secreción de la GnRH, también se lleva a cabo su regulación por retroalimentación específica. La Inhibina se forma en las gónadas y actúa sobre los gonadotropos hipofisarios suprimiendo la formación y la liberación de la FSH, su producción en los ovarios y los testículos es estimulada por la FSH, por lo que constituye un mecanismo de retroalimentación negativa de circuito cerrado para la FSH (En: Catt y Dufau, 1993).

Las hormonas gonadotrópicas están constituidas por dos subunidades, que han sido designadas alfa (α) y beta (β), éstas deben combinarse entre sí para lograr una actividad fisiológica adecuada y están unidas por asociaciones no covalentes. Las subunidades α de estas hormonas tienen un peso de 14 Kda, son producto de un solo gen y tienen la misma composición de aminoácidos aunque pueden variar en sus residuos de carbohidratos. Las subunidades β difieren en su estructura, se codifican en genes separados y confieren la especificidad hormonal, además de participar en la unión con los receptores hormonales. La estructura tridimensional de cada subunidad es mantenida por uniones disulfuro entrecruzadas internamente, cinco en la subunidad α y seis en cada subunidad β . Se sabe que ocurren cambios conformacionales cuando las subunidades α y β se combinan, y los resultados de las modificaciones químicas y enzimáticas sugieren que algunos dominios en la

subunidad α común, así como los de la subunidad β específica, interactúan con el sitio del receptor de las gonadotropinas (En: Catt y Dufau, 1993).

Hormona Estimulante del Folículo.

La FSH es secretada por los gonadotropos de la hipófisis anterior, tiene un peso molecular de 33 Kda y además de aminoácidos contiene galactosa, manosa y fructuosa. En el hombre, el gen que codifica para la subunidad α se localiza en el cromosoma 6 y está formado por cuatro exones. Se han sugerido tres papeles principales para la subunidad α en la hormona heterodimérica activa, uno es que combinada con la subunidad β contiene los sitios de reconocimiento necesarios para la unión con el receptor; el otro es que la subunidad β puede adquirir una configuración activa sólo después de su combinación con la cadena α y el tercero propone que ésta es responsable del inicio de la señalización de la hormona para la activación del fosfato de adenosina cíclico (AMPC) (En: Catt y Dufau, 1993).

La subunidad β confiere la especificidad hormonal, en el hombre el gen que codifica esta cadena se localiza en el cromosoma 11 y contiene tres exones, su expresión está regulada por la Inhibina, la Activina, la Folistatina y la GnRh. La Inhibina se considera un supresor selectivo de la FSH en la síntesis y secreción tanto *in vivo* como *in vitro* de esta hormona. La Activina incrementa la síntesis de la subunidad β y por lo tanto la secreción de FSH. La Folistatina actúa directamente uniéndose a la Activina y neutralizando sus efectos. También se requiere del estímulo pulsátil de la GnRh para la expresión del gen que codifica para la subunidad β (En: Veldhuis, 1993).

Receptor de la Hormona Estimulante del Folículo.

Las células de la granulosa en el ovario y las células de Sertoli del testículo son los dos tipos celulares que expresan el receptor a la FSH (FSH-R) en la gónada. En el hombre el gen para este receptor se localiza en el cromosoma 2p21, consiste de 10 exones y 9 intrones, los primeros 9 exones son relativamente pequeños y codifican para el dominio amino terminal extracelular y el exón 10 codifica para las 7 cadenas

transmembranales y el dominio carboxilo intracelular (Gromoll y col., 1996). Figura 2.

El receptor a la FSH pertenece a la superfamilia de receptores que se acoplan a las proteínas G, es decir, que puede existir como un receptor membranal libre que es capaz de interactuar con estas proteínas (Reichert y Dattatreya Murty, 1989). El FSH-R consiste en una cadena polipeptídica glucosilada de largo variable que atraviesa la membrana plasmática 7 veces. El dominio amino terminal interviene en el reconocimiento inicial de la subunidad β de la FSH con el receptor; contiene 14 secuencias repetidas ricas en leucina que intervienen en esta unión específica. Posteriormente se llevan a cabo cambios conformacionales en el complejo hormona-receptor que derivan en regiones adicionales de unión en la subunidad β con el receptor (Ulloa y Timossi, 1998). El dominio amino terminal une a la hormona con gran afinidad y el dominio carboxilo es el responsable de la activación del receptor. La coordinación de los dos dominios es esencial para la actividad de la hormona (Ryu y col., 1998).

Se ha sugerido una forma gradual de unión y activación para la FSH con su receptor, esto involucra un cambio en la configuración en el dominio amino con el dominio transmembranal para activar el proceso de acoplamiento con las proteínas G, en donde se ha propuesto que interviene el extremo carboxilo del FSH-R y que deriva en la estimulación de la adenilatociclasa para que promueva la síntesis del AMPc, el cual activa a la proteína cinasa A dependiente de AMPc, que cataliza la fosforilación de las proteínas para producir una respuesta celular (En: Ganong, 1998).

El desarrollo y la función normal en el ovario y el testículo requieren una interacción completa entre la FSH y su receptor; ya que se ha demostrado que las mutaciones en el gen que codifica para el FSH-R en el ovario humano traen como consecuencia que no se lleve a cabo la maduración del folículo ovárico, por lo que esta hormona es crítica en la fisiología de las gónadas femeninas. En los estudios realizados en el testículo humano, donde se ha observado que la fertilidad masculina es menos dependiente de la FSH, las mutaciones en el receptor suprimen en grados

variables la espermatogénesis, pero no la bloquean por completo (Tapanainen y col., 1998).

En la rata adulta los niveles del ARNm para el receptor de la FSH son cíclicos durante la espermatogénesis, lo que sugiere que el receptor está cuidadosamente regulado en las diversas etapas de este proceso (Heckert y Griswold, 1993), también hay evidencias de una interacción paracrina que es estadio-específica durante la espermatogénesis entre las células espermatogénicas y las células de Sertoli, que regulan la expresión del FSH-R. El incremento paralelo de la FSH que se detecta en sangre y de su receptor sugieren que la hormona regula a la alta al FSH-R durante el desarrollo testicular en los mamíferos. El incremento en el ARNm del receptor de la FSH en el testículo de rata de 10 días de nacida, coincide con el incremento del número de receptores en cada célula de Sertoli y con la proliferación de este tipo celular (Para una revisión ver: Simoni y col., 1997).

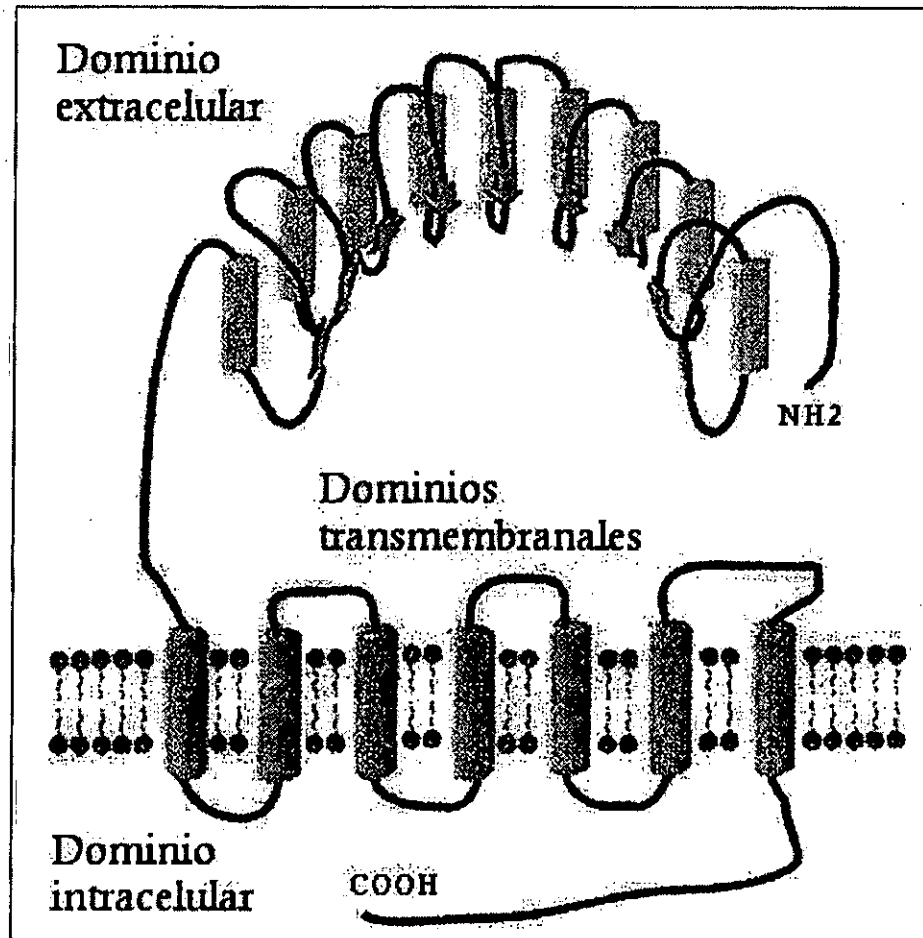


Figura 2. Representación esquemática del receptor a la FSH, en donde se aprecian el dominio amino extracelular, los siete dominios hidrofóbicos transmembranales y el dominio carboxilo intracelular (Modificado de Ryu y col., 1998).

Funciones de la Hormona Estimulante del Folículo.

La FSH en el ovario, actúa sobre el folículo promoviendo su desarrollo, participa además en el crecimiento del ovocito que se encuentra dentro del folículo. La FSH también actúa en las células de la granulosa estimulando la expresión de $P_{450arom}$ para la síntesis de 17β - estradiol. El estradiol incrementa la capacidad de respuesta de las células de la granulosa a la FSH, aumentando la producción del AMPc y la formación de la progesterona. El efecto proliferativo del estrógeno sobre las células de la granulosa ocasiona un aumento en los receptores de la FSH en los folículos en desarrollo (En: Catt y Dufau, 1993).

La función de la FSH en el testículo tiene una relación estrecha con la espermatogénesis, esta relación se lleva a cabo a través de las células de Sertoli, ya que bajo la influencia de esta hormona este tipo celular secreta la Proteína Fijadora de Andrógenos (ABP), la Transferrina, factores de crecimiento y la Inhibina, por lo que la FSH es esencial para el desarrollo testicular normal en animales inmaduros (En: Woodman, 1997). La presencia de la FSH es necesaria para la iniciación de la espermatogénesis, pero el mantenimiento normal de la misma requiere la presencia de una alta concentración intratesticular de andrógenos (En: Catt y Dufau, 1993). Otro factor importante es la edad del individuo, ya que se ha visto que en la rata fetal y recién nacida, esta hormona tiene un efecto mitogénico sobre las células de Sertoli (Orth, 1984). Posteriormente en un testículo de rata de 10 a 45 días de nacida, el efecto mitogénico de la FSH decrece, pero participa en la maduración de las células de Sertoli, ya que favorece la formación de uniones estrechas entre las células adyacentes, el desarrollo del patrón de condensación de cromatina típico de este tipo celular y la formación de indentaciones nucleares (Solari y Fritz, 1978). En ratas adultas se requiere la FSH para mantener la espermatogénesis normal desde el punto de vista cuantitativo, a esta edad también se han observado cambios en la concentración de diferentes proteínas producidas por las células de Sertoli bajo el estímulo de la FSH (ABP, activador del plasminógeno, Transferrina y la Ciclina 2) de acuerdo a los estadios del ciclo del epitelio seminífero (Griswold, 1988). En la función testicular normal se requiere la participación de la testosterona en combinación con la FSH en el testículo de rata adulta (Heckert y Griswold, 1993).

En ovejas también se ha confirmado que las gonadotropinas hipofisarias regulan el desarrollo testicular, éstas actúan en un momento específico de la gestación, se ha observado que a los 70 días de gestación mediante el tratamiento con la Buserelina, que es un antagonista de la GnRH, se produce al nacimiento un testículo con un decremento en el tamaño como consecuencia de una reducción en un 45% en el número de células de Sertoli, sin embargo, el tratamiento con el mismo antagonista en momentos más tardíos de la gestación no tiene este efecto en el tamaño testicular (Brooks y col., 1995).

II.5 Ciclo Celular.

El ciclo celular consiste en la alternancia de la interfase y la división celular (mitosis y citocinesis). La interfase se divide en las siguientes fases: G_1 (*Gap 1*), S (*Synthesis*) y G_2 (*Gap 2*). Figura 3. En G_1 , la célula monitorea su entorno, así como sus propias condiciones y cuando se requiere pasa a la fase S , en ésta se duplica el DNA y se producen las histonas. En la fase G_2 , las células crecen y se aseguran que la duplicación del DNA ha sido terminada antes de que comience la mitosis. Existen poblaciones de células con un alto grado de diferenciación, como las neuronas, que se encuentran detenidas en G_1 por períodos prolongados y que se considera que han salido del ciclo celular, por lo que se dice que están en fase G_0 . Durante la mitosis se reconocen cinco etapas: Profase, Prometafase, Metafase, Anafase y Telofase, después de la cual se lleva a cabo la Citocinesis o división del citoplasma. (En: Alberts y col., 1996 y Jorde y col., 1998).

Las proteínas que participan en el control del ciclo celular se conocen como ciclinas y están conservadas a lo largo de la escala filogenética, también intervienen en otros procesos celulares como es la regulación de la transcripción, la reparación del DNA, la diferenciación celular y la apoptosis (En: Karp, 1998). El control del ciclo celular se basa en la presencia de proteínas cinasas dependientes de ciclinas (Cdks) y de las mismas ciclinas. Las Cdks tienen acción catalítica y se activan en puntos específicos del ciclo celular; se han identificado por lo menos 9 Cdks en las células de mamíferos (Johnson y Walker, 1999). La ciclinas tienen una función reguladora y cuando su concentración se eleva, interaccionan con la cinasa y la

célula entra a la mitosis (En: Karp, 1998). En las células de mamíferos se han identificado 16 ciclinas y todas ellas presentan una región homóloga llamada "Caja de las Ciclinas", que participa en la unión y activación de las Cdks (Schafer, 1998).

Las ciclinas actúan preferentemente en dos puntos del ciclo celular; uno es la transición de G₁ a S, en donde intervienen las ciclinas D2 y E (En: Alberts y col., 1996). También existe una regulación negativa del ciclo celular en la etapa G₁ y se lleva a cabo principalmente por dos familias de proteínas, la familia p16 y la familia p21. La familia p16 (formada por las proteínas p16, p15, p18 y p19), inactiva solamente a Cdk 4 y Cdk 6 (Schafer, 1998). La familia p21 (formada por las proteínas p21, p27, p53 y p57) inhibe a la mayoría de las Cdks, excepto a Cdk 1. La proteína p21 inhibe la replicación, pero no la reparación del DNA. Se ha reportado que la proteína p53 reconoce varios tipos de daño del DNA y si éstos son muy graves, dirige a la célula hacia la apoptosis (Para una revisión ver: Kingman, 2000). Se han identificado alteraciones en el patrón de expresión de la p53 en aproximadamente 50% de las neoplasias (Schafer, 1998). La p27 ha sido implicada en la mediación de señales de inhibición del crecimiento celular, que incluyen al TGF- β y la inhibición del crecimiento celular por contacto (Johnson y Walker, 1999). El otro punto de control del ciclo celular tiene lugar en la transición de G₂ a M y a las ciclinas que intervienen en esta fase se les ha llamado ciclinas mitóticas (En: Alberts y col., 1996). La inhibición del ciclo celular en la fase G₂ ocurre por acción de la cinasa wee 1. Figura 3. (Schafer, 1998).

El ciclo celular se puede regular en los dos puntos mencionados también por moléculas externas como factores de crecimiento y hormonas. Los trabajos de Sicinski y col. (1996) evidenciaron que la FSH puede inducir actividad mitótica en células de la granulosa en el ovario de ratón por medio del estímulo del AMPc, ya que induce la expresión de la ciclina D2, que es un regulador positivo en la progresión del ciclo celular. Se ha documentado que la FSH y el estradiol elevan el nivel de transcripción del ARNm de la ciclina D2 en células de la granulosa en el ovario de rata (Robker y Richards, 1998). Orth demostró que la FSH producida por la hipófisis tiene un papel fundamental en la regulación de la proliferación de las células de Sertoli tanto *in vivo* como *in vitro* en el testículo de rata fetal (Orth, 1984);

también hay evidencias que indican que la FSH administrada *in vitro*, induce la proliferación y diferenciación celular de las células de Sertoli en el testículo de rata fetal (Sasaki y col., 1998), por lo que se sugiere que esta hormona ejerce una influencia importante en la progresión del ciclo celular.

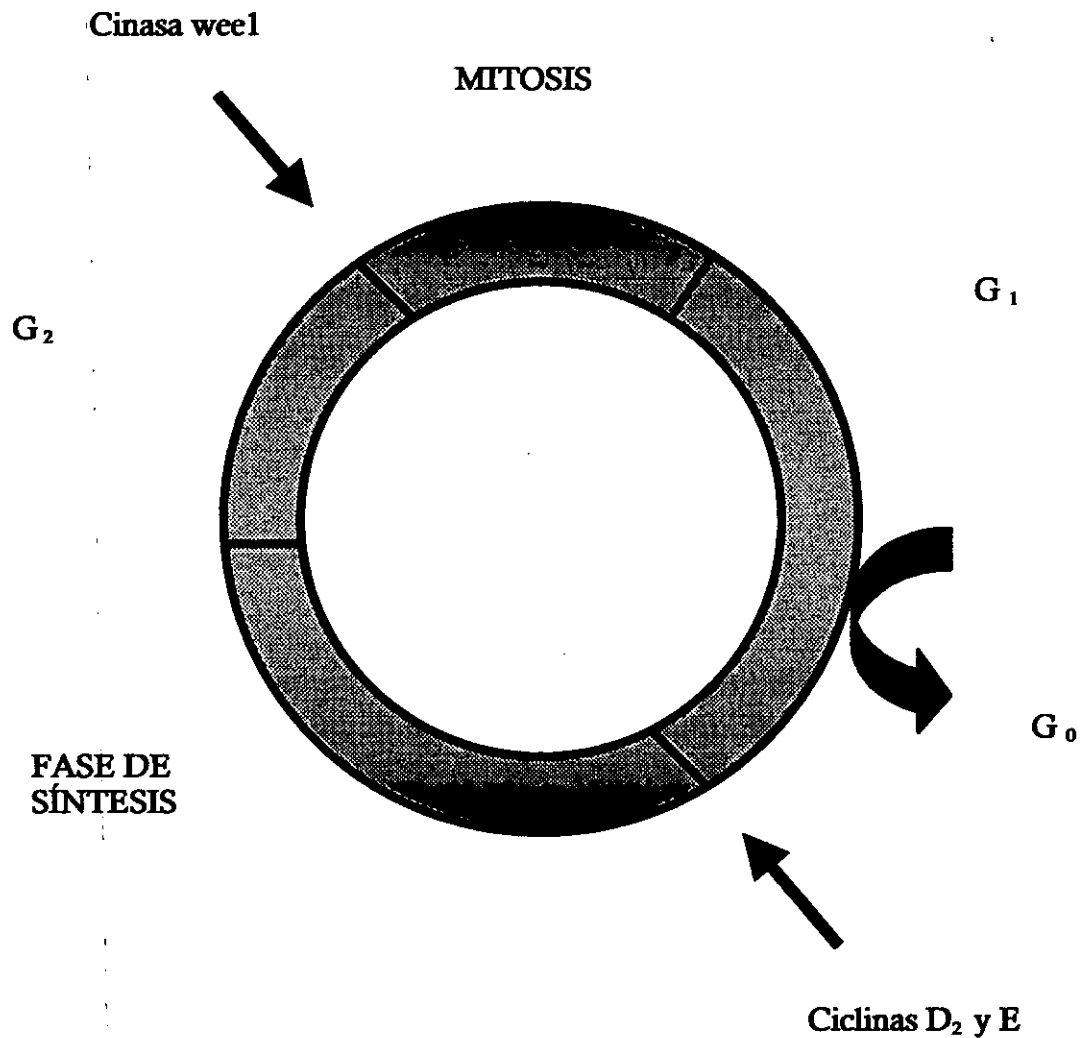


Figura 3. Esquema donde se representan las distintas fases del ciclo celular y los puntos de restricción a lo largo del mismo. Modificado de: http://www.biology.arizona.edu//cell_bio/tutorials/cell-cycle/main.html.

III. JUSTIFICACIÓN

La FSH actúa a través de receptores específicos que se localizan en las células de Sertoli y estimula su proliferación así como la de las células germinales en el testículo de rata recién nacida (Meehan y col., 2000). En la rata prepúber la FSH interviene en la maduración de las células de Sertoli, y en el testículo de la rata y el ratón adultos es importante para la espermatogénesis normal (Heckert y Griswold, 1993; Tapanainen y col., 1998). En ratones con hipogonadismo la FSH administrada en etapa neonatal induce la proliferación de las células de Sertoli, esto influye en el tamaño del testículo maduro y en la espermatogénesis (Singh y Handelsman, 1996).

En pollos recién nacidos el tratamiento con FSH durante el desarrollo embrionario produce un incremento en el número de células de Sertoli y en las espermatogonias, así como en los elementos celulares del tejido intersticial (González-Morán, 1997). Sin embargo, se requiere mayor información sobre la participación de esta hormona durante la organogénesis del testículo en el embrión de pollo.

IV. HIPÓTESIS

Si la FSH estimula la proliferación celular en el testículo, entonces la exposición a FSH producirá un incremento en el índice mitótico de las células del testículo del embrión de pollo.

III. JUSTIFICACIÓN

La FSH actúa a través de receptores específicos que se localizan en las células de Sertoli y estimula su proliferación así como la de las células germinales en el testículo de rata recién nacida (Meehan y col., 2000). En la rata prepúber la FSH interviene en la maduración de las células de Sertoli, y en el testículo de la rata y el ratón adultos es importante para la espermatogénesis normal (Heckert y Griswold, 1993; Tapanainen y col., 1998). En ratones con hipogonadismo la FSH administrada en etapa neonatal induce la proliferación de las células de Sertoli, esto influye en el tamaño del testículo maduro y en la espermatogénesis (Singh y Handelsman, 1996).

En pollos recién nacidos el tratamiento con FSH durante el desarrollo embrionario produce un incremento en el número de células de Sertoli y en las espermatogonias, así como en los elementos celulares del tejido intersticial (González-Morán, 1997). Sin embargo, se requiere mayor información sobre la participación de esta hormona durante la organogénesis del testículo en el embrión de pollo.

IV. HIPÓTESIS

Si la FSH estimula la proliferación celular en el testículo, entonces la exposición a FSH producirá un incremento en el índice mitótico de las células del testículo del embrión de pollo.

V. OBJETIVOS

- *OBJETIVO GENERAL.*

Estudiar el efecto proliferativo de la Hormona Estimulante del Folículo en las células del testículo embrionario de pollo de 14 días de incubación.

- *OBJETIVOS PARTICULARES.*

1. Evaluar el Índice Mitótico en las células intracordonaes del testículo embrionario de pollo de 14 días de incubación, en animales testigo y en animales tratados con la FSH, a las 15, 18, 21, 24, 27 y 30 horas de exposición a la hormona.
2. Evaluar el Índice Mitótico en las células del tejido intersticial del testículo embrionario de pollo de 14 días de incubación, en animales testigo y en animales tratados con la FSH, a las 15, 18, 21, 24, 27 y 30 horas de exposición a la hormona.

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

- *ANIMALES.*

Se utilizaron embriones de pollo White Leghorn de la raza Bab-Cock B-300 de catorce días de incubación, seleccionados por ovoscopia (ver apéndice). Los embriones se incubaron con circulación de aire forzado a 37.8 °C y 80% de humedad relativa.

- *MÉTODOS.*

Se realizó una abertura en la parte media del huevo por medio de la técnica de cámara falsa (ver apéndice), para aplicar directamente las soluciones sobre la membrana corioalantoidea. El grupo tratado recibió 2 UI de FSH Humana (Fertinorm, SERONO) disueltas en 27 µl de solución isotónica de cloruro de sodio, este grupo se expuso a la hormona durante 15, 18, 21, 24 y 30 horas previas al día 14 de incubación. El grupo de animales testigo recibió 27 µl del disolvente a las mismas horas que el grupo tratado. Después de la administración de la hormona y el vehículo respectivamente en cada grupo, se continuó con la incubación de los embriones hasta el día 14. Con el objetivo de detener a las células en metafase, a ambos grupos experimentales se les administró 5µg de Colcemid en 50 µl de agua bidestilada estéril, dejándolo actuar dos horas antes de la disección del testículo.

Al cumplirse los tiempos establecidos de exposición a la hormona, se sacrificó a los embriones por decapitación y se hizo la disección del testículo izquierdo, éstos se fijaron en Bouin y se procesaron mediante la técnica histológica de rutina, se obtuvieron cortes sagitales del testículo de 5 µm ± 2 µm de grosor, los cuales se tiñeron con el método de Hematoxilina -Eosina (ver apéndice).

- *MORFOMETRÍA.*

Los cortes histológicos se observaron en un microscopio compuesto Zeiss, el cual tiene instalada una cámara de video que proyecta la imagen a un monitor de

computadora en la cual se encuentra instalado el programa de digitalización de imágenes Image Pro Plus 2.0.

En cada corte se midió el área ocupada por 10 campos utilizando un aumento de 40X, tomando en consideración los siguientes criterios:

- A. Sólo se consideraron los campos en los que el tejido estaba en condiciones óptimas, con la finalidad de observar con claridad la delimitación de los cordones testiculares.
- B. Se excluyeron las áreas de los extremos de los testículos, por ser zonas de crecimiento y por lo tanto con gran cantidad de células en mitosis.
- C. Se eliminaron las áreas donde había gran cantidad de tejido laxo, correspondiente al estroma.

En cada uno de los campos seleccionados se realizaron las siguientes mediciones:

1. Medición del área total de cada campo. La imagen del corte observado en el microscopio fue llevada al monitor y mediante el programa Image Pro Plus 2.0 previamente calibrado, se utilizó la función de medición de área total.
2. En cada campo se midió el área ocupada por:
 - ◆ Tejido cordonal: Tejido organizado en forma de cordones testiculares, delimitados por una membrana basal. En el interior de los cordones testiculares se encuentran dos tipos celulares; las espermatogonias y las células de Sertoli.
 - ◆ Tejido intersticial: Tejido de localización pericordonal, formado por elementos del estroma que incluyen células de tejido conjuntivo y componentes fibrilares, así como células intersticiales o de Leydig. Esta área se obtuvo restando del área total de cada campo seleccionado, el área ocupada por tejido cordonal.

3. Se contó el número de metafases presentes en el tejido cordonal y el tejido intersticial del testículo. Los parámetros para considerar una célula en metafase fueron:

- a) Ausencia de envoltura nuclear.
- b) La observación de cromosomas como estructuras fibrilares.
- c) Forma redondeada y mayor tamaño celular.
- d) Se descartaron aquellas células que no presentaban una imagen típica de mitosis.

◆ Después se calculó el Índice Mitótico de la siguiente manera:

Índice Mitótico = número de figuras en metafase observadas en $10,000 \mu^2$.

• *ANÁLISIS ESTADÍSTICO.*

Se utilizó el programa Statical Analysis System para realizar la prueba de Duncan y así comparar mediante un análisis de varianza los resultados obtenidos. La prueba de Duncan o de rango múltiple permite hacer todas las comparaciones posibles con los promedios obtenidos de los tratamientos experimentales, se consideró con significado estadístico cuando la probabilidad fue menor a 0.05 (En: Reyes, 1980).

VII. RESULTADOS

• *DESCRIPCIÓN HISTOLÓGICA.*

En el testículo del embrión de pollo de 14 días de incubación, se distinguen dos compartimientos celulares bien definidos: los cordones testiculares y el intersticio. Figura 6A. Los cordones testiculares son de diámetro variable, se encuentran delimitados por una membrana basal y en su interior se aprecian dos tipos celulares: las espermatogonias y las células de Sertoli. Las primeras son las menos abundantes, de gran tamaño, de forma redondeada aunque de límites poco precisos, con núcleo redondo y evidente y con gran cantidad de eucromatina, su citoplasma es ligeramente eosinófilo y presenta espacios claros. Las células de Sertoli, son las más abundantes a esta edad y son células de menor tamaño que las espermatogonias, de forma poliédrica con núcleo situado en la base, de forma redondeada, con uno o dos nucleolos y cromatina más condensada, el citoplasma es eosinófilo. Figura 6B.

Por fuera de los cordones testiculares se aprecia el compartimiento intersticial formado a su vez por dos tipos celulares, el primero corresponde a células pericordonaes localizadas inmediatamente por fuera de la membrana basal que los rodea, tienen forma ahusada, un núcleo ovoide con eucromatina abundante y citoplasma que emite prolongaciones hacia ambos lados del mismo, estas células tienen en general aspecto de células poco diferenciadas. Figura 6B. En algunos cortes entre los cordones, se observan acúmulos de 3 o 4 células de mayor tamaño con un citoplasma más abundante, acidófilo y vacuolado que representa a células intersticiales o de Leydig. Más alejadas de los cordones se encuentran abundantes células pequeñas con características de fibroblastos, con un núcleo ovoide de localización central y citoplasma levemente basófilo. Entre los dos últimos tipos celulares intersticiales se aprecian elementos fibrilares y celulares del tejido conjuntivo, así como estructuras vasculares.

- *ÍNDICE MITÓTICO.*

En las células intracordonaes del testículo de pollo de 14 días de incubación, después de 18 y 21 horas de exposición a 2 UI de FSH hay un incremento estadísticamente significativo en los valores del Índice Mitótico; este aumento alcanza un valor máximo a las 24 horas de exposición a la hormona. Figuras 7, 8A y 8B. Después de 15, 27 y 30 horas de exposición a la FSH, no se observa un incremento en el Índice Mitótico de los grupos tratados, en comparación con sus grupos testigo. Tabla 1, figura 4.

Las células del tejido intersticial del testículo de pollo de 14 días de incubación, después de 18, 21 y 24 horas de exposición a 2 UI de FSH tienen un incremento estadísticamente significativo en el Índice Mitótico. Figuras 7 y 8C. Después de 15, 27 y 30 horas de exposición a la FSH, los valores del Índice Mitótico obtenidos en el grupo tratado, no muestran un incremento con respecto al grupo testigo correspondiente. Tabla 2, figura 5.

Tabla 1. Índice Mitótico de las Células Intracordales del Testículo Embrionario.

<i>Horas de exposición a FSH</i>	n	<i>TESTIGO</i>	n	<i>FSH</i>
15	9	4.14 ± 1.34	11	4.02 ± 1.35
18	9	4.14 ± 1.34	11	7.04 ± 2.10 *
21	7	3.51 ± 1.26	10	7.62 ± 2.14 *
24	12	4.66 ± 1.87	17	8.79 ± 3.40 *
27	13	4.98 ± 1.23	13	4.63 ± 1.18
30	10	4.82 ± 1.00	11	4.75 ± 2.99

Tabla 2. Índice Mitótico de las Células del Tejido Intersticial del Testículo Embrionario.

<i>Horas de exposición a FSH</i>	n	<i>TESTIGO</i>	n	<i>FSH</i>
15	9	4.29 ± 1.97	11	4.06 ± 1.65
18	9	4.29 ± 1.97	11	5.88 ± 2.16 *
21	7	3.54 ± 1.21	10	5.92 ± 2.42 *
24	12	3.72 ± 1.90	17	6.01 ± 2.20 *
27	13	4.33 ± 1.46	13	4.25 ± 1.97
30	10	4.89 ± 0.61	11	4.59 ± 2.84

* P < 0.05 indica diferencia estadísticamente significativa.

ÍNDICE MITÓTICO DE LAS CÉLULAS INTRACORDONALES
DEL TESTÍCULO EMBRIONARIO

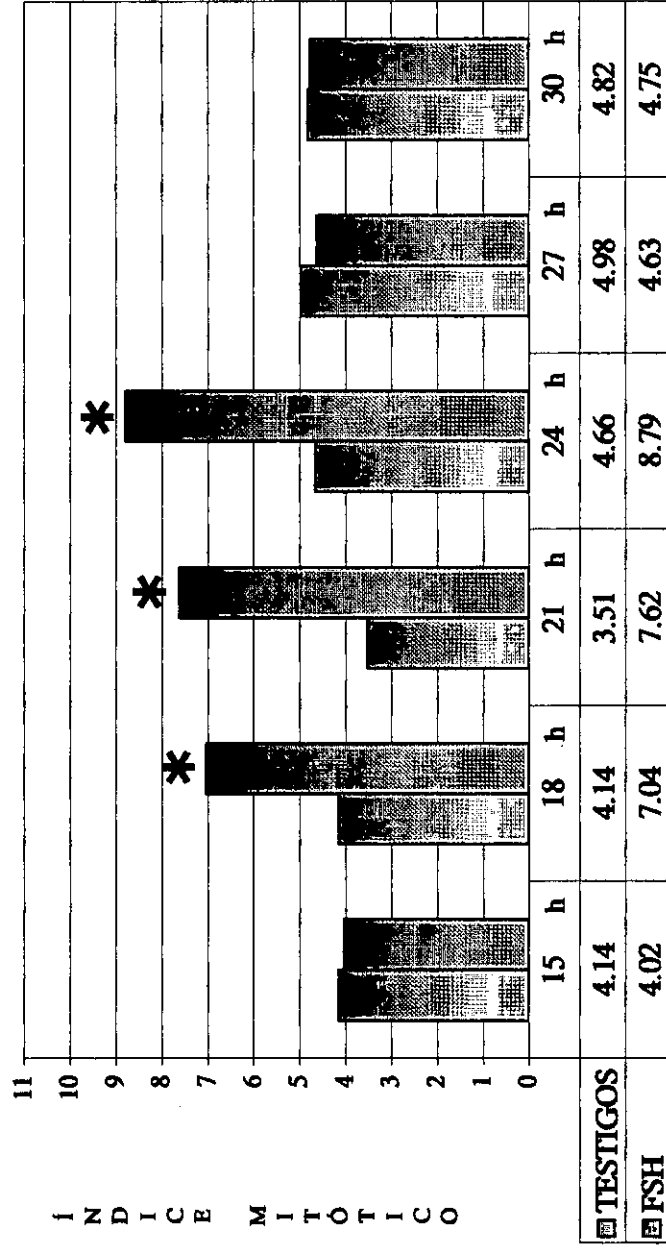


Figura 4. Las células intracordales del testículo embrionario de pollo de 14 días de incubación incrementan su proliferación celular, después de 18, 21 y 24 horas de exposición a FSH.
* Indica diferencia estadísticamente significativa, $P < 0.05$.

ÍNDICE MITÓTICO EN LAS CÉLULAS DEL TEJIDO INTERSTICIAL DEL TESTÍCULO EMBRIONARIO

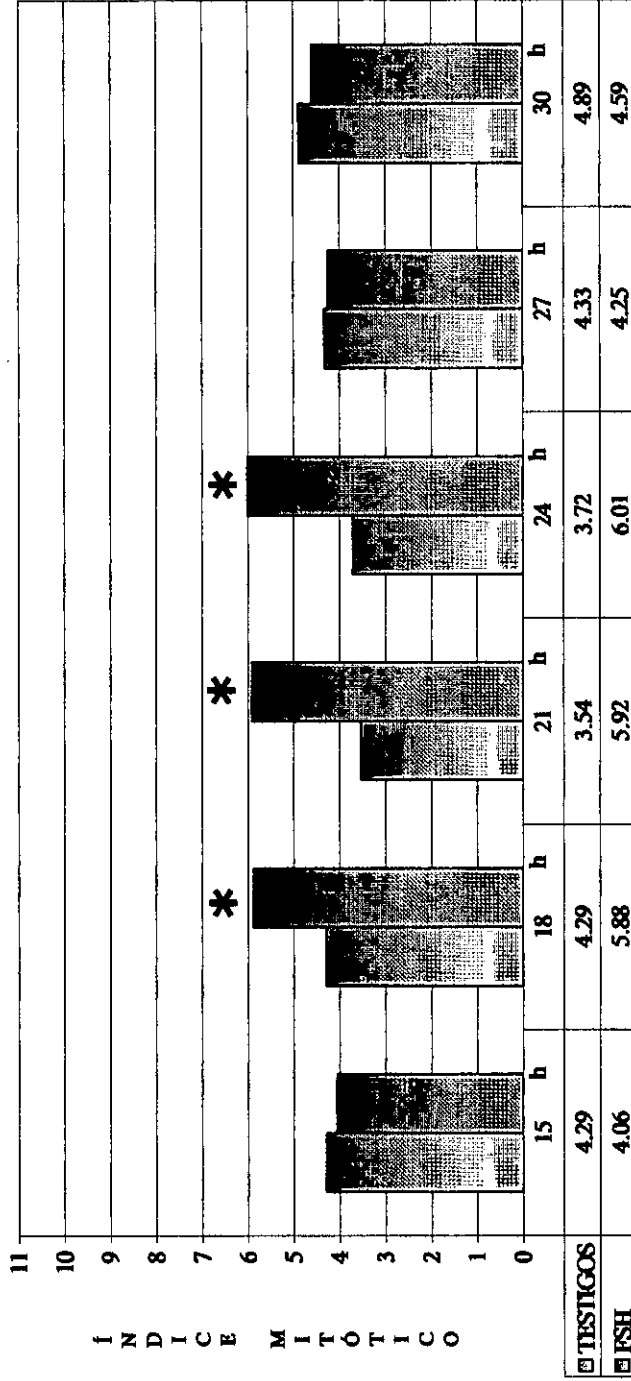


Figura 5. Las células del tejido intersticial del testículo embrionario de pollo de 14 días de incubación incrementan su proliferación celular después de 18, 21 y 24 horas de exposición a FSH.

*Indica diferencia estadísticamente significativa, $P < 0.05$.

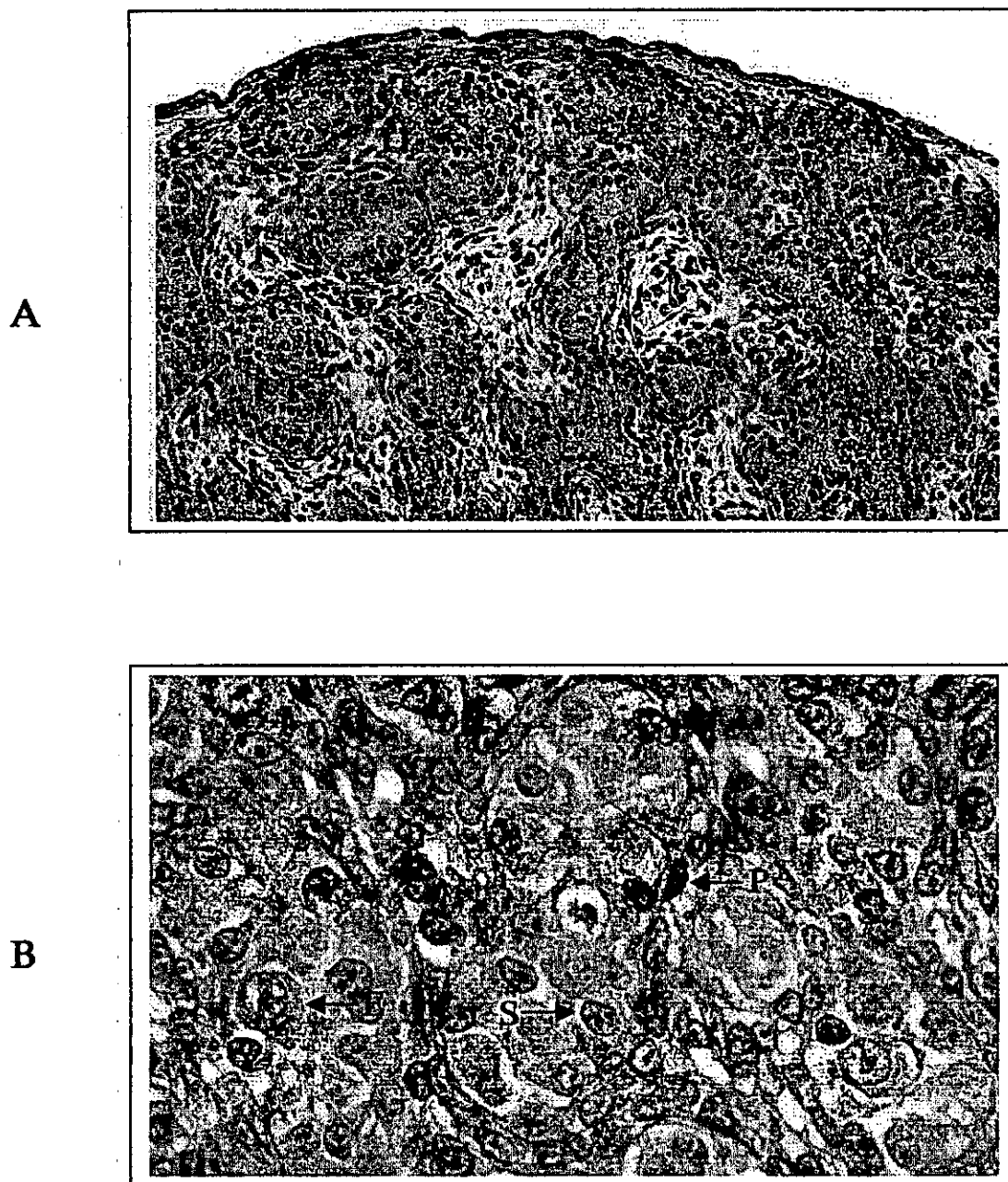


Figura 6. Cortes histológicos del testículo embrionario de pollo de 14 días de incubación, imágenes correspondientes al grupo testigo. **A)** Se observan los cordones testiculares (CT) y el tejido intersticial (TI), (20X). **B)** Se aprecian con mayor detalle los cordones testiculares, formados por espermatogonias (E) y células de Sertoli (S), y elementos del tejido intersticial, tales como células pericordnales (P) (100X).

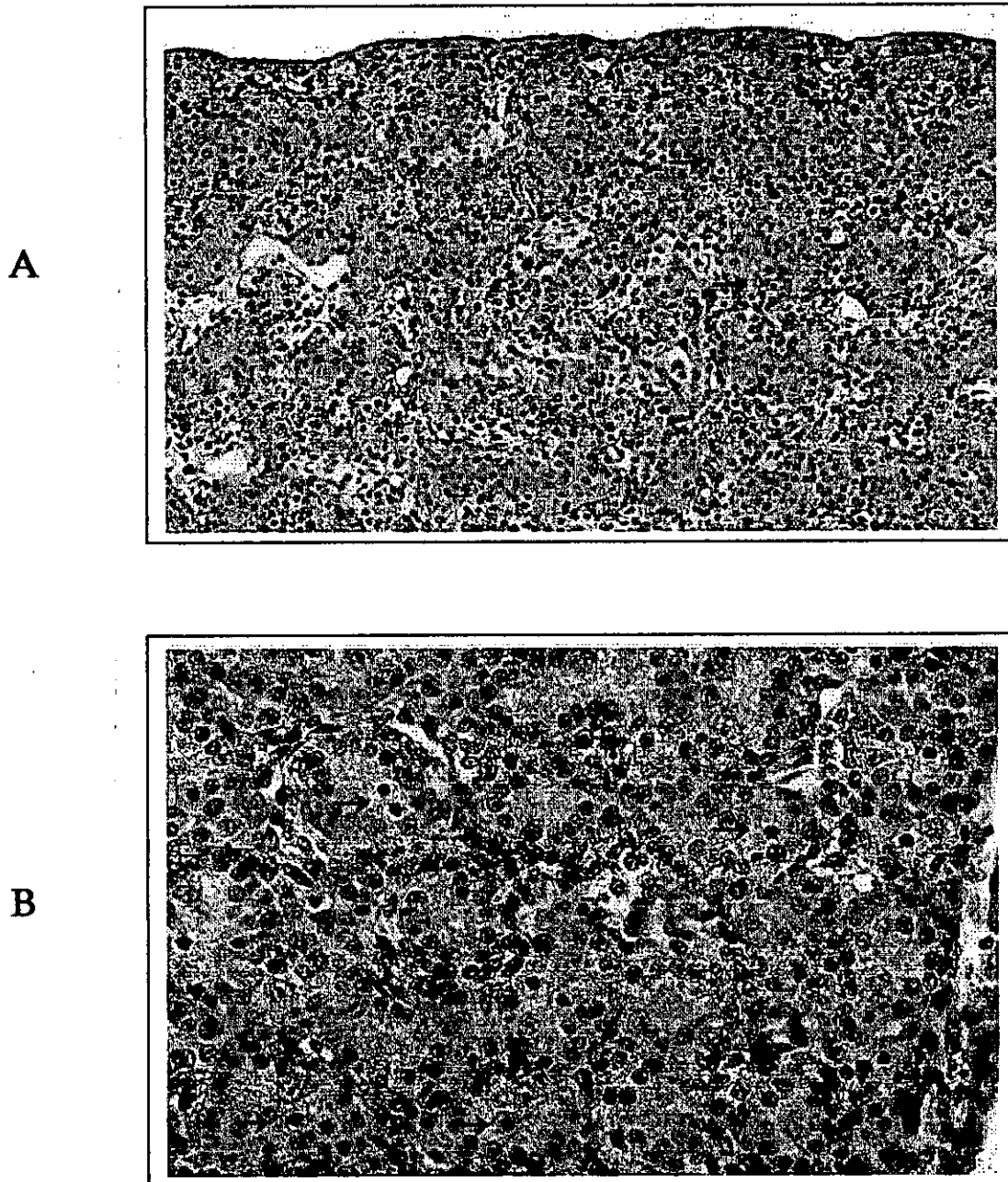


Figura 7. Cortes histológicos del testículo de embrión de pollo de 14 días de incubación,) expuesto a FSH durante 21 h. A) Vista panorámica donde se observan figuras mitóticas (→) en ambos compartimentos testiculares (20X). B) Se observan figuras mitóticas (→), principalmente dentro de los cordones testiculares (40X).

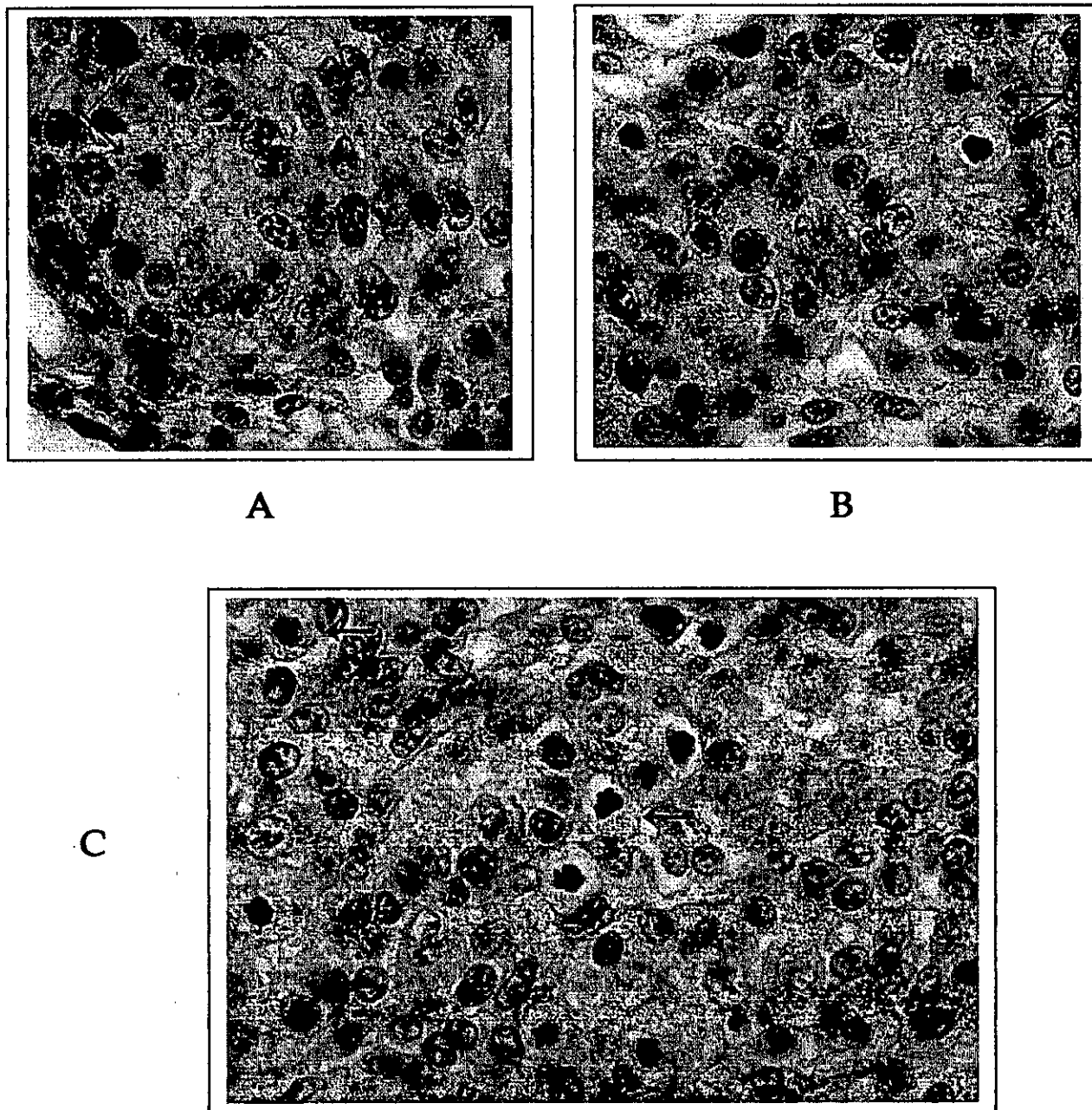


Figura 8. Cortes histológicos del testículo embrionario de pollo de 14 días de incubación, tratado con FSH durante 24 h. A) y B) Cromosomas en metafase en las células intracordales (→) (100X). C) Se observan figuras mitóticas en las células del tejido intersticial (→) (100X).

VIII. DISCUSIÓN

Este trabajo aporta evidencias del efecto estimulante de la FSH sobre la proliferación de las células de los cordones testiculares y del intersticio en el testículo del embrión de pollo.

El modelo experimental del embrión de pollo ha sido ampliamente utilizado en investigación por ser de fácil manejo con el que se puede trabajar un número suficiente de animales, además de que la experimentación *in vivo* puede realizarse de una manera accesible sin intervención de hormonas placentarias (En: Dupin y col., 1998). En esta especie, la esteroidogénesis es de inicio temprano y se lleva a cabo al mismo tiempo que la diferenciación gonadal, además de que la gónada en desarrollo es sensible a hormonas esteroides (Smith y col., 1997).

Para estudiar la proliferación celular existen diversos métodos como la técnica de cuantificación del DNA en células individuales por citometría de flujo, la incorporación de Bromodeoxiuridina (BrdU), de timidina tritiada, así como la valoración del Índice Mitótico (IM). Éste último se ha utilizado con éxito en estudios realizados en células germinales primordiales y en células del sistema nervioso central en el embrión de pollo (Medda y Bose, 1967 y Maeda, 1998). En nuestra investigación se evaluó el Índice Mitótico (Modificado de: Baserga, 1990) en una área de $10,000 \mu^2$ sobre cortes histológicos de tejido testicular teñidos con Hematoxilina-Eosina, esta tinción nos permite distinguir claramente los cordones testiculares y el tejido intersticial.

La histología del testículo fue similar en ambos grupos experimentales, por lo que consideramos que ésta no se modifica por el tratamiento con FSH. Figuras 6 y 7. En el cordón testicular constituido por células de Sertoli y espermatogonias, observamos un aumento en el número de figuras mitóticas, pero con esta técnica no podemos discriminar entre ambos tipos celulares, debido a que las células en mitosis modifican sus características morfológicas. Figuras 8A y 8B. Con base en los antecedentes de la literatura que documentan que la FSH actúa sobre las células de Sertoli (Orth, 1984; Singh y Handelsman, 1996; Pedernera y col., 1999 y Meehan y

col., 2000), parece probable que este tipo celular sea el que prolifera dentro de los cordones testiculares por efecto de esta gonadotropina. Sin embargo, no podemos descartar un efecto de la FSH sobre las células de la estirpe germinal, ya que se han detectado receptores a esta hormona en la superficie de las espermatogonias en el testículo de rata adulta (Orth y Christensen, 1978), por otra parte se ha demostrado la presencia de la FSH en la membrana plasmática de las células de Sertoli y en células de la línea germinal, desde espermatogonias hasta espermátidas redondas en el testículo adulto de humano y de ratón. Además, el ARNm del receptor a la FSH se ha observado en el citoplasma de las células de Sertoli y en las espermátidas redondas en el testículo adulto de humano y de ratón (Baccetti y col., 1998). Sin embargo no se ha documentado que la FSH y su receptor se encuentren en las células de la línea germinal del testículo embrionario y adulto del pollo.

Para saber qué tipo celular está proliferando dentro del cordón necesitaríamos discriminar a las células de Sertoli y las espermatogonias. Se puede utilizar el marcaje del receptor transmembranal c-kit que pertenece a la familia de los factores de crecimiento. En el testículo embrionario y postnatal de rata se ha documentado la presencia del c-kit en las células de la línea germinal y también en las células de Leydig, pero no en las células de Sertoli (Para una revisión ver: Loveland y Schlatt, 1997 y Berruti, 1998). Al ligando del c-kit se le conoce de diversas maneras, entre otros recibe el nombre de Stem Cell Factor (SCF) y es una glicoproteína secretada por las células de Sertoli (Griswold, 1998). El SCF puede existir en dos formas, una que permanece unida a la membrana y otra que es capaz de separar el dominio extracelular y así convertirse en un factor soluble. La forma transmembranal del SCF se ha relacionado con la sobrevivencia de las células germinales primordiales, y se postula que la forma soluble interviene en la proliferación de este tipo celular (Para una revisión ver: Loveland y Schlatt, 1997 y Berruti, 1998). Utilizando un anticuerpo contra el c-kit podríamos identificar dentro del cordón testicular las células de la línea germinal y en el tejido intersticial a las células de Leydig. Para confirmar el efecto proliferativo de la FSH podríamos marcar a las células en síntesis mediante la incorporación de BrdU, con ambos marcajes sabríamos el tipo celular que está proliferando dentro del cordón testicular y en el tejido intersticial.

Se ha reportado que en condiciones *in vitro* en el testículo de rata adulta bajo la estimulación de la FSH se incrementan los niveles del ARNm de las dos formas del SCF, y que bajo las mismas condiciones la forma soluble es capaz de promover la síntesis de DNA en las espermatogonias tipo A (Rossi y col., 1993). Teniendo en cuenta que el sistema c-kit/SCF gobierna la proliferación, sobrevivencia y adhesión de las espermatogonias y que la secreción de las dos formas del SCF está en función de las células de Sertoli, sería interesante investigar si el aumento en la proliferación de estas células es capaz de producir un incremento en la concentración intratesticular de las dos formas del SCF y si la forma soluble es capaz de intervenir en la progresión de las espermatogonias en el testículo de pollo.

Las células de Leydig típicas están presentes en el testículo de pollo alrededor del día 16 de incubación (Jordanov y col., 1978), por lo que al día 14 no se distinguen todavía las células esteroidogénicas en el tejido intersticial del testículo embrionario. Cabe mencionar que si se observan células pericordonaes ubicadas inmediatamente por debajo de la membrana basal de los cordones testiculares, en algunos trabajos se propone que las células pericordonaes parecidas a fibroblastos, dan origen a las células de Leydig, que se localizan más profundamente en el tejido intersticial (Aguilar y col., 1981 y Pedernera y col., 1981). Por la ubicación de las figuras mitóticas, es probable que las células pericordonaes sean las que proliferan, también hay que considerar que las células de Leydig son relativamente escasas a esta edad. No se ha demostrado que el receptor a la FSH esté presente en las células de Leydig, por lo que es poco probable que estas células respondan directamente a la FSH, sin embargo hay algunos antecedentes de que la administración de esta hormona *in vitro* aumenta la secreción de testosterona durante el desarrollo gonadal en el embrión de pollo (Pedernera y col., 1999).

Las células parecidas a fibroblastos son pluripotenciales, ya que originan a las células mioides y a las células pericordonaes. La capa más interna de las células pericordonaes parece tener el citoplasma orientado hacia el cordón testicular, lo que sugiere una interacción entre ambos compartimientos; en testículo adulto de rata se ha documentado que las células peritubulares participan en el mantenimiento de la pared exterior del túbulo seminífero así como también parecen producir factores parácrinos

que pueden ser importantes en la regulación de las interacciones en el túbulo; por ejemplo, en co-cultivos de células de Sertoli con células peritubulares, estas últimas alteran la morfología e incrementan la producción de transferrina y de la proteína fijadora de andrógenos en las células de Sertoli. Entre los factores que pueden mediar las interacciones entre las células de Sertoli y las peritubulares se han considerado a los factores de crecimiento. Los andrógenos secretados por las células de Leydig también influyen en las células peritubulares, ya que éstas tienen receptores a andrógenos y su diferenciación parece ser dependiente de la presencia de andrógenos. La influencia de la FSH en las células de Sertoli promueve las interacciones celulares que influyen en el desarrollo de las células de la estirpe germinal, en la diferenciación de las células peritubulares y en el funcionamiento de las células de Leydig (Para una revisión ver: Skinner y col., 1991).

La interacción entre los diversos tipos celulares es importante en la fisiología testicular, hay evidencias que muestran que los productos de secreción de las células de Sertoli como el Factor de Crecimiento Parecido a Insulina I (IGF-I) y TGF- β , son capaces de afectar el nivel de esteroidogénesis en las células de Leydig, y que la testosterona puede aumentar la respuesta de las células de Sertoli a la FSH en un cultivo testicular de cerdo adulto (Perrard-Sapori y col., 1986). Se ha sugerido que el IGF-1 puede estar implicado en la proliferación, diferenciación y función de las células de Leydig, ya que se ha confirmado la presencia de receptores al IGF-1 en las células de Leydig de varias especies, también se ha visto un efecto estimulante de este péptido en el nivel de transcripción del receptor a LH en este tipo celular. El TGF- β es secretado por las células de Sertoli y las peritubulares, se ha documentado que este péptido tiene un efecto inhibitorio en la expresión del receptor a LH en las células esteroidogénicas (Para una revisión ver: Lejeune y col., 1998). Se ha reportado que en un cultivo de testículo fetal de rata al que se le administró FSH, los niveles de secreción de testosterona se incrementaron significativamente, en este caso no se habla de un efecto directo de la FSH sobre las células de Leydig, ya que en éstas no se han identificado los receptores a esta gonadotropina, más bien se postula que el efecto sobre las células esteroidogénicas es mediado a través de factores parácrinos secretados por las células de Sertoli fetales; la naturaleza de estos factores aún no ha sido

establecida, pero se sugiere que podrían estar involucrados en la regulación de la función de las células de Leydig en el testículo fetal y adulto de rata (Lecerf y col., 1993).

Las células de Leydig cultivadas en combinación con células de Sertoli y en ausencia de FSH, tiene un efecto inhibitorio en varios parámetros de la función de las células esteroidogénicas, en cambio un cultivo al que se le adiciona FSH tiene un efecto positivo en la secreción de testosterona por parte de las células de Leydig de testículo de rata adulta. Por lo que se ha confirmado que la FSH a través de las células de Sertoli, modula algunas de las funciones de las células de Leydig (Para una revisión ver: Lejeune y col., 1998). Sin embargo se requieren más estudios que aporten información acerca de este fenómeno en el testículo embrionario de pollo *in vivo*, por lo que resulta importante investigar si en el testículo embrionario de las aves las células de Sertoli bajo la influencia de la FSH, a través de los factores parácrinos secretados por éstas, son capaces de estimular la actividad esteroidogénica de las células de Leydig.

Se ha reportado que en un cultivo de células humanas provenientes de un tumor de próstata no dependiente de andrógenos, los niveles de la FSH y su receptor están elevados en comparación con los que se observan en el tejido prostático normal, esto ha llevado a pensar que la FSH y su receptor podrían estar participando en el desarrollo de este tipo de neoplasia (Ben-Josef y col., 1999), ya que la transducción de señales a través del acoplamiento de las proteínas G con el receptor se considera una ruta bioquímica involucrada en la regulación de la proliferación celular por los factores de crecimiento, por lo que la activación inadecuada de los componentes de esta vía de señalización intracelular podría derivar en un crecimiento celular descontrolado. Si se confirmara la participación de la FSH y su receptor en el proceso de transformación celular en las neoplasias no dependientes de andrógenos, entonces se podría desarrollar una propuesta terapéutica que junto con los procedimientos convencionales pudiera ayudar en el tratamiento de este tipo de neoplasias.

IX. CONCLUSIONES

La Hormona Estimulante del Foliculo tiene un efecto proliferativo en las células del testículo del embrión de pollo de 14 días de incubación.

Las células intracordales del testículo embrionario de pollo de 14 días de incubación mostraron un aumento estadísticamente significativo en el número de figuras mitóticas a las 18, 21 y 24 horas posteriores a la exposición de FSH.

Las células del tejido intersticial del testículo embrionario de pollo de 14 días de incubación tuvieron un aumento estadísticamente significativo en el valor del Índice Mitótico después de 18, 21 y 24 horas de exposición a la FSH.

X. BIBLIOGRAFÍA

- Aguilar M C, Romano M y Pedernera E, (1981) Ultrastructure of Leydig cells in the testis of chicken submitted to early embryonic surgical bursectomy. *Journal of Anatomy*. 133:543-553.
- Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K y Watson J D, (1996) The cell division cycle. En: *Molecular Biology of the Cell*. Garland. pp 925-967.
- Baccetti B, Collodel G, Constantino-Ceccarini E, Eshkol A, Gambera L, Moretti E, Strazza M y Piomboni P, (1998) Localization of human follicle-stimulating hormone in the testes. *The Federation of American Societies for Experimental Biology Journal*. 12:1045-1054.
- Baserga R, (1990) Measuring parameters of growth. En: *Cell growth and division*. Rickwood D y Hames B D (Eds). IRL Press. pp 1-16.
- Ben-Josef E, Yang S Y, Ji T H, Bidart J M, Garde S V, Chopra D P, Porter A T y Tang D G, (1999) Hormone-refractory prostate cancer cells express functional Follicle-Stimulating Hormone Receptor (FSHR). *The Journal of Urology*. 161:970-976.
- Berruti G, (1998) Signaling events during male germ cell differentiation: bases and perspectives. *Frontiers in Bioscience*. 3:1097-1108.
- Brooks A N, McNeilly y Thomas G B, (1995) Role of GnRH in the ontogeny and regulation of the fetal hypothalamo-pituitary-gonadal axis in sheep. *Journal of Reproduction and Fertility Supplement*. 49:163-175.
- Buehr M, (1997) The primordial germ cells of mammals: some current perspectives. *Experimental Cell Research*. 232:194-207.
- Catt K J y Dufau M L, (1993) Hormonas gonadotróficas: biosíntesis, secreción, receptores y acciones. En: *Endocrinología reproductiva*. Yen S C y Jaffe R B (Eds) W.B. Saunders Company. pp 126-178.
- Clinton M, (1998) Sex determination and gonadal development: a bird's eye view. *The Journal of Experimental Zoology*. 281:457-465.

**ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA**

- Dupin E, Ziller C y Le Douarin N M, (1998) The avian embryo as a model in developmental studies: chimeras and *in vitro* clonal analysis. En: Cellular and molecular procedures in Developmental Biology. de Pablo F, Ferrús A y Stern C D (Eds) Academic Press. pp 1-35.
- Ganong W F, (1998) Endocrinología, metabolismo y función reproductora. En: Fisiología Médica. Manual Moderno. pp 443-507.
- Gilbert S F, (1997) Sex determination. En: Developmental Biology. Sinauer Associates Inc. pp 773-804,843-881.
- González-Morán G, (1997) A stereological study of the different cell populations in chicken testes treated with Follicle-Stimulating Hormone during embryonic development. *Anatomy, Histology and Embryology*. 26:311-317.
- Griswold M D, (1988) Protein secretions of Sertoli cells. *International Review of Cytology*. 110:133-156.
- Griswold M D, (1998) The central role of Sertoli cells in spermatogenesis. *Cell & Developmental Biology*. 9:411-416.
- Gromoll J, Pekel E y Nieschlag E, (1996) The structure and organization of the human Follicle-Stimulating Hormone receptor (FSH-R) gene. *Genomics*. 35:308-311.
- Gustafson M L y Donahoe P K, (1994) Male sex determination: current concepts of male sexual differentiation. *Annual Review Medicine*. 45:505-524.
- Heckert L y Griswold M D, (1993) Expression of the FSH receptor in the testis. *Recent Progress in Hormone Research*. 48:61-77.
- Hiort O y Holterhus P-M, (2000) The molecular basis of male sexual differentiation. *European Journal of Endocrinology*. 142:101-110.
- Huettner A F, (1958) The reproductive system. En: Fundamentals of comparative embryology of the vertebrates. Mac Millan Company. pp 231-233.
- Huhtaniemi I, (1994) Fetal testis (a very special endocrine organ). *European Journal of Endocrinology*. 130:25-31.
- Johnson D G, Walker C L, (1999) Cyclins and cell cycle checkpoints. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*. 39:295-312.

- Jordanov J, Angelova P, Boyadjieva-Michailova A y Bakalska M, (1978) Ultrastructure of developing interstitial cells in chick embryonic gonad in relation to their genesis and steroidogenic function. *Zeitschrift für mikroskopisch-anatomische Forschung*. 92:449-464.
- Jorde B L, Carey C J y White L R, (1998) Ciclo celular. En: Genética médica. Harcourt Brace. pp 20-29.
- Karp G, (1998) Reproducción celular. En: Biología celular y molecular. McGraw- Hill Interamericana. pp 580-626.
- Kent J, Wheatley S C, Andrews J E, Sinclair A H y Koopman P, (1996) A male-specific role for SOX9 in vertebrate sex determination. *Development*. 122:2813-2822.
- Kingman S, (2000) Protection against chemotherapy and radiotherapy induced cell damage. *Drug Discovery Today*. 1:7-8.
- Koopman P, Gubbay J, Vivian N, Goodfellow P y Lovell-Badge R, (1991) Male development of chromosomally female mice transgenic for Sry. *Nature*. 351:117-121.
- Kuwana T, (1993) Migration of avian primordial germ cells toward the gonadal anlage. *Development, Growth and Differentiation*. 35:237-243.
- Lecerf L, Rouiller-Fabre V, Levacher Ch, Gautier C, Saez J y Habert R, (1993) Stimulatory effect of Follicle-Stimulating Hormone on basal and Luteinizing Hormone-Stimulated Testosterone secretions by the fetal rat testis *in vitro*. *Endocrinology*. 133:2313-2318.
- Lejeune H, Habert R y Saez J M, (1998) Origin, proliferation and differentiation of Leydig cells. *Journal of Molecular Endocrinology*. 20:1-25.
- Loveland K L y Schlatt S, (1997) Stem cell factor and c-kit in the mammalian testes: lessons originating from Mother Nature's gene knockouts. *Journal of Endocrinology*. 153:337-344.
- Maeda T, (1998) Analysis of the mitotic index of chicken primordial germ cells before and after settling in the germinal ridge. *Journal of Reproduction and Fertility*. 113:211-215.

- Medda J y Bose A, (1967) A study of Mitotic Index in differentiating central nervous system of chick. *Cytology*. 34:36-44.
- Meehan T, Schlatt S, O'Bryan M, de Kretser D y Loveland L K, (2000) Regulation of germ cell and Sertoli cell development by Activin, Follistatin and FSH. *Developmental Biology*. 220:225-237.
- Oreal E, Pieau C, Mattei M-G, Josso N, Picard J-Y, Carré-Eusèbe D y Magre S, (1998) Early expression of AMH in chicken embryonic gonads precedes testicular SOX9 expression. *Developmental Dynamics*. 212:522-532.
- Orth J y Christensen K, (1978) Autoradiographic localization of specifically bound ¹²⁵I-labeled Follicle-Stimulating Hormone on spermatogonia of the rat testis. *Endocrinology*. 103:1944-1951.
- Orth J M, (1984) The role of Follicle-Stimulating Hormone in controlling Sertoli cell proliferation in testes of fetal rats. *Endocrinology*. 115:1248-1255.
- Pedernera E, Aguilar M C y Romano M, (1981) Ultrastructural differentiation of Leydig cells in the testes of 17-day-old chick embryo and newly hatched chickens. Eleventh international congress of anatomy: advances in the morphology of cells and tissues. 363-372.
- Pedernera E, Solis L, Peralta I y Velázquez P, (1999) Proliferative and steroidogenic effects of Follicle-Stimulating Hormone during chick embryo gonadal development. *General and Comparative Endocrinology*. 116:213-220.
- Ferrard-Sapori M H, Chatelain P, Vallier P y Saez J M, (1986) *In vitro* interactions between Sertoli cells and steroidogenic cells. *Biochemical and biophysical research communications*. 134:957-962.
- Reichert L E Jr y Dattatreymurty B, (1989) The follicle-stimulating hormone (FSH) receptor in testis: interaction with FSH, mechanism of signal transduction, and properties of the purified receptor. *Biology of Reproduction*. 40:13-26.
- Reyes C P, (1980) Pruebas de hipótesis. En: Bioestadística aplicada. Trillas. pp 110-117.
- Robker R L y Richards J S, (1998) Hormonal control of the cell cycle in ovarian cells: proliferation versus differentiation. *Biology of Reproduction*. 59:476-482.

- Rossi P, Dolci S, Albanesi C, Grimaldi P, Ricca R, Geremia R, (1993) Follicle-Stimulating Hormone induction of Steel Factor (SLF) mRNA in mouse Sertoli cells and stimulation of DNA synthesis in spermatogonia by soluble SLF. *Developmental Biology*. 155:68-74.
- Rugerio V C y Ramirez E M M (1998) Método de Hematoxilina-Eosina para cortes en parafina. En: Manual del curso teórico-práctico "Técnica histológica: aplicaciones en la docencia e investigación". UNAM. pp 22-23.
- Ryu K, Gilchrist R L, Tung Ch, Ji I y Ji T, (1998) High affinity hormone binding to the extracellular N-terminal exodomain of the Follicle-stimulating Hormone receptor is critically modulated by exoloop 3. *The Journal of Biological Chemistry*. 273:28953-28958.
- Sasaki M, Yamamoto M, Arishima K y Eguchi Y, (1998) Effects of Follicle-Stimulating Hormone on intermediate filaments and cell division of Sertoli cells of fetal rat testis in culture. *Journal of Veterinary Medicine Science*. 60:35-39.
- Satoh M, (1991) Histogenesis and organogenesis of the gonad in human embryos. *Journal of Anatomy*. 177:85-107.
- Sauveur B y Reviere M, (1992) Desarrollo testicular e implantación de la espermatogénesis. En: Reproducción de las aves. Mundi Prensa. pp 37-44.
- Schafer K A, (1998) The cell cycle: a review. *Veterinary Pathology*. 35:461-478.
- Sicinski P, Donaher J L, Geng Y, Parker S B, Gardner H, Park M Y, Robker R L, Richards J S, McGinnis L K, Biggers J D, Eppig J J, Bronson R T, Elledge S T y Weinberg R A, (1996) Cyclin D2 is an FSH-responsive gene involved in gonadal cell proliferation and oncogenesis. *Nature*. 384:470-474.
- Simoni M, Gromoll J y Nieschlag E, (1997) The Follicle-Stimulating Hormone receptor: biochemistry, molecular biology, physiology and pathophysiology. *Endocrine Reviews*. 18:739-773.
- Sinclair A H, Berta P, Palmer M S, Hawkins J R, Griffiths B L, Smith M J, Foster J W, Frischauf A M, Lovell-Badge R y Goodfellow P N, (1990) A gene from the human sex-determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA-binding motif. *Nature*. 346:240-244.

- Singh J y Handelsman D J, (1996) Neonatal administration of FSH increases Sertoli cell numbers and spermatogenesis in gonadotropin-deficient (hpg) mice. *Journal of Endocrinology*. 151:37-48.
- Skinner M K, Norton J N, Mullaney B P, Rosselli M, Whaley P D y Anthony C T, (1991) Cell-cell interactions and the regulation of testis function. *Annals New York Academy of Sciences*. 637:354-363.
- Smith C A, Andrews J E y Sinclair A H, (1997) Gonadal sex differentiation in chicken embryos: expression of estrogen receptor and aromatase genes. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. 60:295-302.
- Solari A J y Fritz I B, (1978) The ultrastructure of immature Sertoli cells. Maturation-like changes during culture and the maintenance of mitotic potentiality. *Biology of Reproduction*. 18:329-345.
- Swain A y Lovell-Badge R, (1999) Mammalian sex determination: a molecular drama. *Genes & Development*. 13:755-767.
- Tapanainen J S, Vaskivuo T, Aittomäki K y Huhtaniemi I T, (1998) Inactivating FSH receptor mutations and gonadal dysfunction. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 145:129-135.
- Ulloa A A y Timossi C, (1998) Structure-function relationship of follicle-stimulating hormone and its receptor. *Human Reproduction Update*. 4:260-283.
- URL:http://www.biology.arizona.edu//cell_bio/tutorials/cell-cycle/main.html.
- Veldhuis J, (1993) Eje Hipotálamo - Hipofisiario - Testicular. En: *Endocrinología reproductiva*. Yen S C y Jaffe R B (Eds) W.B. Saunders Company. pp 434-477.
- Woodman D D, (1997) Luteinising Hormone and Follicle-Stimulating Hormone. En: *Laboratory animal endocrinology, hormonal action, control mechanism and interactions with drugs*. John Wiley and Sons. pp 121-134.
- Woods J E, (1987) Maturation of the Hypothalamo-Adenohypophyseal-Gonadal axes in the chick embryo. *The Journal of Experimental Zoology Supplement*. 1:265-271.
- Wylie C, (1999) Germ cells. *Cell*. 96:165-174.

XI. APÉNDICE

- *Procedimiento General de Ovoscopia.*

La ovoscopia nos permite seleccionar los huevos embrionados que pueden ser utilizados en los experimentos y descartar los huevos infértiles o contaminados. Este procedimiento consiste en acomodar el huevo con la cámara de aire hacia arriba y en ese punto colocar una lámpara que ilumine el interior para observar los vasos sanguíneos del embrión. Los embriones que utilizamos presentan una red vascular claramente distribuída alrededor de todo el huevo y no presentaron derrames sanguíneos. En un huevo infértil no es posible distinguir la red vascular con claridad o bien se observa el desprendimiento de ésta, el tamaño del embrión es pequeño y generalmente éste se deposita al fondo del cascarón.

- *Técnica de Cámara Falsa.*

La técnica de cámara falsa consiste en hacer una perforación con aguja de disección en la cámara de aire original y luego se lleva a cabo una insición aproximadamente 3 mm x 3 mm, posteriormente se le agrega solución isotónica de cloruro de sodio a la membrana corioalantoidea para poderla remover sin dañar la red vascular del embrión. Con un bulbo de hule se procede a succionar el aire contenido en la cámara de aire con el propósito de crear una segunda cámara de aire, la cual nos permita administrar *in vivo* la sustancia a valorar. La cámara falsa es cubierta con cinta adhesiva. Es importante señalar que la red vascular no debe de sufrir daños para que el desarrollo del embrión no sea alterado.

- *Método de Hematoxilina - Eosina para el procesamiento de las preparaciones histológicas (Rugiero y Ramírez, 1998).*

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 con agua corriente	2 min.
10.- Alcohol ácido	1 baño rápido.
11.- Lavar con 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 en resina sintética	2 min.