



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

"EFECTO DE LAS HORMONAS GONADOTROPAS Y LA  
INSULINA EN LA FUNCION ESTEROIDOGENICA Y  
PROLIFERATIVA DE GONADAS EMBRIONARIAS DE AVES"

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

**B I O L O G O**

P R E S E N T A :

**OSCAR TONATIUH VELAZQUEZ CERVANTES**



FACULTAD DE CIENCIAS  
UNAM

DIRECTOR DE TESIS: DR. PEDRO NICOLAS VELAZQUEZ



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.

**ESTA TESIS NO SALE  
DE LA BIBLIOTECA**



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: Oscar Tonatiuh Velázquez Cervantes  
FECHA: 10/11/2004  
FIRMA: [Signature]

**ACT. MAURICIO AGUILAR GONZÁLEZ**  
**Jefe de la División de Estudios Profesionales de la**  
**Facultad de Ciencias**  
**Presente**

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo escrito:  
"Efecto de las hormonas gonadotropas y la insulina en la función esteroidogénica y proliferativa de gónadas embrionarias de aves"

realizado por Oscar Tonatiuh Velázquez Cervantes

con número de cuenta 9623748-1 , quien cubrió los créditos de la carrera de:  
Biología.

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis  
Propietario

Dr. Pedro Nicolás Velázquez

[Signature]

Propietario

Dr. Luis Felipe Jiménez García

[Signature]  
[Signature]

Propietario

Dr. René de Jesús Cárdenas Vázquez

Suplente

M. en C. Patricia de Guadalupe Tomasini Ortiz

[Signature]

Suplente

M. en C. Rosenda Margarita Ponce Salazar

Consejo Departamental de Biología

[Signature]  
FACULTAD DE CIENCIAS

[Signature]  
M. en C. Juan Manuel Rodríguez Chávez



**RECONOCIMIENTO:**

Este trabajo se realizó en el departamento de Biología Celular y Tisular de la Facultad de Medicina, U.N.A.M., bajo la dirección del Dr. Pedro Nicolás Velázquez y la asesoría de la M. en C. Irma Peralta Delgado.

Este trabajo de tesis fue financiado por PAPIIT IN221502-3

## **Agradecimientos:**

A mis padres:

Por haberme regalado el privilegio de vivir y encontrar en ustedes un constante estímulo y confianza que me ayudaron a lograr mis objetivos. También les agradezco haberme regalado la mayoría de los principios que me formaron como persona y que siempre los harán estar junto a mí.

A mis hermanos:

Claudia, Lilian y Diego por todo el tiempo y experiencias que hemos compartido.

A Sandra Denice:

Por ser mi pareja y mejor amiga, haber compartido las mejores experiencias a lo largo de la carrera y por querer aprender conmigo esto de vivir.

A la banda Paleontológica:

Adriana, Violeta, Nicté, Erandi, Carlos, Arturo, la Dra. Ana Luisa, la Dra. Marisol y el Dr. Sergio por ser parte de mi deformación científica y ser como diría el buen Arturo ¡Puro Rock!

A mi amiga Claudia:

Por su amistad, su apoyo, sus consejos y sus palabras de aliento.

A los miembros que forman este jurado:

Dr. Pedro Nicolás Velázquez, Dr. Luis Felipe Jiménez García, Dr. René de Jesús Cárdenas Vázquez, M. en C. Patricia de Guadalupe Tomasini Ortiz, M. en C. Rosenda Margarita Ponce Salazar. Por la revisión del manuscrito y las aportaciones realizadas para mejorar este trabajo y ser de los mejores profesores que he tenido el gusto de conocer.

## ÍNDICE

<b>RESUMEN</b> .....	1
<b>INTRODUCCIÓN</b>	
Diferenciación de las gónadas.....	2
Células germinales primordiales.....	4
Anatomía de las gónadas.....	5
Características de las gónadas embrionarias de ave con 18 días de desarrollo.....	8
Eje hipotálamo hipófisis gónada.....	10
Gonadotropinas (FSH y LH)/Eje hipotálamo hipófisis gónada.....	11
Factores de crecimiento y hormonas gonadotropas como reguladores como reguladores de división celular en gónadas.....	12
Factores de crecimiento y esteroidogénesis.....	15
<b>JUSTIFICACIÓN DEL TRABAJO DE TESIS</b> .....	18
<b>OBJETIVO</b> .....	19
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	
Materiales.....	20
Material biológico.....	20
Obtención de células gonadales.....	20
Incorporación de timidina y cuantificación de hormonas esteroideas.....	21
<b>RESULTADOS</b>	
Proliferación celular.....	22
Cuantificación de estradiol y testosterona.....	24
<b>DISCUSIÓN</b> .....	26
<b>CONCLUSIONES</b> .....	28
<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	29

## Resumen

El objetivo del presente trabajo fue investigar el efecto de las hormonas gonadotropas y la insulina en la esteroidogénesis y/o proliferación celular en el ovario izquierdo del embrión de pollo de 18 días de incubación. Para tal efecto se sembraron ( $5 \times 10^5$ ) células disociadas de ovario izquierdo de embriones de pollo y fueron cultivadas durante 60 horas en membranas de policarbonato de 13mm de diámetro y una apertura de poro de 1.0- $\mu\text{m}$ , flotando en 2 ml de DMEM-BSA más 0.1  $\mu\text{Ci}$  de [ $^3\text{H}$ ] timidina. Cuando fue necesario, hFSH (0.5 IU/ml), hCG (2 UI/ml), insulina (50 $\mu\text{g/ml}$ ), o las combinaciones de insulina con hFSH o hCG fueron agregadas al DMEM al inicio del cultivo sin cambios posteriores o remplazamiento del medio. La proliferación celular fue estimada por la incorporación de timidina y conteo celular y la secreción de 17 $\beta$ -estradiol y testosterona fueron evaluadas por medio de radioinmunoanálisis. Por otro lado se hizo una curva temporal para insulina, FSH y la combinación de ambas (18, 24, 36, 48 y 60 horas) para determinar diferencias en la respuesta proliferativa y esteroidogénica en el modelo empleado.

Los resultados valorados a las 60 horas de cultivo muestran que la hFSH estimula tanto la secreción de estradiol como la proliferación celular, mientras que la insulina estimula la proliferación celular pero no la secreción de estradiol. Los resultados de la curva temporal muestran que existe un desfase en el inicio de la respuesta proliferativa entre FSH e insulina ya que esta última tiene su efecto desde las 18 horas hasta las 60 horas mientras que la respuesta proliferativa inducida por la FSH se hace evidente desde las 36 horas hasta las 60 horas de cultivo con respecto a los grupos controles. Los grupos tratados con hCG no mostraron estimulación en la proliferación celular pero sí en la producción de estradiol con respecto a los grupos controles.

La ausencia de estímulo en la producción de estrógenos y andrógenos en los grupos tratados con insulina, nos puede sugerir que esta hormona sea capaz de estimular la división celular de alguna subpoblación celular ovárica no esteroidogénica, que tenga la capacidad de regular de manera endocrina o parácrina la síntesis y secreción de las subpoblaciones androgénicas y estrogénicas presentes en el ovario de aves con 18 días de desarrollo.

## INTRODUCCIÓN

### Diferenciación de las gónadas

Las gónadas dan lugar a una situación embriológica única ya que los rudimentos gonadales tienen dos opciones naturales, cuando ésta se diferencia puede transformarse tanto en un testículo como en un ovario y el camino que éste tome determinará el desarrollo sexual del organismo. La determinación sexual primaria del individuo es estrictamente cromosomal y no está influida por el ambiente. Para estos organismos la hembra está definida por los cromosomas sexuales XX y el macho por los cromosomas XY. La determinación sexual secundaria es generada por secreciones hormonales generadas por las gónadas. Si el cromosoma Y falta, el primordio gonadal se transforma en un ovario, glándula que secreta estrógenos, lo que permite el desarrollo de conductos de Müller en el útero, oviductos y porción superior de la vagina. Si el cromosoma Y está presente se desarrollará un testículo, el cual secreta dos hormonas principales. La primera hormona anti-Mülleriana, la cual causa la destrucción de los conductos de Müller. La segunda hormona es la testosterona, que masculiniza al feto, estimulando la formación de la anatomía masculina (Gilbert, 2000).

Los rudimentos gonadales son regiones pareadas del mesodermo intermedio; estas se forman adyacentes a los riñones en desarrollo. Durante el estado indiferenciado, el epitelio de la cavidad gonadal prolifera formando los cordones sexuales. Posteriormente las células germinales primordiales (CGPs), migran a la gónada y son rodeadas por los cordones sexuales. Tanto en las gónadas masculinas como en las femeninas, los cordones sexuales se mantienen unidos al epitelio superficial (Gilbert, 2000).

Si el feto es masculino los cordones siguen proliferando, extendiéndose dentro del tejido conectivo. Estos cordones se fusionan formando una red medular y en su parte distal se forma la fina *rete testis*. Eventualmente los cordones pierden contacto con el epitelio y se separan de este por la túnica albugínea. De esta manera las células germinales se encuentran en los cordones dentro del testículo. Durante la etapa en que el individuo no es maduro sexualmente los cordones se mantienen sólidos. En la madurez los cordones se perforan para dar lugar a los túbulos seminíferos. Y las células germinales comenzarán a transformarse en espermatozoides. Las células que componen los túbulos seminíferos (células de Sertoli), nutren al espermatozoide y secretan hormona anti-Mülleriana. El espermatozoide es transportado del interior del testículo por la *rete testis*, que posteriormente se une a los conductos eferentes. En los machos el

conducto de Wolff se diferencia para formar el epidídimo y el conducto deferente, tubo por el que el espermatozoide pasa hacia la uretra y fuera del cuerpo. Durante el desarrollo del feto las células del mesénquima del testículo se transforman en las células de Leydig, las encargadas de secretar testosterona (Gilbert, 2000).

Si el feto es femenino las células germinales se quedarán cerca de la superficie de la gónada. A diferencia de los machos los cordones germinales en las hembras degeneran. Posteriormente, se genera un nuevo agregado de cordones sexuales que no penetran profundamente en el mesénquima, pero permanecen cerca de la corteza de la gónada. Estos son llamados cordones sexuales corticales, estos cordones se segregan como acúmulos y cada uno de estos rodea una célula germinal. Posteriormente, la célula germinal se transformará en el óvulo y las células que lo rodean en células de la granulosa. Las células del mesénquima del ovario se diferencian para formar las células de la teca. Juntas, las células de la teca y las de la granulosa forman el folículo que envuelve al óvulo y secreta hormonas esteroideas. En las hembras el conducto de Müller permanece intacto y se diferencia en los oviductos, el útero, el cervix y la parte superior de la vagina. El conducto de Wolff en ausencia de testosterona degenera (Gilbert, 2000).

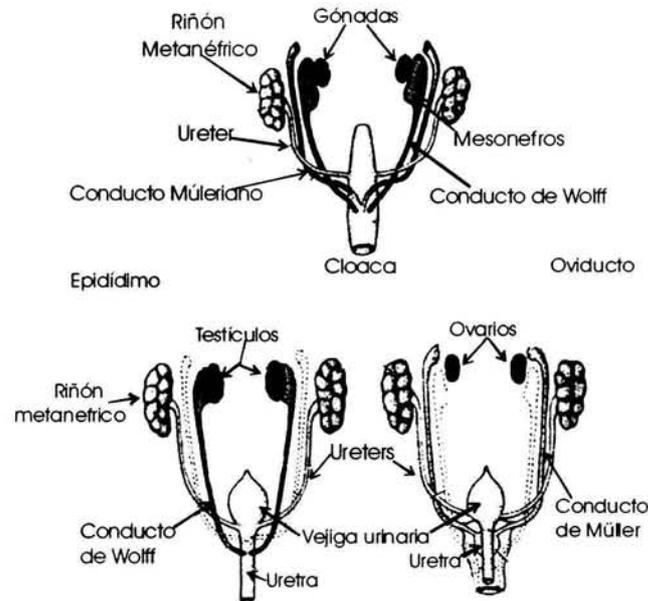


Figura 1. Modelo de la formación de gónadas diferenciadas y ductos genitales en mamíferos.

### Células germinales primordiales (CGPs)

Los organismos con reproducción sexual surgen mediante la fusión de gametos. Todos los gametos provienen de las células germinales primordiales (CGPs), en las aves estas células se derivan de las células del epiblasto que migran de la porción central del área pelúcida a la cresta germinal (una zona del hipoblasto en el borde anterior del área pelúcida donde las CGPs proliferan). A diferencia de los anfibios y mamíferos las CGPs en aves y reptiles viajan a la gónada de manera primaria por medio del flujo sanguíneo. Cuando los vasos sanguíneos se forman en la cresta germinal las CGPs entran a estos y son acarreadas por el flujo sanguíneo a la región donde se está formando la parte superior del tubo digestivo. Aquí salen del flujo sanguíneo y se asocian al mesenterio y migran hacia los conductos genitales.

Las CGPs parecen entrar al flujo sanguíneo por diapédesis, un tipo de movimiento común a linfocitos y macrófagos que le da a las células la capacidad de difusión entre células endoteliales de los capilares sanguíneos. El fenómeno de quimiotaxis se ha hecho evidente en estudios donde se han aislado CGPs del flujo sanguíneo y posteriormente han sido cultivadas entre rudimentos gonadales y otros tejidos embrionarios. El resultado de estos experimentos ha permitido observar la migración de las CGPs hacia los rudimentos gonadales tres horas posteriores a la incubación (Gilbert, 2000).

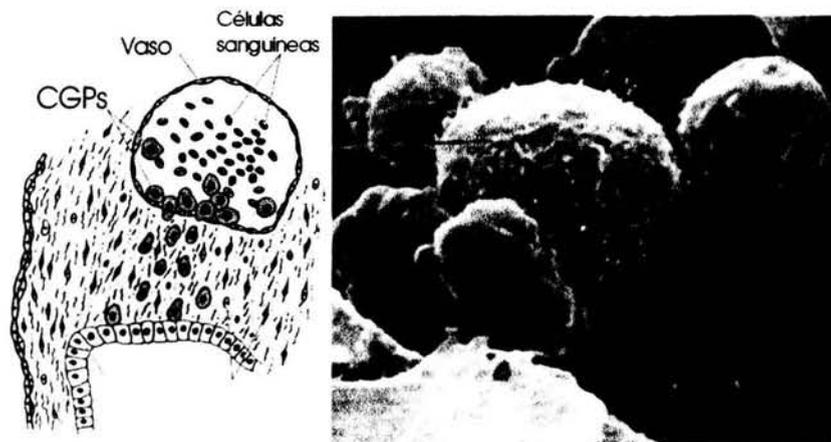


Figura 2. Izquierda. Esquema de la migración de las CGPs en embrión de pollo. Derecha. Imagen de microscopía electrónica de barrido de CGPs de un embrión de pollo en gastrulación.

## **Anatomía de las gónadas**

### Ovario

El ovario es una glándula que tiene dos funciones: la producción de oocitos y su liberación, así como la producción y secreción de hormonas. El ovario está fijado al útero por el mesovario y su fijación a este ocurre a lo largo de uno de los bordes donde está ubicado el hilo ovárico. El ovario se encuentra cubierto por un mesotelio peritoneal que sobre el órgano tiene una apariencia de epitelio cúbico. En los cortes transversales se observa que el ovario está compuesto por una corteza y una médula central. La médula está compuesta por tejido conectivo rico en células donde están incluidos los folículos ováricos (Fawcett, 1995).

Los folículos ováricos están compuestos por un oocito y una capa de tejido epitelial circundante. La mayor parte son folículos primordiales incluidos en la corteza del ovario inmediatamente por debajo de la túnica albugínea. Al madurar el folículo primordial se transforma en un folículo primario. Compuesto por un oocito más grande y la capa aplanada de células epiteliales crece a lo alto pasando a ser cúbica y posteriormente cilíndrica. Pronto proliferan formando un epitelio estratificado que se denomina capa de células de la granulosa, caracterizadas por la secreción de progestágenos, principalmente la progesterona. Esta capa de células está delimitada del tejido circundante por una nítida membrana basal. Durante el desarrollo del oocito se forma una membrana fuertemente refringente eosinófila, la zona pelúcida que separa al oocito de las células de la granulosa. Durante el crecimiento del oocito este se va hundiendo cada vez más en la corteza. Además las células del estroma circundante se ordenan en una capa concéntrica denominada teca folicular (Fawcett, 1995).

Al seguir creciendo el folículo se transforma en un folículo secundario en el que la zona de la granulosa comienza a presentar pequeñas irregularidades. Estas zonas aumentan en tamaño y se unen formando un espacio lleno de líquido llamado antro folicular. La teca folicular se diferencia entonces en una teca interna y una teca externa. Las células del estroma de la teca interna se diferencian a células epitelioideas poliédricas. La capa es muy vascularizada por crecimiento de vasos desde la teca externa. Las células epiteliales contienen numerosas gotas de lípidos en el citoplasma y al microscopio electrónico de transmisión se observa un retículo endoplasmático liso muy desarrollado. Lo que coincide con la determinación de que estas células secretan estrógenos principalmente testosterona. La teca externa continúa siendo de naturaleza conectiva y presenta actividad endocrina principalmente en la secreción de estradiol

(Fawcett, 1995). Cuando el ovario ha alcanzado su madurez total el óvulo forma una elevación sobre la superficie del ovario, al mismo tiempo se liberan las células de la parte basal del oóforo y poco antes de la ovulación el óvulo se desplaza libremente por el líquido folicular rodeado por la zona pelúcida y un grupo de células de granulosa (Fawcett, 1995).

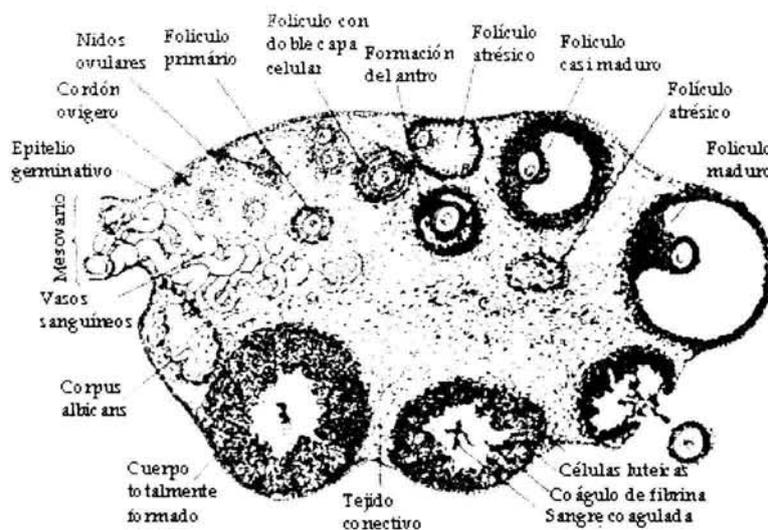


Figura 3. Esquema de ovario maduro de mamífero.

Posterior a la liberación del óvulo, el folículo se transforma en un cuerpo luteo. Las células de la granulosa y la teca crecen poco después de la ovulación y se transforman en células que contienen luteína en su citoplasma. A estas se les llama células luteínicas de la teca y la granulosa. Las de la teca son más pequeñas y oscuras y tienen un núcleo más denso que las células luteínicas de la granulosa, además se encuentran en mucho menor número. Al microscopio electrónico estas células presentan prolongaciones tubulares de la mitocondria y un retículo endoplasmático liso muy desarrollado, morfología que coincide con el hecho de que estas producen estrógenos y progesterona. La progesterona es el principal producto de estas pero la secreción de estrógenos es cuantitativamente importante.

Las células intersticiales se presentan en el estroma intersticial del ovario, estas células se caracterizan por su actividad en producción de estrógenos (Fawcett, 1995).

## Testículo

El testículo al igual que el ovario es una glándula que, tiene doble función, la producción de testosterona y espermatozoides. El testículo esta cubierto por una capa de tejido conectivo, la túnica albugínea desde la que se extiende un engrosamiento hacia el interior del órgano, el mediastino testicular. Desde el mediastino divergen tabiques testiculares hacia la túnica albugínea. Los tabiques dividen al tejido testicular en lobulillos testiculares, cada lobulillo contiene tubos seminíferos, los que representan la porción productora de espermatozoides de la glándula. Cada tubo continúa en la parte cercana al mediastino a un túbulo recto que es comienzo del sistema de conductos de transporte de los espermatozoides. Los túbulos rectos pasan a la *rete testis* que es un sistema de túbulos en el mediastino. La túnica albugínea está recubierta en su parte externa por una capa de mesotelio que representa la capa visceral de la túnica vaginal propia del testículo. La albugínea esta en contacto en profundidad con una capa de tejido conectivo vascular laxo, la túnica vasculosa del testículo. Está se conecta con el tejido conectivo, el intersticio que rodea los túbulos seminíferos y ocupa los lobulillos. Contiene células de Leydig que tienen función endocrina como productoras de testosterona (Fawcett, 1995).

Los túbulos seminíferos están rodeados por una gruesa membrana basal, rodeada a su vez de 3-4 capas de células planas o mioides. Por dentro de la membrana basal los túbulos seminíferos están revestidos por un epitelio estratificado, denominado epitelio seminífero. Este contiene dos tipos principales de células las denominadas células de sostén o células de Sertoli y las células espermatogénicas, que comprenden desde espermatogonias hasta espermatozoides generados por el proceso de espermatogénesis. Las células de Sertoli son más escasas que las células espermatogénicas y están distribuidas entre ellas a espacios regulares. Su citoplasma es irregular ya que produce prolongaciones laterales finas entre las células espermatogénicas, que al unirse con las prolongaciones de otra célula de Sertoli forman la barrera hematotesticular. Además al observarse al microscopio electrónico presentan abundantes gotas de lípidos y un retículo endoplasmático liso bien desarrollado, lo que coincide con la participación de estas en la producción de hormonas esteroideas. En el tejido conjuntivo intersticial entre los túbulos seminíferos se encuentran las células intersticiales o células de Leydig, que tienen la función de síntesis y secreción de la testosterona. Las células de Leydig se presentan en grupos de distinto tamaño, relacionados con capilares. Su citoplasma es fuertemente acidófilo y de grano fino, a menudo de localización excéntrica. A menudo

presenta vacuolas periféricas claras como consecuencia de los lípidos extraídos por la técnica. Al microscopio electrónico se observa un retículo endoplasmático liso bien desarrollado y múltiples mitocondrias con prolongaciones tubulares en la membrana interna (Fawcett, 1995).

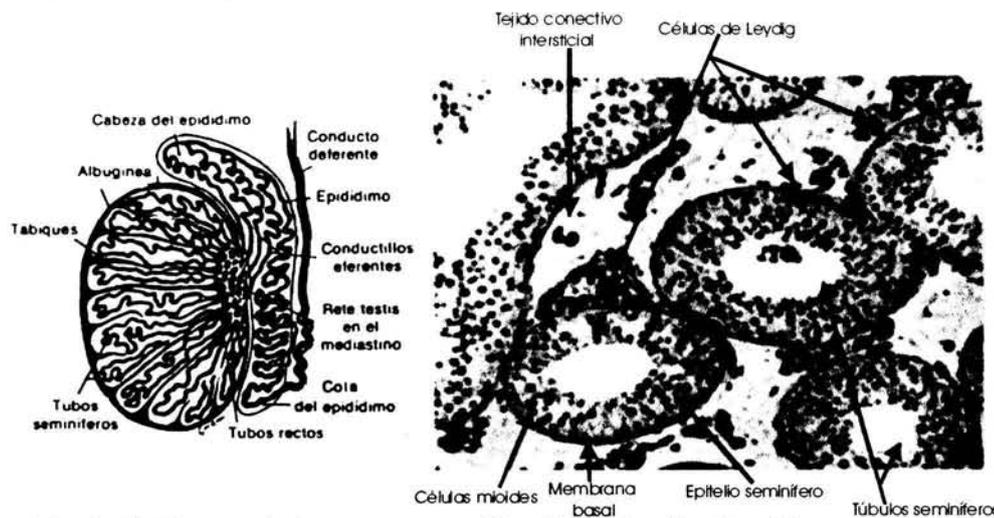


Figura 4. Izquierda. Esquema de los componentes del testículo. Derecha. Corte Transversal de testículo mostrando túbulos seminíferos.

### **Características de gónadas embrionarias de aves con 18 días de desarrollo**

#### **Ovario izquierdo**

El ovario izquierdo de las aves con 18 días de desarrollo está constituido por dos zonas, la corteza y la médula. Los componentes de la corteza ovárica son una fina cápsula de células cúbicas o planas asociadas a tejido conjuntivo, poco vascularizadas y en íntimo contacto con una amplia zona tapizada por ovocitos, entre los cuales se pueden observar vasos capilares con eritrocitos nucleados en la luz de los mismos, en esta etapa no se encuentran folículos primordiales asociados a células pregranulosas, entre la corteza y la médula ovárica se pueden observar fibras y células propias del tejido conjuntivo ricamente vascularizadas que hacen totalmente evidente los límites entre la corteza y la médula ovárica. La médula ovárica está constituida por acúmulos celulares con características propias de células esteroideogénicas como son la presencia de inclusiones lipídicas en el citoplasma, un retículo endoplásmico liso bien desarrollado y mitocondrias con crestas tubulares, también se observan acúmulos celulares con características poco diferenciadas morfológicamente, con un núcleo de cromatina poco condensada y que se caracterizan por no tener inclusiones lipídicas en su citoplasma. Entre los acúmulos celulares antes descritos encontramos una fina red de capilares con eritrocitos nucleados propios de las aves y además se localiza una gran

cantidad de conductos lacunares que se diferencian de los capilares sanguíneos por poseer una luz más amplia limitada por células de aspecto cúbico o cilíndrico bajo. La función de estos conductos no ha sido descrita hasta el momento, aunque en las imágenes morfológicas que se presentan en este trabajo de tesis se pueden localizar células de aproximadamente 20 o 25 $\mu$  de tamaño atravesando hacia la luz de dichos conductos.

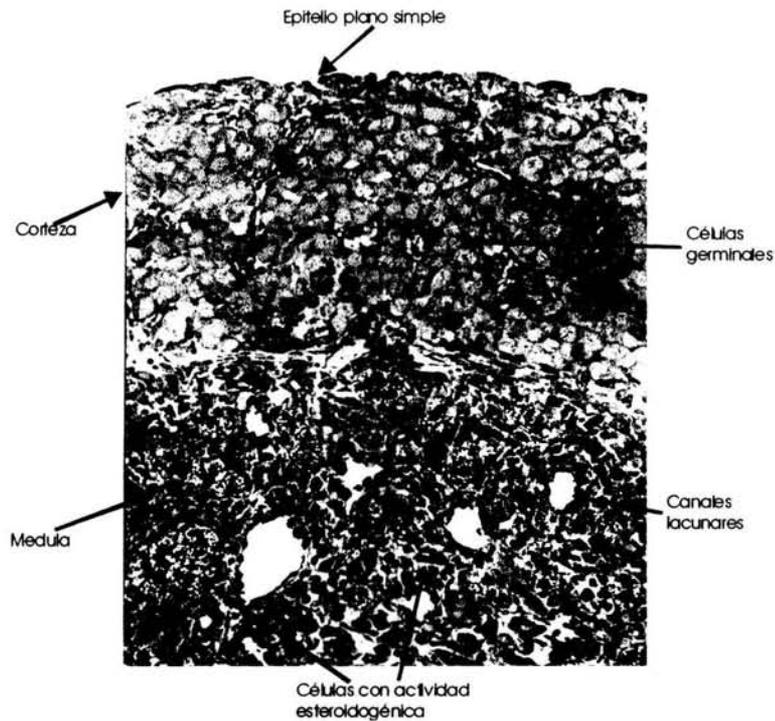


Figura 5. Corte transversal de ovario de pollo de 18 días de desarrollo.

### Testículo

El testículo de las aves con 18 días de desarrollo a diferencia del ovario de la misma edad no presenta límites entre corteza y médula, este órgano está rodeado y protegido por una cápsula de tejido conjuntivo ricamente vascularizada y cubierta por células propias de un epitelio plano simple. Por debajo de la cápsula antes descrita encontramos cordones testiculares que no difieren morfológicamente de los que observamos en un testículo inmaduro de mamíferos, constituidos por dos tipos celulares, en uno de ellos se pueden distinguir células con un núcleo de cromatina poco condensada y ocasionalmente asociada a la presencia de uno o dos nucleolos y con un citoplasma que posee una basofilia perfectamente definida y que es un indicador de una gran actividad proteica citoplasmática posiblemente ocupado por retículo endoplasmático rugoso abundante o polirribosomas (posiblemente células germinales), asociadas a este tipo celular se pueden observar células con un citoplasma más oscuro y un núcleo de

cromatina condensada (células de Sertoli), en la periferia de los cordones seminíferos antes descritos se localizan células pericardiales que muy probablemente participen secretando algunos factores endocrinos necesarios para el proceso de diferenciación de estos cordones seminíferos, entre los cordones seminíferos antes mencionados se localizan acúmulos celulares con características propias de células secretoras de hormonas esteroides como son la presencia muy evidente de inclusiones lipídicas citoplasmáticas (células precursoras de las células de Leydig), además es evidente la presencia de numerosos capilares en cuya luz se pueden observar eritrocitos nucleados propios de esta especie de vertebrados.

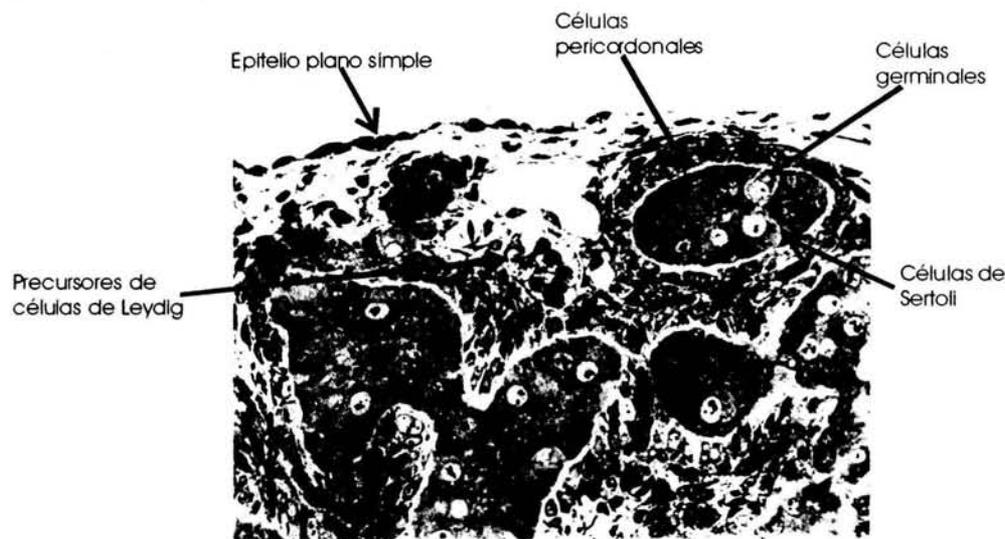


Figura 6. Corte transversal de testículo de embrión de pollo de 18 días de desarrollo.

### **Eje hipotálamo-hipófisis-gónada**

El hipotálamo integra la información sensorial de otros centros cerebrales y controla las funciones de las vísceras en parte mediante sus relaciones neuro-secretoras con la hipófisis. La organización anatómica del eje hipotalámico hipofisiario refleja esta cercana relación. La región central de la base del hipotálamo forma una saliente, llamada eminencia media, de donde proviene el tallo hipofisiario. Está rodeado desde abajo por una extensión anterior de la adenohipófisis, denominada *pars tuberalis*. Esta estructura es penetrada en toda su extensión por numerosas asas capilares del plexo portal primario de la circulación hipofisiaria portal. En la mayor parte de los vertebrados la hipófisis está dividida en tres lóbulos: anterior, también llamado adenohipófisis, *pars distalis*; neural, también llamado posterior o proceso infundibular, e intermedio o *pars intermedia* (Hiriart, 1998).

Con excepción de las hormonas pancreáticas, gastrointestinales y reguladoras del calcio, el eje hipotálamo-hipófisis ejerce control sobre todas las glándulas endocrinas del organismo. El hipotálamo es el centro responsable de la coordinación del sistema endocrino. Recibe información de la corteza cerebral y del sistema nervioso autónomo e interpreta estímulos ambientales y la contrarregulación periférica. En respuesta a estos estímulos el eje hipotálamo-hipófisis regula las actividades de la tiroides, suprarrenales y gónadas, así como la función de crecimiento, producción de leche, y equilibrio hídrico. El hipotálamo interviene además en funciones de naturaleza no endocrina, (regulación de la temperatura) en la actividad del sistema nervioso autónomo y en el control del apetito (Hiriart, 1998).

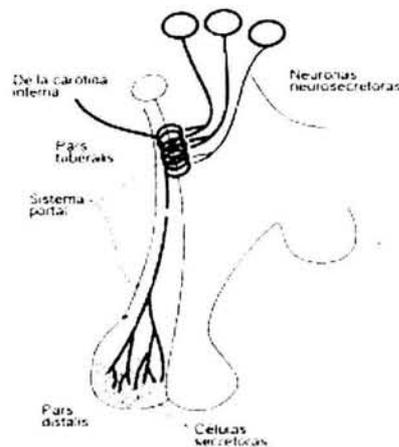


Figura 7. Relación anatómica entre el hipotálamo y la adenohipófisis.

Las hormonas hipotalámicas que actúan directamente sobre la hipófisis son generalmente péptidos pequeños de menos de diez aminoácidos y tienen una vida corta en sangre. Las principales hormonas hipotalámicas son las siguientes:

- a) Hormona liberadora de tirotropina (TRH);
- b) Hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH);
- c) Hormona liberadora de corticotropina (CRH);
- d) Hormona liberadora de hormona de crecimiento (GHRH);
- e) Hormona liberadora de la prolactina
- f) Hormona inhibidora de la prolactina (dopamina);
- g) Hormona inhibidora de la hormona de crecimiento (somatostatina).

#### **Gonadotropinas (FSH y LH)/Eje hipotálamo-hipófisis-Gónada**

Las gonadotropinas, foliculoestimulante (FSH) y luteinizante (LH) son hormonas glucoprotéicas producidas por un grupo de células de la adenohipófisis comunes para ambas y están encargadas de conectar el hipotálamo con las gónadas y regular los ciclos

sexuales. Su biosíntesis se realiza en las células gonadotropas que además, producen activina e inhibina (Hiriart, 1998).

En lo que se refiere a efectos fisiológicos, la FSH estimula la gametogénesis actuando en el hombre sobre las células de Sertoli y en la mujer sobre el desarrollo folicular; también favorece la aparición de receptores de LH en las células de Leydig testiculares. La LH regula la producción de esteroides gonadales, tanto sobre las células de Leydig, como sobre las foliculares ováricas; también su elevación preovulatoria origina la ruptura y luteinización del folículo. Su mecanismo de acción se efectúa a través de receptores de membrana, con el AMP<sub>c</sub> como segundo mensajero. Bioquímicamente, la LH produce en primer lugar aumento de pregnenolona y secundariamente de testosterona y estradiol, vía progesterona (Hiriart, 1998). Su regulación se efectúa dentro del eje sistema nervioso central (SNC)-hipotálamo-hipófisis-gónada. Una sola hormona hipotalámica estimuladora de gonadotropinas (GnRH) controla la producción de FSH y LH. El estradiol, la testosterona, la inhibina ovárica y testicular, y el óxido nítrico participan en la regulación parácrina de FSH y LH.

#### **Factores de crecimiento y hormonas gonadotropas como reguladores de división celular en gónadas.**

Los factores de crecimiento, juegan un papel central en los procesos celulares de proliferación y diferenciación y en consecuencia influyen sobre el tamaño y la capacidad funcional de tejidos y órganos. Los factores de crecimiento pueden ser clasificados por la acción de estos sobre la proliferación celular en: aquellos que la favorecen (EGF, PDEG, FGF, Insulina, ILGF, IL-2) y aquellos que son capaces de frenar la proliferación (TGF- $\beta$ , TNF- $\alpha$ , INF- $\gamma$ , IL-1). Es interesante notar que las células son susceptibles a la acción de los factores de crecimiento solo durante la fase G1 del ciclo celular. De manera similar el efecto de factores antiproliferativos está restringida a la etapa tardía de la fase G1. En el caso de los factores promitogénicos, se han identificado dos fases en la estimulación, en la que intervienen factores de competencia y factores de progresión. Los primeros llevan a la célula a un estado de competencia, que les confiere la capacidad de reiniciar su entrada al ciclo celular, pasando de G0 a G1, sin ser suficientes para inducir progresión a lo largo del ciclo. Los factores de progresión por su parte no son capaces de activar a las células que se encuentran en la fase G0, pero favorecen la progresión de G1 a S. La insulina y los factores de crecimiento tipo insulínico (IGF-I e IGF-II) son los principales promotores de la

proliferación celular (Zentella, 1993). El sistema de IGF esta compuesto por diferentes elementos:

-Dos ligandos: IGF-I e IGF-II.

-Dos receptores: el receptor tipo I mediador de la respuesta proliferativa de los dos ligandos. El receptor tipo II o receptor IGF-II/ manosa-6-fosfato (IGF-II/M6Po) se une a IGF-II y moléculas que presenten residuos M6P como enzimas lisosomales y el factor de crecimiento transformante  $\beta$  (TGF- $\beta$ ). Este receptor no se une a la insulina y tiene una pobre afinidad al IGF-I. Una actividad importante de este receptor es la mediación de la desactivación de enzimas lisosomales.

-Seis proteínas de unión a IGF (IGFBPs), las cuales se unen a IGF-I e IGF-II con una gran afinidad, estas pueden ser clasificadas arbitrariamente en dos grupos: las que tienen un rango de peso molecular menor a los 40 kDa (IGFBP-1, 2, 4, 5 y 6) y mayores a este (IGFBP-3) (Monget y cols.,2002).

En modelos experimentales de distintos mamíferos se ha demostrado la estimulación por IGFs en la función del ovario maduro sobre las células de la granulosa tanto en la proliferación celular como en la esteroidogénesis (Adashi, 1985; Campbell y cols.,1996, 1998; Gutierrez y cols.,1997; Monget y cols., 2002; Marsters y cols., 2003). También se ha demostrado que durante la foliculogénesis en mamíferos, las concentraciones de IGF-I y II no varían durante el crecimiento terminal del folículo y la atresia. En contraste los niveles de proteínas de unión a IGFs (IGFBPs), disminuyen e incrementan dramáticamente durante el crecimiento terminal del folículo y la atresia respectivamente. En particular la expresión del RNAm para IGFBP-2 decrece durante el crecimiento del folículo en ovarios de ovino, porcino y bovino, y la expresión del RNAm para IGFBP-5 incrementa dramáticamente en células de la granulosa de folículos en estado de atresia de bovinos y ovinos (Monget y cols., 2002).

En aves se ha identificado la expresión del gen para IGF-I por medio de la técnica de RT-PCR en células de la teca y granulosa de folículos próximos a la expulsión (F1, F2 y F3) así como en células de riñón. También se ha detectado la presencia del péptido en dichos tejidos con una mayor concentración en las células de la granulosa (Roberts y cols., 1994). El efecto del IGF-I se ha reportado sobre células de la teca en aves donde este factor induce la proliferación celular al mismo tiempo que inhibe la acción basal de la aromatasa y la producción de estrógenos (Onagbesan y cols., 1994).

Las hormonas gonadotropas LH y FSH son de gran importancia en el desarrollo de las gónadas, así como en su función endocrina.

La Hormona Luteinizante (LH) es responsable de estimular la síntesis y secreción de testosterona por las células de Leydig. De la misma manera se ha demostrado que la hormona coriónica gonadotrópica (hCG), presenta un efecto luteinizante sobre las células de Leydig con un incremento en la producción de testosterona de una manera dependiente al tiempo y la dosis de ésta (Castro y Romano, 1994). También se ha demostrado que la hCG no tiene efecto positivo sobre la proliferación celular en el testículo de aves (Peralta y cols., 2004).

La Hormona foliculoestimulante (FSH), está involucrada en el desarrollo y proliferación celular de los folículos ováricos y las células de Sertoli (Orth, 1984; Sasaki y cols., 2000). La actividad de esta hormona como uno de sus múltiples efectos presenta el incremento de la actividad de la aromatasa y consecuente incremento en los niveles de estradiol (Pedernera y cols., 1999). Otro de los efectos de esta hormona es la proliferación celular de las células de Sertoli (Almirón y Chemes, 1988) y de la granulosa en mamíferos (Pedernera y cols., 1999). El efecto de la FSH, ha sido estudiado durante el desarrollo prenatal del ovario de mamíferos, y se ha postulado que ésta está involucrada en la foliculogénesis temprana en primates (Gulyas y cols., 1977; Pedernera y cols., 1999). En el embrión de pollo el incremento de estradiol y testosterona por el tratamiento con FSH se ha reportado *in vitro* a los 15 días de desarrollo (Teng y cols., 1982). Además, el efecto estimulante de la hFSH recombinante en la síntesis de ADN, proliferación celular y secreción de estradiol, fue registrada en células del ovario de embriones de pollo de 18 días de incubación (Velázquez y cols., 1997).

La localización inmunohistoquímica de FSH en la bolsa de Rathke en embriones de pollo de 4 días de desarrollo (Woods y cols., 1985) y la unión de FSH a células ováricas del embrión de pollo (Woods y cols., 1991) sugieren la estimulación de la hormona hFSH en la función del ovario durante el desarrollo del embrión de pollo. Este supuesto se confirma en Pedernera (1999), donde fue demostrado el efecto estimulador de la hFSH sobre gónadas masculinas y femeninas de embriones de pollo de 8 días de desarrollo. Además, se demostró un efecto *in vitro* de la hormona hFSH sobre la proliferación celular en estadios tempranos del embrión de pollo (8, 10 y 13 días), en el testículo y ovario derecho estando ausente en el ovario izquierdo. También se detectó un incremento en la secreción de estradiol y testosterona en el ovario derecho e izquierdo (8, 10 y 13 días), así mismo se detectó en el testículo un aumento en la secreción de

testosterona (8 días), seguido de un periodo de ausencia de respuesta a la hFSH en la secreción de testosterona del testículo de 10 y 13 días de desarrollo. En los embriones más viejos (15-18 días de desarrollo), se observa la estimulación por la hFSH en la proliferación celular y secreción de hormona esteroide en ovario izquierdo y testículo, estando ausente la respuesta en el ovario derecho (Pedernera y cols., 1999).

### Factores de crecimiento y esteroidogénesis

Los factores de crecimiento juegan un papel fundamental en la modulación y secreción de hormonas esteroides influenciando directamente la acción de enzimas que participan en la cascada de reacciones de ésta. En la figura 8 se muestra la cascada de reacciones en la esteroidogénesis.

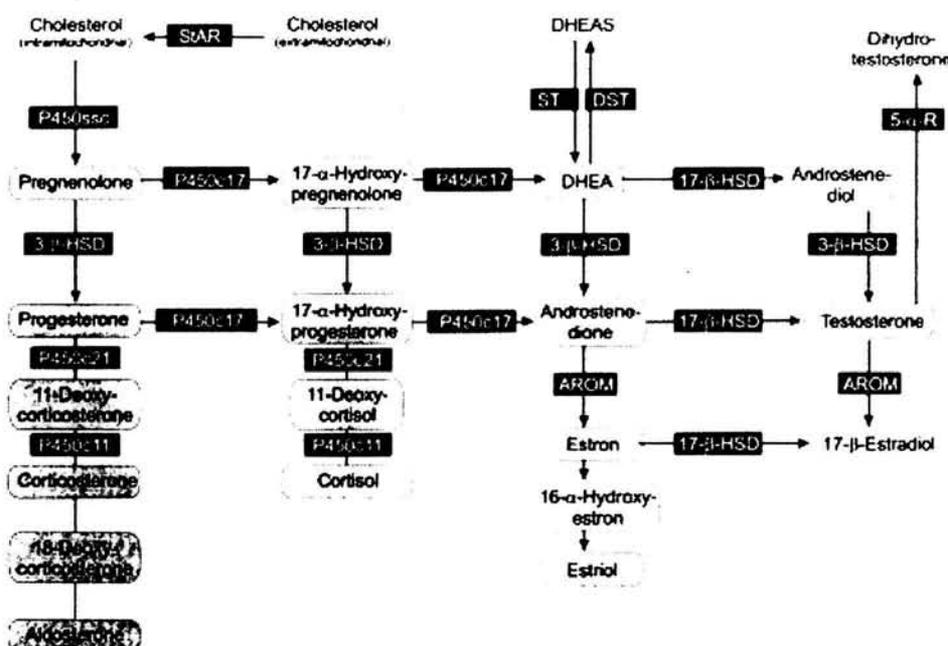


Figura 8. Diagrama que resume los principales eventos enzimáticos en el proceso de la esteroidogénesis. Abreviatura: 3-β-HSD, 3-β-hidroxiesteroide deshidrogenasa; 5-α-R, 5-α-reductasa; 17-β-HSD, 17-β-hidroxilasa; AROM, aromatasa; DHEA, dehidroepiandrosterona; DHEAS, dehidroepiandrosterona sulfato; DST, dehidroepiandrosterona sulfotransferasa; P450c11, 11-β-hidroxilasa; P450c17, 17-α-hidroxilasa/17,20-liasa; P450c21, 21-α-hidroxilasa; P450scc, citocromo P450scc; ST, sulfatasa; StAR, proteína reguladora de la esteroidogénesis.

El interferón (INF) reduce la expresión de StAR en cultivos de células de Leydig en ratas y el factor de crecimiento transformante β1 (TGF-β1) inhibe la síntesis de StAR en las células adrenocorticales de bovinos. El factor de necrosis tumoral (TNF) inhibe la expresión de StAR en células de Leydig de cerdo en una manera dependiente a la dosis y el tiempo, hecho que fue confirmado posteriormente en ratones (Herrmann y cols., 2002).

La P450ssc cataliza el segundo paso en la síntesis de hormonas esteroides, transformando el colesterol en pregnenolona, el cual es el precursor para la síntesis de hormonas esteroides. El TNF inhibe la actividad de la enzima P450ssc en células de Leydig y adrenocorticales de ratas, ratones y cerdos. El factor de crecimiento epidérmico (EGF) incrementa la expresión en células de la placenta y la granulosa. También existe evidencia de que el TGF $\beta$  estimula la expresión de la enzima bajo condiciones de estimulación hormonal (Herrmann y cols., 2002).

La enzima 3- $\beta$ -HSD que induce la conversión de pregnenolona en progesterona, 17 $\alpha$  hidroxipregnenolona en 17 $\alpha$  hidroxiprogesterona, dehidroepiandrosterona en androstenediona y androstenediol en testosterona. Además de proveer los precursores de las hormonas sexuales en las glándulas adrenales, testículos y ovarios. Esta enzima es afectada de manera similar a la P450ssc, el TNF y la Interleusina-1 (IL-1) inhiben la actividad de la 3- $\beta$ -HSD en células de Leydig de múridos. El EGF incrementa la síntesis y acción de la 3- $\beta$ -HSD, lo que también se demuestra para el TGF $\beta$ 1. En contraste el factor de crecimiento fibroblástico tipo a y b (aFGF y bFGF) inhiben la acción de la 3- $\beta$ -HSD.

La P450c17 que cataliza la conversión de pregnenolona y progesterona en 17- $\alpha$ -hidroxipregnenolona y 17- $\alpha$ -Hidroxiprogesterona, respectivamente, y posteriormente en dehidroepiandrosterona y androstenediona, que son los pasos iniciales para formar el cortisol y las hormonas sexuales. Esta enzima se ve afectada en la inhibición del estímulo de la expresión de esta enzima por los factores: TGF $\beta$ 1, TNF, TGF $\alpha$ , EGF y bFGF (Herrmann y cols., 2002).

La 17- $\beta$ -HSD cataliza los pasos finales de la esteroidogénesis pasando de estrona a 17- $\beta$ -estradiol y de androstenediona a testosterona. Otro efecto de esta enzima es la conversión de dehidroepiandrosterona en androstenediol. Los factores TNF y bFGF ejercen un efecto estimulador en células de mama y células tumorales de mama. De igual manera, los factores EGF y TGF $\beta$ 1 estimulan esta enzima (Herrmann y cols., 2002).

El complejo de las aromatasas realiza la conversión de testosterona en estradiol y androstenediona en estrona. El factor TNF inhibe la actividad de las aromatasas cuando estas han sido estimuladas por la acción de la hormona folículo estimulante. Para el caso de los factores TGF, TGF $\beta$  y FGF se han reportado efectos tanto de estimulación como

inhibitorios y el EGF tiene un efecto inhibitorio en las aromatasas estando las células estimuladas o no (Herrmann y cols., 2002).

La 5- $\alpha$ -reductasa es el paso final en la vía de la testosterona. Esta convierte la testosterona en dihidrotestosterona. Esta enzima fue analizada en células de Leydig y fibroblastos del escroto. Los factores TGF $\beta$ 1 y TGF $\beta$ 2 estimulan la actividad de la 5- $\alpha$ -reductasa en fibroblastos de piel humana. En contraste, aFGF y bFGF son capaces de inhibir la actividad de la enzima en ratas inmaduras (Herrmann y cols., 2002).

### **JUSTIFICACIÓN DEL TRABAJO DE TESIS**

Es bien conocido el papel que juegan las hormonas LH y FSH en el desarrollo y crecimiento folicular en la mayoría de los vertebrados, sin embargo el papel que estas hormonas tienen como inductoras de la proliferación celular desde etapas muy tempranas del desarrollo gonadal hasta antes del nacimiento (ovarios prefoliculares de aves) es poco conocida, también existe poca información sobre las modificaciones que estas hormonas producen en el ciclo celular de las subpoblaciones ováricas prefoliculares y si además ejercen una influencia en particular de alguna de ellas.

Por otra parte recientemente se han publicado trabajos que nos sugieren que la insulina y los factores relacionados a la insulina participan en la fisiología de la teca folicular y de las células granulosas de las aves en etapa adulta (ovarios maduros). Tampoco conocemos las vías de señalización intracelular que participan en las tres hormonas antes descritas y que le dan la posibilidad a la célula de que una vez establecido el complejo hormona receptor se tenga la posibilidad de responder sintetizando hormonas esteroides y/o induciendo proliferación celular en gónadas completas disociadas o en las subpoblaciones celulares que constituyen las gónadas antes mencionadas.

**OBJETIVO**

El objetivo del presente trabajo fué aportar evidencias de la participación de las hormonas gonadotropas y la Insulina en la proliferación celular y/o esteroidogénesis en gónadas embrionarias de aves de 18 días de desarrollo.

Determinar si las hormonas gonadotropas y la insulina modifican el ciclo celular y si el efecto de las mismas es dependiente de la dosis empleada (curva dosis respuesta).

Determinar si las hormonas gonadotropas y la Insulina tienen acción en distintas subpoblaciones celulares del ovario de aves de 18 días de desarrollo.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **Materiales**

El medio de cultivo mínimo esencial modificado por Dulbecco (DMEM), y el inhibidor de tripsina de soya fueron obtenidos de GIBCO BRL (Gaithersburg, MD). La albúmina de suero bovino (BSA), gonadotropina corionica humana (hCG), metrizamida, y dodecil sulfato de sodio (SDS) fueron adquiridos de Sigma Chemical Co. (St. Luis, MO). La hormona folículo estimulante humana de alta pureza fué obtenida de Serono (México, DF); 1 mIU es equivalente a 14 ng de hFSH con 0.2 pg de hLH, ambas hormonas fueron inmunodetectadas previamente (Ulloa-Aguirre y cols., 1995). La insulina humana recombinante (Humulin L) fue obtenida de Eli Lilly (Mexico, DF). Las cajas de petri y materiales plásticos estériles para cultivo de tejidos, filtros de policarbonato de 13mm de diámetro y una apertura de poro de 1.0- $\mu$ m (Nucleopore), fueron obtenidos de Costar (Cambridge, MA). La [metil- $^3$ H]-timidina (2.0 Ci/mmol), 17 $\beta$ -[2,4,6,7,- $^3$ H] estradiol (115 Ci/mmol), [ $^3$ H] testosterona (96.5 Ci/mmol), y líquido de centelleo (acuasol) se obtuvieron de NEN Du Pont (Boston, MA). Anti-17 $\beta$ -estradiol y Anti-testosterona se obtuvieron de ICN Biomedicals (Costa Mesa, CA).

### **Material biológico**

Se utilizaron huevos fértiles de la raza White Leghorn, línea (Babcock B-300), obtenidos de la granja ALPES, S. A. de C. V. Tehuacán, Puebla, que se incubaron a 37°C durante 18 días en una atmósfera humidificada y con rotación constante durante las 24 horas del día. Después de este tiempo se hizo ovoscopia para determinar la viabilidad de los embriones, desechándose los productos abortados o con malformaciones evidentes en el momento de la disección para la obtención de las gónadas.

### **Obtención de las células gonadales**

Los ovarios izquierdos de pollo de 18 días de desarrollo, fueron disecados bajo condiciones estériles, cuando se obtuvieron un número aproximado de 20 a 50 ovarios, se sometieron a un tratamiento mecánico y enzimático con tripsina al 0.25% disuelta en solución salina (libre de Ca $^{2+}$  y Mg $^{2+}$ ). Después de 20 minutos de tratamiento con tripsina, las células disociadas de la gónada fueron tratadas con inhibidor de tripsina al 0.5% en medio mínimo esencial modificado por Dulbecco (DMEM) adicionado con

1.0 mg/ml BSA, y finalmente fueron lavadas con dos cambios de DMEM-BSA. El número final de células fue contado con un hemocitómetro. La viabilidad de las células fue siempre superior al 90% utilizando la prueba de exclusión del azul de tripano (Tennant, 1964).

#### **Incorporación de timidina y cuantificación de hormonas esteroides.**

( $5 \times 10^5$ ) células disociadas de ovario izquierdo fueron cultivadas en membranas de policarbonato. Sembradas en acúmulos de aproximadamente 20  $\mu$ l de medio, depositados como una gota pequeña sobre la membrana de policarbonato flotando en 2 ml de DMEM-BSA más 0.1  $\mu$ Ci de [ $^3$ H] timidina. Cuando fue necesario, hFSH (0.5 IU/ml), hCG (2UI/ml), insulina (50 $\mu$ g/ml), o las combinaciones de insulina con hFSH o hCG fueron agregadas al DMEM al inicio del cultivo sin cambios posteriores o remplazamiento del medio. Las células fueron cultivadas a 37°C en un ambiente saturado de 95% aire y 5% CO<sub>2</sub> por 60 horas. La dosis de hFSH y los tiempos de cultivo fueron seleccionados basados en estudios previos de nuestro laboratorio (Velázquez y cols., 1997).

Al final del cultivo las membranas de policarbonato con los agregados celulares fueron procesados para medir los niveles de timidina incorporada. Poco tiempo después, los agregados celulares fueron fijados en ácido-acético 3:1 (v/v), lavados 2 veces con ácido tricloroacético al 10% (w/v) por 60 minutos a 4°C, finalmente se trataron con dodecil-sulfato de sodio al 2% (w/v) por 30 minutos a 60°C. Posteriormente se transfirieron a viales de centelleo, se les agregó acuasol (NEN, Du Pont), y fueron cuantificados en un contador de centelleo líquido (Beckman LS6500) con 58% de eficiencia.

Se tomaron alícuotas de 50 $\mu$ l del medio de cultivo, para cuantificar 17 $\beta$ -estradiol y testosterona por radioinmunoanálisis (RIA) específicos previamente validado (Pedernera y Gomar, 1988). La sensibilidad de la curva estándar fue de 12.5-400 pg para testosterona y 17 $\beta$ -estradiol.

## **RESULTADOS**

### **Proliferación celular**

Los resultados de la incorporación de timidina como una técnica para valorar la proliferación celular inducida por los diferentes tratamientos hormonales, descritos anteriormente en materiales y métodos en agregados celulares sembrados sobre membranas de policarbonato durante 60 horas de cultivo, se muestran en la figura 9, en esta grafica se demuestra que la respuesta en la división celular de los grupos tratados con Insulina, FSH y la combinación de FSH e Insulina, presentan un aumento significativo en la timidina incorporada con respecto a los grupos controles, mientras que el efecto de la hCG y la combinación de hCG con Insulina no induce efecto sobre la incorporación de timidina, siendo esta incluso menor a la de los grupos controles. Para el caso de la proliferación evaluada por conteo celular, los resultados muestran un efecto similar que el obtenido por la incorporación de timidina, Insulina, FSH y la combinación de insulina con FSH muestran un aumento significativo con respecto al control, los grupos tratados con hCG no presentan efecto proliferativo, mientras que la combinación de Insulina con hCG si presenta un efecto en la proliferación celular mayor que el control, pero menor a la respuesta de los grupos tratados con Insulina, FSH o la combinación de Insulina con FSH, probablemente sea un efecto debido a la acción de la insulina.

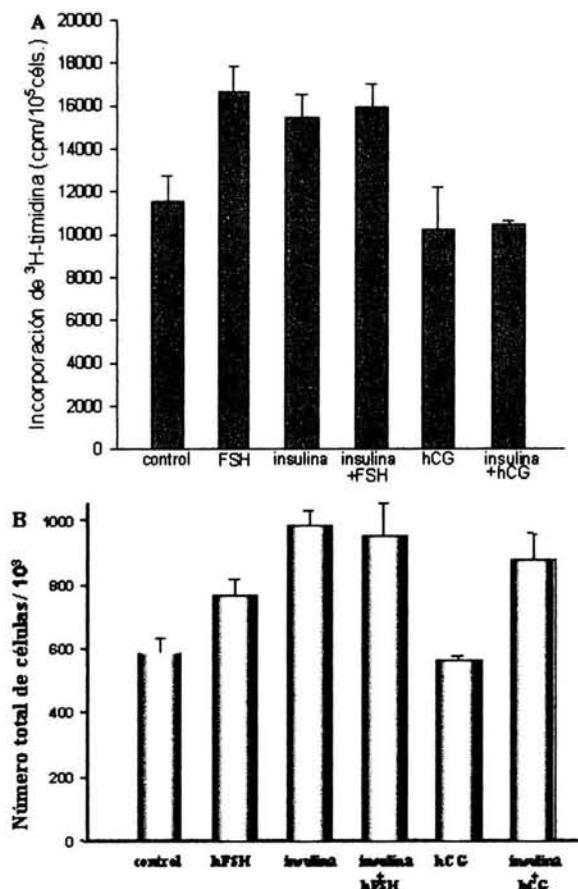


Figura 9. A. Efecto de la insulina y las gonadotropinas en la proliferación celular evaluada por incorporación de timidina después de 60 horas de cultivo. B. Efecto de la insulina y las gonadotropinas en la proliferación celular evaluada por conteo después de 60 horas de cultivo.

La curva temporal de incorporación de timidina valorada a las 18, 24, 36, 48 y 60 horas de cultivo nos demuestra que desde las 18 horas de cultivo los grupos tratados con insulina y la combinación de insulina con FSH incrementan considerablemente la timidina incorporada con respecto a los grupos controles y los tratados con hFSH, mientras que los grupos tratados con hFSH tienen su incremento en la proliferación celular hasta las 36 horas de cultivo, a partir de este momento se mantiene este incremento hasta las 60 horas de cultivo. Esto refleja un desfase en la proliferación celular y posiblemente nos sugiere que las células blanco para ambas hormonas en esta etapa de diferenciación gonadal tengan características morfofuncionales diferentes en el ovario izquierdo del modelo estudiado en este trabajo.

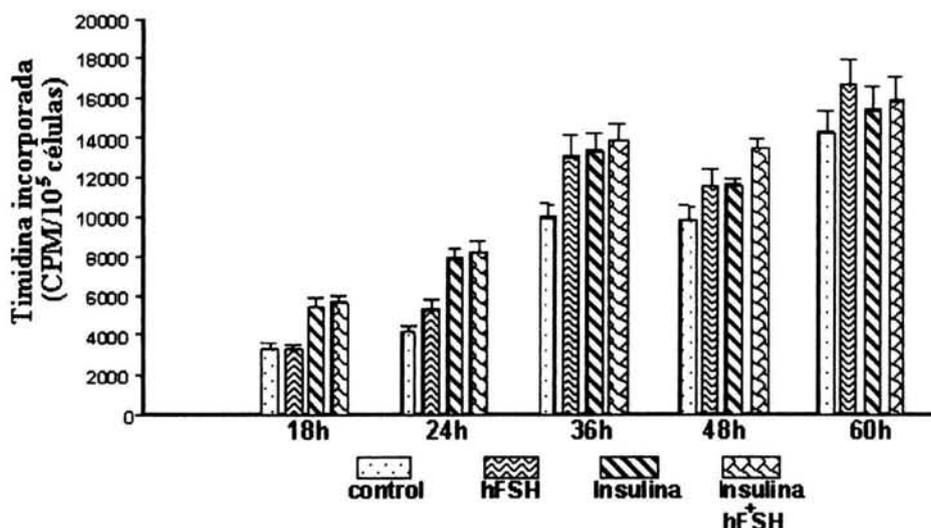


Figura 10. Curva temporal de incorporación de timidina en cultivo de células ováricas de embrión de pollo en diferentes periodos en presencia de insulina y hFSH.

### Cuantificación de Estradiol y Testosterona

En la figura 11 se muestra la producción de estradiol y testosterona en medios de cultivo de ovario izquierdo recuperados a las 60 horas de tratamiento, en presencia de distintas concentraciones de insulina (0.0001ng, 0.001ng, 0.01ng, 0.1ng y 1ng), con estas concentraciones se obtiene un decremento considerable en la secreción de estrógenos y andrógenos con respecto al los grupos control, sugiriendo que esta hormona regula la esteroidogénesis de manera negativa.

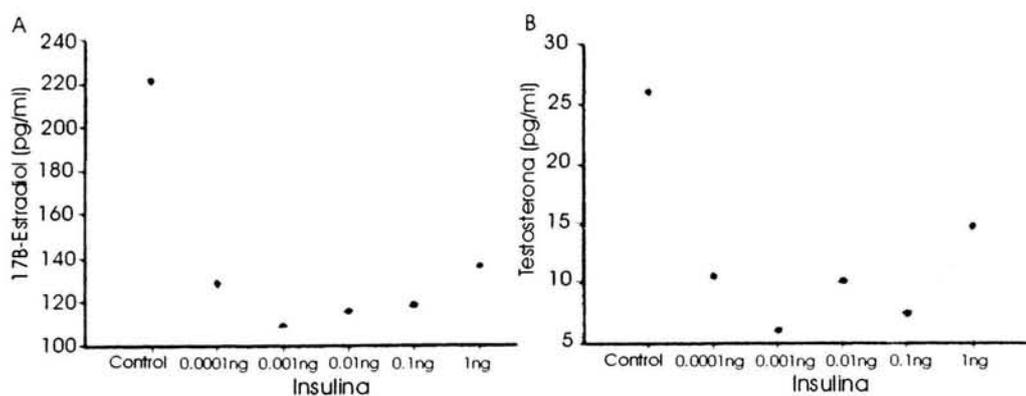


Figura 11. Producción de estradiol y testosterona en cultivo de células ováricas de pollo de 18 días de desarrollo ante distintas concentraciones de Insulina.

En la figura 12 se muestra la curva temporal para secreción de  $17\beta$ -estradiol valorada a las 12, 24, 36, 48 y 60 horas en los tratamientos antes mencionados. Los resultados muestran un incremento en la respuesta esteroidogénica para todos los tratamientos desde las 12 horas de cultivo excepto en los grupos tratados con insulina.

En el lapso de 12 a 24 horas existe un estímulo en la síntesis y secreción de estradiol de todos los grupos tratados con respecto al control, excepto los tratados con insulina. Siendo evidente que el mayor incremento lo presentan los grupos tratados con la mezcla de HCG más insulina. En el lapso de las 36 a 48 horas los grupos tratados con la hormona FSH muestran una mayor síntesis y secreción de  $17\beta$ -estradiol, que los grupos tratados con HCG, HCG más insulina y FSH más insulina. Cabe hacer notar que a las 60 horas los grupos tratados con HCG mantiene niveles de síntesis y secreción de  $17\beta$ -estradiol mayores a los presentados con la hormona FSH.

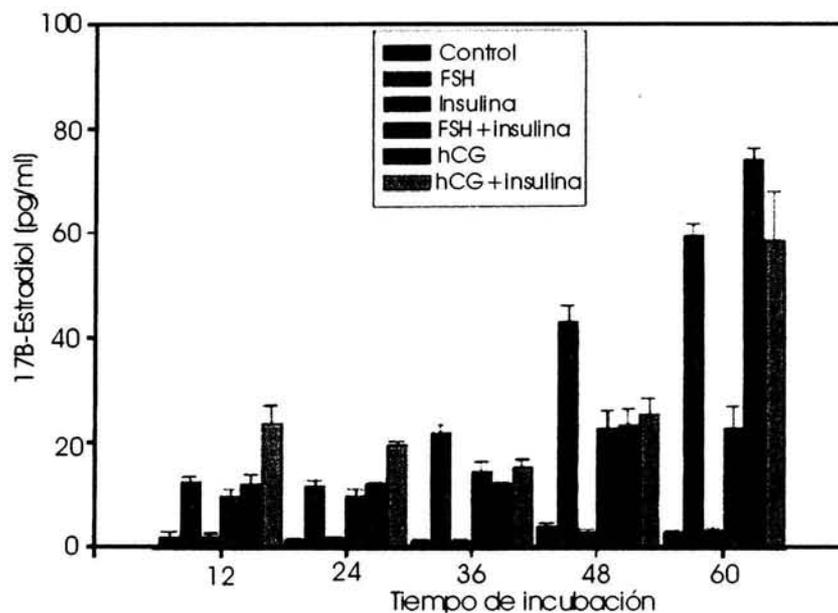


Figura 12. Curva temporal de producción de  $17\beta$ -estradiol de células ováricas de embrión de pollo cultivadas a diferentes periodos en presencia de Insulina y gonadotropinas.

## DISCUSIÓN

En el modelo empleado en el presente trabajo de tesis evaluando la proliferación celular, los resultados obtenidos muestran que existe un estímulo en la proliferación celular en los grupos experimentales tratados con Insulina, FSH, o la combinación de estas con respecto a los grupos controles. La respuesta proliferativa para los grupos tratados con Insulina, FSH o la combinación de ambas fue significativamente mayor que la de los grupos controles, mientras que la respuesta proliferativa de los grupos tratados con hCG, no superó a la de los grupos controles y solo la combinación de esta con insulina mostró una incorporación de timidina significativamente mayor que la de los grupos controles. Además, los resultados muestran que existe un desfase en la respuesta proliferativa entre las hormonas FSH e Insulina, ya que esta última induce proliferación celular desde las 18 horas de cultivo mientras que la FSH incrementa la división celular entre las 24 y 36 horas de cultivo.

Esto nos sugiere que el tratamiento con Insulina y FSH produce un acortamiento en el ciclo celular y que ambas hormonas tienen su efecto en células blanco diferentes, en el caso de la FSH se ha demostrado en nuestro laboratorio que las células blanco de esta hormona gonadotropa son las productoras de  $17\beta$ -estradiol y que esta hormona es capaz de inducir proliferación celular y esteroidogénesis (Velázquez y cols., 1997). También se podría pensar que la hCG en el presente modelo tenga un efecto en la diferenciación celular de las células androgénicas, ya que es una hormona con un efecto luteinizante y que por lo tanto induce la secreción de andrógenos. Estos resultados podrían ser comprobados detectando la presencia de ciclinas en una curva temporal o cuantificando el ciclo celular en los diferentes tratamientos hormonales antes mencionados utilizando la técnica de citometría de flujo.

En cuanto al fenómeno de esteroidogénesis se refiere, el presente trabajo demostró que desde las 12 horas existe un efecto en la síntesis y secreción de  $17\beta$ -estradiol de todos los grupos experimentales, excepto los grupos tratados con insulina. Los grupos tratados con HCG y la mezcla HCG con insulina mantienen una síntesis de  $17\beta$ -estradiol mayor a los grupos tratados con FSH y la mezcla de FSH con insulina, pero este efecto se revierte a partir de las 36 horas de cultivo incrementándose progresivamente hasta las 60 horas, esto posiblemente se deba a que en las primeras 24 horas de cultivo la HCG induzca un efecto esteroidogénico y no proliferativo mientras

que la FSH produzca un efecto proliferativo y esteroidogénico en las células blanco de esta hormona gonadotropa.

Con respecto a la ausencia en la respuesta esteroidogénica de los grupos tratados con insulina desde el inicio y hasta las 60 horas de cultivo en los agregados celulares de ovario izquierdo y el efecto proliferativo evaluado por la incorporación de timidina a las 60 horas, se puede pensar en la posibilidad de que esta hormona estimule la proliferación de células sin actividad de síntesis y secreción de  $17\beta$ -estradiol; como podrían ser los ovocitos, fibroblastos, células de recubrimiento propias de los capilares o las células de recubrimiento de los conductos lacunares presentes en la médula de los ovarios prefoliculares empleados en el presente diseño experimental. Otra posibilidad es que la insulina pudiera inducir proliferación de alguna subpoblación que regule la esteroidogénesis y/o la proliferación de las células androgénicas o estrogénicas ya sea por contacto físico en los agregados celulares o por la secreción parácrina de esta subpoblación celular, ya que en trabajos de nuestro laboratorio se ha demostrado la influencia de subpoblaciones sin actividad esteroidogénica (ovocitos) en la regulación de la esteroidogénesis en el ovario de ave prefolicular (Hernández-Gutiérrez, 1998). Otra alternativa sería que la insulina interfiera o module los factores de crecimiento de competencia o de progresión, o con los factores inhibitorios que participan en la división celular así como con los factores de crecimiento que regulan la actividad enzimática relacionada con la esteroidogénesis (Herrman y cols., 2002).

Estos resultados podrían ser demostrados en trabajos posteriores separando las distintas subpoblaciones celulares que componen al ovario, utilizando un gradiente de densidad continuo para posteriormente realizar co-cultivos de células con actividad esteroidogénica y sin actividad esteroidogénica, para demostrar la participación de las subpoblaciones no esteroidogénicas en la regulación de la proliferación celular y/o esteroidogénesis de los ovarios prefoliculares de aves.

Para probar la hipótesis de que existe una regulación parácrina entre las diferentes subpoblaciones celulares en el modelo empleado en el presente trabajo, se podrían realizar cultivos de células con actividad esteroidogénica en medio de cultivo extraído de cultivos previamente realizados con células sin actividad esteroidogénica, para demostrar la existencia de regulación parácrina de las subpoblaciones celulares no esteroidogénicas en la proliferación celular y/o esteroidogénesis de los ovarios prefoliculares de aves.

## CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en el modelo experimental empleado en el presente trabajo de tesis, nos permiten utilizarlo como un bioensayo para establecer diferencias entre la actividad luteinizante y la actividad folículo estimulante, tomando como indicador la proliferación celular inducida por ambas hormonas gonadotropas, ya que la hCG (hormona con actividad luteinizante) solo es capaz de inducir la síntesis y secreción de hormonas esteroides pero no la proliferación celular en los ovarios prefoliculares de aves utilizados.

En el presente estudio se demostró que existe una clara diferencia en la actividad esteroidogénica y proliferativa entre las hormonas gonadotropas y la Insulina.

La hormona FSH estimula tanto la proliferación celular como la secreción de  $17\beta$ -estradiol, el efecto proliferativo de la hCG no es superior a los grupos controles y estimula la secreción de estradiol, la Insulina estimula la proliferación celular pero inhibe la esteroidogénesis al parecer regulándola de manera negativa.

También se demostró que el efecto proliferativo inducido por la insulina se anticipa al de la FSH, iniciando el efecto sobre la división celular para la insulina a las 18 horas de cultivo, mientras que la respuesta proliferativa para FSH comienza en el lapso de 24 a 36 horas, lo que sugiere que estas hormonas puedan tener células blanco diferentes y además induzcan el acortamiento de ciclo celular a distintos tiempos.

Una subpoblación celular que posiblemente sea estimulada por la insulina podría estar constituida por los ovocitos, ya que en trabajos previos de nuestro laboratorio se ha demostrado que estas células carentes de actividad esteroidogénica son capaces de regular la proliferación celular y la esteroidogénesis de las subpoblaciones celulares ováricas secretoras de  $17\beta$ -estradiol (Hernández-Gutiérrez, 1998).

**BIBLIOGRAFÍA**

Adashi, E. Y., Resnick, C. E., Brodie, A. M., Svoboda, M. E., and Van Wyk, J. J. (1985). Somatomedin-C-mediated potentiation of follicle-stimulating hormone-induced aromatase activity of cultured rat granulosa cells. *Endocrine Reviews*. 6, 400-420.

Almirón, I., and Chemes, I. (1988). Spermatogenic onset. II. FSH modulates mitotic activity of germ and Sertoli cells in immature rats. *International Journal of Andrology*. 11 235-246.

Campbell, B. K., Baird D. T., and Webb, R. (1998). Effects of dose of LH on androgen production and luteinization of ovine theca cells cultured in a serum-free system. *Journal of reproduction and Fertility*. 112, 69-67.

Campbell, B. K., Scaramuzzi, R. J., and Webb, R. (1996). Induction and maintenance of oestradiol and immunoreactive inhibin production with FSH by ovine granulosa cells cultured in serum-free media. *Journal of reproduction and Fertility*. 106, 7-16.

Castro, J. L., and Romano, M. C. (1994). The effects of fetal serum and gonadotropins on testosterone production by cultured chick testicular cells. *Domestic Animal Endocrinology*. 11 (3), 261-269.

Fawcett, W. *Tratado de Histología: sistema reproductor masculino; sistema reproductor femenino*, Ed. Interamericana / McGraw-Hill, duodécima edición 1995, pp. 833-844, 885-933.

Gilbert, E. *Developmental Biology: the saga of the germ line*, Ed. Sinauer Associates, sexta edición 2000, pp. 585-617.

Gulyas, B. J., Hodgen, G. D., Tullner, W. W., and Ross, G. T. (1977). Effects of fetal or maternal Hypophysectomy on endocrine organs and body weight in infant rhesus monkeys (*Macaca mulatta*) with particular emphasis in oogenesis. *Biological Reproduction*. 16, 216-227.

Gutierrez, C. G., Campbell, B. K., Armstrong, D. G., and Webb, R. (1997). Insulin-like growth factor-I (IGF-I) production by bovine granulosa cells in vitro and peripheral IGF-I measurement in cattle serum: an evaluation of IGF-binding protein extraction protocols. *Journal of endocrinology*. 153, 231-240.

Hernández-Gutiérrez, María Elma (1998). Regulación de la división celular del ovario de aves de 18 días de incubación por subpoblaciones celulares ováricas purificadas por gradientes de densidad. Tesis para obtener el grado de bióloga. Facultad de Ciencias U.N.A.M.

Herrman, M., Schölmerich, J., y Straub, R. H. (2002) Influence of cytokines and growth factors on distinct steroidogenic enzymes in vitro a short tabular data collection. *Annals of the New York Academy of sciences*. 966, 166-186.

Hiriart, M. *Biología funcional de los animales: mensajeros químicos y regulación neuroendócrina*, Ed. Siglo XXI-UNAM, primera edición 1998, pp. 209-275.

Marsters, P., Kendall, N. R., and Campbell, B. K. (2003) Temporal relationships between FSH receptor, type I insulin-like growth factor receptor, and aromatase expression during FSH-induced differentiation of bovine granulosa cells maintained in serum-free culture. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 203, 117-127.

Monget, P., Fabre, S., Mulsant, P., Lecerf, F., Elsen, J. M., Mazerbourg, S., Pisselet, C., and Monniaux, D. (2002). Regulation of ovarian folliculogenesis by IGF and BMP system in domestic animals. *Domestic Animal Endocrinology*. 23, 139-154.

Onagbesan, O. M., Peddie, M. J., and Williams, J. (1994). Regulation of cell proliferation and estrogen synthesis by ovine LH, IGF-I, and EGF in theca interstitial cells of the domestic hen cultured in defined media. *General and Comparative Endocrinology*. 94, 261-272.

Orth, J. M. (1984). The role of follicle-stimulating hormone in controlling Sertoli cell proliferation in testes of fetal rats. *Endocrinology*. 115(4):1248-1255.

Pedernera, E., Solis, 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.

Pedernera, E., and Gomar, Y. (1984). Onset of the response to chorionic gonadotropin in the chick embryo testis. *General and Comparative Endocrinology*. 54, 344-349.

Peralta, I., Romano, M. C., and Velázquez, P. N. (2004). Proliferative and steroidogenic effects of follicle-stimulating hormone on cultured chick embryo testis cells. *Poultry Science*. 83 (7), 1193-1198.

Roberts, R. D., Sharp, P. J., Burt, D. W., and Goddard, C. (1994). Insulin-like growth factor-I in the ovary of the laying hen: gene expression and biological actions on granulosa and thecal cells. *General and Comparative Endocrinology*. 93: 327-336.

Sasaki, M., Yamamoto, M., Arishima, K., and Eguchi, Y. (2000). Effect of follicle-stimulating hormone on Sertoli cell division in cultures of fetal rat testes. *Biology of the Neonate*. 78 (1), 48-58.

Teng, C. T., Teng, C. S., Bousfield, G. R., Liu, W. K., and Ward, D. N. (1982). Differential response of growing and regressing chicken ovaries to gonadotropic hormones. *General and Comparative Endocrinology*. 48 (3), 325-332.

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

Ulloa-Agurre, A., Zambrano, E., Timossi, C., Olivares, E., Quintanar, A., Aguinaga, M., Diaz-Cueto, L., and Méndez, J. P. (1995). On the nature of the follicle stimulating signal delivered to the ovary during exogenously controlled follicular maturation. *Archives of Medical Research*. 26 (suplemento), S219-230.

Velázquez, P. N., Peralta, I., and Pedrenera, E. (1997) Proliferative effect *in vitro* of follicle stimulating hormone on the left ovary of the chick embryo. *General and Comparative Endocrinology*. 105, 40-49.

Willis, D. S., Mason, H. D., Watson, H., and Franks, S. (1998). Developmentally regulated responses of human granulosa cells to insulin-like growth factors (IGFs): IGF-I and IGF-II action mediated via the type-I IGF receptor. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 83, 1256-1259.

Woods, J. E., Damianides, Keenan, M., and Thomes, R. C. (1991). FSA and TSH-binding cells in the ovary of developing chick embryo. *Gen. Comp. Endocrinology*. 82, 487-494.

Woods, J. E., Hopkins, W. E., Caliendo, J., Sorentino, M. J., Martens, J. B., and Thomes, R. C. (1985). Ontogenesis of LHRH in the hypothalamus and FSH and LH in the pars distalis of the chick embryo. En "Current trends in Comparative Endocrinology". Lofts and Holmes, Eds. 131.134. Hong Kong Univ. Press. Hong Kong.

Zentella, D. A. (1993) Mensaje bioquímico "factores de crecimiento: un balance entre acelerar y frenar la proliferación celular", Facultad de Medicina. U.N.A.M. México. Volumen XVII: 1-30p.