

00377



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE CIENCIAS

"EFECTO DEL FACTOR DE CRECIMIENTO TRANSFORMANTE B
SOBRE LAS CÉLULAS GERMINALES Y SOMÁTICAS
EN EL OVARIO DEL EMBRIÓN DE POLLO"

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
(BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)

P R E S E N T A

BIOL. LUZ EUGENIA ALCÁNTARA QUINTANA

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

MÉXICO, D. F.



AGOSTO 2005

COORDINACIÓN

m. 346638



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

Ing. Leopoldo Silva Gutiérrez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS COORDINACIÓN

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

NOMBRE: LUZ EUGENIA ALCANTARA
QUINTANA

FECHA: 8-AGO-2005

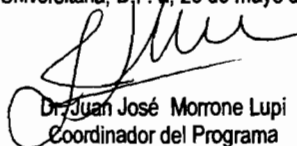
FIRMA: CRJE

Por medio de la presente me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 11 de abril del 2005, se acordó poner a su consideración el siguiente jurado para el examen de grado de Maestría en Ciencias Biológicas (Biología Experimental) del(a) alumno(a) Alcántara Quintana Luz Eugenia con número de cuenta 93259774 con la tesis titulada: "Efecto del Factor de Crecimiento Transformante β sobre las células germinales y somáticas en el ovario del embrión de pollo", bajo la dirección del(a) Dra. María del Carmen Méndez Herrera.

Presidente:	Dra. Teresa Imelda Fortoul van der Goes
Vocal:	Dra. Martha Alicia Menjivar Iraheta
Secretario:	Dra. María del Carmen Méndez Herrera
Suplente:	Dra. Olga Margarita Echeverría Martínez
Suplente:	Dr. Rogelio Hernández Pando

Sin otro particular, quedo de usted.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F. a, 23 de mayo del 2005


Dr. Juan José Morrone Lupi
Coordinador del Programa

c.c.p. Expediente del interesado

AGRADECIMIENTOS:

A CONACYT Y a DGEP por la beca otorgada durante la realización de mi tesis.

A CONACYT 45030-Q y a PAPPIIT IN 214403 por el apoyo recibido.

A mi tutora la Dra. María del Carmen Méndez Herrera por su guía y ayuda constante.

A mis sinodales, la Dra. Teresa Imelda Fourtoul van der Goes, la Dra. Martha Alicia Menjívar Iraheta, el Dr. Rogelio Hernández Pando y la Dra. Olga Margarita Echeverría Martínez por su tiempo y por la crítica constructiva hacia mi trabajo.

Al Dr. Enrique Pedernera Astegiano por compartir conmigo su proyecto de investigación y su enorme ingenio.

A la Técnica Académica Verónica Rodríguez Mata por su apoyo en el procesamiento histológico.

A mis compañeros de laboratorio por estar conmigo en todo momento.

A mis (n) amigos por que aunque estemos lejos, siempre cuento con su apoyo incondicional.

DEDICATORIAS:

A mi familia Barrón-Alcántara por ser mi inspiración

Hannya, gracias por existir

Marco, simplemente gracias

A la familia Alcántara-Quintana por ser mi guía y mi ejemplo constante

Mamá, Papá, Mónica, Fanny y Luis

A la familia Barrón-Alvarado por permitirme compartir con ustedes

A la familia Alcántara- Cruz por que siempre estarán ahí.

Eric, Mónica y Kenneth

Al Dr. Enrique Pedernera- Astegiano y a la Dra. Carmen Méndez Herrera por permitirme ser parte de su equipo de trabajo y enseñarme tantas cosas, pero sobre todo por su calidad humana. Gracias, mil gracias Doctores.

**“EFECTO DEL FACTOR DE CRECIMIENTO TRANSFORMANTE β
SOBRE LAS CÉLULAS GERMINALES Y SOMÁTICAS
EN EL OVARIO DEL EMBRIÓN DE POLLO”**

Índice

I.	Resumen	1
II.	Introducción	2
	II.1. Desarrollo gonadal en aves	2
	II.2. Diferenciación gonadal	4
	II.3. El Factor de Crecimiento Transformante Beta (TGF- β)	7
III.	Antecedentes	12
	III.1. Efectos del TGF- β en el ovario	12
IV.	Hipótesis	14
V.	Objetivos	15
VI.	Material y Métodos	16
	VI.1. Cultivo de órganos	16
	VI.2. Curva de Dosis y Tiempo de cultivo	16
	VI.3. Histología	17
	VI.4. Proliferación celular	17
	VI.5. Apoptosis	18
	VI.6. Estadística	18
VII.	Resultados	19
	VII.1. Curva de Dosis y Tiempo de cultivo	19
	VII.2. Betaglicano soluble	21
	VII.3. Proliferación celular	24
	VII.4. Apoptosis	27
	VII.5. Histología	29
VIII.	Discusión	31
IX.	Conclusiones	34
X.	Perspectivas	35
XI.	Literatura Citada	36

I. RESUMEN

El desarrollo de las gónadas en el embrión de pollo está regulado por hormonas y por la acción local de factores de crecimiento. Recientemente se ha identificado al gen del Factor de Crecimiento Transformante $\beta 2$ (TGF- $\beta 2$) como uno de los genes que se expresan en forma importante durante etapas tempranas en el desarrollo del ovario en embriones de pollo. El objetivo de este estudio fue investigar el efecto del TGF- $\beta 1$ y TGF- $\beta 2$ sobre las células germinales y somáticas en el ovario del embrión de pollo a los 9 días de incubación (d.i.). Para lo cual se obtuvieron ovarios de embriones de pollo de 9 d.i. y se cultivaron con TGF- $\beta 1$ y TGF- $\beta 2$ durante 24, 48, 72, 96 y 120 horas a las concentraciones de 2.5, 5, 10, 20 y 40 ng/ml. También se cultivaron con TGF- $\beta 1$ (10ng/ml) más betaglicano (8 μ g/ml) y con TGF- $\beta 2$ (10ng/ml) más betaglicano (8 μ g/ml). La capacidad del TGF- $\beta 1$ y del TGF- $\beta 2$ de disminuir el número de células somáticas en el ovario fue bloqueada con el betaglicano (antagonista de TGF- β 's). Las observaciones indican que TGF- $\beta 1$ y TGF- $\beta 2$ regulan la proliferación en el ovario del embrión de pollo a los 9 d.i., inhibiendo la proliferación de las células somáticas. También se observó que el TGF- $\beta 1$ y TGF- $\beta 2$ no afectan la proliferación de las células germinales primordiales (cgp) en presencia de las células somáticas en el ovario del embrión de pollo de 9 d.i. y finalmente se sugiere que los TGF- β 's promueven la migración de las cgp de la corteza a la médula ovárica, mediante la acumulación de fibras de matriz extracelular en ovarios de embriones de pollo de 9 d.i. Elucidando que el TGF- β media las interacciones de las cgp y de las células somáticas, y además controla la proliferación de las células somáticas durante la formación de la gónada en estadios muy tempranos de desarrollo en el embrión de pollo.

This study aimed to evaluate TGF- β induced changes in the proliferation index of somatic and germ cells in the chick embryo ovary. The left ovary of 9 day old chick embryo was organ cultured on polycarbonate membranes in a defined medium. TGF- $\beta 1$ and TGF- $\beta 2$ (10 ng/ml) were added to the culture medium. A dose response curve and time elapsed study of TGF- β effect were evaluated by measuring the total number of somatic and germ cells in the cultured gonad. The number of somatic cells in the ovary increased during the culture, this increment was not observed in the TGF- β treated ovary remaining almost constant during the culture. The low number of somatic cells was significant at 10 ng/ml of TGF- $\beta 1$ dose. The reduction in the treated ovary was detected after 48 h of culture, being 50% of the control at 72h of culture. The total number of germ cells in the TGF- β treated ovary augmented during the culture in a similar way to controls. Soluble betaglycan was used to antagonize the effect of TGF- β ; the effect TGF $\beta 1$ and TGF $\beta 2$ on somatic cell number was reverted in the cultured ovary. The proliferation index and the percentage of apoptotic cells were measured by bromodeoxyuridine (BrdU) incorporation and by TUNEL technique, respectively. BrdU incorporation in somatic cells was significantly reduced in TGF- β treated ovary at 24 h and 72 h of culture, while the number of apoptotic cells was not significantly increased. Histological study of the cultured ovary showed a migration of germ cells from the cortical to the medullar region in the TGF- β treated ovary. The disorganization of the ovarian cortex and the germ cell migration were the changes observed after TGF- β treatment. TGF- β in the chick embryo ovary impaired somatic cell proliferation without increasing apoptosis. Germ cell proliferation remained unchanged but germ cells were induced to migrate from the ovarian cortex.

II. INTRODUCCIÓN

El interés por conocer el papel de los miembros de la familia del Factor de Crecimiento Transformante beta (TGF- β) durante el desarrollo de las gónadas, así como el efecto en su función ha sido motivo de numerosos estudios (Miro y Hillier, 1992; Mather *et al.*, 1997; Josso y Di Clemente, 1999; Knight y Glister, 2003). Sin embargo aún falta mucho por conocer acerca del papel que juega “el TGF- β ” durante el desarrollo de la gónada. De ahí la importancia de este trabajo, el cuál esta enfocado en los efectos de este factor sobre el ovario del embrión de pollo.

A continuación se describen de manera breve los eventos que ocurren durante el desarrollo gonadal en el embrión de pollo, así como los genes y moléculas que intervienen durante la diferenciación sexual gonadal; finalmente se dan las características más sobresalientes del TGF- β .

II.1. Desarrollo gonadal en aves.

En las aves, acorde con el sexo cromosómico, la diferenciación de la gónada será hacia testículo ZZ ó hacia ovario ZW, con la particularidad de que en la mayoría de las aves solo se desarrolla el ovario izquierdo.

Las gónadas se desarrollan a partir del mesodermo intermedio sobre la superficie ventrolateral del mesonefros; en el embrión de pollo al cuarto día de incubación (d.i.) están en etapa de cresta genital, pasan a gónada indiferenciada, para luego diferenciarse en ovario o testículo (Smith y Sinclair, 2004).

Dentro de los eventos iniciales que ocurren luego de la formación de la cresta genital (cg) se encuentra la migración de las células germinales primordiales (cgp). Las cgp se originan en el epiblasto de la zona central del área pelúcida, y se van moviendo hacia el hipoblasto, posteriormente se separan para ubicarse en el endodermo del saco vitelino (Ginsburg y Eyaldi-Giladi, 1986). El primer día de incubación las cgp se localizan dentro de los vasos sanguíneos y empiezan a circular a través de el torrente sanguíneo, aproximadamente a los dos d.i. salen de los capilares a la altura del mesenterio dorsal y se dirigen a la cg por medio de prolongaciones citoplasmáticas que les permiten desplazarse hacia su destino (Ando y Fujimoto, 1983; Hardisty, 1984).

Se ha planteado que las cgp responden a algún factor quimiotáctico liberado por la cg (Kuwana, 1993) y llegan a la región urogenital a los dos días y medio de incubación, atraviesan el epitelio celómico que recubre la cg, al mismo tiempo que las células de la misma comienzan a formar cordones epiteliales (Gilbert, 2003). Al tercer y cuarto d.i. prolifera el epitelio celómico y se observan cgp localizadas entre las células epiteliales (Fargeix *et al.*, 1981). La cg queda como una

estructura epitelial-mesenquimatosa (Fargeix, *et al.*, 1981) formada por el epitelio celómico, las células mesenquimáticas, y las cgp. Al quinto d.i. se observa la proliferación de las células gonadales, y se observan dos áreas bien definidas: la corteza, que contiene a las cgp y la médula formada por cordones de células somáticas separadas por mesénquima. Los cordones medulares se derivan de la proliferación de las células del epitelio y el inicio de la diferenciación comienza a ser evidente histológicamente al sexto y medio d.i., lo que corresponde al estadio 30 del desarrollo (E30/H-H; Hamburger y Hamilton, 1951; Smith y Sinclair, 2004).

En los embriones machos (ZZ) se separa el epitelio y el tejido medular, las cgp migran hacia el interior y acompañadas de cordones sexuales primarios proliferan; posteriormente se diferencian para originar a las células de Sertoli. Al completarse la diferenciación de las células de Sertoli, éstas comienzan la producción de la hormona antimülleriana u hormona inhibidora de los conductos de Müller (AMH) que induce la regresión de los conductos paramesonéfricos. El mesénquima y los vasos sanguíneos provenientes de la región mesonéfrica separan el área medular del epitelio celómico, estableciéndose la túnica albúginea.

En los embriones hembras (ZW) las gónadas se desarrollan asimétricamente, el ovario derecho involuciona quedando solo funcional el izquierdo. Entre el sexto y séptimo d.i., la gónada derecha comienza a perder su arreglo histológico, finalmente sufre una regresión después del décimo d.i. quedando como un órgano vestigial al momento de la eclosión (Clinton, 1998). En el ovario izquierdo la proliferación de la corteza aumenta considerablemente su grosor, mientras los cordones comienzan a vacuolarse, formando los canales lacunares. La corteza continúa su crecimiento y las células epiteliales rodean a los grupos de ovogonias formando los cordones sexuales secundarios o corticales. Esta asociación es una fase temprana de la relación que van a presentar más tarde los ovocitos y las células de la granulosa (Smith y Sinclair, 2004).

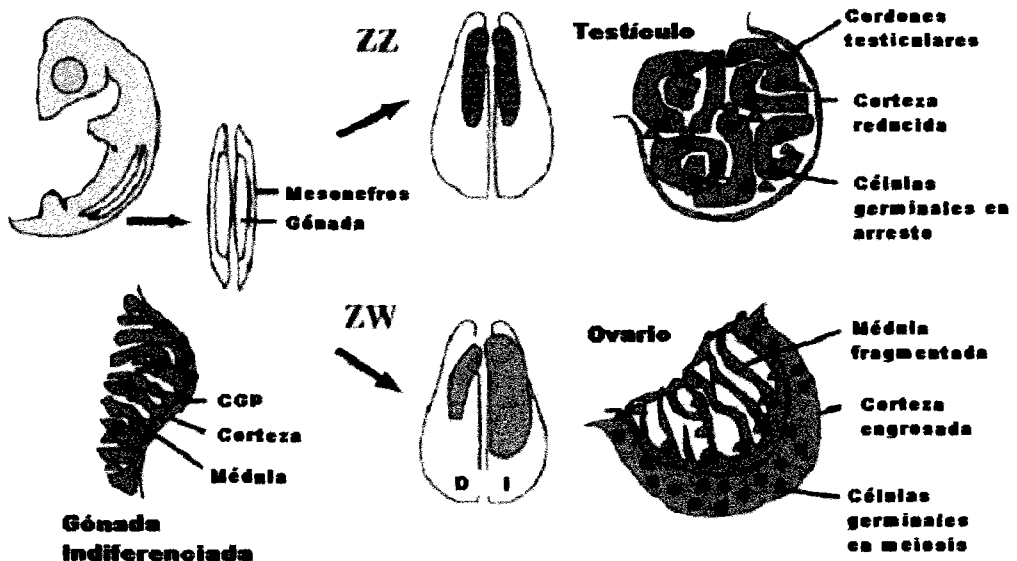


Figura 1. Esquema de la cresta genital. Las gónadas se desarrollan a partir del mesodermo intermedio sobre la superficie ventrolateral del mesonefros. Al cuarto día de incubación es una gónada indiferenciada. Morfológicamente se distingue la corteza (rosa), la médula (azul), las células mesenquimáticas (verdes) y las cgp (negras). Entre el 5.5 y 6.5 d.i. en los embriones ZZ ocurre la diferenciación bilateral y en los embriones ZW la gónada derecha entra en regresión (Smith y Sinclair, 2004).

II.2. Diferenciación gonadal

Actualmente se han identificado varios genes involucrados en la diferenciación sexual gonadal de las aves, entre los cuáles se encuentran el gen *Sox9* (SRY-box containing gene 9), el gen de la AMH (hormona antimülleriana) y el de la P450 arom (aromatasa).

En 1996, Morais da Silva *et al.*, encontraron transcritos del *Sox9* en la cresta genital de embriones de pollo de ambos sexos en el quinto d.i., lo que corresponde a una etapa morfológicamente indiferenciada de la gónada, en días posteriores sexto y séptimo observaron una elevada expresión de *Sox9* en el testículo, mientras que en los ovarios fue baja. Ellos proponen que en las hembras la expresión del *Sox9* ocurre independientemente del mecanismo genético que dirige la diferenciación del ovario en el pollo, y que en los machos los altos niveles de expresión de *Sox9* podrían estar dirigiendo la expresión de AMH. Clinton *et al.* (1997) detectaron la presencia de transcritos de *Sox9*

en gónadas masculinas y femeninas de pollo de seis d.i., así como un incremento en la expresión del gen de la AMH en gónadas masculinas a partir del sexto d.i. hasta el décimo d.i.

Oreal *et al.* (1998) demostraron que la expresión de la AMH ocurre al quinto d.i. mientras que el mensajero del gen *Sox9* se detectó al sexto d.i. Kent *et al.* (1996) sugieren que debido a la expresión espacio-temporal del gen *Sox-9* durante la diferenciación gonadal, podría estar participando en la regulación génica de la diferenciación sexual. Sin embargo hasta ahora no se ha podido elucidar el papel de los genes *Sox* en relación con este proceso en las aves.

Asimismo se han propuesto a la AMH y a la P-450 arom, la cuál convierte andrógenos a estrógenos, como posibles candidatos que participan en la diferenciación sexual gonadal de las aves.

En las aves, la síntesis de AMH ocurre en machos y hembras tanto en la embriogénesis como en la etapa adulta (Hutson *et al.*, 1982). La presencia de esta hormona en embriones femeninos hace que el conducto derecho involucione, mientras que el conducto izquierdo se estabiliza y se diferencia (Josso *et al.*, 1997). También la proporción de andrógenos/estrógenos participa en este proceso: se ha propuesto que en los machos los niveles de estrógenos son tan bajos que no tienen ningún efecto sobre la expresión de AMH, en cambio la concentración de andrógenos la incrementa. En las hembras los niveles de estrógenos son lo suficientemente altos para proteger al conducto paramesonefrico izquierdo de la acción de la AMH y la concentración de andrógenos es la necesaria para ejercer su efecto sobre el conducto derecho (Mc Laughlin *et al.*, 1983). Además se ha demostrado que en los embriones femeninos de las aves el conducto de Müller y el ovario izquierdo presentan una mayor concentración de receptores de estrógenos que el conducto derecho (Gasc, 1980; Teng y Teng, 1975). Asimismo Clinton (1998) encontró que al quinto y medio d.i. se encuentra presente la AMH en gónadas masculinas del embrión de pollo.

En 1987 Bogart propuso que el destino sexual de las aves depende de la proporción entre andrógenos y estrógenos y por lo tanto, de la concentración de la P450 arom en la gónada durante la diferenciación sexual. Wartenberg *et al.* (1992) evaluaron el efecto de la 1-metil-androstendiona, la cual es un inhibidor de la P-450 arom en las células gonadales del embrión de pollo hembra durante la diferenciación sexual, observando la reversión sexual completa del organismo. Asimismo se ha observado la expresión de la P-450 arom en los ovarios de embriones de pollo de sexto y medio d.i., pero no en testículos de la misma edad (Yoshida *et al.*, 1996; Clinton 1998; Shimada,

1998). En trabajos recientes Nomura *et al.* (1999) detectaron transcritos de la P-450 arom en gónadas de hembras del quinto d.i.

Villalpando *et al.* (2000) han encontrado que la expresión de la P-450 arom al sexto d.i. en gónadas femeninas del embrión de pollo, se debe a la correlación que existe entre el ARNm de la P-450 arom y su actividad enzimática para la producción de estradiol (E₂). Estas evidencias apoyan la importancia de la P-450 arom, en la diferenciación sexual gonadal de las aves.

Woods y Erton (1978) demostraron que las gónadas embrionarias de pollo son capaces de sintetizar andrógenos desde el tercer y medio d.i. y estrógenos a partir del cuarto d.i., éstos resultados son cuestionables debido a que en esas edades se está terminando de establecer la cresta genital.

Tanabe *et al.* (1986) e Imataka *et al.* (1989) propusieron a las gónadas embrionarias de pollo, principalmente el ovario, como secretoras de estrógenos. Con experimentos de autorradiografía se ha encontrado que el epitelio superficial del ovario izquierdo es capaz de unir de manera específica a los estrógenos desde el quinto y medio d.i. (Gasc, 1980). Estas evidencias han llevado a proponer que las hormonas esteroides pueden jugar un papel fisiológico fundamental en la diferenciación sexual gonadal y en el desarrollo del ovario de las aves.

Pedernera *et al.* (1999) cuantificaron la secreción del 17 β -estradiol en gónadas de embrión de pollo del octavo d.i., encontrando que la secreción es mayor en el ovario izquierdo que en el derecho. Asimismo se ha detectado la expresión de la P450 17 α -hidroxilasa (P450c17), la cuál convierte progestinas a andrógenos en gónadas de embriones de pollo del quinto d.i. (Yoshida *et al.*, 1996).

Nakabayashi *et al.* (1998) y Kanda *et al.* (2000) detectaron por hibridación *in situ* la expresión del gen de la P450scc (P450 cholesterol side chain cleavage), la cual cataliza la conversión de colesterol a pregnenolona, y la expresión de la 3 β -HSD (3 β -hydroxysteroid dehydrogenase), la cual convierte pregnenolona a progesterona, encontrando los mRNA de ambas enzimas; en el caso de la P450scc se detectó desde el séptimo d.i. y en el caso de la 3 β -HSD desde sexto d.i. en ambas gónadas de embriones de pollo.

Smith *et al.*, (1997) encontraron transcritos de los receptores a estrógenos en la región urogenital de las hembras y machos de embriones de aves del tercer y cuarto d.i. respectivamente. También se han detectado transcritos del receptor a estrógenos alfa, por hibridación *in situ* en el epitelio de

las gónadas izquierdas al séptimo d.i., no así en las gónadas derechas de ambos sexos (Nakabayashi *et al.*, 1998). El receptor a estrógenos fue inmunodetectado en la corteza y la médula de ovarios derechos e izquierdos al séptimo d.i., sin embargo la expresión fue más abundante en la corteza del ovario izquierdo (Andrews *et al.*, 1997).

II.3. El Factor de Crecimiento Transformante Beta (TGF- β).

Este factor de crecimiento pertenece a la familia del TGF- β , la cuál comprende más de 30 polipéptidos relacionados estructuralmente. Incluye a la subfamilia del factor de crecimiento transformante beta (TGF- β), la subfamilia de la inhibina-activina, la subfamilia de las proteínas morfogenéticas del hueso (BMPs), la subfamilia DPP/Vg1, la subfamilia de la hormona Anti-Mülleriana (AMH ó MIS) y otras proteínas como el factor de crecimiento y diferenciación (GDF), y el factor neurotrófico de las células gliales (GDNF; Massagué, 1998).

Los polipéptidos que comprenden la subfamilia del TGF- β s, los TGF- β 1, 2, 3, 4 y 5 desempeñan un papel importante en el desarrollo embrionario, homeostasis, regeneración tisular, e intervienen en procesos celulares como proliferación, diferenciación, migración, adhesión, formación de matriz extracelular, producción de proteasas, hematopoyesis, angiogénesis, quimiotaxis, funciones inmunes e inducción de la apoptosis (Siegel y Massagué, 2003).

El patrón de expresión de los TGF- β s varía en cada tipo celular y no parece ser uniforme entre células del mismo linaje. La estructura prototipo de los TGF- β s, es el TGF- β 1 inicialmente identificado en el medio de cultivo de varias líneas celulares, tanto transformadas como no transformadas. Más tarde se logró su purificación de plaquetas humanas, donde se encuentra de manera abundante, y la subsecuente clonación de su cDNA (Border y Noble, 1995).

Todas las isoformas se sintetizan como precursores diméricos que se secretan al medio extracelular en sus formas inactivas, de las cuales se originan sus formas maduras activas, también diméricas. El TGF- β 1 consta de dos cadenas de 112 aminoácidos unidas por puentes disulfuro, cada cadena es sintetizada a partir del dominio carboxilo terminal de un precursor de 390 aminoácidos (López-Casillas, 1998).

Actualmente se conocen 4 isoformas: β 1, β 2, β 3 presentes en mamíferos, β 5 en *Xenopus* y β 4 descrita en pollo pero se considera homólogo a β 1. Cada una de las tres isoformas presentes en los

mamíferos están codificadas por un gen con distinta localización cromosómica. En el humano es la siguiente: β_1 (19q13), β_2 (1q41) y β_3 (14q24).

El mecanismo de acción de los TGF- β s es a través de los receptores tipo I (T β RI) y tipo II (T β RII), los cuales presentan una actividad de cinasa. Estos detectan la presencia del TGF- β en la superficie celular, iniciando una serie de fosforilaciones que son las mediadoras bioquímicas de las respuestas celulares al TGF- β . Estos receptores son específicos para serinas y treoninas, formados de 500 a 570 aminoácidos, con un peso molecular de 55 y 70 kDa, respectivamente. Están presentes ubicuamente en niveles bajos en células de aves y mamíferos (Massagué, 1990 y López-Casillas, 1998).

Además de los receptores T β RI y T β RII, también se conoce al receptor tipo III (T β RIII ó betaglicano) y a la endoglina. El betaglicano y la endoglina, son proteínas de superficie celular capaces de unir al TGF- β con alta afinidad, no son necesarias para la transducción de la señal pero pueden regular los efectos del TGF- β , gracias a su capacidad de modular el acceso del ligando a los receptores T β RI y T β RII. El betaglicano, es un proteoglicano de membrana con un peso molecular de 280-330 kDa, además de su papel como facilitador de la unión del TGF- β con sus receptores, también puede actuar como antagonista del TGF- β previniendo la formación del complejo de receptores T β RI y T β RII (Massagué, 1990).

El betaglicano, antagonista del TGF- β , es una forma soluble encontrada de forma natural en suero y matrices extracelulares, generada por la proteólisis de su porción extracelular. Asimismo, recientemente Vilchis-Landeros *et al.* (2001) han preparado una proteína recombinante baculoviral del betaglicano soluble y proponen su uso como agente terapéutico anti-TGF β .

La Endoglina es una glucoproteína transmembranal de las células endoteliales, en las cuáles generalmente no esta presente el betaglicano, también puede antagonizar al TGF- β pero solo a la isoforma 1. La reciente identificación del gen de la endoglina como el afectado en la telangiectasia hemorrágica hereditaria tipo 1 hace suponer funciones importantes, aún desconocidas, para este receptor accesorio del TGF- β (López-Casillas, 1998; Cymerman *et al.*, 2000).

La ruta de transducción del TGF- β comienza con la unión del ligando a su receptor T β RII, el cuál es una cinasa constitutivamente activa, después el receptor tipo II unido al ligando fosforila al T β RI en los residuos de serina-treonina en la secuencia TTS β SGSGLP del dominio GS, lo cuál induce su actividad cinasa. Se forma entonces un complejo TGF- β /T β RII/T β RI capaz de transducir la señal. Cuando los receptores son estimulados por la unión del ligando, las Smad 2 y 3 (las Smads, son

grupo de proteínas intracelulares, su nombre proviene del producto del gen Mad de *Drosophila* y de los genes Mad identificados en *Caenorhabditis elegans*, a su relación se le llamo SMA/MAD) son directamente fosforiladas por TBRI en un sitio consenso SS(V/M) en el extremo C-terminal. Una vez fosforiladas Smad 2 y 3, pueden formar un complejo estable con la Smad 4. El complejo activo formado por las Smad 2-3-4 es translocado al núcleo donde se une al DNA, en parte por interacciones con otras proteínas de unión al DNA y por contactos directos Smad-DNA.

El complejo Smad-DNA es capaz de activar la transcripción de genes blanco, esta activación es dependiente en parte de interacciones Smad con coactivadores como p300 y CBP, o bien capaz de reprimir la transcripción por su unión a corepresores como TGIF (Transforming growth interacting factor), Ski (virus descubierto en el Instituto Sloan-Kettering) y Sno (Ski related-novel gene); (Massagué y Chen, 2000; Siegel y Massagué 2003; Figura 2).

Existe una regulación negativa de la vía del TGF- β en varios de sus pasos, la primera se lleva a cabo a nivel de ligando donde TGF- β , nogina, cordina e inhibina compiten por la unión a los receptores de TGF- β ; la segunda ocurre a nivel del TBRI, donde la inmunofilina FKBP12 bloquea la transfosforilación del receptor; la tercera ocurre a nivel de las Smads, la 6 interactúa con TBRI en una manera más estable que las Smad 2 y 3 compitiendo por la unión con el receptor y la 7 bloquea la fosforilación de la Smad 2 y 3; la cuarta ocurre cuando se prende la vía de las MAPKs (proteínas cinasas activadas por mitógenos) y estas fosforilan a la Smad 2 y 3 reduciendo su acumulación nuclear y finalmente la quinta ocurre cuando la ubiquitina disminuye la estabilidad de la Smad 2 y 3 (Wotton y Massagué, 2001).

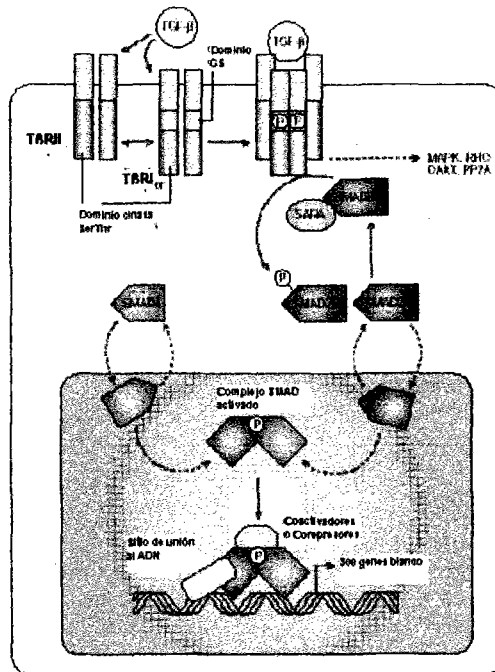


Figura 2. Mecanismo de acción del TGF-β. El TGF-β se une al TβRII y recluta al TβRI, fosforilándolo en el dominio GS (residuos de serina-treonina). El receptor I activo fosforila a las Smad 2/3, provocando la liberación de proteínas ancladas al citoplasma como SARA (SMAD anchor for receptor activation). Las Smad 2/3 fosforiladas forman dímeros o trímeros con Smad 4, se transloca al núcleo e interactúa con cofactores de unión al ADN así como con co-activadores o co-represores, para modular la transcripción de los genes blanco. [Las rutas Smad-independientes actúan río abajo del complejo de receptores. DAXX (death-associated protein), MAPK (mitogen-activated protein kinase), PP2A (protein phosphatase 2A).] Tomada de Siegel y Massague, 2003.

El modelo de knock outs en embriones de ratón y en ratones adultos ha proporcionado evidencias de que la ruta de señalización del TGF-β tiene un papel importante en el desarrollo y en la homeostasis. En la tabla 1 se muestra un resumen de el fenotipo de ratones nulos para el gen del TGF-β, su receptor tipo II y las Smad 2, 3 y 4, donde es apreciable que solo la mutación para el TGF-β1 y Smad 3 son viables (Massagué *et al.*, 2000; Dünker y Kriegelstein, 2000).

Tabla 1. Fenotipo de ratones nulos para el gen de los TGF- β 's, su receptor tipo II y SMAD 2/3. Tomado de Dünker y Kriegstein, 2000.

Gen blanco	Fenotipo mutante durante el desarrollo	Fenotipo mutante en los adultos
Ligando TGF- β 1	Muerte postnatal (aprox. 4 semanas después de nacer) por trastornos inflamatorios. El 50% de los embriones mueren a los 10.5 días de desarrollo debido a defectos de saco embrionario, vasculogénesis y hematopoyesis.	Desordenes inflamatorios y auto inmunes. Defectos en la agregación de plaquetas. Carcinogénesis en piel, glándulas mamarias y colón.
Ligando TGF- β 2	Muerte de cianosis congénita antes o durante el nacimiento. Malformaciones craneofaciales, del ojo, de la columna vertebral, del oído, corazón, pulmón, extremidades y urogenitales.	
Ligando TGF- β 3	Muere a las 24 horas de nacer. Defectos en palatogénesis, en el desarrollo pulmonar y en maduración pulmonar.	
Receptor T β RII	Letal alrededor del 10.5 día de desarrollo. Defectos en saco embrionario, hematopoyesis y vasculogénesis.	
Mediadores intracelulares SMAD2	Letal antes del día 8.5 de desarrollo. Defectos en la formación del mesodermo y en la gastrulación.	
Mediadores intracelulares SMAD3		Viable y fértil. Probables adenocarcinomas colón rectales a la edad de 4 a 6 meses.
Mediadores intracelulares SMAD4	Letal antes del día 7.5 de desarrollo. Crecimiento retardado. Defectos en la formación del mesodermo y en la gastrulación. Desarrollo anormal del endodermo visceral.	

III. ANTECEDENTES

III.1. Efectos del TGF- β en el ovario.

En el ovario de mamíferos las células de la granulosa y de la teca de los folículos de diferentes estadios de desarrollo (primordial-preantral) expresan las isoformas 1, 2 y 3 del TGF- β , así como sus receptores tipo I y tipo II (Chegini y Flanders, 1992; Teerds y Dorrington, 1992; Goddard *et al.*, 1995; Mc Natty *et al.*, 2000) y tipo III (Lewis, *et al.*, 2000; Drummond, *et al.*, 2002; Mc Conell, *et al.*, 2002; Liu *et al.*, 2003).

Los efectos del TGF- β sobre las células foliculares son complejos, por ejemplo, la proliferación de las células de la granulosa puede ser estimulada o inhibida dependiendo de la especie, el estado de maduración folicular y su interacción con otros factores de crecimiento y hormonas (Skinner *et al.*, 1987; Roberts y Skinner, 1991; Lerner *et al.*, 1995).

Mientras el TGF- β estimula la proliferación de las células de la granulosa del ovario de rata (Dorrington *et al.*, 1988), la inhibe en las células de la granulosa del folículo antral de bovino (Skinner *et al.*, 1987) y preantral de hámster (Roy, 1993) y también en este tipo celular, el TGF- β , puede estimular (Ying *et al.*, 1986) o inhibir (Benahmed *et al.*, 1993) la esteroidogénesis.

La secreción de TGF- β in vitro disminuye en cultivo primario de células de la granulosa obtenidas de rata tratadas con FSH (hormona folículo estimulante), DES (dietilestibestrol), E2 (estradiol) y su combinación, sin embargo la proliferación celular aumenta cuando se adiciona TGF- β al medio de cultivo (Saragueta *et al.*, 2002). De la misma forma, la secreción de TGF- β disminuye en células de la teca de ratas tratadas con LH (hormona luteinizante), IGF-1 (factor de crecimiento parecido a la insulina-1) y E2 (Magoffin *et al.*, 1995).

Es conocido que el TGF- β endógeno media la acción mitogénica de E2 en células de la granulosa de rata (Dorrington *et al.*, 1993), además aumenta la actividad de aromatasa inducida por FSH así como la síntesis de progesterona (Hutchinson *et al.*, 1987) y de inhibina (Zhang *et al.*, 1988). También potencia la expresión de los receptores de LH (Kim y Schumberg, 1989). Así mismo TGF- β estimula la producción de progesterona en células tecales de bovinos (Robert y Skinner, 1991) e inhibe la síntesis de CYP17,17-alpha-hydroxylase (Demeter-Arlotto *et al.*, 1993; Fournet *et al.*, 1996).

Otro de los efectos que tiene TGF- β es regular a la alta la expresión del factor de crecimiento de tejido conectivo en células de la granulosa, el cuál interviene en la remodelación de la matriz y angiogénesis durante el crecimiento folicular y la formación del antro (Harlow *et al.*, 2002). TGF- β también tiene la capacidad de inducir al ovocito a reanudar la meiosis en cultivos de folículos de rata madura (Feng *et al.*, 1988).

Para los ovarios fetales de mamíferos, se conoce que el TGF- β es un factor quimiotrópico de células germinales y que puede inhibir su proliferación (Godin y Wylie, 1991; Richards *et al.*, 1999).

Para las gónadas de pollo, se conoce la expresión del TGF β_2 (Burt y Paton, 1991), TGF- β_3 (Burt *et al.*, 1995) y TGF- β_4 (Jakowlew *et al.*, 1988) en el ovario adulto (Law *et al.*, 1995). Y la expresión del TGF- β_2 en ovarios embrionarios desde el quinto al noveno d.i. (Hattori *et al.*, 2002). También en un modelo *in vitro*, se propone que el TGF- β_2 solo o en combinación con otros factores de crecimiento SCF (stem cell factor), LIF (leukemia inhibitory factor), FGF-2 (fibroblast growth factor-2), IL-11 (interleukin-11), IGF-1 (insulin-like growth factor) inhibe la proliferación de las células germinales de embriones de pollo de 6 d.i. (E29/H-H; Fujioka *et al.*, 2004).

IV. HIPÓTESIS

El crecimiento del ovario está regulado por factores de crecimiento, si aumentamos ó disminuimos la concentración del Factor de Crecimiento Transformante β durante el desarrollo embrionario del ovario, el número, la proliferación y la apoptosis de las células germinales y somáticas se verán modificados.

V. OBJETIVO GENERAL

Estudiar los efectos del TGF- β sobre las células germinales y somáticas en el ovario del embrión de pollo a los 9 d.i.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Evaluar el efecto de TGF- β_1 y TGF- β_2 por medio de conteo celular sobre el número de células germinales y somáticas en el ovario del embrión de pollo a los 9 d.i.
2. Evaluar el efecto del betaglicano soluble por medio de conteo celular sobre el número de células germinales y somáticas en el ovario del embrión de pollo a los 9 d.i.
3. Valorar mediante incorporación de BrdU (5-Bromo-2'-deoxiuridina) el efecto de TGF- β_1 , TGF- β_2 y betaglicano soluble sobre la proliferación celular del ovario del embrión de pollo a los 9 d.i.
4. Evaluar con la técnica de TUNEL el efecto del TGF- β_1 sobre la apoptosis del ovario del embrión de pollo a los 9 d.i.
5. Examinar por microscopía, la morfología del ovario del embrión de pollo de 9 d.i. tratado con TGF- β_1 , TGF- β_2 y betaglicano soluble.

VI. MATERIAL y METODOS

VI.1. Cultivo de órganos

Ovarios de embriones de pollo de 9 d.i. fueron disecados y cultivados en grupos de tres sobre membranas de policarbonato (Whatman, Nucleopore PC, no. cat. 110410). En cajas de plástico (Nunc/Surface, no. cat. 153066) con 2.5 ml de medio de cultivo DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium-high glucosa, no. cat. 10569-010). El medio de cultivo fue suplementado con 0.1% Albumax (Gibco-BRL, no. cat. 11020-021) y con 100 μ l de antibiótico Penicilina-Estreptomicina 100x (GIBCO, no. Cat. 10378-010) por 10 ml de DMEM para prevenir contaminaciones bacterianas.

Los tratamientos durante los cultivos de órganos se realizaron en cuatro grupos: el primer grupo fue el testigo, el segundo fue para el TGF- β 1 (Factor de Crecimiento Transformante- β 1 recombinante humano, R&D Systems, no. cat. 240-B/CF), el tercer grupo para el TGF- β 2 (Factor de Crecimiento Transformante- β 2 recombinante humano, R&D Systems, no. cat. 302-B2) a ambos grupos se les administró una concentración de 10 ng/ml y el cuarto grupo para el betaglicano soluble, a este grupo se le administró una concentración de 8 μ g/ml. El betaglicano soluble fue proporcionado gentilmente por el Dr. López-Casillas (IFC, -UNAM). Las concentraciones óptimas de los factores de crecimiento fueron determinadas con experimentos descritos abajo.

VI.2. Curva de Dosis y Tiempo de cultivo

Para el TGF- β 1 y el TGF- β 2 las concentraciones y el tiempo de cultivo óptimo se determinaron de la siguiente forma:

Las gónadas cultivadas se colocaron en viales siliconizados con 0.5 ml de tripsina disuelta en solución salina libre de calcio y magnesio a una concentración de 0.1mg/10ml. Posteriormente el vial se colocó en baño maría a 37 °C durante 10 minutos, con agitación de 90 ciclos/minuto, inmediatamente después se procedió a la disgregación celular con una pipeta pasteur siliconizada. Una vez que se disgregó la gónada se le agregó 0.5 ml de inhibidor de tripsina (Fluka Biochemika) disuelta en DMEM + 0.1% albumax a una concentración de 0.2mg/10ml. Finalmente se realizó la cuantificación de las células germinales y somáticas en una cámara cuenta glóbulos. Las células germinales se distinguen de las somáticas por ser más grandes, tienen núcleo excéntrico y cuerpo de Balbiani.

Para los TGF- β 's se probaron las siguientes concentraciones: 2.5, 5, 10, 20 y 40 ng/ml y los siguientes tiempos de cultivo: 24, 48, 72, 96 y 120 horas; y para el betaglicano soluble, las concentraciones fueron de 8, 4, 2 y 1 μ g/ml y el tiempo de cultivo utilizado fue de 72 h.

Consideramos el tiempo óptimo de 72 h de cultivo y la concentración de 10 ng/ml para los TGF- β 's y de 8 μ g/ml para el betaglicano soluble.

VI.3. Histología

Después del tratamiento con TGF- β_1 , TGF- β_2 o con betaglicano soluble. Los ovarios fueron fijados en Bouin durante 2 h, deshidratados, cortados y teñidos con hematoxilina-eosina y con Tricrómica de Masson para su análisis morfológico.

VI.4. Proliferación celular

Para evaluar el efecto de los tratamientos sobre la proliferación celular, se determinó el porcentaje de células germinales y somáticas en fase de síntesis. Las gónadas fueron cultivadas en las condiciones anteriormente descritas por 24 y 72 h. Posterior a este tiempo de cultivo, se les cambió el medio de cultivo, el cual contenía previamente 1 μ l/ml de 5-Bromo-2'-deoxitridina (BrdU, 1 μ l/ml, 10 000 X), ésta es un análogo de la timina y se incorpora en el DNA durante la fase S y se cultivaron por dos horas más. Después de este tiempo, las gónadas se colocaron en un tubo eppendorf al cual se le agregó tripsina (750 μ l al 0.1% disuelta en solución salina libre de calcio y magnesio); se incubaron 10 min en el baño maría a 37 °C y se disgregaron las gónadas con pipetas pasteur siliconizadas, luego se les agregó 750 μ l de inhibidor de tripsina (disuelto en DMEM al 0.2%). A la suspensión celular obtenida se le centrifugó por 12 min a 1,800 rpm, el botón celular se lavó con 1 ml de PBS. Se volvió a centrifugar en las mismas condiciones y se resuspendió nuevamente con PBS. Se realizaron extendidos celulares en portaobjetos recubiertos con polilisina (20 μ l de muestra) y se dejaron secar a temperatura ambiente.

Los frotis se fijaron en etanol ácido (70ml de ETOH con 30 ml de buffer de glicina a pH 2), por 30 min a -20 °C y la detección de BrdU se realizó de acuerdo al protocolo que proporciona el proveedor (Roche, no. Cat. 1 296 736). Brevemente, los frotis se lavaron 2 veces con PBS a temperatura ambiente durante 10 min, enseguida recibieron otros 2 lavados de 10 min de PBS caliente, y se incubaron 1 h con el primer anticuerpo (1:10) en una cámara húmeda a 37°C. Después del tiempo de incubación se lavaron 3 veces durante 10 min con PBS a temperatura ambiente y se incubaron otra hora con el segundo anticuerpo (1:10) en condiciones de oscuridad. Recibieron un lavado con PBS/Tween al 0.05% y dos con PBS, cada uno de 10 min. Finalmente se montaron y se procedió a realizar el conteo celular en un microscopio de fluorescencia.

VI.5. Apoptosis

Para evaluar el efecto del TGF β ₁ sobre la inducción de la apoptosis, se realizó la técnica del TUNEL según las indicaciones del proveedor (Roche, In Situ Cell Death Detection Kit, POD, no cat. 1 684 817).

Las gónadas se fijaron en paraformaldehído al 4% en PBS, luego se procesaron para su inclusión en parafina. Cortes histológicos de 5 μ m de grosor, se desparafinaron a 60 °C durante 30 min, se lavaron en xileno durante 10 min y se rehidrataron en etanoles graduales al 100, 96, 90, 80 y 70% durante 5 min cada uno. El siguiente paso fue incubar con proteinasa K libre de nucleasas durante 20 min a 37 °C [10-20 μ g/ml en 10mM Tris/HCl, pH 7.4-8]. Después se lavaron 3 veces con PBS y se les incubó 2h con la mezcla del TUNEL en una cámara húmeda en condiciones de oscuridad. Simultáneamente se realizaron los controles negativos permeabilizando a las células en 50 μ l de Label Solution (sin terminal transferasa) en lugar de la reacción del TUNEL. También se realizaron controles positivos, permeabilizando las células con Dnasa I grado I (3000U/ml- 3U/ml en 50mM Tris HCl, Ph 7.5, 10mM MgCl₂ 1mg/ml BSA) por 10 min a 25°C.

Después del tiempo de reacción se lavaron 3 veces con PBS y se pudieron observar al microscopio de fluorescencia. También se revelaron con peroxidasa, para lo cual se adicionó a cada preparación 25 μ l de Converter-POD y se incubaron en una cámara húmeda toda la noche a 4°C. Al día siguiente se lavaron con PBS tres veces y se les adicionó 50 μ l de DAB sustrato y se incubaron por 10 min. Finalmente el montaje fue con PBS/glicerol y la cuantificación del número de células apoptóticas se realizó midiendo en un corte el área del ovario y contando el número de células marcadas por μ m².

VI.6. Estadística

Las comparaciones pareadas se realizaron con la prueba de "t" de Student's. Las comparaciones múltiples se realizaron con una ANOVA (Análisis de Varianza) seguida de Tukey y Duncan. Los grupos se consideraron estadísticamente diferentes con $p \leq 0.05$. Todos los análisis estadísticos se realizaron con SPSS (Statistical Package for the Social Sciencies) v. 10 y con SAS (Software Analysis System) v. 6.

VII. RESULTADOS

VII.1. Curva de Dosis y Tiempo de cultivo

TGF- β_1

En la suspensión celular obtenida de la disgregación de las gónadas cultivadas se distinguen claramente las células germinales de las somáticas. En las gónadas que recibieron el tratamiento con el TGF- β_1 se observa una disminución en el número de células somáticas desde la administración de 10ng/ml de casi el 50% de estas células. El número de células germinales permanece constante a las concentraciones estudiadas. (Figura 3A y 3B). En el caso del TGF- β_2 ocurrió el mismo fenómeno (datos no mostrados).

Curva de dosis de TGF- β_1

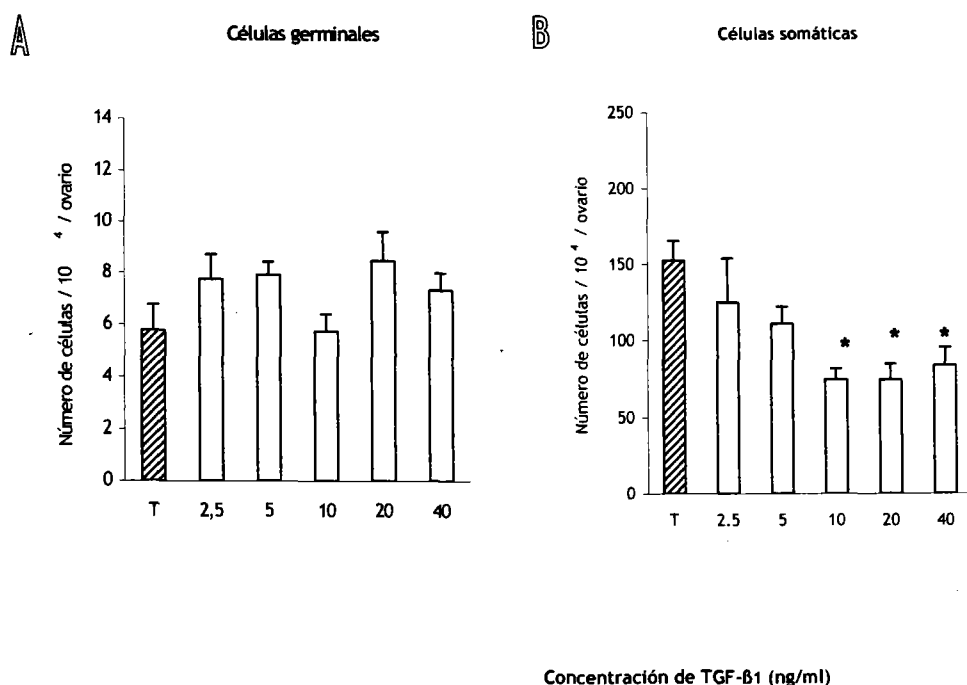


Figura 3. Efecto del TGF- β_1 sobre el número de las células germinales y somáticas en el ovario embrionario de pollo de 9 d.i. cultivado durante 72 h. (A) El TGF- β_1 no modificó significativamente el número de células germinales con respecto al grupo testigo. (B) En el caso de las células somáticas el TGF- β_1 disminuyó significativamente el número de células somáticas entre el testigo y los tratados con TGF- β_1 a las dosis de 10, 20 y 40 ng/ml. Las barras representan la media $\pm$ eem, n = 10-15. *p ≤ 0.05 vs el testigo.

La curva temporal del TGF- β_1 y TGF- β_2 (datos no mostrados) para el ovario embrionario se hizo a la concentración de 10 ng/ml de TGF- β . Se observó una disminución en el número de células somáticas a partir de las 48 h y se mantuvo hasta las 120 h. Sobre el número de células germinales el TGF- β_1 y TGF- β_2 (datos no mostrados) no tuvo efecto estadísticamente significativo (Figura 4A y 4B).

Curva de tiempo del TGF- β_1

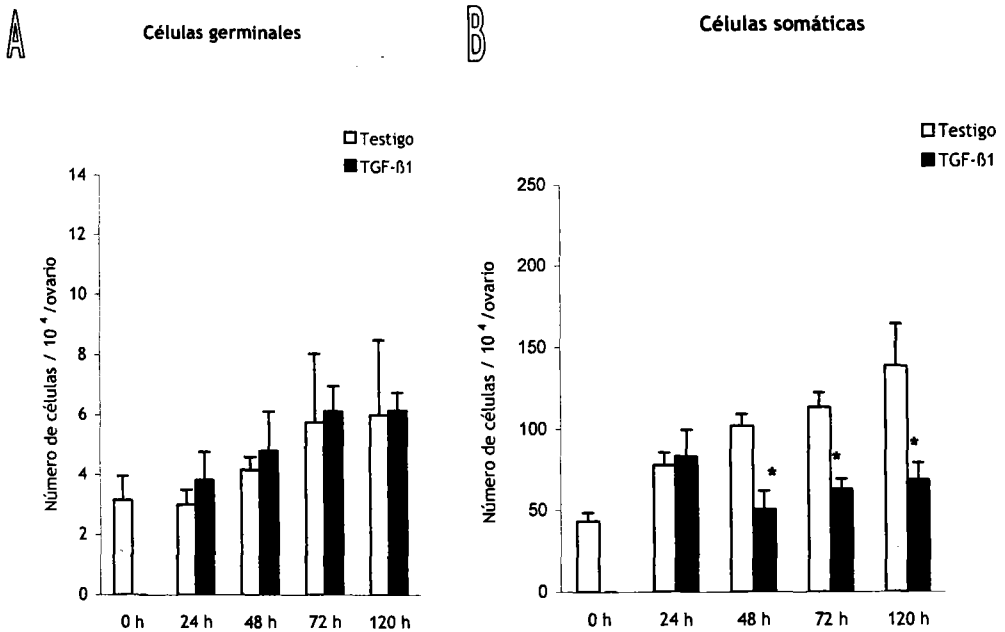


Figura 4. El efecto de TGF- β_1 (10 ng/ml) sobre el número de células germinales y somáticas en el ovario embrionario de pollo de 9 d.i. cultivado durante 24, 48, 72 y 120 h. (A) Se observa que el número de células germinales no se modifica estadísticamente por efecto del TGF- β_1 durante los tiempos de cultivo ensayados. (B) Las células somáticas tratadas con TGF- β_1 disminuyeron significativamente durante los cultivos de 48, 72 y 120 h. Las barras representan la media $\pm$ eem, $n = 3-6$. * $p \leq 0.05\%$ vs el testigo.

VII.2. Betaglicano soluble

El betaglicano soluble a las concentraciones probadas no tuvo ningún efecto estadísticamente significativo con respecto al testigo, sobre el número de células germinales y somáticas del ovario embrionario de pollo de 9 d.i. cultivado durante 72 h (Figura 5 A y 5B).

Curva de dosis de betaglicano soluble

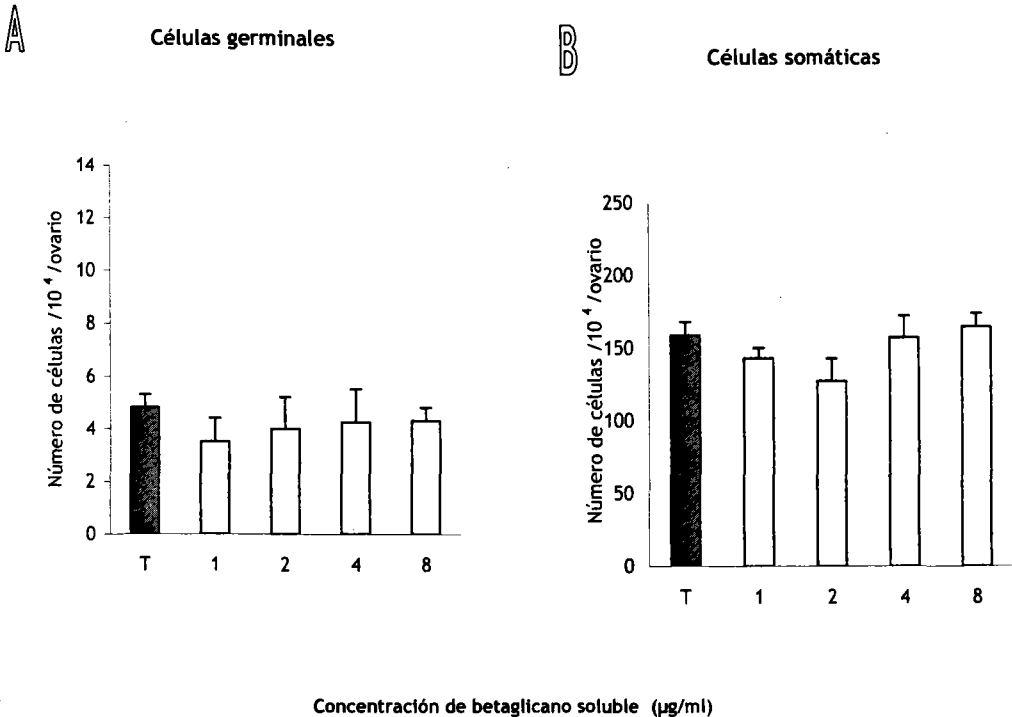


Figura 5. Efecto del betaglicano soluble sobre el número de células germinales y somáticas en el ovario embrionario de pollo de 9 d.i. cultivado durante 72 h. El betaglicano soluble no modificó el número de células germinales (A), ni el número de células somáticas (B) con respecto al testigo. Las barras representan la media $\pm$ eem, $n = 4-18$. * $p \leq 0.05\%$ vs el testigo.

Para observar si el betaglicano soluble revertía el efecto de los TGF- β 's en el ovario embrionario de pollo de 9 d.i., se realizaron cultivos de órgano durante 72 h con los siguientes tratamientos: betaglicano (8 μ g/ml), TGF- β_1 (10 ng/ml), TGF- β_2 (10 ng/ml) ó sus combinaciones.

En los ovarios embrionarios tratados con TGF- β_1 se observó una disminución estadísticamente significativa en el número de células somáticas con respecto al testigo, esta disminución fue del 40% (Figura 6, A). En la misma gráfica, no hubo diferencias estadísticamente significativas entre las muestras tratadas con betaglicano y TGF- β_1 + betaglicano con respecto al testigo. En este caso se pierde el significado estadístico del TGF- β_1 más betaglicano respecto al testigo.

Además, también se comparó el grupo tratado con TGF- β_1 contra el grupo tratado con betaglicano, donde fue observable una disminución del 30% en el número de células somáticas. Para los ovarios tratados con TGF- β_2 se cuantificó un menor número de células somáticas del 40% con respecto al testigo y del 30% con respecto al betaglicano. En este caso, si se observó que el betaglicano revirtió el efecto del TGF- β_2 aumentando el número de células somáticas en casi un 35% (Figura 6, B).

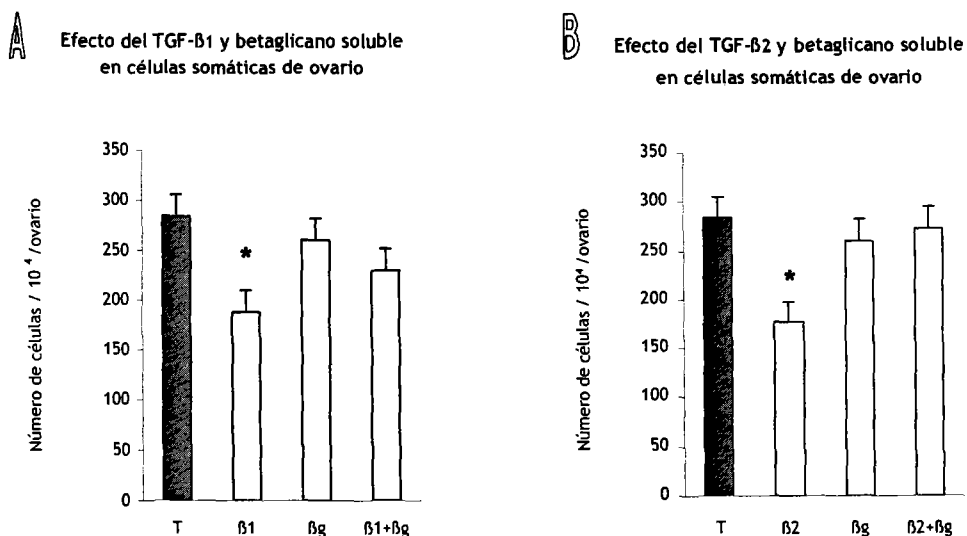


Figura 6. Efecto del TGF- β_1 , TGF- β_2 y betaglicano soluble sobre células somáticas en el ovario del embrión de pollo de 9 d.i. Después de 72 h de tratamiento con TGF- β_1 (A) ó con TGF- β_2 (B), se observó para ambos casos una disminución en el número de células somáticas. Las barras representan la media $\pm$ eem., $n = 4-6$. * $p < 0.05$ vs el testigo.

VII.3. Proliferación celular

Debido a que en los experimentos anteriores observamos que el TGF- β_1 y el TGF- β_2 disminuyeron el número de células somáticas, se decidió evaluar el efecto del TGF- β_1 sobre la proliferación celular, a través del porcentaje de células en fase de síntesis. Se realizó un ensayo de incorporación de BrdU en las células somáticas del ovario embrionario de pollo de 9 d.i. a las 24 y 72 h de cultivo.

El tratamiento con TGF- β_1 disminuyó el porcentaje de células somáticas que incorporaron BrdU en un 50% tanto a las 24 como a las 72 h de cultivo (Figura 7, A y B).

Ovario

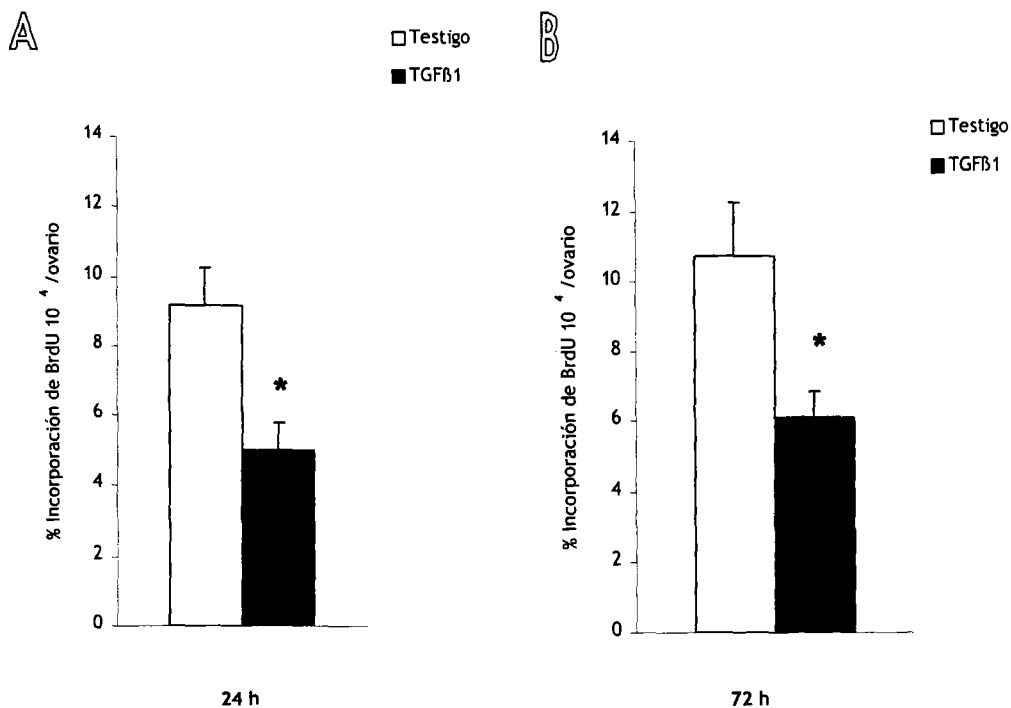


Figura 7. Incorporación de BrdU en las células somáticas del ovario embrionario de pollo de 9 d.i., a las 24 y 72 h de cultivo. Después del tratamiento con TGF- β_1 (A, B) el porcentaje de células que incorporaron BrdU disminuyó un 50%. Las barras representan la media $\pm$ eem, n = 6-7. *p < 0.05 vs el testigo.

Para evaluar el efecto del TGF- β_1 , TGF- β_2 y betaglicano soluble sobre la proliferación celular, se realizó un ensayo de incorporación de BrdU en las células somáticas del ovario embrionario de pollo a las 24 h de cultivo.

En el ovario, el tratamiento con TGF- β_1 y con TGF- β_2 disminuyó el porcentaje de células somáticas que incorporaron BrdU, con respecto al testigo en un 30% y 35% respectivamente y una disminución del 35% y 40% con respecto al betaglicano.

Por otro lado la proliferación de las células somáticas no cambia después del tratamiento con betaglicano soluble y además este inhibe parcialmente el efecto del TGF- β_1 y TGF- β_2 ya que elimina la diferencia observada en la disminución de las células somáticas en fase S, pero no alcanza a mostrar diferencia significativa entre los grupos tratados con TGF- β y con TGF- β mas betaglicano (Figura 8; Tabla 2).

Ovario

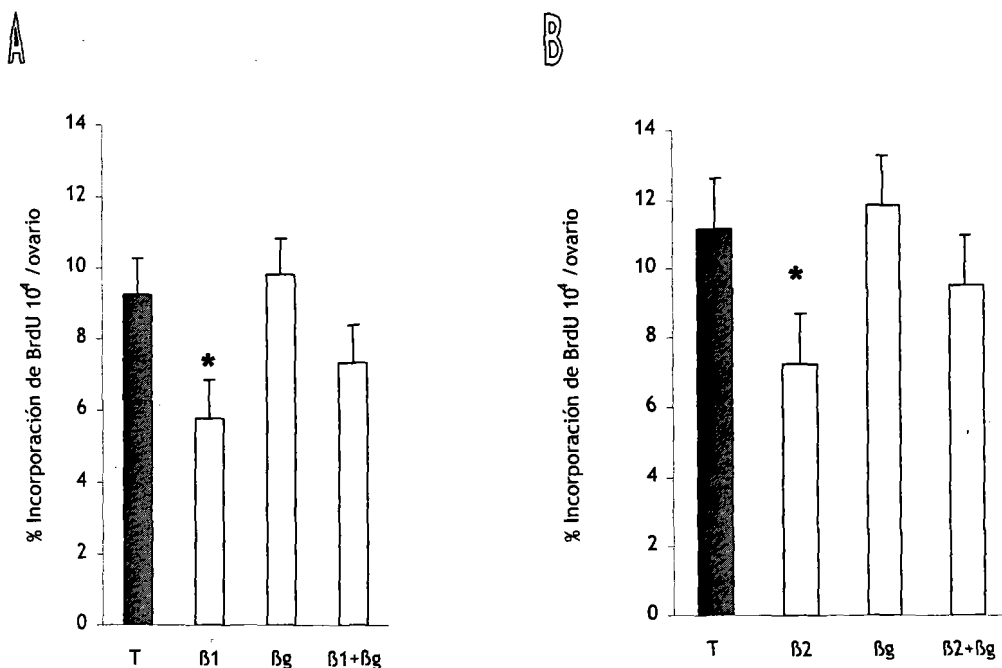


Figura 8. Incorporación de BrdU en las células somáticas del ovario embrionario de pollo de 9 d.i., a las 24 h de cultivo. Después del tratamiento con TGF- β_1 (A) y con TGF- β_2 (B) el porcentaje de células somáticas en síntesis disminuyó un 30% y un 35% respecto al testigo. Y un 35 ó 40% con respecto al betaglicano soluble. Las barras representan la media $\pm$ eem, $n = 4-5$. * $p < 0.05$ vs el testigo.

Tabla 2. Porcentaje de Incorporación de BrdU en las células somáticas del ovario a las 24 h de cultivo.

	Media $\pm$ eem		Media $\pm$ eem
Testigo	9.22 $\pm$ 1.04	Testigo	11.16 $\pm$ 1.45
TGF- β 1	5.79 $\pm$ 0.57 *	TGF- β 2	7.25 $\pm$ 0.33 *
Betaglicano	9.81 $\pm$ 1.00	Betaglicano	11.83 $\pm$ 0.82
TGF- β 1+Betaglicano	7.35 $\pm$ 0.78	TGF- β 2+Betaglicano	9.53 $\pm$ 1.07

* p < 0.05, diferencia estadísticamente significativa respecto al testigo

VII.4. Apoptosis

El efecto del TGF- β 1 sobre la inducción de la apoptosis en las células del ovario del embrión de pollo, se evaluó en cortes histológicos con la técnica del túnel en cultivos de 36 h. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre el porcentaje de células apoptóticas de los ovarios testigos y de los tratados con TGF- β 1 (Figura 9A y 9B, Figura 10).

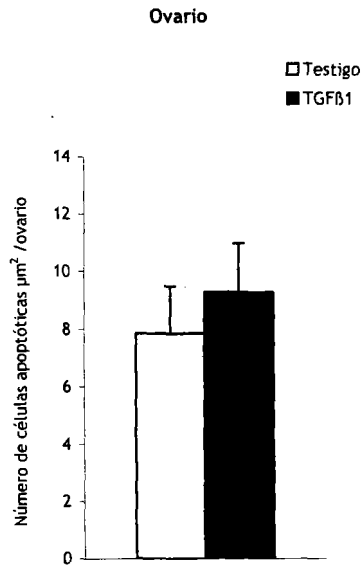


Figura 9. El porcentaje de células apoptóticas detectadas por TUNEL en el ovario embrionario de pollo de 9 d.i., a las 36 h de cultivo no cambia por efecto del TGF- β 1. Las barras representan la media $\pm$ eem, n = 6-7. *p < 0.05 vs el testigo.

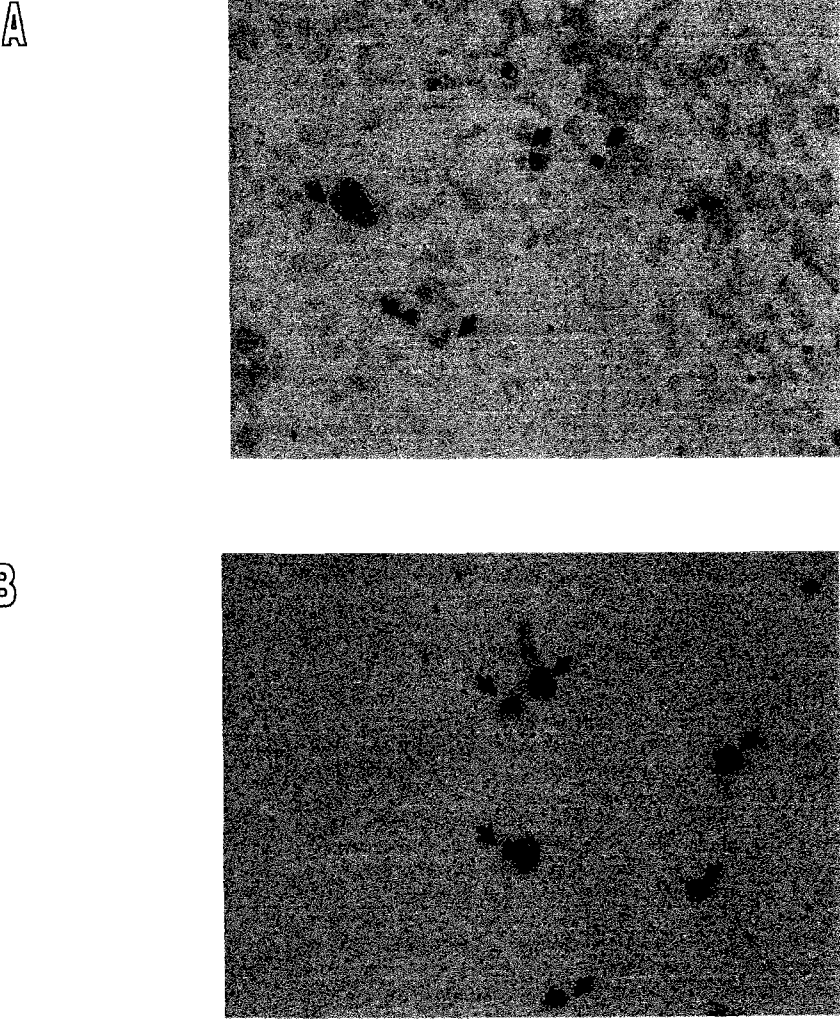


Figura 10. Cortes histológicos del ovario embrionario de pollo de 9 d.i., procesados con la técnica del TUNEL y revelados con peroxidasa. A) Ovario testigo cultivado 36 h, se observan las células apoptóticas (→), (40 X). B) Ovario tratado con TGF-β1 cultivado durante 36 h, se observan las células apoptóticas con la misma tinción del ovario testigo, (40X).

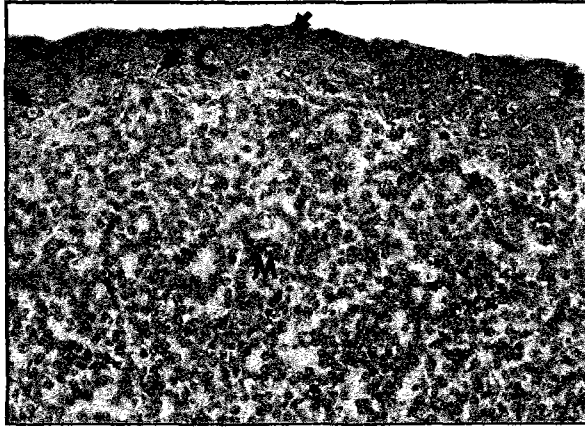
VII.5. Histología

El análisis morfológico del ovario se hizo en cortes histológicos teñidos con H-E y con tricrómica de Masson.

En el ovario testigo del embrión de pollo a los 9 d.i. se observa el epitelio superficial que recubre a la corteza, que a su vez contiene a las ovogonias, por debajo de esta se encuentra la médula, formada por cordones de células somáticas separadas por mesénquima, los cordones medulares se derivan de la proliferación de las células del epitelio.

En los cortes histológicos del ovario tratado con TGF- β teñidos con H-E, se observó la desaparición del epitelio superficial que se encuentra recubriendo la corteza, esta a su vez se desorganiza y por lo tanto no se puede observar un grosor bien definido, existe una migración de las ovogonias de la región cortical donde se encuentran normalmente, a la región medular, asimismo también la médula pierde su arreglo histológico y se vasculariza. En los cortes teñidos con tricrómica de Masson se observa un notable incremento de las fibras de matriz extracelular, así como una acumulación de las ovogonias en una especie de compartimentos que al parecer se han formado por efecto del TGF- β (Figura 11A y 11B).

A



B



Figura 11. Cortes histológicos del ovario embrionario de pollo de 9 d.i., testigo (A) y tratado con TGF- β (B). En (A) se observa el epitelio superficial por encima de la corteza (C) y la médula (M), así como las ovogonias (→) inmersas en la corteza (20X). En (B) se observa la migración de las ovogonias desde la corteza (C) hacia a la médula (M), así como una desorganización de la corteza y un incremento en la matriz extracelular (ME), (40X).

VIII. DISCUSIÓN

En el presente estudio, se evaluó el efecto proliferativo y apoptótico del TGF- β_1 y TGF- β_2 sobre las células germinales y somáticas en el ovario del embrión de pollo a los 9 d.i., utilizando un sistema de cultivo para órgano completo, con concentraciones de TGF- β que van desde los 5 hasta los 40 ng/ml, se utilizó un medio definido libre de suero, debido a que en el suero bovino fetal se ha encontrado un factor parecido al TGF- β (Sakai y Barnes, 1991).

Trabajos previos han reportado la expresión del gen del TGF- β_2 en ovarios y testículos del embrión de pollo desde el quinto hasta el noveno d.i. (Hattori *et al.*, 2002), y un efecto de inhibición de esta isoforma sobre la proliferación de las cgp del embrión de pollo a los 6 d.i., en un sistema de co-cultivo con células del estroma de la cresta genital (Fujioka *et al.*, 2004).

En este trabajo se evaluó el efecto de los factores de crecimiento TGF- β_1 y TGF- β_2 en el ovario del embrión de pollo a los 9 d.i., y se encontró que el TGF- β_1 y TGF- β_2 disminuyen el número e inhiben la proliferación de las células somáticas. Se ha reportado previamente que en varios tipos celulares, las isoformas del TGF- β detienen el ciclo celular en la fase G1 tardía, vía PP2A (Fosfatasa-2A), cuando las células comienzan a entrar a la fase S (Petritsch *et al.*, 2000; Derynck y Zhang, 2003; Siegel y Masagué, 2003). Por lo que creemos que el TGF- β puede estar limitando por esta vía la proliferación de las células somáticas del ovario. Existe la posibilidad de que el TGF- β induzca apoptosis a través de otra vía de señalización, como ya se ha reportado en las gónadas de mamíferos (Coucovanis *et al.*, 1993; Olaso *et al.* 1998).

En nuestros resultados evaluamos con la técnica de TUNEL la apoptosis en ovarios testigo y tratados con TGF- β_1 . Al cuantificar morfológicamente el número de figuras apoptóticas en los ovarios tratados nuestros datos, no mostraron diferencias estadísticas significativas, por lo que en este sentido, no podemos afirmar que la disminución en el número de células somáticas se deba también a la apoptosis. Sin embargo, consideramos que si realizamos mas experimentos a las 36 h y además realizamos otros a 24 h entonces será mas probable encontrar que efectivamente el TGF- β induzca apoptosis en la gónada embrionaria de pollo, ya que se le ha reportado como un agente que induce muerte celular tanto *in vivo* como *in vitro* (Schuster y Krieglstein, 2002).

Por otro lado en lo concerniente a las cgp, existen reportes en las gónadas de mamíferos que indican que el TGF- β puede suprimir el crecimiento de las células germinales (Godin y Wylie, 1991; Richards *et al.*, 1999; Fujioka *et al.*, 2004), efecto que nosotros no encontramos en las ovogonias del ovario de embriones de pollo de 9 d.i. Hay diferencias en la metodología utilizada, ya que en estos trabajos utilizan cultivos primarios de cgp y nosotros utilizamos cultivos de órgano completo, lo que pudiera indicarnos que las células somáticas están interviniendo en la regulación de la proliferación de las CGP, secretando algunos otros factores de crecimiento como SCF, LIF, FGF-2, IGF-1 y IL-11 que ya se han reportado afectan la sobrevivencia y proliferación de las células germinales, y que además son necesarios para el establecimiento de las células germinales en el embrión de pollo (Park y Han, 2000).

Asimismo, el TGF- β_2 es expresado prominentemente en las gónadas embrionarias de pollo durante la fase mitóticamente activa de las cgp (Hattori *et al.*, 2002), lo que nos sugiere que esta isoforma no afecta la actividad mitótica de las células germinales siempre y cuando se encuentren en presencia de las células somáticas; o bien el TGF- β_2 podría estar sinergizando con la vía de las proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPKS) para estimular la proliferación de las ovogonias, sin embargo, los mecanismos de activación de las MAPKS (ErK, JNK o p38 MAPK) por las isoformas del TGF- β y sus consecuencias biológicas hasta el momento están pobremente entendidas (Derynck y Zhang, 2003).

Evaluando también el efecto de antagonista para el TGF- β añadimos al sistema de cultivo, betaglicano soluble, un agente neutralizante de las isoformas del TGF- β (Vilchis-Landeros *et al.*, 2001). Encontrando que el ovario responde diferente al betaglicano soluble de acuerdo con el tratamiento recibido.

Para el TGF- β_1 encontramos que la presencia del betaglicano soluble impide la reducción en el número y la proliferación de las células somáticas. Algo similar se observa con el tratamiento con TGF- β_2 por el agregado de betaglicano soluble. Observamos que el betaglicano soluble aparentemente neutralizó en mayor proporción el efecto anti-proliferativo de β_2 comparado con β_1 , pero estos datos no fueron estadísticamente significativos. La respuesta diferencial puede atribuirse a la afinidad que presenta el betaglicano soluble por las isoformas del TGF- β , ya que la potencia anti-TGF β del betaglicano soluble es 10 veces mayor para β_2 que para β_1 (Vilchis-Landeros *et al.*,

2001). López-Casillas *et al.* (1994) observaron que mientras es necesario 25nM de betaglicano soluble para inhibir la respuesta del $\beta 2$ al 100% son necesarios 400nM para inhibir el $\beta 1$ al 80%.

Histológicamente en el ovario tratado con TGF- β se presentó la desorganización de la corteza por la migración de las ovogonias, este tipo celular en condiciones normales se encontraría en la corteza, sin embargo, después del tratamiento se desplazan a la médula. También parece haber un mayor número de fibras de matriz extracelular. Existen reportes en las gónadas de mamíferos donde proponen al TGF- β como un potente quimioatrayente de las células hematopoiéticas (macrófagos y monocitos) y fibroblásticas en cultivo (Wahl *et al.*, 1987; Postlethwaite *et al.*, 1987), además estimula la secreción de proteínas de matriz extracelular (fibronectina, laminina y colágena IV) y sus receptores (Dickson *et al.*, 2002). Asimismo sabemos que las ovogonias de ratón presentan los receptores tipo I y II para el TGF- β (Richards *et al.*, 1999), por lo que creemos, las células germinales tienen los elementos necesarios para responder al TGF- β que se encuentra en el ovario del embrión de pollo a esta edad, esta respuesta estaría dada por la capacidad de las células germinales de reclutar los elementos de citoesqueleto necesarios para polarizarse y poder migrar a donde existe la mayor concentración de TGF- β , que en este caso sería la médula (Godin y Wylie, 1991).

Finalmente, debido a que no existen reportes referentes al papel del TGF- β en el desarrollo de las gónadas en aves, también realizamos cultivos de testículos del embrión de pollo de 9 d.i. (datos no mostrados); encontrando diferencias en comparación con el ovario, si bien TGF- β_1 si tiene un efecto anti-proliferativo sobre las células somáticas del testículo, y este efecto también es neutralizado con el betaglicano soluble, el TGF- β_2 no tiene ningún efecto sobre las células somáticas de testículo. Lo anterior sugiere que a los 9 d.i. en el desarrollo de la gónada del embrión de pollo, la expresión de los genes para el TGF- β_1 y TGF- β_2 es diferencial. Con base en los resultados aquí mostrados, proponemos que cada isoforma de TGF- β tiene una función diferente en el desarrollo de la gónada del embrión de pollo. Se necesitaran más estudios para dilucidar las probables diferencias en la participación de los TGF- β 's en el desarrollo embrionario del ovario y el testículo.

IX. CONCLUSIONES

- El TGF- β_1 y el TGF- β_2 regulan la proliferación en el ovario del embrión de pollo a los 9 d.i. inhibiendo la proliferación de las células somáticas.
- El TGF- β_1 y el TGF- β_2 no afectan la proliferación de las ovogonias en el ovario del embrión de pollo de 9 d.i.
- El TGF- β_1 y el TGF- β_2 promueven la migración de las células germinales de la corteza a la médula ovárica, posiblemente mediante la acumulación de fibras de matriz extracelular en embriones de pollo de 9 d.i.
- Los efectos del TGF- β_1 y el TGF- β_2 en el ovario son neutralizados por la presencia del betaglicano soluble.

X. PERSPECTIVAS

Los resultados de este trabajo muestran a las isoformas 1 y 2 del TGF- β como inhibidores de la proliferación de las células somáticas en el ovario del embrión de pollo a los 9 d.i. Probablemente, el TGF- β intervenga deteniendo el ciclo celular sin que aparentemente induzca apoptosis. Sería necesario abordar este tema con perspectiva al estudio de las vías de transducción de señales, es decir cuantificar las proteínas que pueden estar siendo fosforiladas al prender una u otra vía (sobrevivencia-muerte).

Este trabajo también propone al TGF- β como una posible molécula que promueve la migración de las cgp de la corteza a la médula ovárica y la acumulación de fibras de matriz extracelular en ovarios de embriones de pollo de 9 d.i. En este sentido, es necesario profundizar en como se llevan a cabo los mecanismos de la migración por una actividad quimiotáctica de los TGF- β 's.

Finalmente se propone para cada isoforma del TGF- β una función diferente en el desarrollo de el ovario y el testículo del embrión de pollo a los 9 d.i., por lo que sería necesario cuantificar la expresión de los genes y la presencia de RNA mensajeros de dichas isoformas en ambas gónadas para confirmar esta propuesta, así como establecer la ventana de tiempo en la que esta actuando cada isoforma.

XI. LITERATURA CITADA

- Ando, Y. and Fujimoto, T. 1983. Ultrastructural evidence that chick primordial germ cells leave the blood-vascular system prior to migrating to the gonadal anlagen. *Dev. Growth Differ.* 25:345-352.
- Andrews, J., Smith, C. and Sinclair, A. 1997. Sites of estrogen receptor and aromatase expression in the chicken embryo. *Gen and Comp Endocrinol.* 108:181-190.
- Avallet, O., Vigrer, M., Perrard-Saper, M. H. and Saez, J. M. 1987. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 196:575-581.
- Benahmed, M., Morera, A. M., Ghiglieri, C., Tabone, E., Menezo, Y., Hendrick, J. C. and Franchimont, P. 1993. Transforming Growth Factor- β s in the Ovary. *Annu. N. Y. Acad. Sci.* 687:13-19.
- Bogart, M. H. 1987. Sex determination: a hypothesis based on steroid ratios. *J. Theoret. Biol.* 128:349-57.
- Border, W. A. and Noble, N. A. 1995. TGF- β . *Scientific American. Science and Medicine.* January/February. 68-77
- Burt, D.W., Paton, I. R., 1991. Molecular cloning and primary structure of the chicken TGF- β 2 gene. *DNA Cell Biol.* 10:723-34.
- Burt, D. W., Dey, B., Paton, I. R., Morrice, D. R., Law, A. S. 1995. The chicken TGF- β 3 gene: Genomic structure, transcriptional analysis and chromosomal location. *DNA Cell Biol.* 14:111-123.
- Caussanel, V., Tabone, E., Hendrick, J. C., Dauchex, F. and Benahmed, M. 1997. Cellular distribution of TGF- β 1, 2 and 3 and their types I and II receptors during postnatal development and spermatogenesis in the boar testis. *Biol. Reprod.* 56:357-367.
- Clinton, M. 1997. Differentially expressed genes in the developmental chick gonad. En: *First International Symposium on the Biology of Vertebrate Sex Determination.* April 7-11. Honolulu-Hawaii.
- Clinton, M. 1998. Sex determination and gonadal development: a bird's eye view. *The Journal of the Experimental Zoology.* 281:457-465.
- Chegini, N. and Flanders, K. 1992. Presence of transforming growth factor- β and their selective cellular localization in human ovarian tissue of various reproductive stages. *Endocrinology.* 3:1707-1715.
- Cymerman, U., Vera, S., Pece-Barbara, N., Bourdeau, A., White, R. I. Jr., Dunn, J. and Letarte M. 2000. Identification of hereditary hemorrhagic telangiectasia type 1 in newborns by protein expression and mutation analysis of endoglin. *Pediatr Res.* 47:24-35.

- Coucouvanis, E. C., Sherwood, S. W., Carswell, C. C., Spack, E. G., Jones, P. 1993. Evidence that mechanism of prenatal germ cell death in the mouse is apoptosis. *Exp. Cell Res.* 209:238-247.
- Cupp, A. S., Kim, G., and Skinner M. K. 1999. Expression and action of transforming growth factor beta (TGF- β 1, TGF- β 2, and TGF- β 3) during embryonic rat testis development. *Biology of Reproduction.* 60:1304-1313.
- De Felici, M., Dolci, S., Pesce, M. 1992. Cellular and molecular aspects of mouse primordial germ cell migration and proliferation in culture. *Int. J. Dev. Biol.* 36:205-213.
- Demeter-Arlotto, M., Rainey, W. E., Simpson, E. R. 1993. Maintenance and regulation of 17 α -hydroxylase expression by bovine thecal cells in primary culture. *Endocrinology.* 132:1353-58.
- Derynck, R. and Zhang, Y. E. 2003. Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF- β family signaling. *Nature.* 425:577-84.
- Dickson, C., Webster, D., Johnson, H., Millena, A. and Khan, S. 2002. Transforming growth factor- β effects on morphology of immature rat Leydig cells. *Molecular and Cellular Endocrinology.* 195:65-77.
- Dorrington, J. H., Bendell, J. J. and Khan, J. A. 1993. Interactions between FSH, 17- β estradiol and TGF- β regulate growth and differentiation in the rat gonad. *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.* 44:441-447.
- Dorrington, J. H., Chuma, A. V., Bendell, J. J. 1988. TGF- β and FSH promote rat granulosa cell proliferation. *Endocrinology.* 123:353-59.
- Drummond, A., Lee, Minh., Ethier, J., Dyson, M. and Findlay, J. 2002. Expression and Localization of Activin Receptors, Smads, and β glycan to the Postnatal rat ovary. *Endocrinology.* 143:1423-1433.
- Dünker, N. and Kriegelstein, K. 2000. Targeted mutations of transforming growth factor- β genes reveal important roles in mouse development and adult homeostasis. *Eur. J. Biochem.* 267:6982-6988.
- Fargeix, N., Didier, E. and Didier, P. 1981. Early sequential development in avian gonads. *Rep. Nutr. Develop.* 21:479-96.
- Feng, P., Catt, J. and Knecht, M. 1988. TGF- β stimulates meiotic maturation of the rat oocyte. *Endocrinology.* 122:181-86.
- Fournet, N., Weitsman, S. R., Zachow, R. J. and Magoffin, D. R. 1996. TGF- β inhibits ovarian 17 α hidroxylase activity by a direct non competitive mechanism. *Endocrinology.* 137:166-174.
- Fujioka, T., Soh, T., Fujihara, N. and Hattori, M. 2004. Function of TGF- β 2 in the Growth of Chicken Primordial Germ Cells and Germinal Ridge Stroma cells during Embryonic Development. *Journal of Exp Zool.* 301A: 290-296.
- Gasc, J. M. 1980. Estrogen target cells in gonads of the chicken embryo during sexual differentiation. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 55:331-42.

- Gautier, C., Levacher, C., Avallet, O., Vigier, M., Rouiller-Fabre, V., Lecerf, L., Saez, J. and Habert, R. 1994. Immunohistochemical localization of TGF β 1 in the fetal and neonatal rat testis. *Mol. Cell. Endocrinol.* 99:55-61.
- Gautier, C., Levacher, C., Saez, J. and Habert, R. 1997^a. Transforming Growth Factor- β 1 inhibits steroidogenesis in dispersed fetal Testicular cells in culture. *Mol Cell Endocrinol.* 131:21-30.
- Gautier, C., Levacher, C., Saez, J. and Habert, R. 1997^b. Expression and regulation of Transforming Growth Factor- β 1 mRNA and protein in rat testis in vitro. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 236:135-139.
- Gilbert, F. S. 2003. *Developmental Biology*. 7^a ed. Sunderland. Mass. Sinauer Associates Inc. Cap: 17. Sex determination. 547-572 pp.
- Ginsburg, M. and Eyaldi-Gilaldi, H. 1986. Temporal and spatial aspects of the gradual migration of primordial germ cells from the epiblast into the germinal crescent in the avian embryo. *J. Embryo Exp. Morph.* 95:53-71.
- Goddard, I., Hendrick, J. C., Benahmed, M. and Morera, A. M. 1995. TGF- β receptor expression in cultured porcine granulosa cells. *Mol. Cell. Endocrinol.* 115:207-13.
- Goddard, I., Bourai, M., Keramidas, M., Hendrick, J. C., Feige, J. J. and Benahmed, M. 2001. TGF- β receptor types I and II in cultured porcine Leydig cells: expression and hormonal regulation. *Endocrinology.* 41:2008-79.
- Godin, I. and Wylie, C. C. 1991. TGF- β 1 inhibits proliferation and has a chemotrophic effect on mouse PGC in culture. *Development.* 113:1451-57.
- Hamburger V, and Hamilton, H. L. 1951. A series of normal stages in the development of the chick embryo. *J. Morphol.* 88:49-92.
- Hardisty, M. W. 1984. Primordial germ cells and the vertebrate germ line. In: the vertebrate ovary. Jones (ed) Plenum Publishing Corp. Cap. 1. Pp: 1-46.
- Harlow, C. R., Davidson, I., Burns, K. H., Yan, C., Matzuk, M. H. and Hillier, S. G. 2002. FSH and TGF- β superfamily members regulate granulosa cell connective tissue growth factor gene expression in vitro and in vivo. *Endocrinology.* 143: 3316-25.
- Hattori, M., Furuta, H., Hiyama, Y., Kato, Y. and Fujihara, N. 2002. Prominent expression of transforming growth factor-beta2 (TGF- β 2) gene in the chicken embryonic gonad as revealed by suppressive subtraction cloning. *Gen. Comp. Endocrinol.* 125:311-316.
- Hutchinson, L. A., Findlay, J. K., De Vos, F. L. and Robertson, D. M. 1987. Effects of bovine inhibin, TGF- β and bovine activin. A granulosa cell differentiation. *Biochem Biophys Res Commun.* 146:1405-1412.
- Hutson, J. M., Ikawa, H. and Donahue, P. K. 1982. The ontogeny of Müllerian Inhibiting Substance in the gonads of chicken. *J. Pediatr. Surg.* 16:822.

- Imataka, H., Susuki, K., Inano, H., Kahmoto, K. and Tamaoki, B. 1989. Biosynthetic pathways of testosterone and estradiol 17- β in slices of the embryonic ovary and testis of the chicken (*Gallus domesticus*). *Gen Comp Endocrinol.* 73:69-79.
- Jakowlew, S. B., Dillard, P. J., Sporn, M. B. and Roberts, A. B. 1988. Complementary deoxyribonucleic acid cloning of a messenger ribonucleic acid encoding TGF- β 4 from chicken embryo chondrocytes. *Mol. Endocrinol.* 2:1186-1195.
- Josso, N., Picard, J. and Tran, D. 1997. The antimullerian hormone. *Recent Prog. Horm. Res.* 33: 117-63.
- Josso, N. and Di Clemente, N. 1999. TGF- β Family Members and Gonadal Development. *TEM.* 10:216-222.
- Kanda, I., Yasuhisa, A., Osamu, T. and Takaa, M. 2000. Expression of cytochrome p450 cholesterol side chain cleavage and 3 β -hydroxysteroid deshydrogenase during embryogenesis in chick adrenal and gonads. *Gen. Comp. Endocrinol.* 118:96-104.
- Kent, J., Wheatley, S., Andrews, J. E., Sinclair, A. H. and Koopman, P. 1996. Specific role for Sox9 in vertebrate sex determination. *Development.* 122:2813-22.
- Kim, C. and Schumberg, D. W. 1989. The production of TGF- β activity by rat granulosa cells cultures. *Endocrinology.* 124:1345-51.
- Kuwana, T. 1993. Migration of avian primordial germ cells toward the gonadal anlage. *Develop. Growth and Differ.* 35:237-43.
- Knight, P. G. and Glister, C. 2003. Local roles of TGF- β superfamily members in the control of ovarian follicle development. *Animal Reproduction Science.* 78:165-182.
- Law, A. S., Burt, D. W. and Armstrong, D. G. 1995. Expression of transforming growth factor-beta mRNA in chicken ovarian follicular tissue. *Gen. Comp. Endocrinol.* 98:227-233.
- Le Magueresse-Battistoni, M., Morera, A. M., Goddard, I. and Benahmed, M. 1995. Expression of mRNAs for Transforming Growth Factor- β Receptors in the rat testis. *Endocrinology.* 6:2788-2791.
- Lerner, A. A., Salomone, D. F., Chiappe, M. E. and Boranao, J. L., 1995. Comparative studies between freshly isolated and spontaneously immortalized bovine granulosa cells: protein secretion, steroid metabolism and responsiveness to growth factor. *J. Cell. Physiol.* 164:395-403.
- Lewis, K. A., Gray, P. C., Blount, A. L., Mc Conell, L. A., Wiater, E., Bilezikjian, L. M. and Vale, W. 2000. Betaglycan binds inhibin and can mediate functional antagonism of activin signalling. *Nature.* 404:411-414.
- Linn, T., Blaisdell, J. and Haskell, J. F. 1987. Transforming growth factor-beta inhibits Leydig cell steroidogenesis in primary culture. *Biochem Biophys Res. Commun.* 146:387-344
- Liu, J., Kuulasmaa, T., Kosma, V. M., Butzow, R., Vanttinen, T., Hyden-Gransk, C. and Voutilainen, R. 2003. Expression of betaglycan, and inhibin coreceptor in normal human ovaries

- and ovarian sex cord-stromal tumors and its regulation in cultured human granulosa luteal cells. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 88:5002-8.
- López-Casillas, F., Payne, H. M., Andres, J. L. and Massagué, J. 1994. Betaglycan can act as dual modulator of TGF- β access to signaling receptors: mapping of ligand binding and GAG attachment sites. *J. Cell. Biol.* 124:557-568.
 - López-Casillas, F., 1998. El lado oscuro y el lado brillante del TGF- β . *Mensaje Bioquímico*. Vol. XXII. 137-161.
 - Magoffin, R. A., Hubert-Leslie, D. and Zachow, R. J. 1995. Estradiol 17- β , IGF-I and LH inhibits secretion of TGF- β by rat ovarian theca-interstitial cells. *Biol. Reprod.* 53:627-635.
 - Massagué J. 1990. The transforming growth factor- β family. *Annu. Rev. Cell. Biol.* 6:597-641.
 - Massagué J. 1998. TGF- β signal transduction. *Annu. Rev. Biochem.* 67:753-791.
 - Massagué J., Blain, S., and Lo R. 2000. TGF β Signaling in Growth Control, Cancer, and Heritable Disorders. *Cell*. Vol. 103:295-309.
 - Massagué J. and Chen. 2000. Controlling TGF- β signaling. *Genes and Development*. 14:627-644.
 - Mather, J. P., Moore, A. and Li, L. H. 1997. Activins, inhibins and follistatins: further thoughts on a growing family regulators. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 215:209-222.
 - Mc Conell, L. A., Leal, A. and Vale, W. 2002. The distribution of Betaglycan Protein and mRNA in Rat Brain, Pituitary, and Gonads: Implications for a Role for Betaglycan in Inhibin-Mediated Reproductive Functions. *Endocrinology*. 143:1066-1075.
 - Mc Laughlin, D. T., Hutson, J. M. and Donahue, P. K. 1983. Specific estradiol binding in embryonic müllerian ducts: a potential modulator of regression in male and female chick. *Endocrinology*. 113:141-45.
 - McNatty, K. P., Fidler, A. E., Juengel, J. L., Quirke, L. D., Smith, P. R., Heath, P., Lundy, T., O'Connell, A. and Tisdall, D. J. 2000. Growth and paracrine factors regulating follicular formation and cellular function. *Mol. Cell. Endocrinol.* 163:11-20.
 - Miro, F. and Hillier, S. G. 1992. Relative effects of activin and inhibin on steroid hormone synthesis in primate granulosa cells. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 75:1556-1561.
 - Morais da Silva, S., Hacker, A., Harley, V., Goodfellow, P., Swain, A. and Lovell-Badge, R. 1996. Sox9 expression during gonadal development implies a conserved role for the gene in testes differentiation in mammals and birds. *Nat. Gen.* 14:62-68.
 - Nakabayashi, O., Kikuchi, H., Kikuchi, T. and Mizuno, S. 1998. Differential expression of genes for aromatase and estrogen receptor during the gonadal development in chicken embryos. *J. Mol. Endocrinology*. 20:193-202.
 - Nomura, O., Nakabayashi, O., Katsuhiko, N., Horoshi, Y. and Shigeki, M. 1999. Expression of five steroidogenic genes including aromatase gene at early developmental stages of chicken males and female embryos. *J. Steroid Biochem and Mol. Biol.* 71:103-109.

- Olaso, R., Gautier, C., Levacher, C., Durand, P., Saez, J. and Habert, R. 1997. Immunohistochemical localization of transforming growth factor- β 2 in the fetal and neonatal rat testis. *Mol. Cell. Endocrinology*. 126:165-172.
- Olaso, R., Pairault C., Boulogne, B., Durand, P. and Habert R. 1998. Transforming Growth Factor- β 1 and β 2 Reduce the Number of Gonocytes by Increasing Apoptosis. *Endocrinology*. 2:733-740.
- Oreal, E., Preiau, C., Mattei, M. G., Josso, N., Picard, J. Y., Carre-Eusebe, D. and Magre, S. 1998. Early expression of AMH in chicken embryonic gonads precedes testicular Sox9 expression. *Dev Dynamics*. 212:522-532.
- Park, T. S. and Han, J. Y. 2000. Derivation and characterization of pluripotent embryonic germ cells in chicken. *Mol. Reprod. Dev*. 56:475-82.
- Pedernera, E., Solis, L., Peralta, I. and Velázquez, E. N. 1999. Proliferative and steroidogenic effect of follicle-stimulating hormone during chick embryo gonadal development. *Gen. Comp. Endocrinol*. 116:213-220.
- Petritsch, C., Beug, H., Balman, A., Oft M. 2000. TGF- β inhibits p70 S6 kinase via protein phosphatase 2A to induce G1 arrest. *Genes Dev*. 14:3093-3101.
- Postlethwaite, A. E., Keshi-Oja, J., Moses, H. L. and Kang, A. H. 1987. Stimulation of the chemotactic migration human fibroblast by TGF- β . *J. Exp. Med*. 165:251-256.
- Richards, A., Enders, G. and Resnick J. 1999. Activin and TGF- β Limit Murine Primordial Gem Cell Proliferation. *Developmental Biology*. 207:470-975.
- Roberts, A. J. and Skinner, M. K. 1991. TGF α and TGF- β diferentially regulate growth and steroidogenesis of bovine thecal cells during antral follicle development. *Endocrinology*. 129:2041-2048.
- Roy, S. R. 1993. EGF and TGF- β modulation of FSH-induced deoxyribonucleic acid sintesis in hamster pre-antral and early antral follicles. *Biol. Reprod*. 48:552-567.
- Sakai, Y. and Barnes, D. 1991. Assays of astrocyte differentiation-inducing activity of serum and TGF- β . *Method Enzimol*. 198:337-340.
- Saragueta, P. E., Lanuza, G. M. and Baranau, J. L. 2002. Autocrine rol of TGF- β 1 on rat granulose cell proliferation. *Biol. Reprod*. 66:1862-68.
- Schuster, N. and Krieglstein, K. 2002. Mechanisms of TGF-beta-mediated apoptosis. *Cell Tissue Res*. 307:1-14.
- Shimada, K. 1998. Gene expression of steroidogenic enzymes in chicken embryonic gonads. *J. Exp. Zool*. 281:450-56.
- Siegel, P., and Massagué, J. 2003. Cytostatic and apoptotic actions on TGF- β in homeostasis and cancer. *Nature Reviews*. Vol.3. 801-820.
- Skinner, M. and Moses, H. 1989. TGF- β gene expression and action in the seminiferous tubule: Peritubular cell-Sertoli cell interactions. *Mol. Endocrinol*. 3:625-633.

- Skinner, M. K., Keiski-Oja, J., Osten, K. G. and Moses, H. L. 1987. Ovarian thecal cells produce TGF- β which can regulate granulosa cell growth. *Endocrinology*. 121:786-792.
- Smith, C. A., Andrews, J. E. and Sinclair, A. H. 1997. Gonadal sex differentiation in chicken embryos; expression of estrogen receptor and aromatase genes. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 60:295-302.
- Smith, C. A. and Sinclair, H. A. 2004. Sex determination: insights from the chicken. *Bioessays*. 26:120-132.
- Tanabe, Y., Saito, N. and Nakamura, T. 1986. Ontogenetic steroidogenesis by testes, ovary and adrenals of embryonic and postembryonic chickens (*Gallus domesticus*). *Gen and Comp. Endocrinol.* 63:456-63.
- Teerds, K. and Dornington, J. 1992. Immunohistochemical localization of transforming growth factor- β 1 and β 2 during follicular development in the adult rat ovary. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 84:R7-R13.
- Teerds, K. and Dornington, J. 1993. Localization of transforming growth factor- β 1 and β 2 during testicular development in the rat. *Biol. Repro.* 48:40-45.
- Teng, C. S. and Teng, C. T. 1975. Studies on sex-organ development isolation and characterization of oestrogen receptor from chick müllerian duct. *J. Biochem.* 150:185.
- Vilchis-Landeros, M., Montiel, J., Mendoza, V., Mendoza-Hernández, G. and López-Casillas F. 2001. Recombinant soluble betaglycan a potent and isoform-selective TGF- β neutralizant agent. *Biochem J.* 355:215-222.
- Villalpando, I., Sánchez-Bringas G., Sánchez-Vargas, I., Pedernera, E. and Villadan-Monroy, H. 2000. The p450 aromatase gene is asymmetrically expressed in a critical period for gonadal sexual differentiation in the chick. *General and Comparative Endocrinology*. 117:325-334.
- Wahl, S. M., Hunt, D. A., Wakefield, L. M., McCartney-Francis N., Wahl, L. M., Roberts, A. B. and Sporn, M. B. 1987. TGF- β induces monocyte chemotaxis and growth factor production. *Proc. Natn. Acad. Sci.* 84:5788-92.
- Wartenberg, H., Lenz, E. and Schweikert, U. 1992. Sexual differentiation and the germ cell in sex reversed gonads after aromatase inhibition in the chicken embryo. *Andrologia*. 24:1-6.
- Wotton, D. and Massagué, J. 2001. Smad Transcriptional Corepressors in TGF- β Family Signaling. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 254:145-164.
- Woods, J. E. and Erton, L. H. 1978. The synthesis of the estrogens in the gonads of the chick embryo. *Gen. Comp. Endocrinol.* 36:360-370.
- Ying, S. Y., Becker, A., Ling, N., Veno, N. and Guillemin, R. 1986. Inhibin and TGF- β have opposite modulating effects on the FSH induced aromatase activity of cultured rat granulosa cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 136:969-975.

- Yoshida, K., Shimada, K. and Saito, N. 1996. Expresion of P450 17 α -hydroxylase and p450 aromatase genes in the chicken gonad before and after sexual differentiation. Gen. Comp. Mol. Biol. 102:233-240.
- Zhang, Z. W., Findlay, J. K., Carson, R. S., Herington, A. C. and Burger, H. G. 1988. TGF- β enhances basal and FSH-stimulated inhibin production by rat granulosa cells in vitro. Mol. Cell. Endocrinol. 58:161-166.