



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE CIENCIAS

**PARTICIPACION DE LA HORMONA FOLICULO ESTIMULANTE
(FSH) EN ALGUNAS VIAS DE SEÑALIZACION INTRACELULAR
EN TESTICULOS EMBRIONARIOS DE AVES**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADEMICO DE:

DOCTOR(A) EN CIENCIAS

P R E S E N T A

M. en C. IRMA PERALTA DELGADO

DIRECTOR DE TESIS: DR. PEDRO NICOLAS VELAZQUEZ

MEXICO D.F.

2006



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.


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

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 7 de noviembre del 2005, se acordó poner a su consideración el siguiente jurado para el examen de DOCTORA EN CIENCIAS de la alumna **PERALTA DELGADO IRMA** con número de cuenta **83080092** y número de expediente **3951144**, con la tesis titulada: **"Participación de la hormona folículo estimulante (FSH) en algunas vías de señalización intracelular en testículos embrionarios de aves"**, bajo la dirección del Dr. Pedro Nicolás Velázquez.

Presidente:	Dr. Marco Antonio Juárez Oropeza
Vocal:	Dra. Rosenda Isabel Peñaloza Espinosa
Vocal:	Dr. René de Jesús Cárdenas Vázquez
Vocal:	Dra. Marcela Esperanza Aguilar Morales
Secretario:	Dr. Pedro Nicolás Velázquez
Suplente:	Dra. Marta Catalina Romano Pardo
Suplente:	Dr. Luis Felipe Jiménez García

Sin otro particular, quedo de usted.

Atentamente
"POR MI RAZA HABERÁ EL ESPÍRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 17 de mayo del 2006.


Dr. Juan Núñez Farfán
Coordinador del Programa

c.c.p. Expediente del interesado

RECONOCIMIENTO

Este trabajo de tesis fue realizado en el departamento de Biología Celular y Tisular de la Facultad de Medicina de la UNAM, bajo la dirección del Dr. en C. Pedro Nicolás Velázquez. El proyecto fue realizado por el apoyo económico de DGAPA (PAPIIT IN221502-3 y PAPIIT IN213306-3)

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

A los miembros del jurado:

DR. MARCO ANTONIO JUÁREZ OROPEZA

DRA. ROSENDA ISABEL PEÑALOZA ESPINOSA

DR. RENE DE JESÚS CARDENAS VAZQUEZ

DRA. MARCELA ESPERANZA AGUILAR MORALES

DR. PEDRO NICOLAS VELAZQUEZ.

DRA. MARTA CATALINA ROMANO PARDO

DR. LUIS FELIPE JIMÉNEZ

Por la revisión del manuscrito y las valiosas aportaciones que contribuyeron a mejorar este trabajo

Al Pas. de Biol.. GUILLERMO ESPINOSA VILLANUEVA por su apoyo en la elaboración de los cortes histológicos para inmunohistoquímica.

AGRADECIMIENTOS

A ti. Por permitirme llegar a este momento de mi vida

A mi madre CARMEN DELGADO, por su apoyo incondicional y por el gran cariño mostrado durante toda mi vida, este trabajo es un logro alcanzado con el esfuerzo de las dos.

A mi Padre, con cariño y nostalgia

A mis hermanos: SARA, MEMI, DAYNA, SERGIO, RAFAEL, ARMANDO, JORGE, ARTURO Y EDUARDO.

A todos mis sobrinos por su gran cariño

A PEDRO por su amistad

A la maestra EMMA BRACAMONTES por su apoyo

A mis amigas LETI, NORMA Y ANDREA.

A TODOS AQUELLOS QUE FORMAN PARTE DE MI VIDA

***Dedico este trabajo a mi mamá Carmen Delgado
con todo mi amor y admiración.***



INDICE

Resumen

Abstract

INTRODUCCION	1- 29
Diferenciación Gonadal	2- 10
Regulación Endócrina	10- 12
Receptores a FSH, LH y hCG	12- 14
Proliferación Celular	14- 16
• Control del ciclo celular	16- 17
• Puntos de Control y de Restricción	17- 19
• Proliferación Celular en las Gónadas	19- 22
Señalización Intracelular.....	23- 29
Justificación.....	29
Objetivos.....	30
Materiales y Métodos.....	31- 34
Resultados.....	35- 41
Discusión	42- 45
Conclusiones.....	46
Bibliografía.....	47- 56
Apéndice.....	57- 58

RESUMEN

La participación de las hormonas luteinizante (LH) y folículo estimulante (FSH) en la fisiología del aparato reproductor, ha sido descrita ampliamente en la mayoría de los vertebrados.

Durante el desarrollo gonadal, la FSH interviene en la diferenciación de las células granulosas de los folículos ováricos y de las células de Sertoli de los túbulos seminíferos en el testículo, regulando la proliferación celular y la síntesis de hormonas esteroides en mamíferos adultos (Robker y Richards, 1998), estas hormonas gonadotropas, participan en la esteroidogénesis y la proliferación celular en gonadas embrionarias de aves antes de que se establezca el sistema endócrino (Velázquez y cols. 1997; Pedernera y cols. 1999). La participación de la FSH en la regulación de la fisiología gonadal está relacionada con la activación de diferentes señales intracelulares dentro de las que destaca la vía del AMPc. La regulación de las funciones gonadales por la FSH y la LH, se realiza por la activación de las proteínas G y la consiguiente formación de AMPc que a su vez, induce la activación de la proteína cinasa dependiente de AMPc o PKA. Estudios recientes han logrado establecer que la activación de la vía AMPc-PKA dependiente de FSH, no es la única utilizada por esta gonadotropina, al demostrarse la existencia de rutas de señalización intracelular independientes de PKA, que incluyen las vías de la fosfolipasa A, de calcio-calmodulina y la MAPK entre otras, relacionadas con la proliferación y diferenciación celular, así como con procesos metabólicos de las células germinales en mamíferos (Scobey, 2001; González-Robayna y cols. 2000; Richards, 2001). En las aves al igual que en los mamíferos, la FSH participa de manera importante en la división de células gonadales de embriones de pollo de diferentes edades (Velázquez y cols. 1997; Pedernera y cols. 1999) y estimula la producción de AMPc (Richards, 2001) y PKA. Sin embargo, se desconoce si otras vías independientes de AMPc-PKA, como en los mamíferos, están involucradas en la división celular durante el desarrollo embrionario de las gónadas embrionarias de las aves.

Los objetivos del presente trabajo fueron determinar el efecto proliferativo de la FSH en testículos embrionarios de pollos de 18 días de incubación, las probables vías de señalización intracelular utilizadas por esta hormona para

estimular la división celular, así como determinar las subpoblaciones testiculares efectoras de esta hormona gonadotropa.

Para cumplir con nuestros objetivos se realizaron cultivos de células testiculares disociadas sobre membranas de policarbonato, flotando sobre medio condicionado (DMEM) adicionado con FSH o con fármacos reguladores de la actividad de las cinasas de residuos de tirosina o de serina treonina durante 60 horas; se agregó ^3H -timidina al medio de cultivo como un indicador de la proliferación celular. Además se realizaron cultivos de fragmentos testiculares adicionados con FSH y BrdU para determinar por inmunofluorescencia, la proliferación celular e identificar las células efectoras de la FSH.

Los resultados de la curva dosis-respuesta mostraron que la dosis media (ED_{50}) para la FSH fué de 0.625 UI/ml; mientras que se observó un incremento en la incorporación de ^3H -timidina en los grupos adicionados con FSH desde las 24 horas de cultivo, notándose un incremento estadísticamente significativo con respecto al grupo control, entre las 36 y 60 horas de cultivo. El tratamiento con los diferentes compuestos reguladores de la actividad de cinasas de residuos de tirosina (PTK) y de serina/treonina, produjo un incremento estadísticamente significativo en los grupos tratados con herbimicina A (inhibidor de PTK), mientras que la FSH humana de alta pureza (hFSH) y FSH recombinante (rhFSH) estimularon significativamente la proliferación celular. Compuestos como el AMPc, la forskolina (reguladores de PKA), el éster de forbol (PMA) (regulador de PKC) y los reguladores de PTK lavendustina y genisteina no produjeron diferencias significativas en la incorporación de timidina tritiada con respecto a los grupos controles. La mezcla de reguladores de cinasas con FSH, produjo un incremento en la proliferación celular, en todos los grupos experimentales, siendo esta diferencia estadísticamente significativa en los grupos tratados con forskolina, genisteina y PMA.

En los cortes semifinos de testículos embrionarios procesados por la técnica inmunocitoquímica de BrdU, se observó una mayor cantidad de células positivas en los grupos tratados con herbimicina A y FSH, confirmando los resultados obtenidos con la técnica de incorporación de ^3H -timidina.

Nuestros resultados sugieren que probablemente la vía de señalización que involucra cinasas de residuos de tirosina, sea utilizada como una vía de inhibición de la proliferación celular al observarse que un inhibidor de esta vía (herbimicina A), produce un incremento en la proliferación celular en esta etapa de desarrollo embrionario, mientras que otras vías comúnmente reconocidas como dependientes de FSH, tal es el caso de la vía AMPc-PKA, al parecer en esta edad, no tienen un papel importante en el mecanismo de división celular en testículos embrionarios de aves.

Abstract

The participation of luteinizing hormone (LH) and follicle stimulating hormone (FSH) in the physiology of the reproductive system has been widely studied in vertebrates.

FSH is involved in the differentiation of the granulosa cells of the ovarian follicle and Sertoli cells of the seminiferous tubule in the testis.. This gonadotropin is also involved in the control of cell proliferation and steroid hormone synthesis in mammalian adult life (Robker and Richards, 1998). FSH is important in the regulation of cell proliferation and steroidogenesis in the chick embryo (Velazquez et al, 1997; Pedernera et al, 1999). It has been shown that FSH participates in adult gonadal physiology throughout the activation of different signal pathways, mainly those that involved cAMP. The process involves also the activation of G proteins, cAMP and activation of the cAMP dependent protein kinase (PKA). Recent studies have demonstrated that PKA is not the only signaling pathway used by FSH. In fact, phospholipase A, calcium-calmodulin and MAP kinase signalling pathways have been related to cell proliferation and differentiation as well as with metabolic processes in mammalian germinal cells (Scobey, 2001; Gonzalez-Robayna et al, 2000; Richards 2001). FSH also has an important role in the gonadal cell proliferation of the chick embryo (Velázquez et al, 1997; Pedernera et al, 1999) and stimulates the production of cAMP and PKA in mammalian granulosa cells (Richards, 2001). However, the participation of signal pathways different from that of cAMP-PKA have not been investigated in the avian embryo gonadal development.

The aims of the present study were to study the role of FSH in the *in vitro* proliferation of chick embryo testis cells, as well as the signalling pathways involved, and to determine which were the target cell subpopulations for this hormone.

For this purpose, 18 day-old chick embryo testis cells were dissociated and cultured for 60h on polycarbonate membranes. The culture media was DMEM with or without FSH or different regulators of the activity of tyrosine or serine/treonine kinases. In some experiments the regulators were added simultaneously with FSH. ³H-thymidine incorporation was used as an indicator

of DNA synthesis. In addition, fragments of chick embryo testis were cultured in the presence or absence of FSH or herbimycin A, and BrdU was added to identify the proliferating cell subpopulations.

Results: FSH dose-response experiments showed that ED50 for the hormone was 0.625 IU/ml. The effect of FSH on ^3H -thymidine incorporation began at 24h, and the increment was significant at 36h and 60h of culture. The high pure human FSH (hFSH) as well as the human recombinant FSH (hrFSH) significantly stimulated ^3H -thymidine incorporation to testicular cells, whereas the cells treated with the PTK inhibitor herbimycin A, increased the ^3H -thymidine uptake. On the other hand, regulators of PKA like cAMP and forskolin, as well as PKC regulators as phorbol ester did not affected proliferation estimated by ^3H -thymidine incorporation. The presence of PTK regulators lavendustin and genistein did not modify ^3H -thymidine uptake either. The addition of FSH plus the kinase regulators resulted in an increased ^3H -thymidine incorporation to the testis cells with all the compounds investigated. However, these increments were statistically significant only when FSH was added simultaneously with forskolin, genistein or PMA.

The BrdU technique showed a high signal in the cells treated with FSH or with herbimycin A. These data confirmed the results obtained using ^3H -thymidine uptake.

In summary, an inhibitor of tyrosine kinase like herbimycin A, induced an increment in chick embryo testis cell proliferation, which strongly suggests that tyrosine kinase signalling pathway functions inhibiting the proliferation of these cells. Our results also showed that the FSH-dependent signalling pathways, as the cAMP-PKA pathway, have no a significant role during the embryonic stage of chick embryo testis.

INTRODUCCION

En el testículo de los vertebrados se sintetizan hormonas, factores de crecimiento y algunas proteínas que regulan las funciones de este órgano durante el desarrollo embrionario y en la etapa adulta; algunas hormonas, como los andrógenos y la hormona antimülleriana, participan activamente junto con el gen *Sry* en la diferenciación de la gónada masculina. Durante la diferenciación gonadal, se desencadenan distintos procesos como la proliferación y la diferenciación celular, así como la síntesis de hormonas esteroides que son regulados endócrinamente por las hormonas hipofisarias, FSH (hormona folículo estimulante) y LH (hormona luteinizante) sintetizadas en la adenohipófisis, bajo la acción de factores liberadores producidos a nivel del hipotálamo. Ambas hormonas regulan directa o indirectamente las funciones que realizan las células somáticas y sexuales que constituyen tanto el ovario como el testículo. La FSH, interviene en el desarrollo, crecimiento y maduración de las células de Sertoli; estimula la síntesis de hormonas esteroides (particularmente 17β -estradiol) y de cerca de 100 proteínas, entre las que se encuentra el activador del plasminógeno, que estimula el paso de las espermatogonias a través de la barrera hematotesticular durante la espermatogénesis (Knobil y Neill, 1988); en este proceso de maduración celular, la FSH tiene un papel secundario, debido a que la testosterona producida por las células de Leydig, estimula la maduración y diferenciación de las células sexuales durante la espermatogénesis (Heckert y Griswold, 1993). Por otra parte, la LH regula el desarrollo y la maduración de las células de Leydig (Huhtaniemi 1994; Saéz 1994) estimulando la secreción de testosterona, necesaria para la diferenciación gonadal y para la nutrición de las células germinales a través de su acción sobre las células peritubulares y la consiguiente formación de lactato por las células de Sertoli (Norton y cols. 1994; Mullaney y cols. 1994). La regulación de la actividad biosintética ejercida por la FSH y la LH sobre sus células blanco, en el ovario y en el testículo, se realiza por la presencia de receptores a estas hormonas desde etapas muy tempranas del desarrollo embrionario en aves (Woods y cols. 1991).

Sin embargo, se ha demostrado que la síntesis de hormonas esteroides durante las primeras etapas del desarrollo, no se encuentra regulada por estas

hormonas hipofisiarias, la síntesis de 17β -estradiol y andrógenos por ejemplo, se inicia desde los 3.5 días de desarrollo en aves (Weniger, 1968, 1971; Woods y Podczaski, 1974; Woods y Erton, 1978) anticipadamente al establecimiento del eje hipotálamo hipófisis-gónada, el cual se establece hasta el día 13.5 de incubación en machos y 14.5 en hembras (Gilbert, 1971; Woods y cols. 1983). Una vez unidas a receptores específicos en sus células blanco, la FSH y LH desencadenan un sistema de señales intracelulares que culmina con la división y diferenciación celular, así como la síntesis de hormonas esteroides sexuales. Al formarse el complejo hormona-receptor, se estimula un cambio conformacional en ciertas proteínas que se encuentran en la membrana celular, estas moléculas conocidas como proteínas G, son heterotrímeros formados por las subunidades α , β , y γ , la subunidad α estimula a la adenilato ciclasa, con la consecuente formación de AMPc (las subunidades β y γ al parecer no intervienen en este proceso) (Soria y Arias, 1997), posteriormente se activa la proteína cinasa dependiente de AMPc, la PKA, estimulándose la secreción de progesterona y la síntesis de enzimas esteroideogénicas en células de la granulosa de mamíferos (Shinohara y cols. 1985). La acción de la FSH y la LH sobre la PKA, a través de la formación de AMPc, aún se encuentra en discusión, se han encontrado pocos genes que son regulados por estas hormonas hipofisiarias que posean sitios comunes para el elemento regulador de AMPc conocido como CRE, el cual se une a CREB, que es miembro de una familia de factores de transcripción (Richards, 1994).

DIFERENCIACION GONADAL

La diferenciación sexual en los diferentes grupos de vertebrados presenta pequeñas variaciones entre ellos; en los mamíferos, los machos constituyen al sexo heterogamético, ya que presentan un cromosoma X y un cromosoma Y, mientras que las hembras son homogaméticas, XX (Zarkower, 2001), es así que durante la fecundación, el espermatozoide aporta un cromosoma X o Y al ovocito estableciéndose el sexo genético del cigoto (Carlson, 1994). En el caso de las aves, las hembras son heterogaméticas (ZW), por lo que ellas determinan el sexo genético del cigoto (Zarkower, 2001). Una vez que se realiza la fecundación, se desencadenan diversos mecanismos de proliferación

y diferenciación celular que tienen como objetivo principal el establecimiento del patrón básico del cuerpo del embrión, dentro del cual se encuentra la diferenciación gonadal.

La presencia de células con el par de cromosomas XY, desencadena cambios en la morfología de las crestas urogenitales, formadas a partir de mesodermo intermedio, que van a diferenciarse en el sistema urinario y el sistema genital. Del tejido de estas estructuras se originarán las células somáticas del testículo (Sertoli, Leydig, peritubulares, etc.) y del ovario (granulosas y tecales). Inicialmente para la diferenciación del tejido gonadal es importante la presencia de elementos reguladores de la diferenciación tales como el factor Wt1 (tumor de Wilms), factor esteroideogénico (Sf1), proteína 1 del homeobox LIM (lim1 también llamada Lhx1), proteína 9 del homeobox LIM (lim 9) y genes M33 (Zarkower, 2001). Todos estos factores llevan al tejido de la cresta urogenital a que se reorganice y se conforme una estructura cuya morfología no indica aún si se trata de ovario o de testículo y que se denomina gónada indiferenciada; en este momento el tejido gonadal tiene dos opciones, una puede diferenciarse hacia testículo o bien, puede diferenciarse hacia ovario. La diferenciación hacia testículo es desencadenada por la presencia del gen SRY y de otros determinantes testiculares como SOX9 (*high mobility group* (HMG), box-9), (Harley y cols. 2003) en el caso de los mamíferos. En las aves y otros vertebrados como los reptiles, SOX9, parece no ser un gen determinante de la diferenciación testicular y el gen Sry está ausente en estos grupos de vertebrados. En las aves, reptiles, peces y mamíferos se ha demostrado la expresión del gen Dmrt1 en las crestas urogenitales en etapas muy tempranas del desarrollo embrionario (Raymond y cols. 1999 a y b; Smith y cols. 1999; Moniot y cols. 2000; Kettlewell y cols. 2000; Marchand, 2000), este gen en humanos “mapea” un intervalo corto del cromosoma 9 mientras que en las aves, que tienen una determinación sexual ZZ/ZW, este gen “mapea” al cromosoma Z, que es muy similar en secuencia y organización al cromosoma 9 de los humanos. En ambos casos, se ha determinado que se requieren dos copias de este gen para la diferenciación testicular (Raymond y cols. 1999 a y b).

En el caso del ovario se desconoce si existen genes comparables al gen Sry del cromosoma Y, sin embargo el gen Dax1 (perteneciente a una subfamilia de

receptores nucleares) parece actuar como un gen “anti-testicular” y Wnt4 suprime la diferenciación de las células de Leydig en el ovario (Zarkower,2002). (fig. 1)

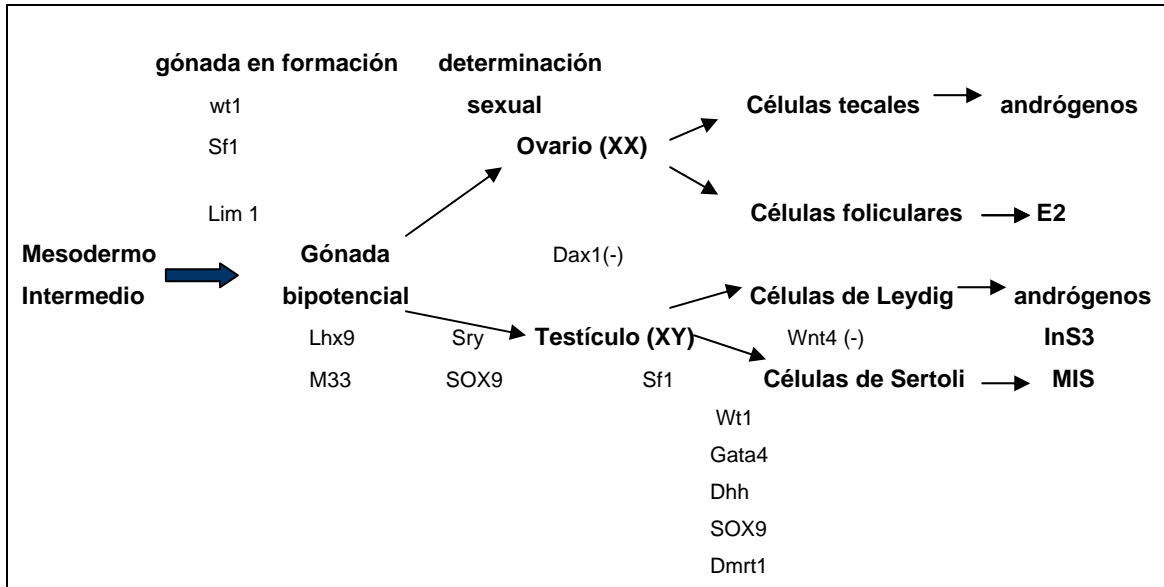


Figura 1. En el siguiente esquema se muestran los genes involucrados en la determinación sexual de los mamíferos. La formación de las gónadas requiere de genes como el Wt1 (tumor de Wilms-1), Sf1 y Lim1 quienes determinan la reorganización de las crestas urogenitales y se forma una gónada indiferenciada (gónada bipotencial). Esta estructura comienza a diferenciarse hacia testículo o hacia ovario dependiendo de la acción del gen Sry y de SOX9 en embriones XY. En el caso del ovario, se desconoce la contraparte del Sry; sin embargo el gen Dax1, al parecer actúa como un factor “anti-testicular” y el Wnt4 inhibe la diferenciación de las células de Leydig en el ovario. Una vez que se lleva a cabo la determinación sexual en los machos, diferentes genes, incluyendo Sf1, Wt1, GaTa4 (proteína binding-GATA), Dhh (sonic hedgehog), Sox9 y Dmrt1 regulan la diferenciación de los distintos tipos celulares del testículo. Las células testiculares de Sertoli secretan la sustancia antiMülleriana (MIS o también llamada HAM), mientras que las células de Leydig producen testosterona y el factor tipo insulínico 3 (Ins3). Tanto MIS como la testosterona inhiben la diferenciación femenina y mantienen la diferenciación masculina, respectivamente. (Tomado de Zarkower, 2001).

La llegada de las células germinales primordiales (CGP) originadas del endodermo del saco vitelino, a las crestas urogenitales, inicia una reorganización de los componentes celulares de estas estructuras, así como un incremento en su división celular. En este momento, las características morfológicas de los primordios gonadales no son determinantes para establecer la presencia de ovarios o testículos. En los mamíferos, la primera manifestación estructural de la diferenciación sexual se observa en la gónada masculina, con la presencia de cordones sexuales, estas estructuras son formadas por células de Sertoli y células que rodean al cordón, llamadas células peritubulares o mioideas que forman la lámina basal que los delimita. En el interior del cordón sexual se observan células de Sertoli y espermatogonias,

mientras que en el exterior se encuentran células de Leydig fetales que producen cantidades elevadas de andrógenos importantes para la diferenciación sexual (Moreno-Mendoza y Merchant-Larios, 1997; Huhtaniemi, 1994), así como células mesenquimatosas y vasos sanguíneos (fig. 2).

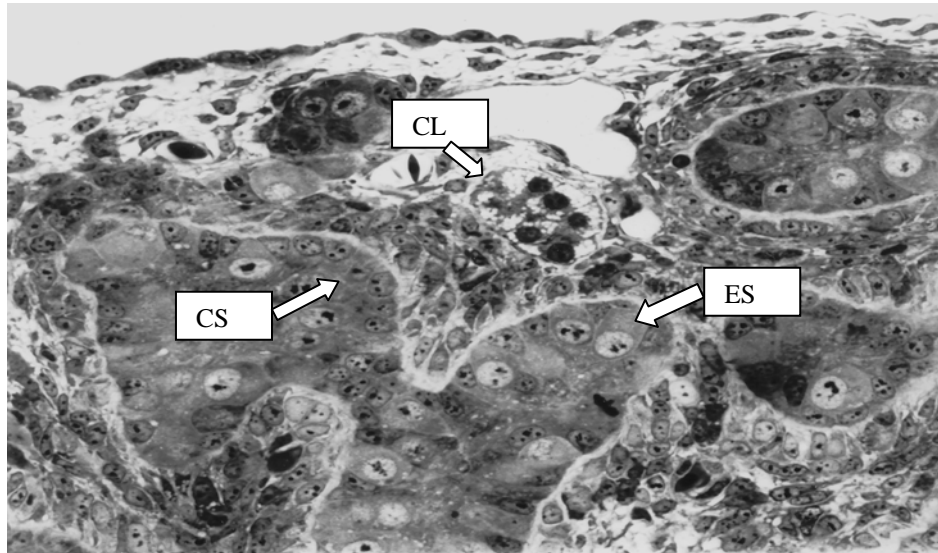


Figura 2. Corte histológico de testículo embrionario de pollo de 18 días de incubación, en donde se observan células con inclusiones lipídicas secretoras de testosterona (células de Leydig (CL)) y cordones testiculares formados internamente por células de Sertoli (CS) y espermatogonias (ES), rodeando al cordón se encuentran células peritubulares.

Inicialmente los cordones sexuales, se encuentran en toda la gónada, pero a medida que avanza el desarrollo, el tejido mesenquimatoso, así como los vasos sanguíneos hacen que los cordones sexuales, ahora denominados cordones testiculares, se establezcan finalmente en la porción medular de la gónada (Moreno-Mendoza y Merchant-Larios, 1997).

Las células somáticas que forman parte de la gónada, contribuyen en su diferenciación y en la maduración de las células sexuales (inicialmente llamadas células germinales primordiales (CGP), a través de la secreción de factores de crecimiento que regulan la diferenciación celular y las múltiples funciones que realizan estas células. Las células de Sertoli, por ejemplo, son conocidas también como células nutricias, ya que se encargan de crear un soporte estructural para las espermatogonias, así como cubrir los requerimientos nutricios de las células sexuales. Estas células somáticas además, sintetizan la hormona anti-Mülleriana (HAM) o sustancia inhibidora de los conductos de Müller (SIM), responsable de la regresión de los conductos Müllerianos o paramesonéfricos, que en las hembras forman las tubas uterinas

y la parte superior de la vagina (Carlson, 1994), también forman la barrera hematotesticular, sintetizan la proteína transportadora de andrógenos, transferrina e inhibina, entre otras (Knobil, 1988). La actividad proliferativa de las células de Sertoli durante la etapa fetal es elevada, pero va disminuyendo al avanzar el desarrollo embrionario, manteniéndose hasta los 21 días después del nacimiento en la rata (Orth, 1984), este mecanismo celular es regulado por la FSH, la cual se ha demostrado que actúa sobre la distribución y la cantidad de filamentos de citoqueratina y vimentina del citoesqueleto de las células de Sertoli (Sasaki y cols. 1998) (fig. 3); los filamentos de vimentina presentan cambios en su número y localización debidos a la acción de la proteína dependiente de AMPc (PKA) (Spruill y cols. 1983 a y b).

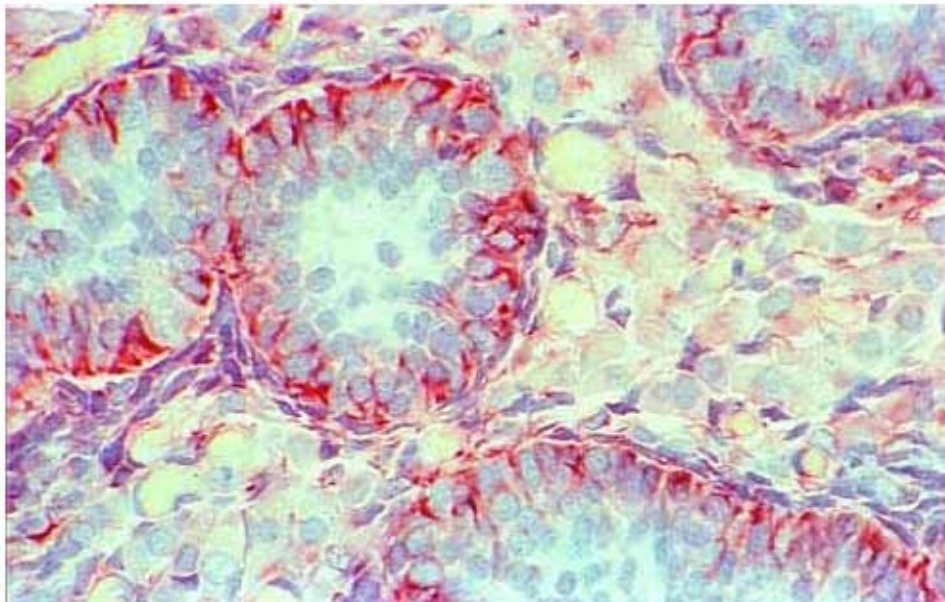


Figura 3. Corte histológico de testículo humano al nacimiento. Se observan túbulos testiculares formados por células de Sertoli, en el citoplasma de estas células, se observan filamentos de vimentina (color rojo) y rodeando los túbulos, células peritubulares.

Otro tipo importante de células somáticas testiculares lo constituyen las células de Leydig productoras de andrógenos. El origen embrionario de estas células aún se encuentra en discusión. Inicialmente se propuso que las células somáticas gonadales provenían del mesonefros (Witschi, 1951); sin embargo, se observó en cultivos de órganos que la diferenciación de las principales células testiculares, células de Leydig y de Sertoli, es independiente de la presencia de este órgano. La teoría más aceptada es la que propone su origen

a partir de células del mesénquima (Satón, 1985; Pelliniemi y Dym, 1980 y Saéz, 1994), sin embargo, se ha demostrado que al cultivar gonadas indiferenciadas con mesonefros provenientes de embriones transgénicos que expresan el gen Lac-Z, el cual se caracteriza por producir una coloración azul en las células que lo contienen al ser incubadas en el sustrato x-gal, las células provenientes del mesonefros, migran hacia las gónadas y mediante estudios morfológicos se demostró que algunas tienen la capacidad de diferenciarse en células de Leydig (Moreno y Merchant, 1997). Una vez establecidas en el testículo, se ha observado que estas células presentan cambios a medida que avanza el desarrollo embrionario. Durante la etapa fetal, la capacidad esteroidogénica de estas células es muy elevada a pesar de tener un volumen menor que el observado en la etapa adulta. Anteriormente se pensaba que esta alta producción de hormonas esteroides se debía a la presencia de una población especial de células, morfológicamente distintas a las células de Leydig observadas en el adulto (Huhtaniemi, 1994). Estas células de Leydig fetales, mantienen una elevada producción de andrógenos, principalmente dihidrotestosterona (Saéz, 1994). Actualmente se reconoce la existencia de dos poblaciones de células de Leydig durante el desarrollo testicular. La población fetal, se origina poco después de la diferenciación del testículo, cerca de los 12.5 días postcoito en el ratón y es esencial para la masculinización del feto. La población adulta de células de Leydig, se origina entre el día 7 y 10 después del nacimiento en el ratón y la secreción de testosterona en este periodo, regula la conducta sexual del macho, las características sexuales secundarias y la reproducción (O'Shaughnessy y cols. 2002 a y b; Vergouwen y cols. 1991; Baker y cols. 1999; Nef y cols. 2000).

Las células de Leydig encontradas en etapas tempranas del desarrollo embrionario, tienen la característica de formar acúmulos celulares, en lugar de dispersarse en el espacio intercelular, como ocurre en las células de Leydig del adulto. También se ha determinado que en la etapa fetal, las células de Leydig carecen de receptores a la hormona luteinizante, lo cual ha sugerido que en etapas iniciales, su diferenciación puede ser independiente de esta hormona (Huhtaniemi, 1994; O'Shaughnessy y cols. 1998); mientras que la diferenciación de la población de células de Leydig adultas es dependiente de la LH (O'Shaughnessy y cols. 2002 a y b; Ariyaratne y cols. 2000). Esta

población sólo expresa los RNAm para 17β hidroxisteroide deshidrogenasa III (17β -HSDIII), prostaglandina D-sintetasa (PGD), 3β -hidroxisteroide deshidrogenasa (3β -HSD) y estrógenos (O'Shaughnessy y cols. 2002 a y b). En 1994, Huhtaniemi propuso un modelo que resume la diferenciación de las células de Leydig, en el se propone que inicialmente las células precursoras de las células de Leydig, carecen de la maquinaria enzimática necesaria para producir hormonas esteroides, no presentan las características morfológicas de células productoras de estas hormonas, tales como retículo endoplásmico liso bien desarrollado, inclusiones lipídicas y mitocondrias con crestas tubulares (Lording y De Krester, 1972; Mendis-Handagama y cols. 1987), además, carecen de receptores específicos para LH. Poco tiempo después, estas células se diferencian y adquieren la capacidad esteroidogénica y la morfología que las caracteriza. (fig. 4).

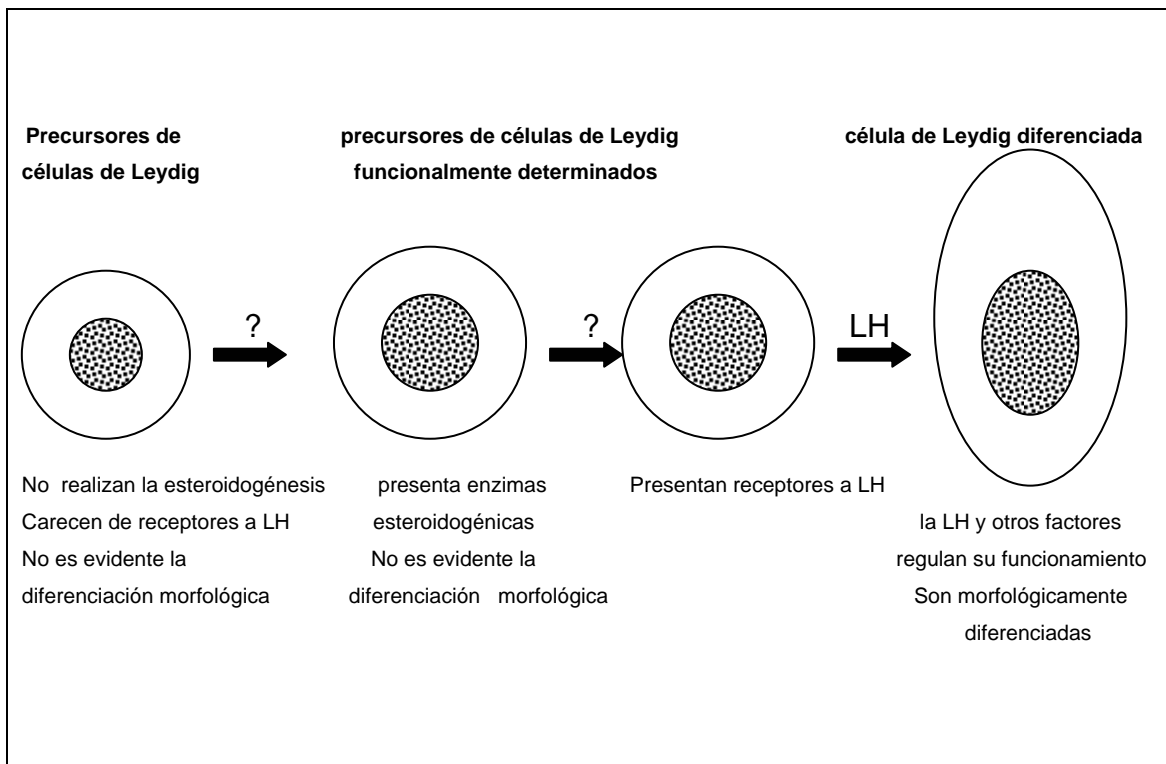


Figura 4. Esquema propuesto por Huhtaniemi en 1994. Se observa la diferenciación y maduración de las células de Leydig en el testículo de mamíferos.

Cada uno de los componentes celulares que forman parte de la gónada masculina, interactúan entre ellos de manera importante para que se lleve a cabo la diferenciación gonadal y se realicen de manera armónica las funciones

características de esta estructura. Las funciones de las células de Leydig por ejemplo, son reguladas, además de la acción de la LH, por diversos factores de crecimiento producidos por la misma célula (regulación autócrina) como el factor de crecimiento insulínico tipo I (IGF-I), o también de manera parácrina por las células de Sertoli a través de la acción de la inhibina, activina, IGF-I, factor de crecimiento transformante- β (TGF β), entre otros (Saéz,1994) y por las células peritubulares o mioides, que utilizan los andrógenos producidos por las células de Leydig, para incrementar la secreción del factor PmodS (Skinner y Fritz, 1985, 1986) que a su vez actúa junto a la FSH sobre las células de Sertoli, estimulando la secreción de transferrina y lactato, utilizados para el desarrollo y nutrición de las células germinales (Norton y cols. 1994; Mullaney y cols. 1994). (Fig. 5).

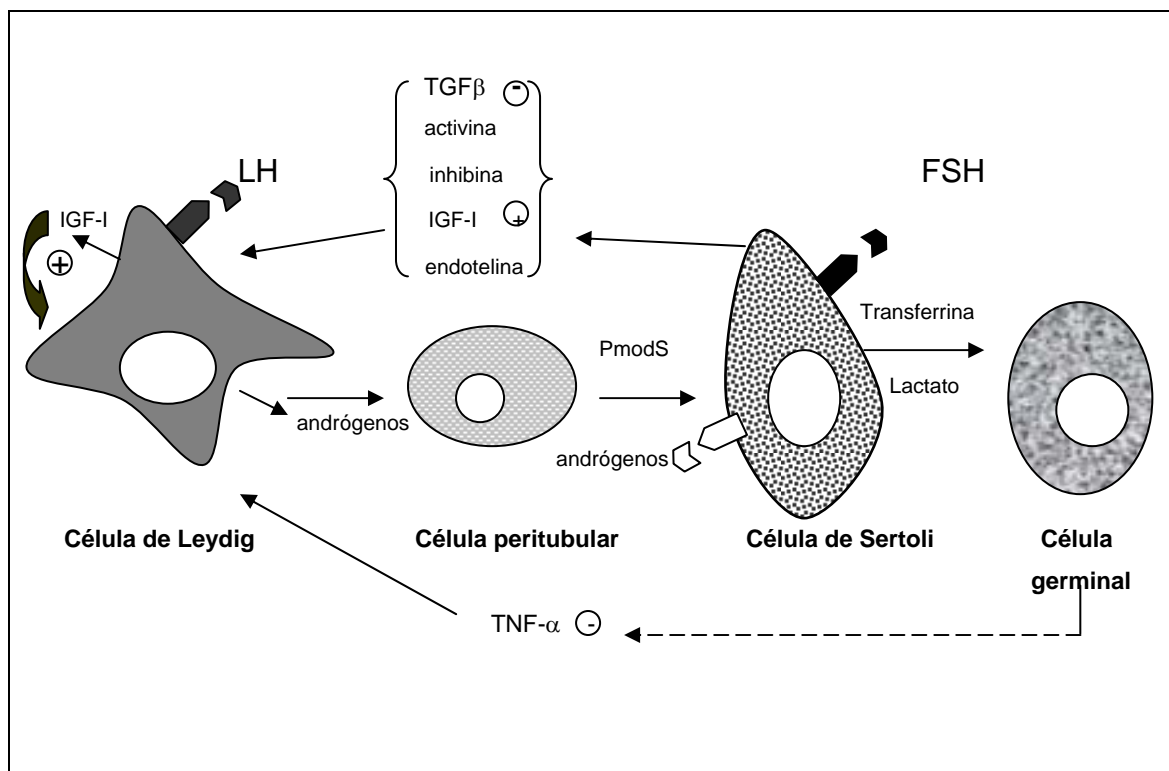


Figura 5. Esquema donde se muestran las interacciones entre varios tipos de células testiculares. Las células de Sertoli producen lactato por la acción del factor PmodS y transferrina, utilizados para la nutrición de las células germinales. Otros factores como el IGF-I, la activina y la inhibina, regulan de manera autócrina y parácrina las funciones de las células de Leydig, Sertoli, peritubulares y células germinales en el testículo.

Finalmente, después del desencadenamiento de múltiples eventos celulares, se establece una gónada masculina o femenina, que regulara la presencia de caracteres sexuales específicos para cada sexo, a través del mantenimiento

de la secreción de hormonas sexuales, tales como testosterona y estradiol respectivamente, así como la producción de células sexuales maduras (espermatozoides y ovocitos) para la reproducción.

REGULACION ENDOCRINA

La regulación de la actividad gonadal se realiza por el establecimiento del eje hipotálamo-hipófisis-gónada, en donde cada una de las estructuras que lo constituyen, participan de manera armónica en la síntesis de diferentes moléculas que regulan directa o indirectamente las funciones gonadales. Factores ambientales como el fotoperíodo, los cambios de temperatura y la disponibilidad del alimento, así como factores internos como la alimentación, el estrés, etc, actúan sobre el sistema nervioso central produciendo la secreción de neurotransmisores por el hipotálamo, para que se libere la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH). Esta hormona actúa sobre las células gonadotropas de la adenohipófisis liberando FSH y LH; ambas gonadotropinas viajan por torrente sanguíneo hacia las gónadas y regulan las funciones de las células granulosas y tecaes del ovario, así como de las células de Sertoli y Leydig en el testículo, respectivamente. Existen evidencias de que durante el desarrollo embrionario temprano, los constituyentes celulares de las gónadas, pueden funcionar en forma independiente a la LH y a la FSH. Es así que durante las primeras etapas de diferenciación de las células de Leydig fetales o cuando estas células carecen de LH o de receptores a esta hormona, la producción de andrógenos no se ve afectada (O'Shaughnessy y cols., 1998; Kendall y cols.1995; Pointis y cols. 1975). Más tarde, la diferenciación y el mantenimiento de las funciones de estas células son acciones dependientes de la presencia de LH. La independencia de la LH en el funcionamiento de las células de Leydig durante etapas muy tempranas del desarrollo gonadal, indicaba la presencia de otros reguladores no hipofisarios. O'Shaughnessy y cols. en el 2003, demostraron que las células de Leydig en el testículo fetal de ratón, responden al estímulo de la hormona adrenocorticotrópica (ACTH), incrementando los niveles de andrógenos *in vitro*.

Por otro lado, en las aves se demostró que la síntesis de 17β -estradiol y andrógenos se inicia a partir del día 3.5 de desarrollo (Weniger, 1968; 1971;

Woods 1974, 1978), mientras que el eje hipotálamo-hipófisis-gónada se establece más tardíamente, en el día 13.5 de incubación en machos y 14.5 en hembras (Gilbert, 1971; Woods y cols. 1981). La regulación de la síntesis de hormonas esteroides por la FSH *in vitro*, se demostró en embriones de pollo desde los 8 días de incubación (Pedernera y cols. 1999); lo anterior sugiere, que al igual que en los mamíferos, la diferenciación gonadal, así como la producción de hormonas esteroides, son eventos inicialmente autónomos probablemente regulados por factores de origen extragonadal o producidos por la gónada misma (Woods, y cols.1983; Erickson, 1994).

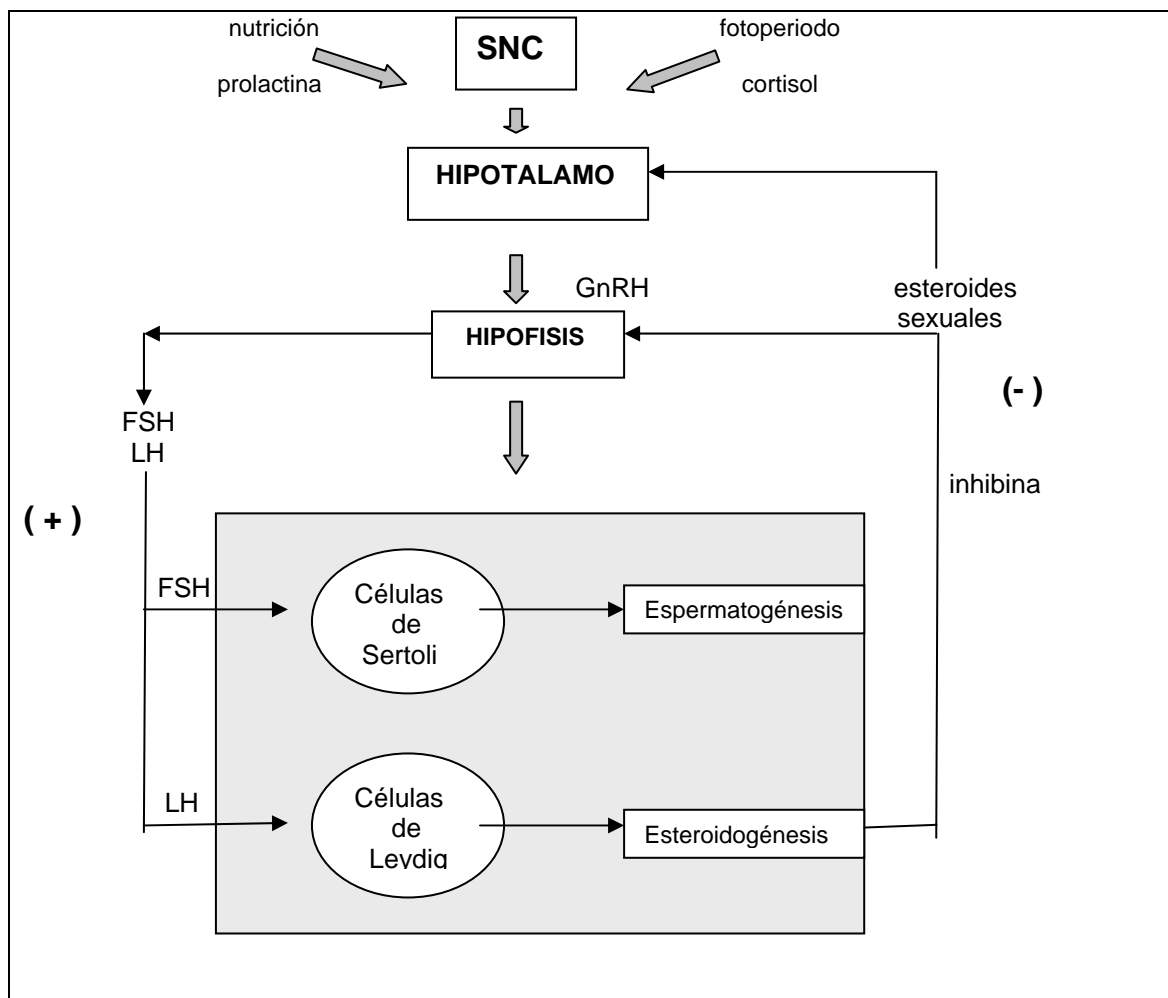


Figura 6. Esquema que muestra el eje hipotálamo-hipófisis gónada. La función de este eje depende de la acción de reguladores como la FSH y la LH (+ estimuladores) o la inhibina y las hormonas esteroides (- inhibidores).

Una vez establecido el eje hipotálamo-hipófisis-gónada (fig. 6), la función gonadal se realiza de manera más o menos constante durante toda la vida del organismo, presentándose cambios evidentes durante la pubertad en los

humanos y otros mamíferos, así como cambios dependientes del periodo luz-obscuridad, de la temperatura, de la disminución del alimento, etc., en la mayoría de los vertebrados.

Además de la regulación de las funciones gonadales, es importante mencionar que existe evidencia que sugiere la participación del eje hipotálamo-hipófisis-gónada a través de la secreción de hormonas esteroides en la regulación de la función del sistema inmune. Es así, que por ejemplo, los estrógenos y la testosterona regulan la proliferación de células B y T del sistema inmune (Tanriverdi y cols. 2003) y órganos linfoides y células del sistema inmune periférico presentan sitios de unión a esteroides sexuales (Kawashima y cols. 1992; Suenaga y cols. 1998). Lo anterior nos indica que existen muchos aspectos aún desconocidos en el funcionamiento y la regulación de los procesos gonadales y su interacción con otros sistemas en el organismo de los vertebrados.

Receptores a FSH, LH y hCG

Las hormonas FSH, LH, hCG y TSH son glucoproteínas que poseen dos cadenas peptídicas muy similares, α y β , ricas en enlaces disulfuro (Pierce y Parson, 1981). La subunidad α es común a las cuatro hormonas, mientras que la subunidad β es la que confiere la actividad biológica específica a cada una de ellas. Estas hormonas se caracterizan por poseer receptores en la membrana celular que presentan siete segmentos transmembranales con un dominio amino terminal en la región extracelular, mientras que un carboxilo terminal se presenta en la región intracelular (Johnson y Dhanasedaran, 1989; O'Dowd y cols. 1989) (fig 7). Estos receptores interactúan con proteínas G (Loosfelt y cols. 1989; McFarland y cols. 1989; Parmentier, 1989; Sprengel y cols. 1990). Otros miembros de esta familia de receptores incluyen los adrenérgicos, de dopamina y rodopsina, entre otros (Dal Toso y cols. 1989; Sunahara y cols. 1990). El cDNA para el receptor de FSH fue clonado por Sprengel en 1990 y determinó que es una proteína de 75000 Da, con una secuencia de 675 aminoácidos. Mientras que muchos de los receptores acoplados a proteínas G presentan un amino terminal de pocos aminoácidos (30-40 aproximadamente), los receptores a FSH, LH/hCG y TSH tienen un

dominio amino terminal de 348, 333 y 398 aminoácidos respectivamente. El dominio extracelular de los receptores de estas hormonas, presentan aproximadamente entre el 40 y 45% de similitud en su secuencia de aminoácidos y están organizados en 25 residuos ricos en leucina que son importantes para la interacción proteína-proteína importantes en la unión de la hormona al receptor.

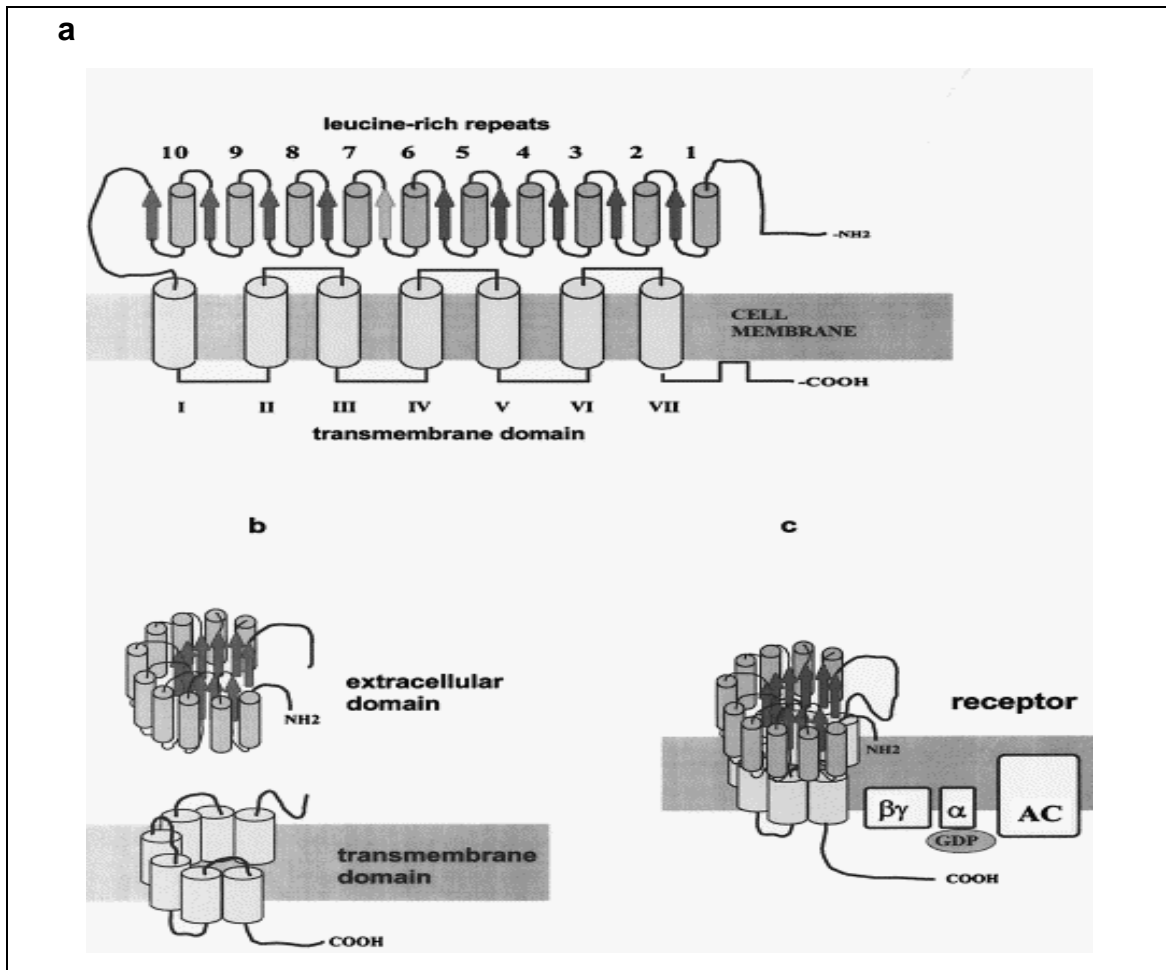


Figura 7. Organización estructural hipotética de los receptores a gonadotropinas: a) el receptor presenta un dominio extracelular, otro dominio transmembranal y otro intracelular. El dominio extracelular presenta repeticiones ricas en leucina, organizados en α hélices (cilindros) y láminas-β (flechas). b) Tanto el dominio transmembranal como el extracelular pueden tener forma de U y las láminas-β ocupan la superficie vacía del dominio extracelular. c) el dominio extracelular se coloca sobre el dominio transmembranal y el receptor se encuentra listo para interactuar con la proteína G. (subunidades α y βγ de la proteína G; AC, adenilato ciclasa) (Tomado de Simoni y cols. 1998).

Los dominios transmembranales de los receptores a FSH, LH/hCG y TSH tienen cerca del 70% de secuencias homólogas y tienen una homología importante en esta región a la de otros miembros de la familia de receptores acoplados a proteínas G (dopamina, α y β adrenérgicos entre otros) (Vassart y

cols. 1991). Las estructuras de los genes para el receptor de LH, TSH y FSH ya han sido caracterizados y se ha determinado que son más complejos que los genes de otros miembros de esta familia de receptores (Gross y cols. 1991; Heckert y cols. 1992; Heckert y Griswold, 1993; Koo y cols. 1991; Tsai-Morris y cols. 1991). Los genes que codifican los receptores para FSH y LH, se encuentran localizados en el brazo corto del cromosoma 2 (2p21) y presentan varias características similares:

- a) son genes muy grandes de 10 (TSH, FSH) y 11 (LH) exones.
- b) los exones del 2 al 9 en cada receptor, codifican para las secuencias repetidas de leucina en el amino terminal.

Las secuencias repetidas de leucina sugieren que se originaron de un gen que se ha conservado durante la evolución de los receptores acoplados a proteínas G. Se ha propuesto que los receptores para FSH, LH y TSH constituyen una subfamilia de receptores acoplados a proteínas G, que tienen un origen evolutivo relativamente reciente (Vassart y cols. 1991) (fig7).

Las células gonadales poseen receptores para las hormonas gonadotropas (FSH, LH/hCG) y para hormonas esteroides, entre otros.

Proliferación celular

La regulación de la proliferación celular es el resultado de la interacción entre programas endógenos de expresión génica y señales externas proporcionadas por hormonas, factores de crecimiento e interacciones célula-célula. La integración de todas estas señales determina que la célula se divida, se diferencie o sufra un proceso de muerte celular programada o apoptosis.

La división celular es un mecanismo que se desarrolla de manera cíclica en todas las células y que presenta varias fases con características particulares cada una de ellas. También conocido como ciclo celular, este evento presenta las fases de G1, S y G2, que constituyen la interfase del ciclo, mientras que en la fase M de mitosis o meiosis, se divide o se recombina el material genético, respectivamente. Ambos procesos son muy similares, la diferencia entre ambos se basa en que la mitosis es la encargada de producir un

incremento en el número de células de un organismo con la misma carga genética, mientras que la meiosis participa en la reproducción sexual al dar origen a células sexuales con la mitad del complemento cromosómico. En un ciclo mitótico la fase conocida como G₀, se caracteriza porque la célula no se encuentra en un periodo de “reposo” como se creía antiguamente, sino que presenta una actividad metabólica importante, en esta etapa la célula crece o se diferencia. Una vez que el medio extracelular lo permite, la célula reconoce estímulos químicos específicos provenientes de factores de crecimiento, hormonas y estímulos físicos, como el contacto celular, que favorecen o inhiben la entrada a la fase de G₁ del ciclo celular. En esta fase la célula se prepara para iniciar la replicación del material genético que se realizará en la fase de síntesis o fase S. Debido a la susceptibilidad a agentes externos que bloquean o inhiben la entrada a la fase de G₁, esta es considerada como un periodo de susceptibilidad a agentes externos que regulan la proliferación celular, además, al final de G₁ se encuentra un **punto de restricción** o “W” en células de mamíferos y “Star” en levaduras (Zentella y cols. 1996), el cual una vez sobrepasado el ciclo no puede detenerse y la célula entra a la fase S. Una vez duplicado el material genético, inicia la fase G₂ en la cual la célula multiplica sus organelos y aumenta su tamaño en preparación a la fase M de división celular. En la fase M se rompe la membrana nuclear, los cromosomas duplicados se alinean en el ecuador durante la metafase, las fibras del huso mitótico se anclan al cinetocoro y jalan los cromosomas hacia los polos (Hyams y Brinkley 1989) (fig. 8) durante la anafase.

Durante la telofase las cromátidas hermanas separadas llegan a los polos, las fibras cinetocóricas desaparecen, se forma una nueva envoltura nuclear alrededor de cada grupo de cromátidas hermanas. La cromatina condensada comienza a extenderse y los nucleólos reaparecen. El citoplasma se divide en un proceso conocido como citocinesis, en el que la membrana de la zona central de la célula, perpendicular al eje del huso y entre los núcleos hijos, se desplaza hacia el centro originando un surco de segmentación o de división que gradualmente se hace más profundo hasta que entra en contacto con los estrechos restos del huso mitótico entre los dos núcleos, para finalmente romperse por cada extremo dejando dos células hijas completas y separadas.

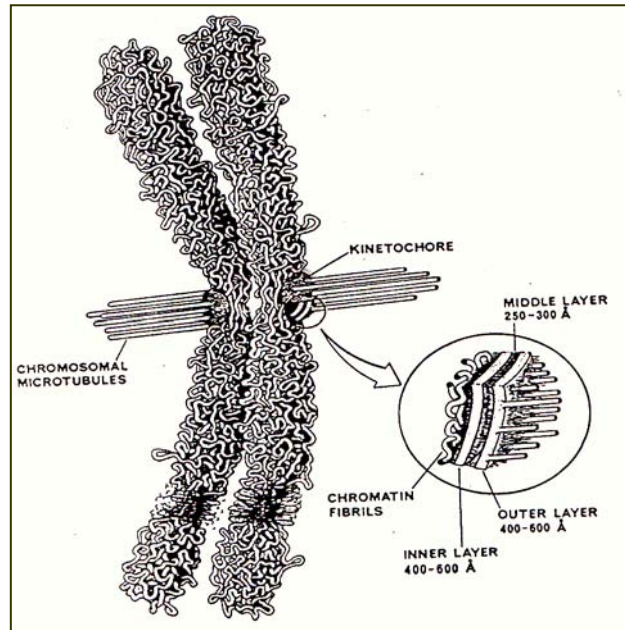


Figura 8. El cinetocoro es una estructura constituida principalmente por proteínas (CENP-A, CENP-B, CENP-C), ADN y RNA, al cual se anclan las fibras del huso mitótico y a través del cual las fuerzas mitóticas jalan los cromosomas hacia los polos durante la anafase (Hyams y Brinkley, 1989).

Control del ciclo celular

El funcionamiento correcto de cada una de las fases del ciclo celular requiere de cambios en complejos enzimáticos entre los que se encuentran las ciclinas, las cinasas dependientes de ciclinas (Cdk) y los complejos formados por ambas (Cdk + ciclina). Las ciclinas como su nombre lo indica, son proteínas que se encuentran a lo largo del ciclo celular, mientras que las cinasas son enzimas encargadas de la fosforilación de proteínas. Los complejos formados entre ambas proteínas dirigen el avance de la célula hacia cada una de las fases del ciclo celular, por lo que la dinámica del ciclo celular depende así, de la presencia de complejos activos e inactivos de Cdk + ciclinas. Las Cdk se activan por su unión con ciclinas, así como por la fosforilación y desfosforilación de la Cdk.

Estos complejos proteicos, se inactivan por la acción de distintas proteínas inhibitoras de Cdk (Cki) y por la degradación de las subunidades de la ciclina en estadios específicos del ciclo celular. Se ha demostrado que las ciclinas D1, D2, D3, E, A y B se expresan conjuntamente con las cinasas Cdk2, Cdk4 y Cdk5 durante la progresión de la fase G1 a la fase M.

El complejo Cdk4-D funciona tempranamente en respuesta a factores de crecimiento, mientras que los complejos Cdk2-E y Cdk2-A son esenciales para la replicación de DNA, además de la participación importante de los complejos Cdk2-A y Cdk2-B en la mitosis (Peralta-Zaragoza y cols.1997; Zentella y cols. 1996) (fig.9).

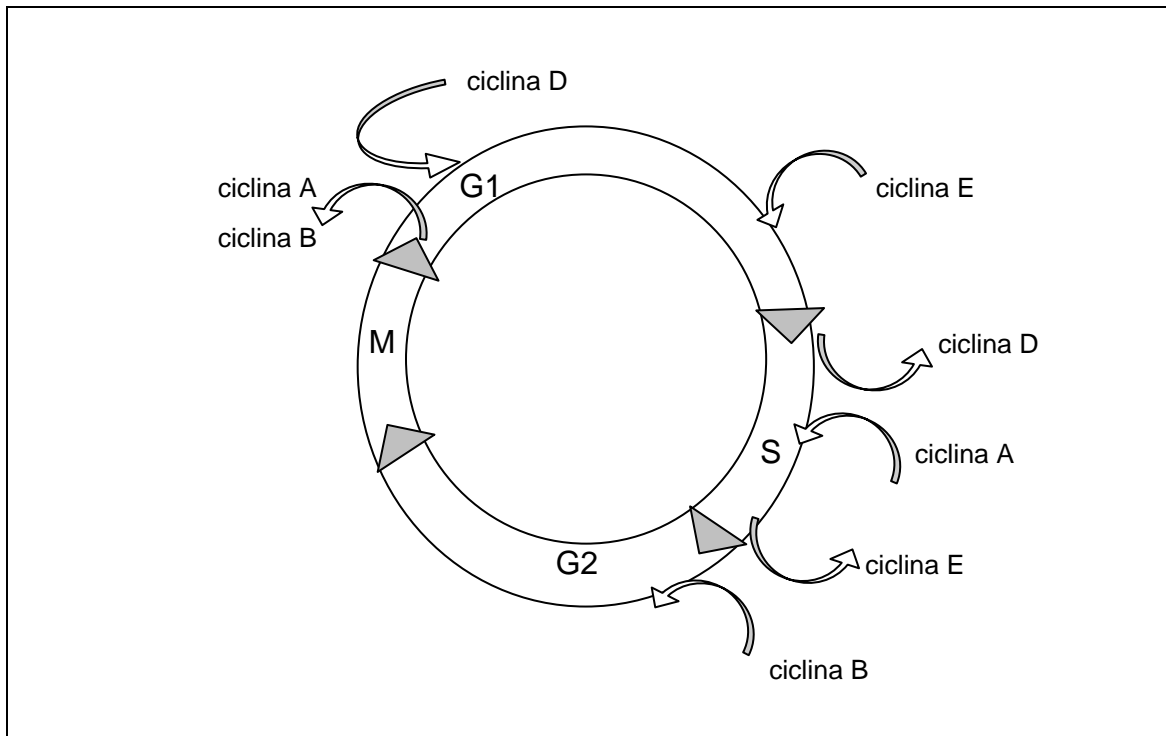


Figura 9. Participación de las distintas ciclinas a lo largo del ciclo celular. Puntos de síntesis (flechas de entrada al ciclo) y degradación (flechas de salida) de ciclinas a lo largo del ciclo celular de mamíferos. (Tomado de Zentella y cols. 1996).

Puntos de control y de restricción del ciclo celular

Al final de la fase G1 se encuentra un punto en el que se determina si la célula avanza de manera irreversible a la siguiente fase del ciclo celular. Este **punto de restricción**, se conoce que esta mediado por la proteína reguladora de genes E2F. Esta proteína se encuentra en estado inactivo cuando se une a la proteína del retinoblastoma (Rb), poco fosforilada; la activación del complejo cdk-ciclina D, permite la fosforilación de Rb, induciendo la separación de E2F, que una vez libre, inicia la replicación de DNA en la fase S. El complejo cdk-

ciclina E, acumulado casi al final de la fase G1, también estimula el paso hacia la fase S (fig.10).

Justo después del punto de restricción de la fase G1, se encuentra el primer punto de control. Un **punto de control** se caracteriza, por estar formado por un conjunto de proteínas que se encargan de revisar que las condiciones extra e intracelulares, sean las óptimas para que se realice de manera adecuada cada una de las fases del ciclo celular. Si los componentes de estos puntos de control detectan alguna anomalía en la replicación del material genético, si esta incompleto, si el ambiente celular es desfavorable, etc, se desencadenan

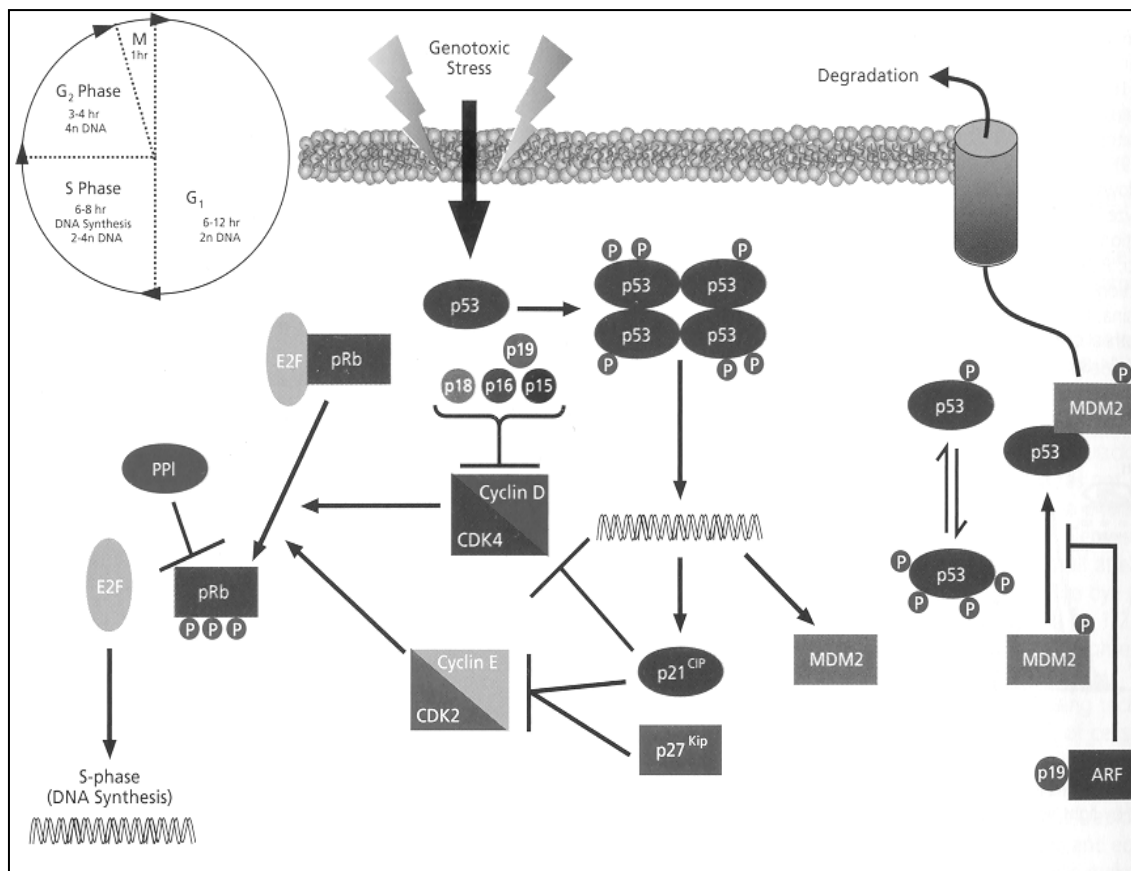


Figura 10. El ciclo celular consiste en cuatro fases, la fase de G1 (Gap1) en donde la célula crece. Al final de esta fase se encuentra el punto de restricción en donde la célula está "comprometida" a avanzar a la siguiente fase del ciclo celular. Se conoce que en G1 la proteína Rb no fosforilada, se une al factor de transcripción E2F y lo inactiva. Rb se fosforila por la acción del complejo ciclina D/cdk, y libera a E2F, el cual inicia la replicación de DNA durante la fase S. Para la entrada a la fase S, también es importante la presencia del complejo ciclina E/cdk2. En caso de que la célula resulte dañada se acumula la proteína p53 e induce la inhibición a través de p21 y/o p27 del complejo ciclina D/cdk y ciclina E/cdk2, con lo cual la célula sale del ciclo celular. (www.sigma-aldrich.com)

mecanismos que hacen que la célula corrija el error, o si este rebasa los mecanismos de reparación, se induce la salida del ciclo celular y la entrada a un proceso de muerte celular programada o apoptosis. Estos puntos de control

se encuentran al final de la fase G1, después del punto de restricción, a la salida de la fase G2 y al final de la fase M. (fig. 11).

Proliferación celular en las gónadas

La actividad proliferativa de los constituyentes celulares de las gónadas varía durante toda la ontogénesis, es así que por ejemplo, la actividad mitótica de las células de Sertoli durante la etapa fetal es elevada, pero disminuye al avanzar el desarrollo prenatal, manteniéndose hasta los 21 días después del nacimiento en la rata (Orth, 1984); la regulación de este evento está dada por la acción de la FSH sobre la proteína cinasa dependiente de AMPc, PKA (Spruill y cols. 1983 a y b).

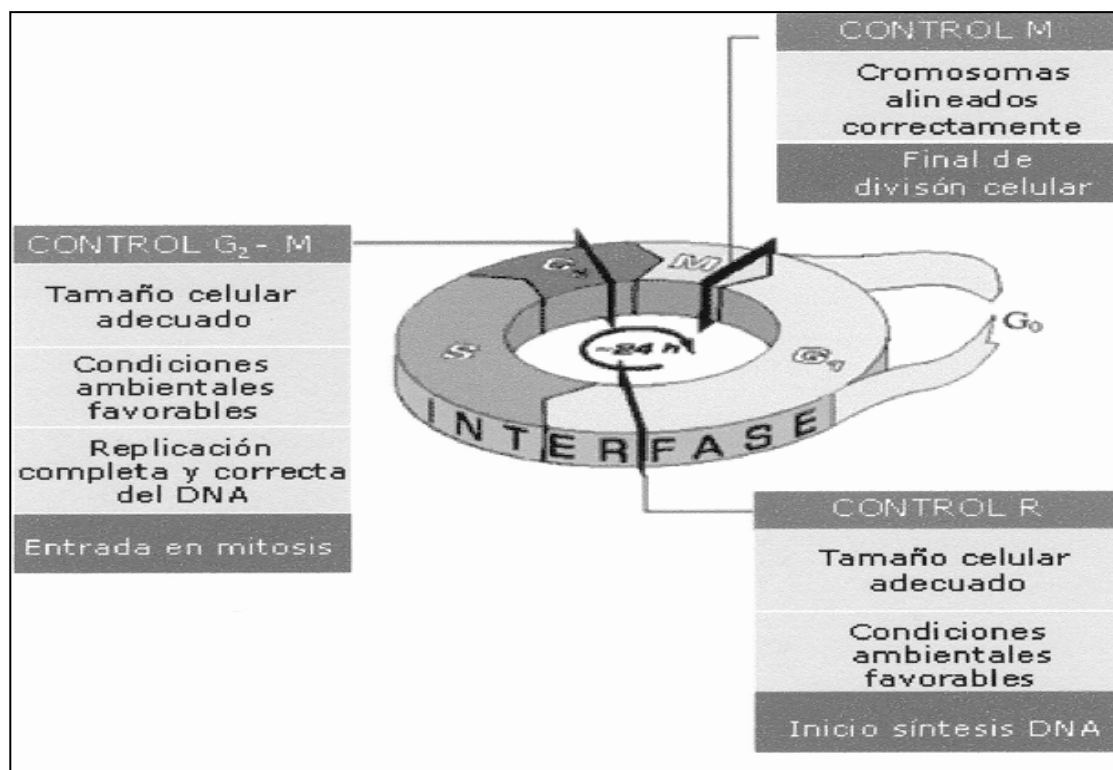


Figura 11. Puntos de control del ciclo celular. En cada punto de control, la célula "revisa" que mecanismos como la duplicación celular se realicen de manera correcta. Si todo se encuentra en condiciones óptimas, la célula avanza a la siguiente fase del ciclo celular, hasta completarlo. Estos puntos de "revisión", se encuentran en la fase de G1, G2 y M.

En general, se ha demostrado que de las gonadotropinas (LH/hCG y FSH) sólo la FSH tiene una actividad proliferativa muy importante durante el desarrollo gonadal y en el mantenimiento de las funciones de estos órganos; además de estas hormonas, el estradiol y algunos factores de crecimiento como el TGFβ

(factor de crecimiento transformante β), también actúan como agentes mitogénicos en células granulosas y de Sertoli, del ovario y testículo de mamíferos, respectivamente (Dorrington y cols. 1993). Durante el ciclo ovulatorio, la presencia de receptores a FSH en folículos primarios es mayor que en folículos terciarios, en donde la cantidad de receptores a esta hormona es menor a la de receptores para LH, el incremento en el número de receptores a FSH al inicio de la foliculogénesis, está relacionado con el crecimiento folicular, el cual implica un aumento en la proliferación de células de la granulosa y células de la teca, mientras que el aumento de receptores a LH, tiene que ver con la cercanía del rompimiento del folículo terciario durante la ovulación, y la posterior luteinización de las células granulosas, lo cual ocurre bajo acción de la LH. En el testículo de mamíferos, no son tan evidentes los cambios que se dan durante la espermatogénesis, con respecto a lo que se presenta en el ovario, sin embargo, al igual que en la gónada femenina, la FSH regula la elevada actividad proliferativa de las células de Sertoli durante la etapa fetal, la cual disminuye en el adulto, e indirectamente estimula la espermatogénesis, ya que este mecanismo se lleva a cabo en ausencia de FSH y puede realizarse en presencia de testosterona (Heckert y Griswold, 1993). En las aves al igual que en los mamíferos, la proliferación de las células de Sertoli y de la granulosa se realiza por la acción de la FSH desde etapas muy tempranas del desarrollo embrionario (Velázquez y cols. 1997; Pedernera y cols. 1999), sin embargo, en estos vertebrados a diferencia de lo que ocurre en los mamíferos, se ha demostrado que el estradiol no tiene efectos mitogénicos en cultivos de células testiculares y de ovario de embriones de pollo de 18 días de incubación (Velázquez y cols. 1997; Peralta y cols. 2004). Se ha demostrado que la proliferación celular es un mecanismo regulado por ciclinas y cinasas dependientes de ciclinas (cdks), entre otros, y que la hormona FSH participa en la proliferación de las células gonadales, entonces ¿esta hormona actúa sobre los diferentes reguladores del ciclo celular?, en el ovario de los mamíferos se ha demostrado que durante el desarrollo folicular la FSH y el estradiol, regulan la actividad de la ciclina D2 y E, importantes para la progresión de las fases G1 y S del ciclo celular en las células granulosas, mientras que la LH hace que estas células salgan del ciclo celular y se inicie el proceso de luteinización (Robker y Richards, 1998). Al parecer en el proceso

de foliculogénesis las ciclinas, actúan como reguladores positivos de este evento, mientras que moléculas como $p27^{KIP1}$ y $p21^{CIP1}$ son agentes inhibidores de la división celular. En ratones que carecen de ciclina D2, se ha observado que el desarrollo folicular y la ovulación son deficientes, la proliferación de las células granulosas estimulada por FSH y estradiol está ausente, mientras que la ausencia de $p27^{KIP1}$ y $p21^{CIP1}$, no altera el crecimiento folicular y las células granulosas continúan proliferando, pero se altera la capacidad de luteinización de las células granulosas, comprometiendo la secreción de progesterona (Nakayama y cols. 1996; Fero y cols. 1996; Jirawatnotai y cols. 2003) (fig 12).

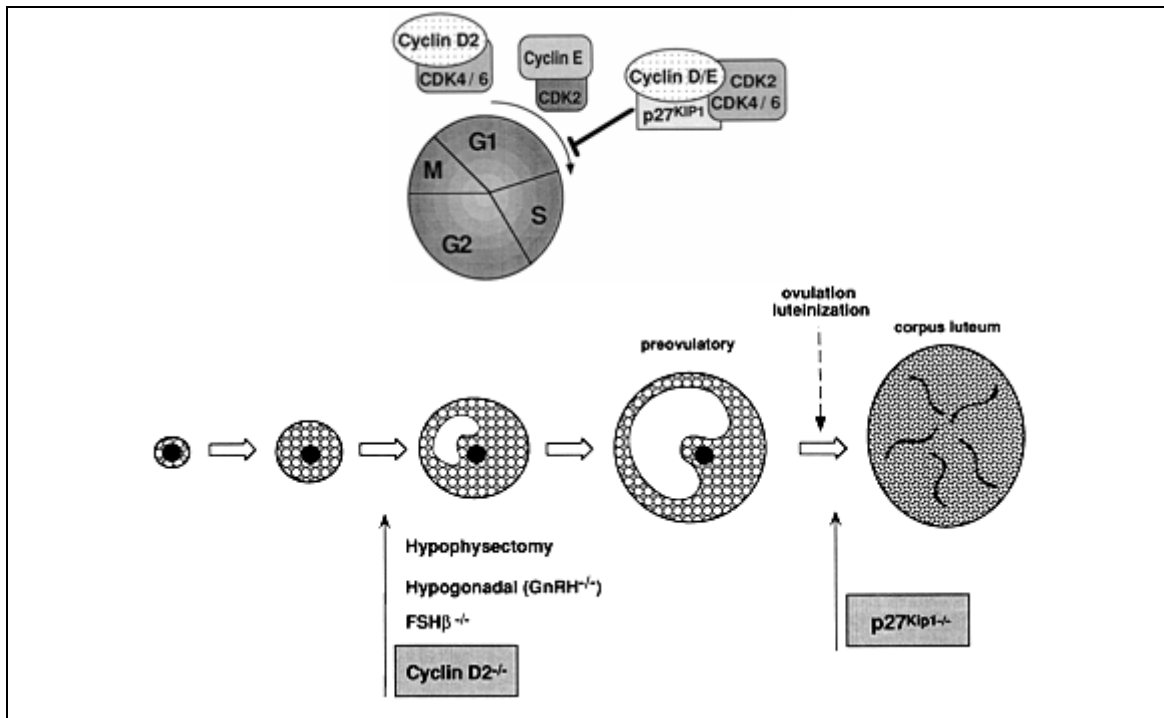


Figura 12. Esquemas del ciclo celular y del desarrollo folicular en el ovario de mamíferos. La ciclinas D2 y E se asocian a las cinasas dependientes de ciclinas Cdk4/6 y Cdk2 respectivamente, induciendo la progresión de las fases G1 y S. $P27^{kip1}$, se asocia a los complejos ciclinas-cinasas inhibiendo el desarrollo del ciclo celular. En los folículos ováricos se ha demostrado que la ciclina D2 promueve la proliferación de las células granulosas del folículo en ratas hipofisectomizadas, mientras que $p27^{kip1}$ eleva sus niveles durante la ovulación/luteinización (estimada por la LH/hCG) inhibiendo la proliferación celular e induciendo la luteinización de las células granulosas (Tomado de Robker y Richards, 1998).

La transformación de las células granulosas en células lúteas productoras de progesterona, está determinada por la acción de la LH; esta hormona se ha demostrado que produce una “down regulation” de la expresión de ciclina D2 y E, al incrementar los niveles de $p27^{kip1}$, con lo que la FSH y el estradiol

promueven el crecimiento folicular, mientras que la LH conlleva a la salida del ciclo celular a las células foliculares y estimula su diferenciación en células productoras de progesterona durante la luteinización (Robker y Richards, 1998).

En el caso del testículo, al igual que lo que ocurre en el ovario, la FSH regula la actividad mitótica de las células de Sertoli en etapas prenatales y poco tiempo después del nacimiento, momento en el que comienzan a disminuir los niveles de proliferación de estas células y en donde los andrógenos y la hormona tiroidea son reguladores importantes de este mecanismo (Holsberger y cols. 2005). En el testículo adulto de mamíferos se ha observado que la ausencia de $p27^{kip1}$ en ratones, produce un crecimiento anormal de los testículos (organomegalia), y la ausencia de $p27^{kip1}$ y $p21^{CIP1}$ incrementa el número de células de Sertoli, (Holsberger y cols. 2005); la actividad de estos inhibidores de la proliferación celular al parecer es regulada por la hormona tiroidea (Holsberger y cols. 2003; Buzzard y cols. 2003), ya que se ha observado que niveles elevados de esta hormona (hipertiroidismo) acorta el periodo de división de las células de Sertoli, mientras que a niveles bajos (hipotiroidismo), se produce un aumento en la proliferación de estas células (Joyce y cols. 1993; van Haaster y cols. 1992 y 1993). Aunque $p27^{kip1}$ y $p21^{CIP1}$ son importantes reguladores negativos de las células de Sertoli en etapa adulta, particularmente $p27^{kip1}$, tiene un papel predominante en este tipo de regulación al demostrarse un incremento del 125% en la población adulta de células de Sertoli de ratones knockout para $p27^{kip1}$, mientras que el efecto de la ausencia de $p21^{CIP1}$ es mucho menor en este mismo modelo biológico (Holsberger y cols. 2005). En el caso del desarrollo gonadal embrionario de las aves se desconoce el efecto que tiene la FSH sobre los diferentes reguladores de la proliferación celular, sin embargo en estudios preliminares realizados en nuestro laboratorio, se ha observado que la FSH probablemente modifique la fase G1 del ciclo celular en una pequeña subpoblación celular del ovario izquierdo de embriones de pollo de 18 días de incubación (datos no publicados), por lo que es importante caracterizar esta subpoblación e investigar las moléculas que regulan la proliferación del ovario y el testículo en etapas embrionarias.

Señalización intracelular

Hormonas, factores de crecimiento y factores de diferenciación son componentes de sistemas de señalización extracelular, encargados de regular las distintas funciones que se realizan durante toda la vida en diversos organismos. Estas señales provenientes del medio externo celular, se internalizan desencadenando una red de señales intracelulares que ejercen su efecto en el citoplasma o a nivel del núcleo celular, regulando procesos como la diferenciación, la división celular y la apertura de canales iónicos, entre otros. Las vías de señalización en muchos mecanismos celulares, inician una vez que el ligando se une a un receptor en la membrana celular o bien a receptores citoplásmicos. Las hormonas gonadotropas FSH y LH, poseen receptores en las membranas de sus células blanco en el ovario y en el testículo, células tecales y de Leydig para la LH y granulosa y de Sertoli para FSH, respectivamente. Los receptores para estas hormonas gonadotropas, al igual que las propias hormonas, presentan cambios conformacionales que al parecer son requeridos para la señalización (Dias, 2005; Fan y Hendrickson, 2005). Estas hormonas, al igual que la hormona estimulante de la tiroides (TSH) y la hormona adrenocorticotrópica (ACTH), producen vías de señalización características en muchas células endócrinas (Richards, 2001). (fig 13).

Los receptores para FSH y LH entre muchos otros, se encuentran asociados a proteínas G, estas proteínas son heterotrímeros constituidos por las subunidades α , β y γ . Una vez que se detecta la unión del ligando al receptor, se producen cambios conformacionales en la proteína, que producen la disociación de la subunidad α que se une a GTP para su activación, mientras que las subunidades β y γ permanecen unidas; el complejo α -GTP interactúa con el efector, mientras que β y γ regulan el efecto intracelular de la unión al ligando (Van Biesen y cols. 1996). El acoplamiento específico a la proteína G, es determinado por sus dominios intracelulares (siete dominios transmembranales con 3 asas intracelulares (i_1 - i_3) y 3 asas extracelulares), particularmente por la segunda y tercera asas intracelulares y el carboxilo terminal, por lo que es posible modificar el acoplamiento específico de estas proteínas, cambiando una relativamente pequeña región en la tercer asa

intracelular (Cotechia y cols. 1992). La actividad de la proteína G, es inhibida por la función de GTPasa intrínseca de la subunidad α , la cual hidroliza el GTP a GDP y pirofosfato, permitiendo la reasociación de la subunidad α al dímero β y γ (Van Biesen y cols. 1996; Soria y Arias, 1997). La subunidad α , separada del dímero β - γ , actúa sobre diversas moléculas de señalización, que pueden fosforilar (proteínas cinasas) o desfosforilar (fosfatasas) residuos de tirosina, serina y treonina principalmente.

La liberación y activación de la subunidad α de la proteína G, produce la activación de la adenilciclase con la consiguiente producción de AMPc. Se ha demostrado que niveles elevados de AMPc actúan sobre la proteína cinasa dependiente de AMPc o PKA la cual fosforila residuos de serina/treonina. La subunidad catalítica de PKA es traslocada al núcleo, fosforilando y activando diferentes factores de transcripción dentro de los cuales se encuentra CREB (AMP regulatory element-binding protein), el cual produce un incremento en la expresión de genes, como el de la aromatasa (Carlone y Richards, 1997) y el de la α -inhibina en células granulosas del ovario de mamíferos (Mukherjee y cols. 1998).

El factor CREB a su vez, es coregulado por la proteína de unión a CREB, CBP/p300, que se une a múltiples factores de transcripción como NF κ B (Gerritsen y cols. 1997).

Además de CREB, otros factores de transcripción son activados por AMPc, como el receptor a estrógenos α/β (ER α/β) y la proteína estimuladora-1 (SP-1) (Richards, 2001). La activación de CREB vía PKA está relacionada con procesos de proliferación y diferenciación celular.

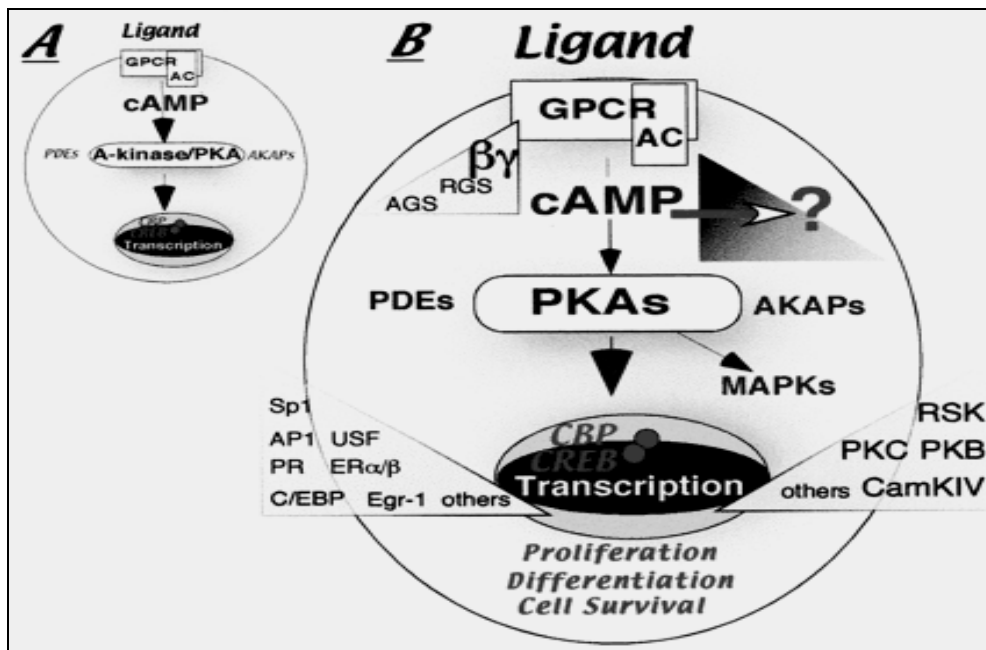


Figura 13. Vía clásica del receptor acoplado a proteínas G (GPCR-activado) activado en células endocrinas. En **A**, se muestra la ruta clásica lineal que activan las hormonas glucoproteicas en casi todas las células endocrinas. En **B**, se muestran modificaciones en la vía clásica, en donde se incluyen las fosfodiesterasas (PDEs), isoformas de PKAs, proteína de anclaje para cinasa A (AKAPs), y diversos factores de transcripción como CREB, CBP/p300, etc., los cuales intervienen en el desarrollo de mecanismos como la proliferación y diferenciación celular. (Tomado de Richards, 2001)

En general se acepta que la vía de señalización utilizada por la FSH y la LH en células gonadales, es a través de la activación de PKA, con la previa formación de AMPc, sin embargo, en estudios recientes se ha demostrado que esta hormona hipofisaria puede activar vías dependientes de PKA y vías independientes de PKA en células de la granulosa de mamíferos adultos (González-Robayna y cols. 2000; Richards, 2001). En estudios recientes, realizados en células de la granulosa del ovario de mamíferos, se ha encontrado que la FSH estimula la fosforilación y activación de la proteína cinasa B (PKB) (González-Robayna y cols. 2000). Esta proteína se expresa en muchos tipos celulares, pero su regulación, así como sus funciones aún se encuentran en investigación; sin embargo, PKB se reconoce como una cinasa terminal en una cascada de señalizaciones importantes para la sobrevivencia celular (Datta y cols. 1999) y la vía de PKB mejor caracterizada es la estimulada por la insulina y el factor de crecimiento insulínico tipo I (IGF-I) (Datta y cols. 1999; Dudek y cols. 1997). Se cree que la FSH vía PKB, probablemente altere la actividad de algunas proteínas, especialmente la inhibición de proteínas relacionadas con la apoptosis. (Richards, 2001).

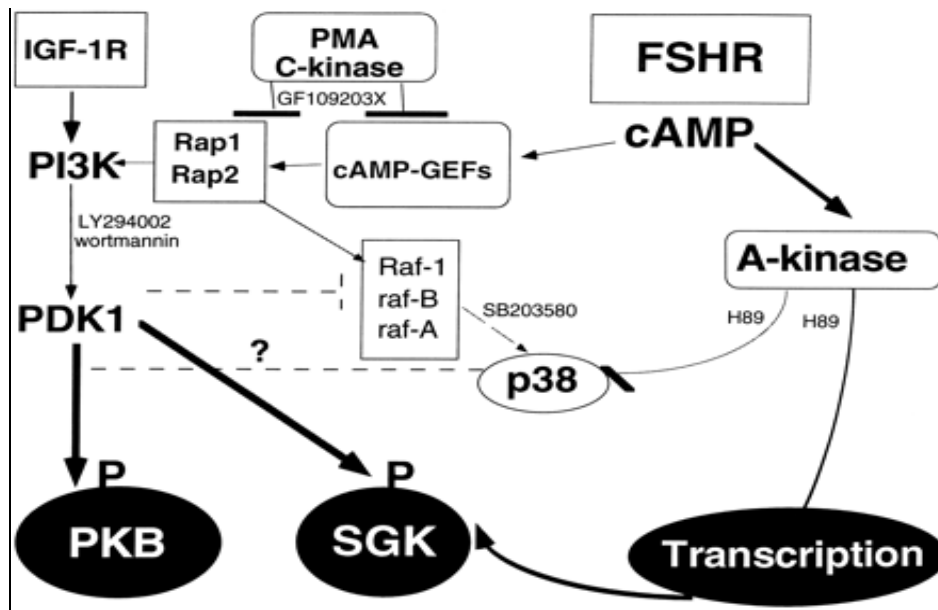


Figura 14. Modelos de acción del AMPc en células de la granulosa. La FSH activa a PKA induciendo la expresión de genes específicos como Sgk. La FSH vía PI3-K actúa sobre PDK1, fosforilando PKB de manera independiente de PKA y mimetizando y aumentando la fosforilación de PKB inducida por el factor de crecimiento insulínico-I (IGF-1). IGF-1 también fosforila PKB y Sgk, vía PI3-K. El PMA, que es un activador de la proteína cinasa C (PKC), inhibe la fosforilación de PKB y Sgk regulada por AMPc, pero no la regulada por IGF-1. (Tomado de González-Robayna y cols. 2000).

PKB es una cinasa activada por FSH, pero muy probablemente este estímulo sea realizado por una vía diferente a la de PKA, debido a que la inhibición específica de PKA con H89 (antagonista de PKA), no altera los niveles de PKB en células granulosas, por lo que algunos autores han propuesto la utilización de otras vías en las que no participa PKA (González-Robayna y cols. 2000). Un ejemplo de vía independiente de PKA, es la que utiliza la FSH para fosforilar PKB, en ella la FSH eleva los niveles de AMPc, pero se activa a la cinasa dependiente de fosfatidilinositol (PI3k), la cual actúa sobre PDK1, fosforilando finalmente a PKB y a la cinasa glucocorticoides-inducida y suero, (sgk), la cual también puede activarse por una vía dependiente de PKA. Se ha observado que el miristato de forbol (PMA), que es un activador de la proteína cinasa C, inhibe la fosforilación de PKB y Sgk regulada por AMPc en células de la granulosa de mamíferos (González-Robayna y cols. 2000) (fig.14).

En las células de Sertoli de mamíferos, se ha establecido que la FSH, participa en la regulación de distintas vías de señalización; la primera en ser identificada fue la vía AMPc-PKA, a través de la cual se realiza la activación del factor de transcripción CREB (Walker y cols. 1995), en estudios *in vivo*, se ha observado que en ratones con una isoforma de CREB que no puede fosforilarse, se

presentan alteraciones en la espermatogénesis de más del 40 %, debido a la apoptosis de espermátocitos y la subsecuente pérdida de más del 75% de las espermátidas (Scobey y cols. 2001), resaltándose así, la importancia de CREB para la espermatogénesis.

Por otro lado, la FSH también activa la proteína cinasa mitógeno-activada (MAPK) y la cinasa relacionada con señales extracelulares (extracellular signal-related kinase) ERK, en células de Sertoli *in vitro*, seguido del acoplamiento de FSH a su receptor y la activación de la subunidad α de la proteína G. La activación de ERK es dependiente de PKA y de la cinasa de residuos de tirosina src, aunque la vía exacta de señalización no ha sido caracterizada, se ha demostrado que la activación de ERK y MAPK por la FSH se da en un periodo corto posnatal en las células de Sertoli, ERK por ejemplo, se ha demostrado su presencia en un periodo corto de desarrollo en ratas (5-11 días) (Crepieux y cols. 2001), por lo que se cree que esta vía no tiene un papel importante en la espermatogénesis y en otras funciones de las gónadas adultas, mientras que para MAPK el periodo de activación de esta vía por FSH, se encuentra relacionado con el periodo de proliferación de las células de Sertoli, el cual ocurre los primeros 15 días después del nacimiento (González-Robayna y cols. 2000). La inducción de la ciclina D1 y del factor de transcripción E2F que son promotores del ciclo celular, por ERK y FSH, sugieren que los efectos mitogénicos de la FSH vía ERK y MAPK son poco importantes, debido a periodos cortos y específicos en que son utilizadas estas vías para la proliferación de células de Sertoli en ratas adultas (Walker y Cheng, 2005)

Otra vía regulada por la FSH es la que involucra al calcio, se ha observado que esta hormona (10-100ng/ml) induce un incremento intracelular de Ca^{2+} a los pocos segundos de la estimulación (Grasso and Reichert, 1989; Lalevee y cols. 1997) y este mecanismo se realiza por un incremento de AMPc (Lalevee y cols. 1997). El incremento en el flujo de Ca^{2+} a nivel intracelular, conduce a la activación de calmodulina y la cinasa CaM que pueden afectar la estructura del citoesqueleto de las células de Sertoli y la fosforilación de factores de transcripción como CREB (Spruill y cols. 1983b; Wu y cols. 2001). El flujo de Ca^{2+} también es importante para la dinámica de uniones celulares Sertoli-Sertoli (Walker y Cheng, 2005). Otra vías intracelulares reguladas por la FSH

son la vía de la cinasa IP3K y la fosfolipasa A₂ (PLA₂). En células granulosas, la activación de IP3K por FSH genera fosfolípidos de inositol específicos que activan la proteína cinasa B codificada por el gen Akt (González-Robayna y cols. 2000), en células de Sertoli, también se encontró que la FSH activa a PKB en una forma dependiente de PI3K (Meroni y cols. 2002). Al parecer esta vía es utilizada para procesos metabólicos necesarios para el soporte de las células germinales, ya que al utilizar inhibidores de PI3K, se ha observado que se disminuye la capacidad de la FSH para estimular la actividad de la lactato deshidrogenasa (LDH) requerida para producir lactato por las células germinales y γ -glutamiltanspeptidasa (γ -GTP) un transportador de aminoácidos a través de la membrana plasmática.

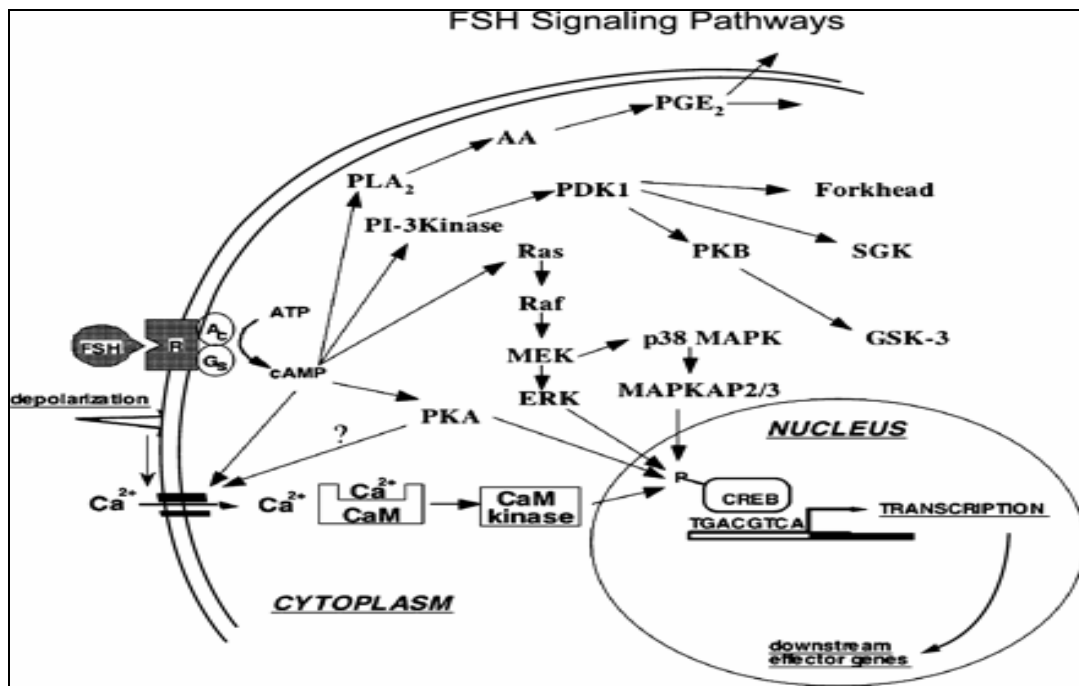


Figura 15. Señales intracelulares activadas por FSH en células de Sertoli de mamíferos. Inicialmente la FSH se une a su receptor produciendo la activación de la adenililciclase (AC) vía proteínas G, produciéndose un incremento en los niveles intracelulares de AMPc. Diversos factores son activados por AMPc, incluyendo PKA que puede fosforilar diferentes proteínas en la célula y regular la expresión y actividad de diversos factores de transcripción, por ejemplo CREB. La FSH produce un flujo de Ca²⁺ mediado por AMPc y tal vez, la PKA modifique los canales de calcio de la superficie. La depolarización de la célula también involucra un flujo de Ca²⁺. El incremento en los niveles de Ca²⁺ activa la calmodulina y las cinasas CaM, que participan entre otras cosas, en la fosforilación de CREB. Durante la pubertad, la FSH activa la vía de la MAP cinasas (MAPK) y la cinasa ERK, esta última es capaz de activar factores de transcripción como SRF, c-jun y CREB. En células granulosas de mamíferos, la FSH también activa a la MAPK p38. La FSH y el AMPc también actúan sobre los factores de intercambio de guanina (GEFS) para activar a PI3-K y a los fosfoinositidos dependientes de proteína cinasa 1 (PDK1) y PKB en células de Sertoli de mamíferos. En células granulosas se identifica al factor de transcripción "forkhead", cinasa glucocorticoides-inducida (SGK) y la cinasa-3 glicógeno sintasa (GSK-3) como blancos adicionales de la vía PI3-K. La FSH también regula la inducción de PLA₂ y la consiguiente liberación de ácido araquidónico (Tomado de Walker y Cheng, 2005).

Dependiente de IP3K es también la captación de glucosa que es convertida en lactato que provee la energía necesaria a las células germinales y la secreción de transferrina la cual, es muy importante para la espermatogénesis (Meroni y cols. 2002).

La activación de la PLA₂ por la FSH, conduce a la liberación de ácido araquidónico y su subsecuente metabolismo a prostaglandina E₂ y otros eicosanoides que intervienen en señales intra y extracelulares (Walker y Cheng, 2005).

JUSTIFICACION

Se reconoce hasta ahora, que la FSH utiliza al menos, cinco vías de señalización intracelular, PKA-AMPC, MAPK, calcio, PI3-K y PLA₂ que regulan las funciones de las células de Sertoli (fig. 15) e indirectamente las funciones de las células germinales; estas vías de señalización pueden entrecruzarse, dando una mayor complejidad a la comprensión de las funciones realizadas en las células de Sertoli y en la gónada en general.

La mayoría de los estudios realizados para identificar las vías intracelulares utilizadas por esta hormona, para regular las funciones en las gónadas, se basan en experimentos en ratas adultas; en esta etapa, se ha observado que existen modificaciones en la utilización de algunas vías de señalización dependientes de FSH, lo que nos da una idea de que el papel que tiene esta hormona en mecanismos de proliferación celular por ejemplo, así como la vía de señalización intracelular regulada por ella, puede modificarse de acuerdo a los requerimientos fisiológicos específicos, en las diferentes etapas del desarrollo embrionario, así como en la etapa adulta en los mamíferos y en otros vertebrados. Es claro el papel de la FSH en la proliferación celular en mamíferos (Dorrington y Armstrong, 1979), así como en las aves (Velázquez y cols. 1997), sin embargo, poco se conoce sobre las vías intracelulares utilizadas por esta gonadotropina, para regular la división celular durante el desarrollo embrionario de las aves, por lo que los objetivos del presente trabajo fueron:

OBJETIVOS

- ***Determinar la proliferación celular inducida por la hormona folículo estimulante (FSH) en cultivos de células testiculares de embriones de pollo de 18 días de incubación, utilizando la técnica de cuantificación de ³H-timidina incorporada.***
- ***Determinar la(s) probable(s) vía(s) de señalización intracelular utilizadas por la FSH para inducir proliferación celular en cultivos celulares de testículos embrionarios de pollos de 18 días de incubación.***
- ***Identificar la(s) subpoblaciones testiculares efectoras de la FSH utilizando la técnica inmunocitoquímica de 5-bromodesoxiuridina (BrdU), en cultivos organotípicos de testículos embrionarios de pollos de 18 días de incubación.***

MATERIALES Y METODOS

Material biológico. Huevo fértil libre de patógenos proporcionado por la granja avícola ALPES (puebla, México).

REACTIVOS

Acido acético concentrado (Merck, México, S.A.)
Acido tricloroacético (Merck, México, S.A.)
Adenosin monofosfato cíclico, AMPc-dibutiril (SIGMA, St. Louis, USA)
Albúmina sérica bovina (Merck, México, S.A.)
Azul tripano (SIGMA, St. Louis, USA)
Bicarbonato de sodio NaHCO₃ (J.T. Baker S.A. de C.V. México)
Cloruro de potasio KCl (Merck, México, S.A.)
Cloruro de sodio NaCl (Merck, México, S.A.)
DMEM (Medio Mínimo Esencial Modificado por Dulbecco) (GIBCO, Grand Island N.Y. USA)
Duodecil sulfato de sodio (SIGMA, St. Louis, USA)
Forskolina de *Coleus forskohlii* (SIGMA, St. Louis, USA)
Genisteina (SIGMA, St. Louis, USA)
Herbimicina A de *Streptomyces hygroscopicus* (SIGMA, St. Louis, USA)
Hormona folículo estimulante humana (Serono de México, S.A. de C.V.) 1 mUI
hFSH (fertinorm) es equivalente a 14 ng. de hFSH con 2pg de LH (Ulloa-Aguirre y cols. 1995).
Hormona folículo estimulante recombinante Gonal-F (Serono de México S.A. de C.V.)
Inhibidor de tripsina (SIGMA, St. Louis, USA)
Lavendustina A (SIGMA, St. Louis, USA)
Líquido de centelleo (Beckman, USA)
Metanol (Merck, México S.A.)
PMA (phorbol 12-myristate 13-acetato 4 β , 9 α , 12 β , 13 α , 20-pentahidroxitiglia-1,6-dien-3-one 12-tetradecanoato 13-acetato. (SIGMA, St. Louis, USA)
Timidina tritiada (DUPONT, NEN products) (2.0 Ci/mmol).
Tripsina (GIBCO, Grand Island N.Y. USA)

Metodología

Se obtuvieron testículos embrionarios de pollo de 18 días de incubación en condiciones estériles; posteriormente las gónadas se colocaron en solución salina libre de calcio y magnesio (S.S.B.) (*ver apéndice). Una vez obtenido todo el tejido, procedimos a disociarlo mecánico-enzimáticamente con tripsina (0.25%) durante 20 minutos a 37°C, transcurrido este tiempo se agregó inhibidor de tripsina (0.5%) para detener la reacción enzimática. El disociado

celular se centrifugó dos veces durante 10 minutos a 1200 r.p.m. con medio mínimo esencial modificado por DULBECCO más albúmina sérica bovina (DMEM+BSA) (*ver apéndice), para eliminar residuos enzimáticos. Posteriormente se determinó la viabilidad celular con la técnica de exclusión del azul tripano (Tennant, 1960). Una vez que se determinó un porcentaje de viabilidad celular mayor al 90%, se procedió a sembrar 500 000 células testiculares sobre membranas de policarbonato flotando en 2 ml. de DMEM + BSA, adicionado con FSH humana (hFSH) en distintas concentraciones para realizar una curva dosis-respuesta y en otros experimentos se utilizó FSH recombinante (rhFSH), o bien compuestos reguladores de la actividad de proteínas cinasas de residuos de tirosina- (genisteína, lavendustina A y herbimicina A) y reguladores de proteínas serina/treonina cinasas (forskolina, adenosin monofosfato cíclico (AMPC) y PMA), según el grupo experimental. Las dosis utilizadas de FSH para la curva dosis-respuesta fueron:

Grupo	Concentración de hFSH (UI/ml)
Control	0.0
Experimental 1	0.001
2	0.0035
3	0.007
4	0.015
5	0.031
6	0.0625
7	0.125
8	0.25
9	0.5
10	1.0
11	2.0

Los grupos experimentales para evaluar los diferentes compuestos reguladores de cinasas fueron los siguientes:

A) grupos controles DMEM + BSA

B) Grupos experimentales

DMEM + BSA + 0.5 UI/ml. hFSH

DMEM + BSA + 0.5 UI/ml. rhFSH

“ “ “ + genisteína 20 μ M

“ “ “ + lavendustina A 150 μ M

“ “ “ + herbimicina A 900nM

“ “ “ + forskolina 0.2 μ M

“ “ “ + AMPc 1mM

“ “ “ + PMA 2.04 μ M

C) Grupos experimentales, adicionados con reguladores de proteínas cinasas + FSH

Otra serie de experimentos se realizaron para obtener una curva temporal de respuesta a hFSH, en los cuales se adicionó 0.5 UI/ml de hFSH a los cultivos de células testiculares y se incubaron durante 24, 36, 48 y 60 horas, en cada una de las cuales se valoró la incorporación de 3 H-timidina.

A todos los grupos se les adicionó 0.1 μ Ci de 3 H-timidina para cuantificar su incorporación y se incubaron durante 60 horas (excepto los grupos para curva temporal de respuesta), a 37°C en una atmósfera de 95% de aire y 5% de CO₂.

CULTIVOS ORGANOTÍPICOS DE TESTÍCULO

Después de la obtención en condiciones estériles, de testículos embrionarios de pollo de 18 días de incubación, las gónadas se colocaron en una solución de tripsina (0.25%) y se resuspendieron durante 10 a 15 minutos para eliminar la cápsula de tejido conjuntivo que las rodea. Posteriormente, se obtuvieron pequeños fragmentos testiculares que se colocaron en cajas para cultivo de 35 x 10mm, con DMEM+BSA adicionado con 5-bromodesoxiuridina (BrdU). Estos cultivos se incubaron en las mismas condiciones que los cultivos celulares.

Después de 60 horas de incubación, los fragmentos testiculares se colocaron en una solución de paraformaldehido-glutaraldehido para su fijación y posteriormente se procesó el tejido para la obtención de cortes semifinos, a los cuales se les realizó la técnica inmunocitoquímica para BrdU (ver apéndice).

ANALISIS ESTADISTICO

Las diferencias entre los grupos experimentales fueron evaluadas por análisis de varianza y las pruebas de comparaciones múltiples de Duncan y Tukey (1 y 5%).

RESULTADOS

Incorporación de timidina tritiada

Curvas dosis-respuesta y temporal para FSH

Al cultivar las células testiculares de embriones de pollo de 18 días de incubación expuestos a diferentes dosis de hFSH durante 60 horas de cultivo, se encontró que el máximo efecto en la incorporación de ^3H -timidina fue con 2 UI/ml de hFSH, mientras que la dosis efectiva 50 (ED50) fue de 0.0625 UI/ml de hFSH (fig. 16).

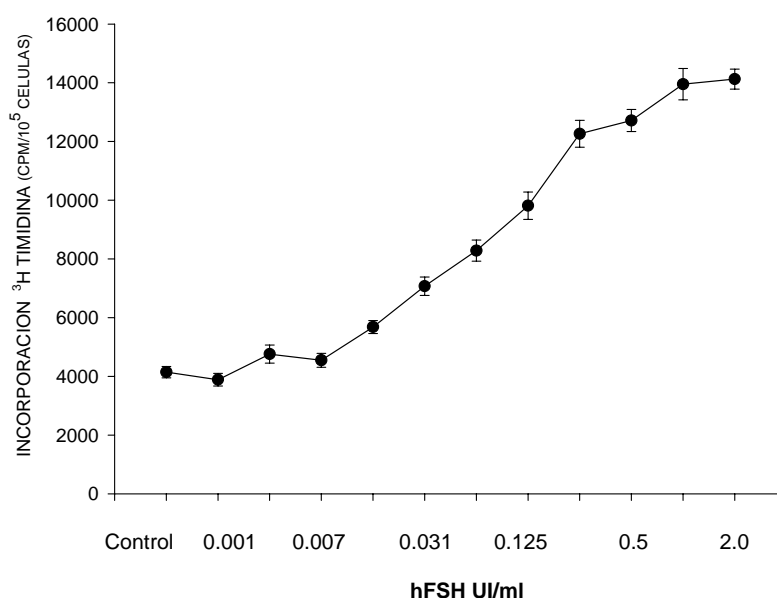


Figura 16. Curva dosis-respuesta para la hormona folículo estimulante humana (hFSH). Se muestra la incorporación de ^3H -timidina a las 60 horas de cultivo de agregados de células testiculares. Cada punto representa la media \pm SEM de cuatro experimentos por separado.

Al evaluar la incorporación de timidina tritiada en los cultivos de agregados celulares a diferentes tiempos de incubación (24, 36, 48 y 60 horas), se encontró que desde las 24 horas de cultivo ya existen diferencias entre los grupos tratados y el grupo control, estas diferencias fueron estadísticamente significativas desde las 36 hasta las 60 horas de cultivo, en donde se presentó la mayor incorporación de timidina tritiada (fig. 17).

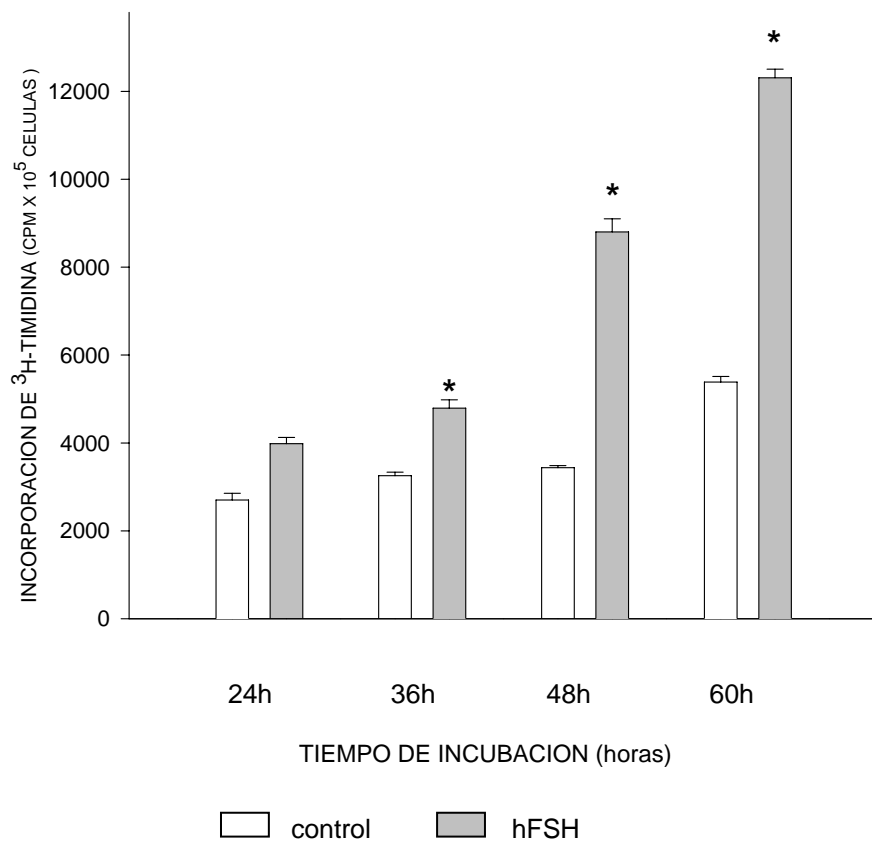


Figura 17. Incorporación de ³H-timidina en cultivos de agregados de células testiculares en diferentes tiempos de incubación. Las barras representan la media ± SEM de tres experimentos por separado con cuatro replicas cada uno. Los asteriscos indican las diferencias estadísticas significativas con respecto al grupo control (P< 0.001)

Tratamiento con reguladores de la actividad de cinasas

De los grupos tratados con inhibidores de cinasas de residuos de tirosina (PTK), lavendustina A, genisteína y herbimicina A, sólo esta última incremento significativamente la incorporación de ³H-timidina con respecto al grupo control (gráfica 3). Los grupos experimentales tratados con lavendustina A, presentaron un estímulo en la proliferación celular, menor al del grupo control. La FSH humana y la FSH recombinante produjeron de manera similar, un incremento en la proliferación de células testiculares, siendo su efecto mayor al producido por la herbimicina A.

De los grupos experimentales tratados con agentes activadores de proteína cinasa A, (AMPc, forskolina), se observó que el AMPc, estimuló muy poco la incorporación de timidina tritiada, siendo este estímulo estadísticamente no

significativo con respecto al grupo control, mientras que la forskolina, produjo una incorporación menor al grupo control.

Tampoco se observaron efectos significativos con el éster de forbol PMA, activador de proteína cinasa C, en la proliferación de células testiculares de embriones de pollos de 18 días de incubación (fig. 18).

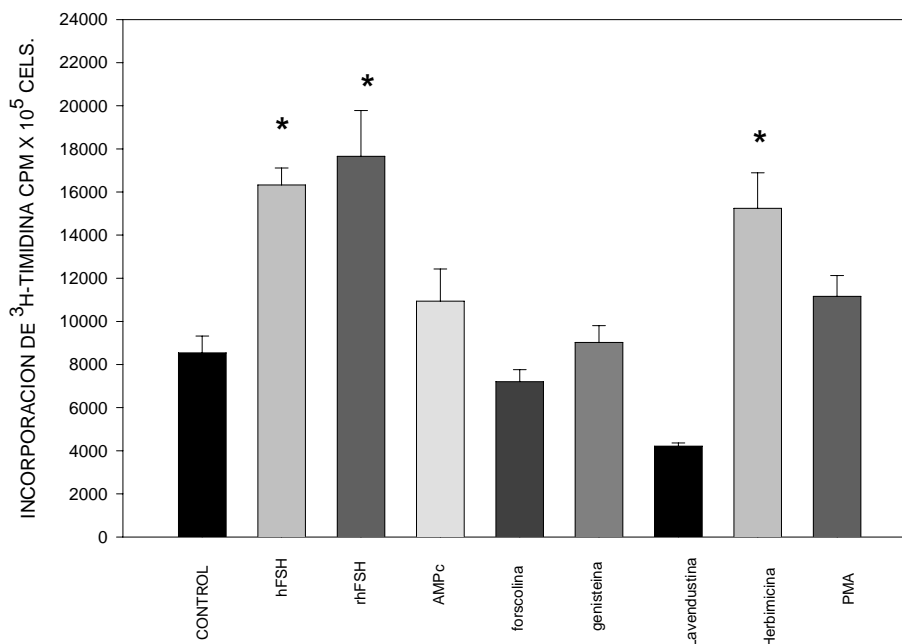


Figura 18. Efecto sobre la incorporación de ³H-timidina de la FSH humana, (hFSH), recombinante (rhFSH) y de los diferentes reguladores de cinasas en cultivos de células testiculares. Compuestos activadores de PKA como AMPc y forskolina no produjeron un incremento significativo, en la proliferación celular, mientras que el compuesto inhibidor de PTKs., herbimicina A y la FSH estimularon significativamente la incorporación de ³H-timidina en células testiculares embrionarias de aves, a las 60 horas de cultivo. Las barras representan la media ± SEM de diez experimentos por separado con cuatro replicas cada uno. Los asteriscos indican diferencias significativas con respecto al grupo control (p<0.001).

Los grupos experimentales tratados con reguladores de cinasas a los cuales se les adicionó simultáneamente hFSH, incrementaron significativamente la incorporación de ³H-timidina, comparada con el grupo control, que sólo tenía DMEM + BSA (fig. 19).

Sin embargo, los grupos tratados con forskolina, genisteina, herbimicina A y PMA adicionados con FSH, mostraron una mayor incorporación, estadísticamente significativa con respecto al grupo control, siendo el grupo tratado con herbimicina A + hFSH, el que mostró el mayor incremento en la incorporación de ³H-timidina de todos los grupos experimentales. La adición únicamente de hFSH, como se esperaba, también produjo un aumento significativo en la incorporación de ³H-timidina (fig.19).

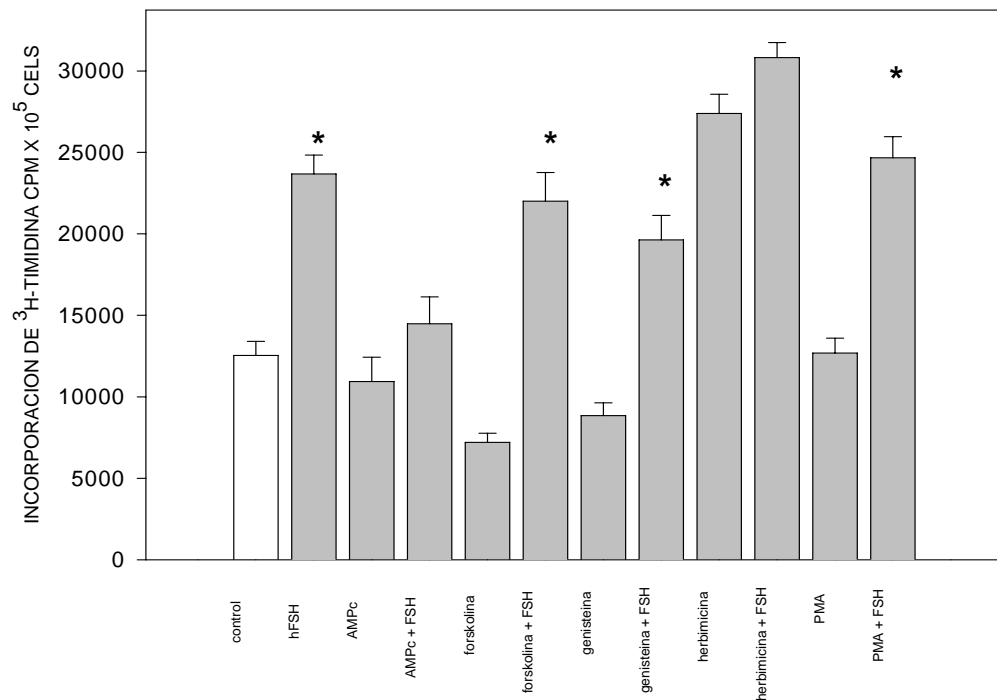


Figura 19. Incorporación de ³H-timidina en grupos tratados con hFSH, reguladores de proteínas cinasas y la mezcla de ambos. La adición simultánea de hFSH en los diferentes grupos tratados con compuestos activadores de PKA (AMPc y forskolina), inhibidores de PTK (herbimicina A, lavendustina A y genisteína) y el activador de PKC, PMA, produjo un incremento significativo en la proliferación celular en todos los grupos con respecto a los grupos adicionados solo con el agente regulador de proteínas cinasas. Los grupos adicionados con AMPc, AMPc+hFSH y herbimicina, herbimicina A + hFSH, no mostraron diferencias entre ellos. Los asteriscos muestran las diferencias estadísticamente significativas con respecto al grupo control. (P < 0.001)

La adición de hFSH a los grupos tratados con AMPc, no produjo diferencias estadísticamente significativas con respecto a la adición sólo de AMPc; se observó una respuesta similar en la incorporación de timidina tritidada en los grupos tratados con herbimicina A sola y los adicionados con hFSH.

Inmunocitoquímica

Los testículos embrionarios cultivados en presencia de 5-bromodesoxiuridina (BrdU), fueron procesados para realizar técnicas inmunocitoquímicas de alta resolución, se obtuvieron cortes semifinos para microscopía electrónica, los cuales fueron tratados con la técnica inmunocitoquímica para BrdU. Posteriormente fueron observados y fotografiados en un microscopio de fluorescencia y se encontró un incremento considerable en el número de núcleos positivos para BrdU en los grupos tratados con hFSH y herbimicina con respecto a los grupos controles (fig. 20).

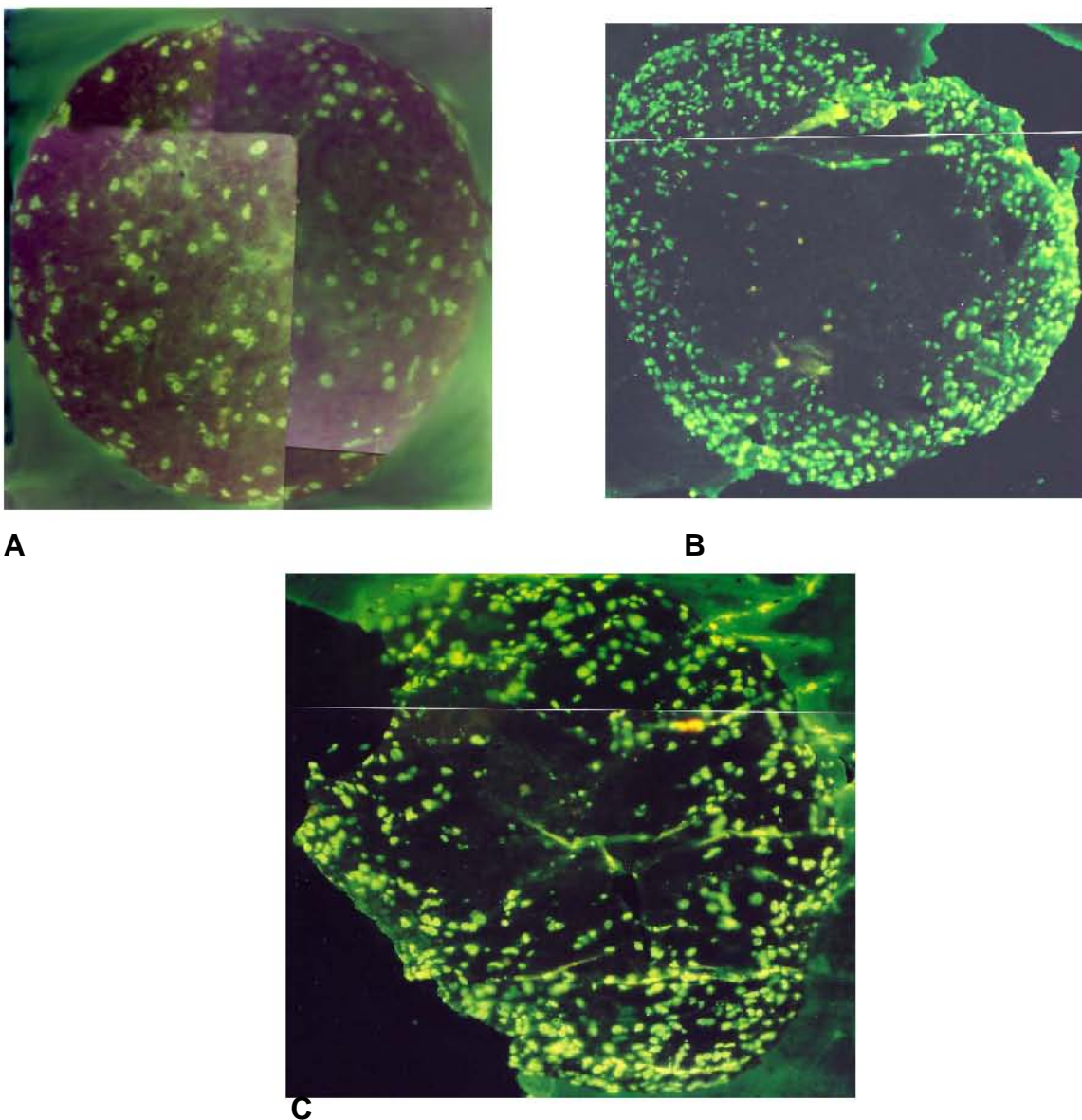
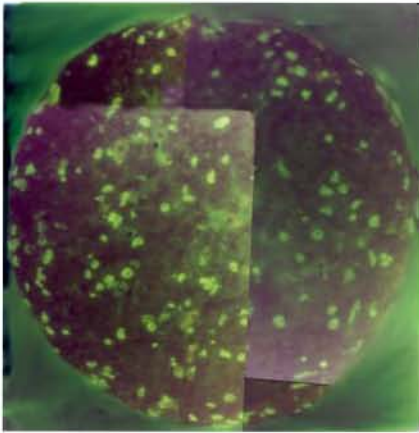


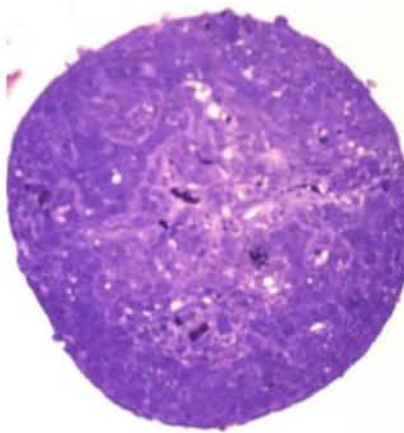
Figura 20. Cortes semifinos de testículos de embriones de pollo de 18 días de incubación. A) grupo control, B) grupo tratado con hFSH y C) grupo tratado con herbimicina A.. El grupo control presenta un menor número de células positivas para BrdU que los grupos tratados. (200x)

I Control

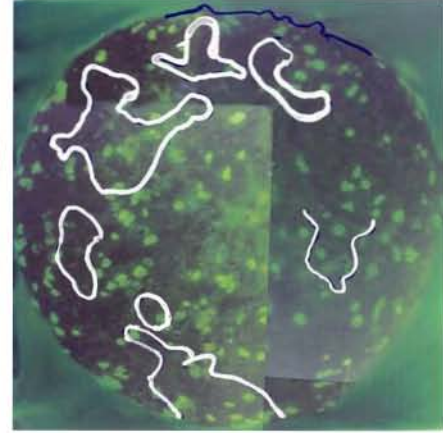
A



B

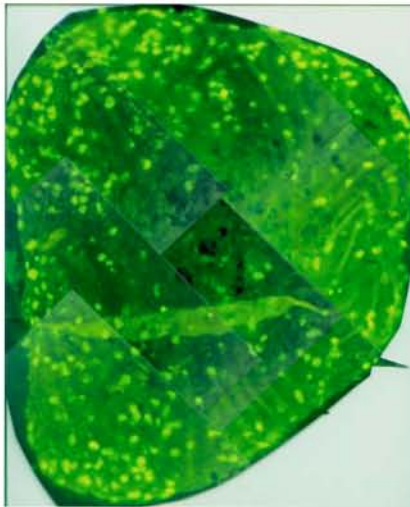


C

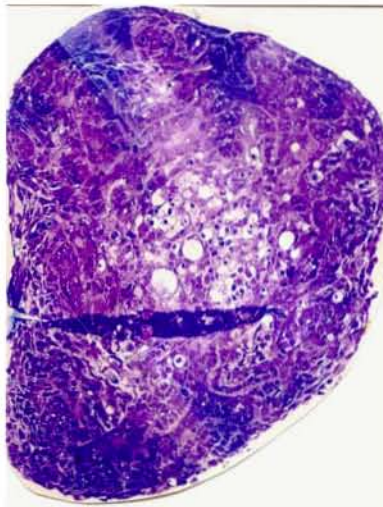


II hFSH

A



B



C



Figura. 21. Cortes semifinos de testículos embrionarios de pollos de 18 días de incubación cultivados en (DMEM- BSA) adicionado con BrdU por 60 horas. Grupos controles (I), grupos tratados con hFSH (II). A) microfotografía con microscopía de fluorescencia, B) microfotografía con microscopía de campo claro contrastada con azul de toluidina, C) superposición de las imágenes A y B, caracterizando las subpoblaciones celulares efectoras de la hFSH. 400X

Para determinar las subpoblaciones celulares efectoras de la FSH se tomaron fotografías con microscopía de fluorescencia de cortes semifinos de testículos embrionarios cultivados en medio de cultivo adicionado con BrdU por 60 horas. Después del tratamiento, se desmontaron las preparaciones de estos cortes

semifinos y se contrastaron con azul de toluidina para posteriormente fotografiarlos con microscopía de campo claro. Se obtuvieron por superposición de imágenes la localización de los núcleos positivos para BrdU, tanto de células somáticas como germinales de la gónada (fig 21). Los resultados obtenidos demostraron un incremento en la proliferación de las células testiculares, en respuesta a la adición de FSH, al producir esta hormona, un incremento en la incorporación de ^3H -timidina en cultivos celulares y por otro lado, observarse un mayor número de núcleos positivos para BrdU en los cortes semifinos de fragmentos testiculares procesados por esta técnica. En estos cortes también se observó que el mayor número de células que incorporan BrdU en su núcleo, tanto en los grupos control, como en los tratados con hFSH, se encuentran fuera de los cordones testiculares, en la región intersticial.

DISCUSIÓN

La proliferación celular y la síntesis de hormonas esteroides durante el desarrollo gonadal, son eventos importantes que participan en el establecimiento de una estructura con características y funciones específicas

En el desarrollo y crecimiento folicular, por ejemplo, las hormonas gonadotropas (LH y FSH) participan en la regulación de la síntesis y secreción de andrógenos, estrógenos y progestágenos, así como en la proliferación celular en ambas gónadas. Estas gonadotropinas son necesarias para la diferenciación gonadal y su actividad se inicia tempranamente en el desarrollo de las aves y de los mamíferos (Pedernera y cols., 1999; Peralta y cols. 2004).

Para que se inicie la actividad fisiológica de ambas gonadotropinas, es necesaria la unión de estas hormonas a su receptor de membrana y la activación de la cascada de señalización intracelular, la cual involucra la participación del AMPc y la cinasa dependiente de AMPc, PKA; es reconocido que esta vía de señalización es utilizada por ambas gonadotropinas para regular muchas de las funciones gonadales, como la proliferación y diferenciación celular; sin embargo, en investigaciones más recientes, se ha demostrado la existencia de cascadas de señalización reguladas por la FSH, independientes de PKA, en células de la granulosa y células de Sertoli de mamíferos (González-Robayna, 2000; Richards, 2001; Walker y Cheng, 2005). Estas cascadas de señalización involucran la participación de AMPc y la consiguiente activación de la vía de calcio-calmodulina, la activación de la vía de la MAPK, importante por su participación en la proliferación de células de Sertoli de mamíferos, en periodos cortos después del nacimiento (Crepieux y cols. 2001), la vía de la fosfatidilinositol 3-cinasa (IP₃K) y la vía de la fosfolipasa A (fig. 15).

Una de las vías de señalización dependientes de PKA, involucra a la cinasa ERK, la cual es regulada por la cinasa de residuos de tirosina (PTK) Src, esta molécula es una tirosina cinasa intracelular, la cual al igual que otras PTKs, como Bcr-Abl, y el receptor a EGF, son bloqueadas de manera irreversible por la herbimicina A (Levitzki y Gazit, 1995), mientras que otros compuestos como la genisteína y la lavendustina A, actúan como inhibidores de amplio espectro de la actividad de las PTKs.

Lo anterior, nos ayuda a explicar los resultados obtenidos al demostrar que el AMPc adicionado a cultivos de células testiculares de embriones de pollo de 18 días de incubación, no produjo un incremento significativo en la incorporación de ³H-timidina, al igual que la forskolina que es un agente estimulador de PKA, indicando que la vía de señalización AMPc-PKA, en la etapa del desarrollo embrionario que investigamos, probablemente tiene un papel secundario en la regulación de la proliferación celular estimulada por la FSH, en este periodo del desarrollo embrionario de las aves.

El éster de forbol, PMA que es un reconocido activador de la proteína cinasa C (PKC), tampoco produjo cambios significativos en la incorporación de timidina tritiada en el modelo estudiado, sin embargo, se ha descrito que esta cinasa, además de las cinasas de residuos de tirosina (PTK) y la PKA, son vías de señalización utilizadas para la diferenciación de las células granulosas de mamíferos (Peluso y cols. 1993).

La utilización de diferentes compuestos inhibidores de PTK, como genisteína, lavendustina A y herbimicina A, demostró que esta última produjo un incremento estadísticamente significativo en la proliferación celular, cuantificada por la incorporación de ³H-timidina, haciéndose evidente también por la técnica de incorporación de BrdU. La herbimicina A, es un compuesto que bloquea de manera irreversible a las cinasas intracelulares Src, Bcr-Abl y el receptor a EGF (Levitzki y Gazit, 1995). Este fármaco actúa específicamente sobre la cinasa Src, que pertenece a una familia de cinasas de residuos de tirosina citoplásmicas, las cuales están relacionadas con la regulación de diversas funciones celulares, como la proliferación, migración y adhesión celular (Thomas and Brugge, 1997). Al parecer, Src está regulada por la subunidad α , de las proteínas G, acopladas a algunos receptores como los de la FSH, LH y otras glucoproteínas (Ma y cols. 2000) En las gónadas se desconoce la función exacta de esta cinasa, pero se ha demostrado que activa a la cinasa ERK, que es regulada a su vez, por la vía FSH-PKA en células de Sertoli de mamíferos (Crepieux y cols. 2001). La cinasa ERK, estimula a la ciclina D1 y al factor E2F, importantes para la división de células de Sertoli en ratas adultas (Walker y Cheng, 2005).

Nuestros resultados sugieren que las cinasas de residuos de tirosina o PTKs, participan en la inhibición de la proliferación celular en el modelo estudiado;

muy probablemente la cinasa relacionada con este mecanismo de inhibición, sea Src, o alguna otra cinasa citoplásmica inhibida por la herbimicina A, esto nos indica que en células testiculares embrionarias de aves, ocurre algo distinto a lo observado en células de Sertoli de mamíferos, al demostrar que alguna PTK citoplásmica inhibe la división celular en nuestro modelo experimental y esta vía probablemente actué sobre alguna ciclina o algún otro factor regulador de la división celular, como lo hace Src, en los mamíferos.

La FSH muy probablemente, utiliza la vía de PKA para estimular la proliferación celular en el testículo embrionario de aves, pero no como vía principal, ya que observamos un bajo incremento en la división celular en los grupos tratados con AMPc, sin embargo, nos preguntamos porque la vía AMPc-PKA, aparentemente, no es la vía primaria que utiliza FSH para estimular la proliferación celular, en este momento del desarrollo embrionario; tal vez esto se deba a que existen variaciones en la proliferación de las células de Sertoli, en las diferentes etapas de desarrollo pre y posnatal. Se desconoce si existen variaciones en las vías de señalización utilizadas para la división de estas células en las diferentes etapas de desarrollo. Sin embargo, principalmente después del nacimiento, se ha demostrado que existen rutas de señalización intracelular independientes de PKA, que forman parte de la cascada de señalización desencadenada por la FSH y que participan en distintas funciones como el metabolismo celular, la división celular y el mantenimiento del citoesqueleto de las células de Sertoli de mamíferos.

Otro hecho importante, es que la combinación de FSH + herbimicina A, en cultivos de células testiculares de pollo con 18 días de incubación, produjo un efecto proliferativo estadísticamente significativo al compararlo con esta gonadotropina sola, indicando que existe una relación entre la vía de las cinasas de residuos de tirosina y probablemente la vía de PKA, debido también, al incremento en la proliferación celular, observado en los grupos tratados con forskolina + FSH.

Actualmente se desconocen los mecanismos de señalización intracelular utilizados por la FSH para estimular la proliferación celular durante el desarrollo embrionario del testículo de aves, por lo que nuestros resultados son importantes, al aportar información sobre el papel de las cinasas de residuos

de tirosina en la regulación de este mecanismo de división celular, estimulado por la FSH, durante el desarrollo gonadal de las aves.

Los resultados obtenidos, utilizando la técnica de BrdU como indicador de la proliferación celular, mostraron la presencia de células positivas en el interior de los cordones testiculares, que por sus características morfológicas nos permiten identificarlas como células de Sertoli, mientras que entre los cordones testiculares, en la región que corresponde al intersticio, se observaron un gran número de núcleos celulares fluorescentes que corresponden a las células secretoras de andrógenos y a la población de células pericordonaes; esto nos indica que es elevado el nivel de proliferación de las células somáticas estimulado por la FSH, en el testículo de las aves en esta etapa del desarrollo y es evidente que deben existir relaciones de tipo parácrino y autócrino como se ha descrito en las gónadas de mamíferos (Saéz, 1994), entre los componentes celulares del testículo embrionario de las aves.

CONCLUSIONES

- La FSH estimula la proliferación de células testiculares de embriones de pollo de 18 días de incubación
- La FSH no utiliza la vía de señalización intracelular en la que participa la cinasa dependiente de AMPc (PKA) o la PKC, como rutas principales para estimular la división celular en el modelo estudiado.
- La vía de señalización intracelular, en la que participan las cinasas de residuos de tirosina (PTK), se determinó que tiene un efecto inhibitorio en la proliferación celular en el testículo embrionario de las aves.
- El estímulo proliferativo de la FSH en el testículo embrionario, probablemente está relacionado con estímulos parácrinos y autócrinos que regulan las funciones y la proliferación de las células que se encuentran en la región intersticial del testículo embrionario de aves.

BIBLIOGRAFÍA

1. Ariyaratne HB., Mendis-Handagama SM., Hales DB. And Mason JI. (2000). Studies of the onset of Leydig precursor cell differentiation in the prepubertal rat testis. *Biol. Reprod.* 63, 165-171.
2. Baker PJ., Sha JA., McBride MW., Peng L., Payne AH. and O'Shaughnessy PJ.(1999). Expression of 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase type I and VI isoforms in the mouse testis during development. *Eur. J. Biochem.* 260, 911-916.
3. Buzzard JJ., Wreford NG., Morrison JR. (2003). Thyroid hormone, retinoic acid, and testosterone suppress proliferation and induce markers of differentiation in cultured rat sertoli cells. *Endocrinology.* Sep;144(9):3722-31
4. Carlone DL, Richards JS (1997). Functional interactions, phosphorylation, and levels of 3'5'-cyclic adenosine monophosphate-regulatory element binding protein and steroidogenic factor-1 mediate hormone-regulated and constitutive expression of aromatase in gonadal cells. *Mol Endocrinol* 11:292–304.
5. Carlson BM. (1994). *Human embryology and developmental biology.* 1a edición. Mosby Year Book, Inc. St. Louis Missouri.
6. Cotecchia S, Ostrowski J, Kjelsberg MA, Caron MG, Lefkowitz RJ. (1992). Constitutive activation of the alpha 1B-adrenergic receptor by all amino acid substitutions at a single site. Evidence for a region which constrains receptor activation. *J Biol Chem.* Jan 25;267 (3):1430-3.
7. Crepieux P, Marion S, Martinat N, Fafeur V, Vern YL, Kerboeuf D, Guillou F & Reiter E (2001). The ERK-dependent signalling is stage-specifically modulated by FSH, during primary Sertoli cell maturation. *Oncogene* 20 4696–4709
8. Dal Toso R., Sommer B., Ewert M., Herb A., Pritchett DB., Bach A., Shivers BD. and Seeburg PH. (1989). *EMBO J.* 8, 4025-4034.
9. Datta SR, Brunet A, Greenberg ME (1999). Cellular survival: a play in three Akts. *Genes Dev* 13:2905–2927
10. Dias JA (2005). Endocrinology: fertility hormone in repose. *Nature* 433 203–204.
11. Dorrington JH. and Armstrong TD. (1979). Effect of FSH on gonadal functions. *Rec. Progr. Hormone. Res.* 35, 301-342.

12. Dorrington JH, Bendell JJ, Khan SA. (1993). Interactions between FSH, estradiol-17 β and transforming growth factor- β regulate growth and differentiation in the rat gonad. *J Steroid Biochem Mol Biol.* Mar;44(4-6):441-447.
13. Dudek H, Datta SR, Franke TF, Birnbaum MJ, Yao R, Cooper GM, Segal RS, Kaplan DR, Greenberg ME (1997). Regulation of neuronal survival by the serine-threonine protein kinase Akt. *Science* 275:661–665
14. Erickson GF.(1994). Non-gonadotropin regulation of ovarian function: growth hormone and IGFs. In: Filicori M., Flamigni C., Eds. *Ovulation induction: basic science and clinical advances: International congress series.* Amsterdam, The Netherlands: Elsevier Science Publishers. 1046, 73-84.
15. Fan QR & Hendrickson WA (2005). Structure of human follicle-stimulating hormone in complex with its receptor. *Nature* 433 269–277
16. Fero ML, Rivkin M, Tasch M, Porter P, Carow CE, Firpo E, Polyak K, Tsai LH, Broudy V, Perlmutter RM, Kaushansky K, Roberts JM. (1996). A syndrome of multiorgan hyperplasia with features of gigantism, tumorigenesis, and female sterility in p27^{Kip1}-deficient mice. *Cell*; 85:733–744.
17. Grasso P & Reichert LE Jr. (1989). Follicle-stimulating hormone receptor-mediated uptake of $^{45}\text{Ca}^{2+}$ by proteoliposomes and cultured rat sertoli cells: evidence for involvement of voltage-activated and voltage-independent calcium channels. *Endocrinology*, 125 3029–3036
18. Gerritsen ME, Williams AJ, Neish AS, Moore S, Shi Y, Collins T.(1997). CREB-binding protein/p300 are transcriptional coactivators of p65. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:2927–2932
19. Gilbert AB. (1971). In: *Physiology and Biochemistry of the domestic fowl.* (DJ. Bell and BM. Freeman, eds. Academic Press, London 3, 1149-1168.
20. Gonzalez-Robayna IJ, Falender AE, Ochsner S, Firestone GL, Richards JS (2000). FSH stimulates phosphorylation and activation of protein kinase B (PKB/Akt) and serum and glucocorticoid-induced kinase (Sgk): evidence for A-kinase independent signaling in granulosa cells. *Mol Endocrinol* 14:1283–1300
21. Gross B., Misrahi M., Sars S. and Milgrom E. (1991). Composite structure of the human thyrotropin receptor gene. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* Jun 14, 177(2), 679-687.

22. Harley RV., Clarkson JM. and Argentaro A.(2003). The molecular action and regulation of the testis-determining factors, SRY (sex-determining Region on the Y Chromosome) and SOX9 [SRY-related High-Mobility Group (HMG) Box9]. *Endocrine Reviews*, 24(4): 466-487.
23. Heckert L.L., Daley I. and Griswold MD. (1992). Structural organization of the follicle-stimulating hormone receptor gene. *Mol. Endocrinol.* Jan 6(1), 70-80.
24. Heckert I. and Griswold MD. (1993). Expression of the FSH receptor in the testis. *Recent Prog. Horm. Res.* Vol 48, 61- 77.
25. Holsberger DR, Jirawatnotai S, Kiyokawa H, Cooke PS. (2003). Thyroid hormone regulates the cell cycle inhibitor p27Kip1 in postnatal murine Sertoli cells. *Endocrinology.* Sep;144(9):3732-8.
26. Holsberger DR, Buchold GM, Leal MC, Kiesewetter SE, O'Brien DA, Hess RA, Franca LR, Kiyokawa H, Cooke PS. (2005). Cell-cycle inhibitors p27Kip1 and p21Cip1 regulate murine Sertoli cell proliferation. *Biol Reprod.* Jun;72(6):1429-36. Epub 2005 Feb 23.
27. Huhtaniemi I.(1994). Fetal testis a very special endocrine organ. *Euro. Jour. Endocrinol.* 130, 25-31.
28. Hyams JS. And Brinkley BR. (1989). Mitosis. In: *Molecules and mechanism.* Ed. Academic Press. 83-167.
29. Jirawatnotai S, Moons DS, Stocco CO, Franks R, Hales DB, Gibori G, Kiyokawa H. (2003).The cyclin-dependent kinase inhibitors p27Kip1 and p21Cip1 cooperate to restrict proliferative life span in differentiating ovarian cells. *J Biol Chem.* May 9;278(19):17021-7. Epub 2003 Feb 27.
30. Johnson GL, Dhanasekaran N. (1989).The G-protein family and their interaction with receptors. *Endocr Rev.*Aug;10 (3):317-31. Review.
31. Joyce KL., J. Porcelli and PS. Cooke. (1993). Neonatal goitrogen treatment increases adult testis size and sperm production in the mouse. *J. Androl,* 14(6): 448-455.
32. Kawashima I, Seiki K, Sakabe K, Ihara S, Akatsuka A, Katsumata Y (1992). Localization of estrogen receptors and estrogen receptor-mRNA in female mouse thymus. *Thymus.* Sep;20 (2):115-21.
33. Kendall SK, Samuelson LC, Saunders TL, Wood RI, Camper SA. (1995) Targeted disruption of the pituitary glycoprotein hormone α -subunit produces hypogonadal and hypothyroid mice. *Genes Dev* 9:2007–2019

34. Kettlewell JR., Raymond CS. and Zarkower D. (2000). Temperature-dependent expression of turtle *Dmrt1* prior to sexual differentiation. *Genesis*. 26, 174-178.
35. Knobil E. and Neill JD. (1988). The Sertoli cell. In: *The physiology of reproduction*. Raven Press New York. Vol. 1.933-974.
36. Koo YB., Ji I., Slaughter RG. And Ji. TH. (1991). Structure of the luteinizing hormone receptor gene and multiple exons of the coding sequence. *Endocrinology*. May; 28 (5):2297-308.
37. Lalevee N, Pluciennik F & Joffre M (1997). Voltage dependent calcium current with properties of T-type current in Sertoli cells from immature rat testis in primary cultures. *Biology of Reproduction*, 56 680–687
38. Levitzki A. and Gazit A. (1995). Tyrosine kinase inhibition: an approach to drug development. *Science*, 267, 24 March.1782-1788.
39. Lording DW. and De Krester DM. (1972). Comparative ultrastructural and histochemical studies of the interstitial cells of the rat testis during fetal and postnatal development. *J. Reprod. Fertil.* 298: 261-269.
40. Loosfelt H, Misrahi M, Atger M, Salesse R, Vu Hai-Luu Thi MT, Jolivet A, Guiochon-Mantel A, Sar S, Jallal B, Garnier J, et al. (1989). Cloning and sequencing of porcine LH-hCG receptor cDNA: variants lacking transmembrane domain. *Science*. Aug 4;245 (4917):525-8.
41. Ma Yong-Chao, Huang J., Ali S., Lowry W. and Huang Xin-Yun. (2000). Src Tyrosine kinase is a novel direct effector of G proteins. *Cell*, Vol. 102, 635-646.
42. McFarland KC, Sprengel R, Phillips HS, Kohler M, Rosemblyt N, Nikolics K, Segaloff DL, Seeburg PH. (1989). Lutropin-choriogonadotropin receptor: an unusual member of the G protein-coupled receptor family. *Science*. Aug 4;245 (4917):494-9.
43. Marchand O. (2000). DMRT1 expression during gonadal differentiation and spermatogenesis in the rainbow trout. *Oncorhynchus mykiss*. *Biochem. Biophys. Acta*. 1493, 180-187.
44. Mendis-Handagama SMLC., Risbridger GP., de Krester DM. (1987). Morphometric analysis of the components of the neonatal and the adult rat testis interstitium. *Int. J. Androl.* 10: 525-534.
45. Meroni SB, Riera MF, Pellizzari EH & Cigorruga SB. (2002). Regulation of rat Sertoli cell function by FSH: possible role of phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B pathway. *Journal of Endocrinology*, 174 195–204

46. Moniot B., Berta P., Scherer G., Sudbeck P. and Poulant F. (2000). Male specific expression suggest role DMRT1 in human sex determination. *Mech. Dev.* 91. 323-325.
47. Moreno MN. y Merchant-Larios H. (1997). Desarrollo embrionario de las Gónadas. En: curso internacional, "Actualización en Fisiología". Sociedad Mexicana de Ciencias Fisiológicas A.C. UNAM y Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.
48. Mullaney PB., Roselli M. and Skinner MK. (1994). Developmental regulation of Sertoli cell lactate production by hormones and the testicular paracrine factor, PmodS. *Mol. and Cell. Endocrinol.* 104, 67-73.
49. Mukherjee A, Urban J, Sassone-Corsi P, Mayo KE. (1998). Gonadotropins regulate inducible cyclic adenosine 3',5'-monophosphate early repressor in the rat ovary. *Mol Endocrinol* 12:785–800
50. Nakayama K, Ishida N, Shirane M, Inomata A, Inoue T, Shishido N, Horii I, Loh DY, Nakayama K. (1996). Mice lacking p27^{Kip1} display increased body size, multiple organ hyperplasia, retinal dysplasia, and pituitary tumors. *Cell*; 85:707–720
51. Nef S., Shipman T. and Parada LF. (2000). A molecular basis for estrogen-induced cryptorchidism. *Dev. Biol.* 224, 354-361.
52. Norton NJ., Vigne Jean-Lois and Skinner MK. (1994). Regulation of Sertoli cell differentiation by the testicular paracrine factor PmodS: análisis of common signal transduction pathways. *Endocrinology.* 134 (1). 149-157.
53. O'Dowd BF, Lefkowitz RJ, Caron MG. (1989). Structure of the adrenergic and related receptors. *Annu Rev Neurosci.* 12:67-83. Review.
54. Orth JM. (1984). The role of follicle stimulating hormone in controlling Sertoli cell proliferation in testes of fetal rats. *Endocrinology,* 115(4), 1248-1255.
55. O'Shaughnessy PJ., Baker P., Sohnius U., Haavisto AM., Charlton HM. And Huhtaniemi I. (1998). Fetal development of Leydig cell activity in the mouse is independent of pituitary gonadotroph function. *Endocrinology* 139 (3), 1141-1146.
56. O'Shaughnessy PJ., Johnston H., Willerton L. and Baker PJ. (2002). Failure of normal adult Leydig cell development in androgen-receptor-deficient mice. *J. Cell Sci.* 115, 3491-3496.

57. O'Shaughnessy PJ., Willerton L. and Baker PJ. (2002). Changes in Leydig cell gene expression during development in the mouse. *Biol. Reprod.* 66, 966-975.
58. O'Shaughnessy PJ., Fleming LM., Jackson G., Hochgeschwender U., Reed P. and Baker PJ. (2003). Adrenocorticotrophic hormone directly stimulates testosterone production by the fetal and neonatal mouse testis. *Endocrinol.* 144(8): 3279-3284.
59. Pelliniemi LJ. and Dym M. (1980). The fetal gonad and sexual differentiation. In: *Maternal-Fetal Endocrinology*. Edited by D. Tulchinsky and K.J. Ryan. 252-280. W.B. Saunders, Philadelphia.
60. Parmentier M. (1989). Molecular cloning of the thyrotropin receptor. *Science.* 246: 1620-1622.
61. Pedernera E., Solís AL., Peralta DI. and Velázquez PN. (1999). Proliferative and steroidogenic effects of follicle stimulating hormone during chick embryo gonadal development. *Gen. Comp. Endocrinol.* 116, 213-220.
62. Peralta DI., 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: 1193-1198.
63. Peralta-Zaragoza O., Román-Bahena M., Díaz-Benítez CE., and Madrid-Marina V. (1997). Regulación del ciclo celular y desarrollo de cáncer: perspectivas terapéuticas. *Salud Pública Mex.* 39(5), 451-462.
64. Pierce JG. and Parsons TF. (1981). Glycoprotein hormones: structure and function. *Annual Review of Biochemistry.* 50: 465-495.
65. Pointis G, Mahoudeau JA, Courrier R. (1975). The effect of gonadotropic hormones and the fetal hypophysis on testosterone production by the testis of 18 day mouse fetuses in organ culture. *C R Acad Sci Hebd Seances Acad Sci Ser D* 280:2361–2364
66. Raymond CS., Kettlewell JR., Hirsch B., Bardwell VJ and Zarkower D. (1999a). Expression of *Dmrt1* in the genital ridge of mouse and chicken embryos suggest a role in vertebrate sexual development. *Dev. Biol.* 215, 208- 220.
67. Raymond CS., Kettlewell JR., Hirsch B., Bardwell VJ and Zarkower D. (1999b). A region of human chromosome 9p required for testis development contains two genes related to known sexual regulators. *Hum. Mol. Genet.* 8, 989-996.

68. Richards JS. (1994). Hormonal control of gene expression in the ovary. *Endocrine Reviews*. 15,6.
69. Richards J. (2001). New signaling pathways for hormones and cyclic adenosine 3',5'-monophosphate action in endocrine cells. *Mol Endocrinol*. Feb;15 (2):209-18.
70. Robker RL and Richards JS.(1998). Hormonal control of the cell cycle in ovarian cells: proliferation versus differentiation. *Biol Reprod*. Sep;59(3):476-82.
71. Saéz JM. (1994). Leydig cells: endocrine, paracrine and autocrine regulation. *Endocrine reviews*.15 (5), 574-626.
72. Sasaki M., Yamamoto M., Arishima K. and Eguchi Y. (1998). Effects of follicle-stimulating hormone on intermediate filaments and cell division of Sertoli cells of fetal rat testis in culture. *J. Vet. Med. Sci*. 60(1): 35-39.
73. Saton M. (1985). The histogenesis of the gonad in rat embryos. *J. Anat*. 143: 17-37.
74. Scobey MJ, Bertera S, Somers JP, Watkins SC, Zeleznik AJ & Walker WH. (2001) Delivery of a cyclic adenosine 3', 5'-mono-phosphate Response element binding protein (CREB) to seminiferous tubules results in impaired spermatogenesis. *Endocrinology*, 142 948–954
75. Simoni M, Gromoll J, Nieschlag E. (1998). Molecular pathophysiology and clinical manifestations of gonadotropin receptordefects. *Steroids*. May-Jun;63 (5-6):288-93.
76. Skinner MK and Fritz IB. (1985). Testicular cells secrete a protein under androgen control that modulates Sertoli cell function. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 82: 114-118.
77. Skinner MK. and Fritz IB. (1986). *Mol. Cell. Endocrinol*. 44, 85-97.
78. Smith CA., McClive PJ., Western PS., Reed KJ. And Sinclair AH. (1999). Conservation of a sex-determining gene. *Nature*. 402. 601-602.
79. Shinohara O., Knech M. and Catt JK. (1985). Inhibition of gonadotropin-induced granulosa cell differentiation by activation of protein kinase C. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 82, 8518-8522.
80. Soria JLE. y Arias-Montaña JA. (1997). Señalización celular por segundos mensajeros. En: Curso Internacional Precongreso actualización en Fisiología. XL Congreso Nacional de Ciencias Fisiológicas. Sociedad Mexicana de Ciencias Fisiológicas, UNAM, Programa Universitario de

Investigación en Salud y Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. 85-104 pp.

81. Sprengel R., Braun T., Nikolics K., Segaloff DL. and Seeburg PH. (1990). The testicular receptor for follicle stimulating hormone: structure and functional expression of cloned cDNA. *Mol. Endocrinol.* 4(4), 525-530.
82. Spruill WA., Steiner AL., Tres LL. and Kierszenbaum AL. (1983a). Follicle-stimulating hormone-dependent phosphorylation of vimentin in cultures of rat Sertoli cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 80: 993-997.
83. Spruill WA, Zysk JR, Tres LL & Kierszenbaum AL. (1983b) Calcium/calmodulin-dependent phosphorylation of vimentin in rat sertoli cells. *PNAS*, 80 760–764
84. Suenaga R, Evans MJ, Mitamura K, Rider V, Abdou NI. (1998). Peripheral blood T cells and monocytes and B cell lines derived from patients with lupus express estrogen receptor transcripts similar to those of normal cells. *J Rheumatol.* Jul;25 (7):1305-12.
85. Sunahara RK., Niznik HB., Weiner DM., Stormann TM., Brann Mr., Kennedy JL., Gelernter JE., Rozmahel R., Yang YL. and Israel Y. (1990). Human dopamine D1 receptor encoded by an introless gene chromosome 5. *Nature (London)*, 347: 80-83.
86. Tanriverdi F., Silveira LFG, MacColl GS. and Bouloux PMG. (2003). The hypothalamic-pituitary-gonadal axis: immune function and autoimmunity. *J. Endocrinol.* 176, 293-304.
87. Tennant JR (1964). Evaluation of the trypan blue technic for the determination of cell viability. *Transplantation.* 2: 685.
88. Thomas SM. and Brugge JS. (1997). Cellular functions regulated by src family kinases. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* 13, 513-609.
89. Tsai-Morris CH., Buczko E., Wei W., Xie XZ. and Dufau ML. (1991). Structural organization of the rat luteinizing hormone (LH) receptor gene. *J. Biol. Chem.* 266, june 15, 266(17), 11355-11359.
90. Van Biesen T, Luttrell LM, Hawes BE, Lefkowitz RJ. (1996). Mitogenic signaling via G protein-coupled receptors. *Endocr Rev.* Dec;17 (6):698-714.
91. Van Haaster LH, De Jong FH, Docter R, De Rooij DG. (1992). The effect of hypothyroidism on Sertoli cell proliferation and differentiation and hormone levels during testicular development in the rat. *Endocrinology.* Sep;131 (3):1574-6.

92. Van Haaster LH, de Jong FH, Docter R, de Rooij DG.(1993). High neonatal triiodothyronine levels reduce the period of Sertoli cell proliferation and accelerate tubular lumen formation in the rat testis, and increase serum inhibin levels. *Endocrinology*. Aug; 133 (2):755-60.
93. Vassart G., Parmentier M., Libert F. and Dumont J. (1991). Molecular genetics of the thyrotropin receptor. *Trends. Endocrinol. Metab.* 2(4), 151-156.
94. Velázquez PN., Peralta and E. Pedernera. (1997). Proliferative effect in vitro of follicle-stimulating hormone on the left ovary of the chick embryo. *Gen. Comp. Endocrinol.* 105, 40-49.
95. Vergowen RP., Jacobs SG., Huiskamp r., Davids JA. and Rooij DG.(1991). Proliferative activity of gonocytes, sertoli cell and interstitial cells during testicular development in mice. *J. reprod. Fertil.* 93, 233-243.
96. Walker WH, Fucci L & Habener JF. (1995) Expression of the gene encoding transcription factor adenosine 3', 5'-monophosphate (cAMP) Response element-binding protein: regulation by follicle-stimulating hormone-induced cAMP signaling in primary rat Sertoli cells. *Endocrinology*, 136 3534–3545.
97. Walker WH. and Cheng J. (2005). FSH and testosterone signaling in Sertoli cells. *Reproduction*. Jul; 130 (1):15-28.
98. Weniger JP. (1968). Sur la précocité de la sécrétion d'oestrogènes par les gonades embryonnaires de poulet cultivées in vitro. *C.R. Acad. Sci., Paris, Sér.D.* 266, 2277-2279.
99. Weniger JP. (1971). Biosynthèse d'oestrogènes par les ébouches gonadiques de Poulet. *Gen. comp. endocrinol.* 16, 391-397.
100. Witschi E. (1951). Embryogenesis of the adrenal and the reproductive gland. *Recent. Prog. Horm. Res.* 6: 1-27
101. Woods JE. and Podczaski ES. (1974). Androgen synthesis in the gonads of the chick embryo, *Gen. Comp. Endocrinol.* 13, 242-254.
102. Woods JE and Erton LH. (1978). The synthesis of estrogens in the gonads of the chick embryo. *Gen. Comp. Endocrinol.* 36, 360-370.
103. Woods JE and Brazzil DM. (1981). Plasma 17 β .estradiol levels in the chick embryo. *Gen. Comp. endocrinol.* 44, 37-43.
104. Woods JE., Rutherford JE. and Thommes RC. (1983). Functional development of the hypothalamic adeno-hypophyseal-testicular (HAT) axis in the chick embryo. *Gen. Comp. Endocrinol.* 50: 235-241.

105. Woods JE., Damianides-Keenan M. and Thommes RC. (1991). FSH and TSH binding cells in the ovary of the developing chick embryo. *Gen. Com. Endocrinol.* 82, 487-494.
106. Wu G-Y, Deisseroth K & Tsien RW. (2001). Activity-dependent CREB phosphorylation: Convergence of a fast, sensitive calmodulin kinase pathway and a slow, less sensitive mitogen-activated protein kinase pathway. *PNAS*, 98 2808–2813
107. Zarkower D. (2001). Establishing sexual dimorphism: conservation amidst diversity?. *Nature Reviews.* 2, 175-185.
108. Zarkower D. (2002). Invertebrates may not be so different after all. *Novartis Found. Symp.* 244:115-126.
109. Zentella DA., López MR., Gómez GE., Paredes GRE., Ibarra SMJ. (1996). El ciclo celular y su regulación: la interacción entre las proteínas cinasas CDKs y la familia de las ciclinas. *Bol. Educ. Bioq. (México).* XV (1): 4-12.

APÉNDICE

Solución Salina Balanceada (SSB) libre de Ca⁺ y Mg

Cloruro de Sodio NaCl.....	8.0 gr.
Fosfato de potasio dibásico KH ₂ PO ₄	0.2 gr.
Cloruro de potasio KCl.....	0.2 gr.
Fosfato de sodio dibásico Na ₂ HPO ₄	1.15 gr.

Aforar a 1000ml. de agua ultrapura y agregar 2 gotas de rojo fenol

Medio Mínimo Esencial Modificado por Dulbecco (DMEM)

DMEM.....	10.0 gr.
Albúmina Sérica Bovina (BSA).....	1.0 gr.

Disolver y aforar en 1000 ml. de agua ultrapura y ajustar el pH de 7.6 con una solución de bicarbonato de sodio NaHCO₃ al 5%.

TÉCNICA PARA CUANTIFICAR LA INCORPORACIÓN DE ³H-TIMIDINA EN CULTIVOS PRIMARIOS DE TESTÍCULOS DE EMBRIONES DE POLLO DE 18 DIAS DE INCUBACION

1. Eliminar el medio de cultivo con una micropipeta hasta donde sea posible (sin mover el botón celular).
2. Pasar la membrana de policarbonato a un vial de vidrio y agregar cuidadosamente 2 ml. De solución fijadora (metanol-ácido acético 3:1).
3. retirar el fijador y agregar 2 ml. de ácido tricloroacético (TCA) frío al 10% y mantener durante 60 minutos a 4°C.
4. Eliminar el TCA
5. Agregar 400 µl de duodecil sulfato de sodio (SDS) al 2% e incubar durante 30 minutos a 60°C
6. Mantener a temperatura ambiente, agregar 5 ml. de líquido de centelleo y cuantificar la timidina incorporada en un contador de centelleo líquido.

TÉCNICA DE INMUNOFLUORESCENCIA PARA 5-BROMODESOXIURIDINA (BrdU).

1. Lavar los cortes con PBS (1x), dos cambios de 10 minutos.
2. Lavar con agua ultrapura, tres cambios (10 min. cada cambio).
3. Calentar a 65°C (3 min.).
4. Incubar a 37°C con el primer anticuerpo (anti-BrdU) (1:5) 40 min.
5. Lavar con PBS (1x) 2 cambios (10 min.).
6. Lavar con agua ultrapura, dos cambios (10 min.).
7. Incubar a 37°C con el segundo anticuerpo (anti-mouse-Ig-fluorescein) (1:5) 40 min.
8. Lavar con PBS (1x), dos cambios (10 min.).
9. Lavar con agua ultrapura, 3 cambios (10 min.)
10. Montar la preparación (medio de montaje de fluorescencia)

PHYSIOLOGY AND REPRODUCTION

Proliferative and Steroidogenic Effects of Follicle-Stimulating Hormone on Cultured Chick Embryo Testis Cells

I. Peralta,* M. C. Romano,^{†1} and P. N. Velázquez*

*Departamento de Biología Celular y Tisular, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, México D. F., 04510 México; and [†]Departamento de Fisiología, Biofísica y Neurociencias, CINVESTAV, apartado postal 14-740, 07000, México D.F., México

ABSTRACT The present study evaluated the follicle-stimulating hormone (FSH) effect on cell proliferation and steroid production by chick embryo testis. Dissociated cells from 18-d-old embryos were cultured on polycarbonate membranes in defined media. In some experiments, cells were further separated by a metrizamide gradient, and 5 cellular subpopulations were recovered and cultured. [³H]thymidine was added to the culture media. When necessary, 17 β -estradiol, human FSH (hFSH), recombinant human FSH (rhFSH), or human chorionic gonadotropin (hCG) was added to the medium at the beginning of the culture. The total number of cells and the incorporation of [³H]thymidine increased when hFSH or rhFSH was added. No changes were produced by the addition of hCG or 17 β -estradiol. The dose-re-

sponse curve to hFSH resulted in an ED₅₀ of 0.25 IU/mL. The stimulatory effect of hFSH on total number of cells and on [³H]thymidine incorporation was significant at 36 h of culture and was maintained up to 60 h. Testosterone production increased with the addition of FSH or rhFSH, meanwhile estradiol production was below the limit of detection of RIA. The hFSH proliferative effect measured as [³H]thymidine incorporation was observed only in the F3, F4, and F5 fractions of the density gradient. Present results show that hFSH and rhFSH, but not hCG or estradiol, stimulate testis cell proliferation in a time- and dose-dependent manner. The combination of [³H]thymidine incorporation and testosterone production in fractions obtained from the metrizamide density gradients suggests that the cell fractions of the chick embryo testis show a differential response to FSH.

(Key words: cell proliferation, chick embryo, follicle-stimulating hormone, testis, testosterone)

2004 Poultry Science 83:1193–1198

INTRODUCTION

The hypothalamic-pituitary-gonadal axis of the chick embryo starts functioning by d 13 of incubation (Woods et al., 1975, 1989; Woods, 1987). It has been demonstrated that the chick synthesizes steroid hormones very early in embryonic development (Haffen and Cedard, 1968; Guichard et al., 1973). Testosterone synthesis continues after hatching, as has been demonstrated in vitro in the testes of 2-d-old chicks (Connell et al., 1966). Furthermore, the chick embryo gonads are able to respond to gonadotropin stimulus. Teng et al. (1982) observed a stimulatory effect of follicle-stimulating hormone (FSH) and mammalian luteinizing hormone (LH) on the production of 17 β -estradiol and testosterone by the ovaries of 15-d-old chick embryos.

Our group has previously reported an effect of FSH and human chorionic gonadotropin (hCG) in the mainte-

nance of basal and gonadotropin-stimulated testosterone production by newly hatched chick testes (Castro and Romano, 1994). We found that gonadotropins enhance the testis production of androgens in a time- and dose-dependent manner, suggesting that these hormones modulate the steroidogenic activity of the neonatal population of chick testis cells (Castro and Romano, 1994). Furthermore, the addition of 0.5 IU/mL of recombinant FSH for 60 h has been shown to stimulate DNA synthesis, cell proliferation, and 17 β -estradiol secretion in the ovaries and testes at 8, 10, 13, 15, and 17 d of embryonic development (Velázquez et al., 1997; Pedernera et al., 1999).

In the present paper, we have further investigated the effect of FSH on the proliferation of embryonic chick embryo testis cells by determining the time course of the effect and the dose-effect response of human FSH (hFSH). Because FSH stimulates aromatization and thus increases the synthesis of estradiol, we decided to investigate if the

©2004 Poultry Science Association, Inc.

Received for publication October 14, 2003.

Accepted for publication January 26, 2004.

¹To whom correspondence should be addressed: mromano@fisio.cinvestav.mx.

Abbreviation Key: DMEM = Dulbecco's modified Eagle medium; FSH = follicle-stimulating hormone; hCG = human chorionic gonadotropin; hFSH = human follicle-stimulating hormone; LH = luteinizing hormone; rhFSH = recombinant human follicle-stimulating hormone.

effect of hFSH on the testis was mediated by estradiol. It has been shown that estradiol stimulates cell proliferation in the mammalian ovary (Dorrington et al., 1993), however it did not enhance the proliferation of 18-d-old chick embryo ovaries (Velázquez et al., 1997). To our knowledge, there is no information available on the role of estrogens on the proliferation of chick embryo testis cells. In the present paper, we have compared the effect of human and recombinant human FSH (rhFSH) with that of estradiol, and the effect of FSH on testis cell proliferation with the possible effect of another gonadotropin, hCG (which shares receptors with LH) that modulates the secretion of testosterone in the chick testes (Castro and Romano, 1994). To our knowledge, there is no information about the role of hCG in the proliferation of the chick testis cells, so we have compared the effect of FSH and hCG on the uptake of [³H]thymidine by chick embryo testis cells.

MATERIALS AND METHODS

Materials

Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), trypsin, and soybean trypsin inhibitor² were purchased from Grand Island Biological Co. BSA, metrizamide, sodium dodecyl sulfate, and human chorionic gonadotropin (hCG) were purchased from Sigma Chemical Co.³ Human follicle-stimulating hormone (hFSH) from urine of postmenopausal women (Fertinorm HP) was obtained from Serono;⁴ 1 mIU is equivalent to 14 ng of hFSH and contains 0.2 pg of hLH (both immunodetected, Ulloa-Aguirre et al., 1995). LH-free recombinant-derived human FSH (rhFSH, Gonal-F) was purchased from Serono.⁴ Tissue culture plastic dishes and polycarbonate filters, 1.0- μ m pore size and 13 mm in diameter, were purchased from Costar.⁵ [Methyl-³H] thymidine (2.0 Ci/mmol), 2,4, ³H-testosterone (96.5 Ci/mmol), 17 β -[2,4,6,7-³H]estradiol (115 Ci/mmol) and Acuasol⁶ were products from NEN DuPont.⁶ Anti-testosterone and anti-17 β -estradiol sera were obtained from ICN Biomedical.⁷

Testis Cell Preparation

Testes from 18-d-old chick embryos (Babcock B300) were dissected under sterile conditions, pooled in groups of 30, and incubated in 0.25% trypsin, in PBS (Ca²⁺ and Mg²⁺ free), pH 7.4, at 37°C in a shaking bath (90 cycles/min). After 20 min of trypsin treatment, the dispersed testicular cells were treated with 0.5% soybean trypsin inhibitor in Dulbecco's Modified Eagle's medium (DMEM) with 1.0 mg/mL of BSA, and then washed with 2 changes of DMEM-BSA.

In some experiments, dissociated testicular cells were applied at the top of a continuous metrizamide gradient (0 to 20%) prepared by diluting metrizamide in DMEM. The cells were centrifuged at 1,500 \times g for 20 min. Five testicular cell subpopulations were obtained from the gradient, and recovered cells were washed twice with DMEM-BSA. The final cell number of each fraction was calculated using a hemacytometer chamber and adjusted to 5 \times 10⁵ cells/disk. Cell viability was always over 90%, as established by the trypan blue exclusion test (Tennant, 1964). Cell subpopulations were cultured for 60 h. In the experiments devoted to testosterone production, 2 polycarbonate disks containing 5 \times 10⁵ cells each were placed in petri dishes. Steroid production was measured in the culture media after 60 h of incubation in the conditions described above.

Cell Culture, [³H]Thymidine Incorporation, Cell Counting, and Hormone Assays

Samples of dissociated cells (5 \times 10⁵ cells) from the whole testes and from the 5 cellular subpopulations obtained from the density gradient were cultured on polycarbonate membranes as described by Escalante-Alcalde and Merchant-Larios (1992). The cells were resuspended in 20 μ L of DMEM and were applied as a small drop in the center of the membrane, which was floating on 2 mL of DMEM-BSA plus 0.1 μ Ci of [³H]thymidine. When necessary, 17 β -estradiol (200 ng/mL, dissolved in 10 μ L of ethanol), hFSH, rhFSH, or hCG³ (2 IU/mL) was added to the medium at the beginning of the culture without any subsequent change of medium or replenishment. Cells were incubated at 37°C in a humidified environment of 95% air and 5% CO₂ for up to 60 h.

At the end of the culture period, polycarbonate membranes with the cellular aggregates were processed for [³H]thymidine measurement. Briefly, the cellular aggregate was fixed with methanol:acetic acid 3:1, washed twice with 10% (wt/vol) trichloroacetic acid for 60 min at 4°C, then treated with 2% (wt/vol) SDS for 30 min at 60°C, transferred to scintillation vials, combined with Aquasol,⁶ and counted in a scintillation counter (58% efficiency). Aliquots (50- μ L) of the medium were collected for steroid production measurement; 17 β -estradiol and testosterone were directly measured by specific and previously validated RIA (Pedernera et al., 1999), using anti-testosterone and anti-17 β -estradiol sera. In some experiments, the cellular aggregates were dissociated from the polycarbonate membranes by 0.25% trypsin treatment, followed by 0.5% soybean trypsin inhibitor. Dissociated cells were recovered by centrifugation at 200 \times g for 10 min and the total number of viable cells recovered was counted as described above.

Morphological Study

Samples of the cultured testicular cells were fixed by immersion in 4% paraformaldehyde with 0.25% glutaral-

²Gibco, Grand Island, NY.

³Sigma Chemical Co., St. Louis, MO.

⁴Serono, Mexico City, Mexico.

⁵Nucleopore filter, Costar, Cambridge, MA.

⁶NEN DuPont, Boston, MA.

⁷ICN Biochemical, Costa Mesa, CA.

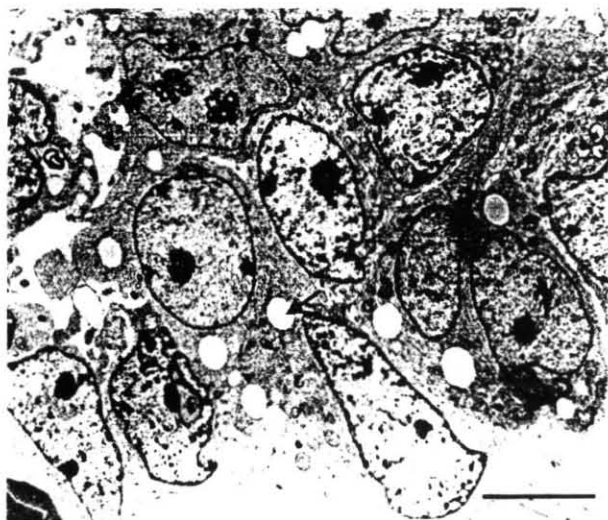


FIGURE 1. Electron micrograph of testicular cells from 18-d-old chick embryos in a multilayered culture on polycarbonate membranes at the end of culture (60 h). Some cells display a few lipid droplets in the cytoplasm (arrow). The bar indicates 5 μ m.

dehyde in 0.15 M phosphate buffer, pH 7.4, embedded in plastic resin and processed for electron microscopy.

Statistics

Data were evaluated by ANOVA followed by Duncan's test for multiple contrasts.

RESULTS

The procedure used for culturing the testicular cells resulted in a multilayered aggregate. The electron micrographs showed that, at 60 h in culture, the cells were reassociated and no necrotic or altered areas were observed (Figure 1). The total number of cells recovered from the polycarbonate membranes after 60 h significantly increased when cultured in the presence of hFSH or rhFSH. On the other hand, no changes in the total cell number were observed in the hCG and 17 β -estradiol treatment groups (Figure 2). The incorporation of [³H]thymidine to the whole testicular cell aggregates increased significantly when hFSH or rhFSH was added for 60 h to the culture medium. Testicular cells treated with hCG or 17 β -estradiol during the culture period did not differ in [³H]thymidine incorporation from control values (Figure 3).

The maximum effect, measured as [³H]thymidine incorporation at 60 h of testicular cell culture, was obtained with 2 IU/mL of hFSH; the dose-response curve of hFSH resulted in an ED₅₀ of 0.25 IU/mL (Figure 4).

A significant stimulatory effect of hFSH on the incorporation of [³H]thymidine to the cells was evident after 36 h of culture and continued to increase throughout the period of the study. Cultures for either 48 or 60 h with hFSH increased [³H]thymidine incorporation to twice the

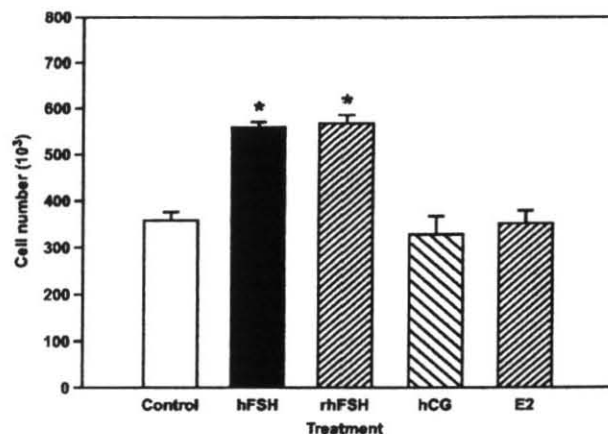


FIGURE 2. Total number of cells recovered from the aggregates at the end of the culture period (60 h). Cells were from chick embryo testes at 18 d of development. Hormones, 17 β -estradiol (E₂; 200 ng/mL), human follicle-stimulating hormone (hFSH), recombinant human follicle-stimulating hormone (rhFSH) (0.5 IU/mL), or human chorionic gonadotropin (hCG) (2 IU/mL) was added at the beginning of the culture. Bars represent the mean \pm SEM of 5 separate experiments. Asterisks represent statistical significance for comparison with the control ($P < 0.01$).

control levels; a greater fold increase at 48 h was not demonstrated (Figure 5).

Steroid hormone measurements showed that hFSH and hCG significantly stimulated testosterone production by the cultured testis cells (Figure 6). The estradiol concentration in the culture media was below the sensitivity of the RIA standard curve in all the groups (results not shown).

The results above were obtained by culturing a cellular suspension from the whole testis. In addition, we have investigated [³H]thymidine incorporation to 5 subpopulations obtained from a metrizamide density gradient after

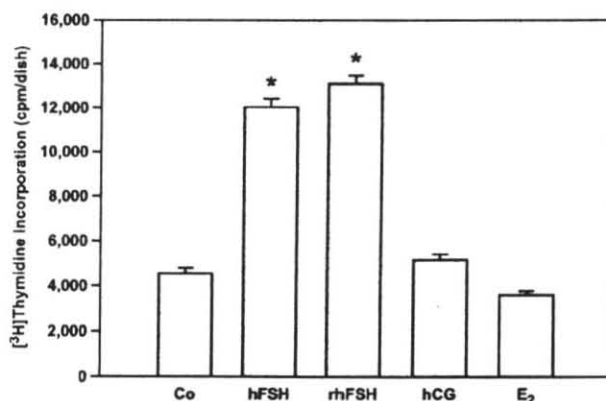


FIGURE 3. Incorporation to the testis cell aggregates after 60 h of culture. Hormones, 17 β -estradiol (E₂; 200 ng/mL), human follicle-stimulating hormone (hFSH), recombinant human follicle-stimulating hormone (rhFSH) (0.5 IU/mL), or hCG (2 IU/mL), and [³H]thymidine were added to the medium at the beginning of the culture (see Materials and Methods). Bars represent the mean \pm SEM of 4 separate experiments, each with 4 replicates. Asterisks indicate statistical significance ($P < 0.001$) for comparison with the control.

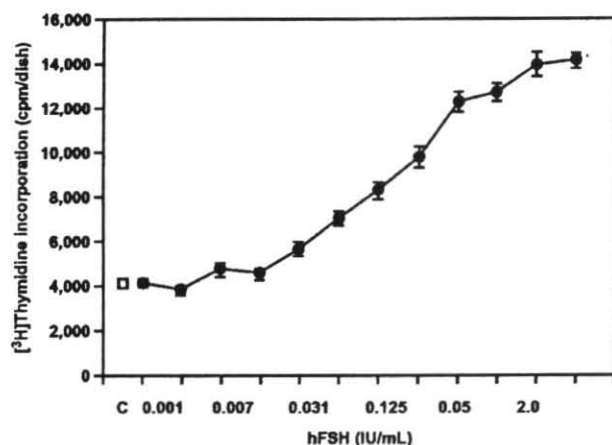


FIGURE 4. Dose-response curve to human follicle-stimulating hormone (hFSH) measured as [³H]thymidine incorporation to the testis cell aggregates cultured for 60 h. Each point represents the mean \pm SEM of 4 separate experiments, each with 4 replicates. The open square represents the basal incorporation.

60 h in culture (Figure 7a). In basal conditions, fractions F1, F2, and F3 displayed a low rate of incorporation, whereas density fractions F4 and F5 showed a high [³H]thymidine incorporation. The addition of hFSH to the culture medium significantly enhanced the in vitro [³H]thymidine incorporation of cells recovered from F3, F4, and F5 fractions (Figure 7a). No changes occurred when hFSH was added to fractions F1 and F2. The measurement of testosterone production in the culture media showed that F4 had the lowest basal steroid production. All fractions significantly increased testosterone production in the presence of FSH. However, the F5 response to hFSH was twice that of the F2, F3, and F4 responses (Figure 7b).

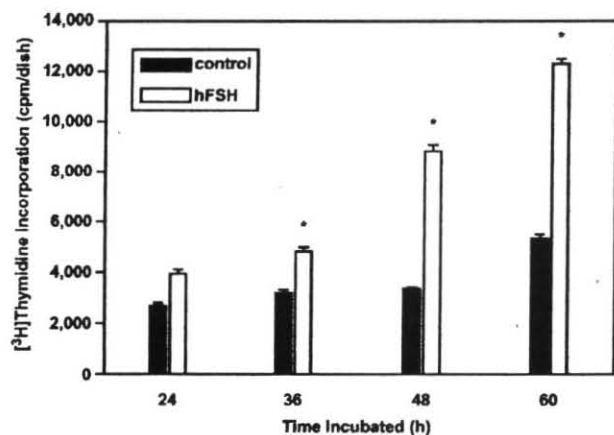


FIGURE 5. Time course of the incorporation of [³H]thymidine to testis cells collected at several times of culture. Bars represent the mean \pm SEM of 2 separate experiments, each with 4 replicates. Asterisks indicate statistical significance ($P < 0.001$) for comparison with time-matched controls.

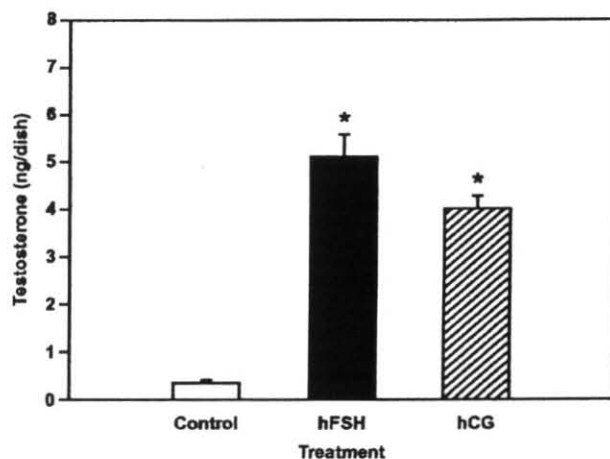


FIGURE 6. Testosterone content in culture media from testis cells from 18-d-old chick embryos. Testicular cells were cultured during 60 h with human follicle-stimulating hormone (hFSH) or human chorionic gonadotropin (hCG) in the medium. Bars represent the mean \pm SEM of 5 separate experiments. Asterisks indicate statistical significance ($P < 0.001$) for comparison with the controls.

DISCUSSION

The method used for culturing the testicular cells, that is, seeding a high-density cell suspension on polycarbonate membranes, is similar to an organ culture system. This technique allows the formation of small multilayer aggregates where cell reassociation facilitates interactions between cells (Merchant-Larios and Moreno Mendoza, 1998). Although the culture medium was not supplemented with serum, testicular cells had a normal appearance after 60 h of culture, a fact that was evident in the electron microscopy images. In addition, the constant increment in [³H]thymidine incorporation by the cultured cells (Figure 5) and their ability to produce testosterone and respond to gonadotropin stimulation (Figure 6) suggest that the cells were in appropriate physiological conditions.

Only the addition of hFSH to the defined culture medium increased both the number of cells and the DNA synthesis in cultured testicular cells of 18-d-old chick embryo. Effects were observed with hFSH of high purity and with rhFSH, which is devoid of LH activity, demonstrating the specificity of the FSH effect on testis cell proliferation (Figure 3). It was important to differentiate the hFSH effects because hCG has been demonstrated to stimulate 17 β -estradiol secretion in the ovary of the newly hatched chicken (Guichard et al., 1979; Pederneira et al., 1988). The results of our experiments (Figures 3 and 6) strongly suggest that the role of hCG would be to stimulate the steroidogenic function of a stable population of mature Leydig cells.

We did not find any effect on the proliferation of testis cells with the addition of 17 β -estradiol. Therefore, it seems unlikely that the effect of FSH on cell proliferation would be the consequence of stimulation of estradiol production by hFSH. A role for growth factors as intermedi-

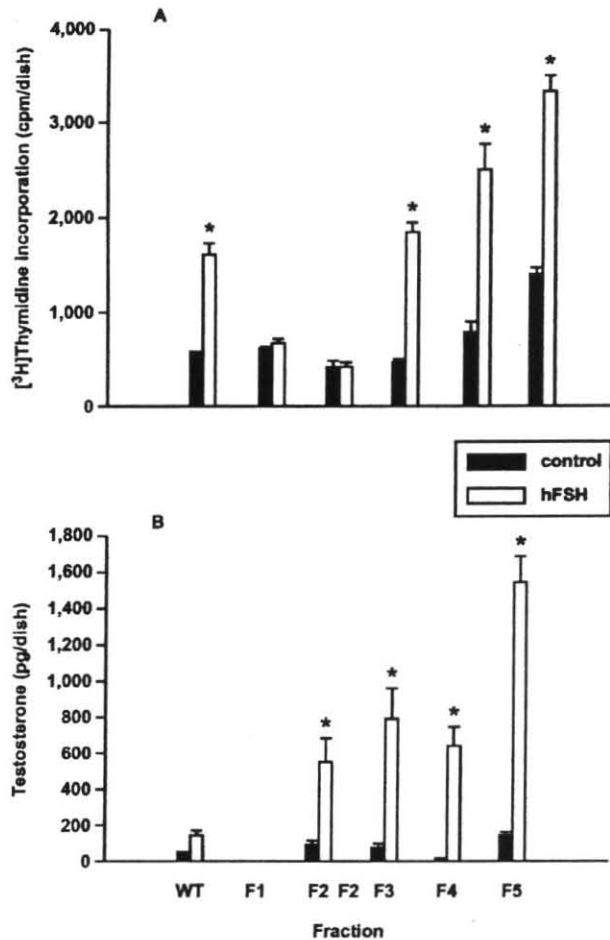


FIGURE 7. Response of cell fractions to human follicle-stimulating hormone (hFSH). Panel A: [^3H]thymidine incorporation to testicular cell subpopulations obtained from the density gradient after being incubated in the presence of hFSH for 60 h. WT indicates the uptake by the whole testis cell suspension. F1 to F5 represent the 5 cellular fractions recovered from the gradient. Bars represent the mean \pm SEM of 4 separate experiments, each with 4 replicates. Asterisks indicate statistical significance ($P < 0.05$). Panel B: production of testosterone by testicular cell subpopulations obtained from the density gradient after being incubated in the presence of hFSH for 60 h. WT indicates the production by the whole testis cell suspension. F1 to F5 represent the 5 cellular fractions recovered from the gradient. The production of testosterone by F1 was not detectable. Bars represent the mean \pm SEM from 3 determinations by duplicate from 3 separate experiments. ND = nondetectable. Asterisks indicate statistical significance ($P < 0.05$).

ates in the FSH effect on DNA synthesis by granulosa cells has been postulated by numerous authors. One such example is that of insulin-like growth factor-I, which potentiates the FSH effect on DNA synthesis (Bley et al., 1992; Young et al., 1992). Another example is the requirement of transforming growth factor- β for FSH-stimulated cell proliferation (Dorrington et al., 1993). Embryonic cells are an important source of growth factors in many tissues, therefore the chick embryo testicular cells may be producing growth factors such as insulin-like growth factor-I or transforming growth factor- β to sustain the FSH-stimulated proliferation of testis cells, as has been shown in mammalian cells (Lin, 1996; Saez and Lejeune, 1996).

The incorporation of [^3H]thymidine by cell fractions obtained with the metrizamide gradient showed that the effect of FSH was not the same for all the fractions (Figure 7a). Fraction F2, which did not proliferate in response to FSH, significantly increased testosterone production in the presence of hFSH, suggesting that this subpopulation may be mainly composed of mature Leydig cells that are no longer proliferating. In contrast, the F5 cells increased both cell proliferation and testosterone production in the presence of FSH, suggesting that the F5 fraction contained pre-Leydig cells that are still proliferating and are simultaneously capable of increasing steroid production in the presence of gonadotropins. It may be that cell fractions F3 to F5, which significantly proliferated in the presence of FSH, are enriched in fibroblasts and Sertoli cells; abundant mitoses were observed in these fractions (not shown). Interestingly, both cell types are important producers of growth factors in the mammal (Skinner, 1993). Although the metrizamide gradient could not perform a 100% separation of the embryonic testis cells subpopulations, the technique showed that FSH selectively stimulated the proliferation of certain embryonic testis cells. In addition, the combination of [^3H]thymidine incorporation and testosterone production by the cell fractions gave additional information regarding the effect of FSH on testis cells.

It is well known that Leydig cells have differentiated at 18 d of embryonic development and are actively producing testosterone. The response of chick embryo testes to hCG suggests that this exogenous gonadotropin cross-reacts with one of the chicken hormone receptors, likely the LH receptor (Figure 6). There are several reports that cultured embryonic testis cells respond to hCG, increasing androgen production (Guichard et al., 1979; Bobes et al., 2001). Furthermore, Huhtaniemi et al. (1984) have shown that hCG and LH share the same receptor in mammalian gonads. Although no receptors for FSH have been found in Leydig cells, the important effect of hFSH on testosterone production observed in the present study may be explained by paracrine interactions (Saez and Lejeune, 1996). A similar effect of FSH on testosterone production has been shown in cultured newborn testes, even when FSH preparations containing a very low concentration of hCG were used (Castro and Romano, 1994). To this regard, Lecerf et al. (1993) have described a stimulatory effect of human recombinant FSH on the basal and hCG-dependent testosterone production by rat fetal testes. The influence of FSH on steroid production by Leydig cells is probably mediated by trophic factors secreted by Sertoli cells (Saez and Lejeune, 1996).

Our results strongly suggest that FSH plays an important role in the proliferation and function of the cell subpopulations that comprise the immature testes of the chick embryo, and clearly distinguish its effect from that of hCG and estradiol. Although hCG did stimulate testosterone production by the testis cells, no effects on cell proliferation could be observed. We also showed that the mechanism of action of FSH on testis cell proliferation is

not mediated by estradiol, because this steroid did not induce any proliferative effect on the cultured cells.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported in part by grants PAPIIT IN209700 and IN221502-3, UNAM, México. The authors acknowledge Ricardo A. Valdéz for help in the preparation of figures.

REFERENCES

- Bley, A. M., C. J. Simón, G. A. Estévez, L. Jiménez de Asúa, and L. J. Barañao. 1992. Effect of follicle stimulating hormone on insulin-like growth factor-I stimulated rat granulosa cell deoxyribonucleic acid synthesis. *Endocrinology* 131:1223-1229.
- Bobes, R. J., J. I. Castro, C. Miranda, and M. C. Romano. 2001. Insulin modifies the proliferation and function of chicken testis cells. *Poult. Sci.* 80:637-642.
- Castro, J. I., and M. C. Romano. 1994. The effects of fetal serum and gonadotropins on testosterone production by cultured chick testicular cells. *Domest. Anim. Endocrinol.* 11:261-269.
- Connell, G. M., C. J. Conell, and K. B. Eiknes. 1966. Testosterone synthesis by the two-day-old chick testis *in vitro*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 7:158-165.
- Dorrington, J. H., J. J. Bendell, and S. A. Khan. 1993. Interactions between FSH, estradiol-17 β and transforming growth factor- β regulate growth and differentiation in the rat gonad. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 44:441-447.
- Escalante-Alcalde, D., and H. Merchant-Larios. 1992. Somatic and germ interactions during histogenetic aggregation of mouse fetal testes. *Exp. Cell Res.* 198:150-158.
- Guichard, A., L. Cedard, and K. Haffen. 1973. Aspect comparatif de la synthèse de stéroïdes sexuels par les gonades embryonnaires de Poulet a différents stades du développement (étude en culture organotypique a partir de précurseurs radiactifs). *Gen. Comp. Endocrinol.* 20:16-28.
- Guichard, A., K. Haffen, L. Cedard, Th-M. Mignot, and D. Scheib. 1979. Effects of hCG and of seasons on "in vitro" steroidogenesis by 18-day chick embryo gonads. *Ann. Biol. Anim. Biochim. Biophys.* 19:1317-1325.
- Haffen, K., and L. Cedard. 1968. Etude, en culture organotypique *in vitro*, du métabolisme de la déhydroépiandrostérone et de la testostérone radiactives, par les gonades normales et intersexuées del l'embryon de Poulet. *Gen. Comp. Endocrinol.* 11:220-234.
- Huhtaniemi, I. T., K. Nozu, W. D. Warren, and M. Dufau. 1984. Acquisition of regulatory mechanisms for gonadotropin receptors and steroidogenesis in the maturing rat testis. *Endocrinology* 111:1711-1720.
- Lecerf, L., V. C. H. Rouiller-Fabre, C. Levacher, C. Gautier, J. M. Saez, and R. Habert. 1993. Stimulatory effect of follicle-stimulating hormone on basal and luteinizing hormone-stimulated testosterone secretions by the fetal rat testis *in vitro*. *Endocrinology* 133:2313-2318.
- Lin, T. 1996. Insulin-like Growth Factor-I regulation of the Leydig cell. Pages 477-492 in *The Leydig Cell*. A. H. Payne, M. P. Hardy, and L. D. Russell, ed. Cache River Press, Vienna, IL.
- Merchant-Larios, H., and N. Moreno-Mendoza. 1998. Mesonephric stromal cells differentiate into Leydig cells in the mouse fetal testis. *Exp. Cell Res.* 244:230-238.
- Pedernera, E., Y. Gómez, P. N. Velázquez, M. A. Juárez-Oropeza, and M. González del Pliego. 1988. Identification of steroidogenic cell subpopulations in the ovary of the newly hatched chicken. *Gen. Comp. Endocrinol.* 71:153-162.
- Pedernera, E., L. Solis, I. Peralta, and P. N. Velázquez. 1999. Proliferative and steroidogenic effects of follicle stimulating hormone during chick embryo development. *Gen. Comp. Endocrinol.* 116:213-220.
- Saez, J. M., and H. Lejeune. 1996. Regulation of Leydig cell function by hormones and growth factors other than LH and IGF-1. Pages 381-406 in *The Leydig Cell*. A. H. Payne, M. P. Hardy, and L. D. Russell, ed. Cache River Press, Vienna, IL.
- Skinner, M. K. 1993. Secretion of growth factors and other regulatory factors. Pages 237-247 in *The Sertoli Cell*. L. D. Russell and M. D. Griswold, ed. Cache River Press, Clearwater, FL.
- Teng, C. T., C. S. Teng, G. R. Bousfield, W. K. Liu, and D. N. Ward. 1982. Differential response of growing and regressing chicken ovaries to gonadotropic hormones. *Gen. Comp. Endocrinol.* 48:325-332.
- Tennant, J. R. 1964. Evaluation of the trypan blue technique for the determination of cell viability. *Transplantation* 2:685-694.
- Ulloa-Aguirre, A., E. Zambrano, C. Timossi, E. Olivares, A. Quintanar, M. Aguinaga, L. Díaz-Cueto, and J. P. Méndez. 1995. On the nature of the follicle-stimulating signal delivered to the ovary during exogenously controlled follicular maturation. *Arch. Med. Res.* (26, Suppl.):S219-230.
- Velázquez, P. N., I. Peralta, and E. Pedernera. 1997. Proliferative effect *in vitro* of follicle stimulating hormone on the left ovary of the chick embryo. *Gen. Comp. Endocrinol.* 105:40-49.
- Woods, J. E. 1987. Maturation of the hypothalamo-adenohypophyseal-gonadal (HAG) axes in the chick embryo. *J. Exp. Zool. (Suppl.)* 1:265-271.
- Woods, J. E., C. G. Scanes, M. Seeley, P. Cozzi, F. Onyese, and R. C. Thommes. 1989. Plasma LH and gonadal LH-binding cells in normal and surgically decapitated chick embryos. *Gen. Comp. Endocrinol.* 74:1-13.
- Woods, J. E., R. M. Simpson, and P. I. Moore. 1975. Plasma testosterone levels in the chick embryo. *Gen. Comp. Endocrinol.* 27:543-547.
- Young, E. L., D. T. Baird, R. Yates, L. E. Reichert, and S. G. Hillier. 1992. Hormonal regulation of the growth and steroidogenic function of human granulosa cells. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 74:842-849.