



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA
PRODUCCION Y DE LA SALUD ANIMAL

PAPEL DE LA TESTOSTERONA DENTRO DEL PROCESO
DE OVULACIÓN DE LAS GALLINAS DE POSTURA

T E S I S

PARA OBTENER EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS

P R E S E N T A

LUCÍA ELIANA RANGEL PORTA

TUTOR: **PhD CARLOS G GUTIÉRREZ AGUILAR**

COMITÉ TUTORAL: **PhD LUIS ALBERTO ZARCO QUINTERO**
PhD ENRIQUE PEDERNA ASTEGIANO

MÉXICO, 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.

DEDICATORIAS

Dedico este trabajo a mis queridos Migueles, porque iluminan cada día de mi vida y me dan la fuerza y energía para seguir superándome cada momento de mi vida.

Gracias por todo su amor y cariño, los amo.

A mi mamá, Ory y Mars.

Porque me apoyan en cada nueva meta que me propongo y me ayudan a que la concluya. Las quiero mucho.

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

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca que me fue otorgada para la realización de mis estudios; y a la Fundación Internacional para las Ciencias (IFS) por el apoyo financiero a los trabajos realizados en el Doctorado.

A mi tutor Dr Carlos Gutiérrez, por permitirme trabajar contigo, por todas las horas dedicadas a mi formación y por la paciencia que tuviste ante mis crisis, haciendo que siempre me levantara. Muchas gracias.

A mi Comité Tutorial, Drs Luis Zarco y Enrique Pedernera, porque siempre me alentaron y sus comentarios ayudaron a la realización de este trabajo. Al Dr Zarco especialmente porque siempre ha creído en mi y me ha apoyado incondicionalmente. A los miembros de mi jurado, Drs José Antonio Quintana, Gary Garcia Espinoza, Gabriela González Mariscal y Gabriel Gutiérrez Ospina, por sus valiosos comentarios para mejorar esta tesis.

Al CEIEPA y el Departamento de Producción Animal Aves, especialmente a los Dr Ezequiel Sánchez, Elizabeth Posadas, Ernesto Avila, José Antonio Quintana y Reynaldo Moreno, por el apoyo con los animales y las instalaciones para la realización de los trabajos incluidos en esta tesis.

A Arantza y Ana, porque siempre me ayudan y apoyan, pero principalmente por brindarme su infinita e invaluable amistad, que hace que cada día de trabajo sea un grato momento para compartir.

A todas las personas que me ayudaron desinteresadamente durante tantos muestreos y procedimientos de laboratorio, miembros todos de las “corucos party”, porque sin su ayuda estos trabajos no se hubieran logrado. Especialmente: Cipatli, Susi, Rosita, Toño, Nico, Agustín, Arnulfo, Alvaro, Ubaldo, Coque, Laura, Gisel, Memo y Clara.

RESUMEN:

Los estudios de esta tesis muestran inequívocamente que la testosterona es una hormona esencial para el proceso ovulatorio de las gallinas de postura. En el capítulo 2 se mostró que la inmunización activa y pasiva contra la testosterona bloqueó la ovulación sin afectar el desarrollo folicular, y suprimió el pico de progesterona que precede a la ovulación. Así mismo, se mostró que el bloqueo agudo de la acción de la testosterona, por la inhibición específica del receptor con su antagonista (flutamida), bloqueó la ovoposición y los picos preovulatorios de progesterona, LH y estradiol, que normalmente se asocian con la ovulación (capítulo 3). Por otro lado, en estudios *in vitro* se vio que la testosterona, por sí sola y en concentraciones fisiológicas, es capaz de estimular la producción de progesterona por las células de la granulosa del folículo preovulatorio, gracias a una acción mediada por sus receptores específicos (capítulo 4); y que esta capacidad estimuladora cambia dependiendo de la madurez de las células de la granulosa, siendo más responsivas las células maduras que las inmaduras (capítulo 5). Estos resultados indican la existencia de un papel local de la testosterona a nivel ovárico, para estimular la secreción de progesterona por las células de la granulosa cuando las concentraciones de la testosterona se encuentran dentro de los rangos fisiológicos normales. Finalmente con los últimos estudios *in vivo*, a pesar de que no se pudo establecer un sitio único de acción de la testosterona en el eje hipotálamo-hipofisiario-gonadal, los resultados sugieren que la testosterona actúa a nivel del folículo preovulatorio para que ocurra exitosamente la ovulación, probablemente haciéndolo responsivo a la LH y promoviendo la liberación de la progesterona preovulatoria. En conclusión, los estudios realizados demuestran que la testosterona tiene un papel fundamental en el proceso ovulatorio de las gallinas, el cual se debe en parte, a que tiene una acción estimuladora sobre la producción de progesterona por las células de la granulosa.

ABSTRACT:

This thesis establishes that testosterone is an essential hormone for the ovulatory process in laying hens. Chapter 2 demonstrated that active and passive immunization against testosterone blocks ovulation without affecting follicular development, and caused the absence of the preovulatory surge of progesterone that normally precedes ovulation. Similarly, in chapter 3 it was demonstrated that the acute blockage of testosterone action by the specific receptor antagonist (flutamide) blocks the oviposition and the preovulatory surges of progesterone, LH and oestradiol, which normally are associated with ovulation. Furthermore, *in vitro* studies showed that testosterone alone and in physiological concentrations, was able to stimulate progesterone production by granulosa cells from the F1 follicle, via its specific receptor (chapter 4); and that this stimulatory action changes due the maturity of granulosa cells, being more responsive the mature than the immature cells (chapter 5). These results suggest a local role of testosterone within the ovary to stimulate progesterone secretion by the granulosa cells, when testosterone concentrations are physiological. Finally, in the last *in vivo* studies, it was not possible to establish a unique site of testosterone action within the hypothalamic-pituitary-ovary axis. The results suggest that testosterone acts at preovulatory follicular level for the successful ovulation, probably making the follicle able to response to LH and promoting the release of the preovulatory surge of progesterone. In conclusion, these studies demonstrated that testosterone has a fundamental role in the ovulatory process in laying hens. This role is at least in part by a stimulatory action on the progesterone production by granulosa cells.

TRABAJOS GENERADOS DE ESTA TESIS

ARTICULOS EN REVISTAS INDEXADAS

Publicados:

Rangel PL, Lassala A, Gutierrez CG. Testosterone immunization blocks the ovulatory process in laying hens without affecting ovarian follicular development. *Animal Reproduction Science* **86** (2005) 143-151.

Rangel PL, Sharp PJ, Gutierrez CG. Testosterone antagonist (flutamide) blocks ovulation and preovulatory surges of progesterone, luteinizing hormone and oestradiol in laying hens. *Reproduction* **131** (2006) 1109-1114.

Enviado:

Rangel PL, Rodríguez A, Gutierrez CG. Testosterone directly induces progesterone production and interacts with physiological concentrations of LH to increase granulosa cell progesterone production in laying hens. *Animal Reproduction Science* (2006).

En preparación:

Rangel PL, Rodríguez A, Rojas S, Sharp PJ, Gutierrez CG. Testosterone stimulates progesterone production by granulosa cell in laying hens (*Gallus domesticus*), depending on the degree of maturation of the follicle.

TRABAJOS EN CONGRESOS:

Rangel PL, Lassala A, Gitiérrez CG. Inhibición del pico preovulatorio de progesterone por la inmunización activa contra testosterona en gallinas de postura. *XXXIX Reunión Nacional de Investigación Pecuaria* (2003) 130

Rangel PL, Lassala A, Gitiérrez CG. Testosterone induces progesterone production and interacts with physiological concentrations of LH to increase granulosa cell progesterone production in hens *Gallus domesticus*. 38th Annual Meeting of the Society for the Study of Reproduction *Biology of Reproduction special issue* (2005) 124.

DECLARACIÓN

La autora da consentimiento a la División de Estudios de Posgrado e Investigación de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México, para que la tesis este disponible para cualquier tipo de intercambio bibliotecario.

Lucía Eliana Rangel Porta

PERMISOS DE REIMPRESION

Date: July 18, 2006

Our ref: FCR/RangelUNAMBG7-06

L. Rangel
eliana@servidor.unam.mx

PUBLICATION DETAILS: ANIMAL REPRODUCTION SCIENCE, V86(1-2): 143-151, Rangel PL, Lassala A, & Gutierrez CG: "Testosterone immunization blocks the ovulatory process in laying hens without affecting ovarian follicular development" (c) 2005 Elsevier BV.

As per your letter dated July 4, 2006, we hereby grant you permission to reprint the aforementioned material at no charge in your thesis subject to the following conditions:

1. If any part of the material to be used (for example, figures) has appeared in our publication with credit or acknowledgement to another source, permission must also be sought from that source. If such permission is not obtained then that material may not be included in your publication/copies.
2. Suitable acknowledgment to the source must be made, either as a footnote or in a reference list at the end of your publication, as follows:
"Reprinted from Publication title, Vol number, Author(s), Title of article, Pages No., Copyright (Year), with permission from Elsevier."
3. Reproduction of this material is confined to the purpose for which permission is hereby given.
4. This permission is granted for non-exclusive world English rights only. For other languages please reapply separately for each one required. Permission excludes use in an electronic form. Should you have a specific electronic project in mind please reapply for permission.
5. Should your thesis be published commercially, please reapply for permission.

Yours sincerely,

Boris Ginsburgs
for Elsevier

Your future requests will be handled more quickly if you complete the online form at <http://www.us.elsevierhealth.com./>>
www.us.elsevierhealth.com.

Dear Lucia

With reference to the attached request to reproduce the paper published in *Reproduction* (2006) vol 131 1109-1114 in your thesis, permission is granted subject to the following conditions:

1. Copyright for the material must be held by the Society for Reproduction and Fertility (SRF). If SRF does not hold copyright there will be an acknowledgement line by the material. In this case, you must obtain separate permission from the copyright owners.
2. The agreement of the authors must be obtained by you.
3. An acknowledgement should appear contiguous to the reproduced material, and should include the bibliographic details of the original publication (e.g. author (s), year, journal title, volume, page) together with "© Society for Reproduction and Fertility (year). Reproduced by permission"

Yours sincerely

Cathy

Catherine McLevy-Baglin
Departmental Secretary
Society for Endocrinology
& BioScientifica Ltd
Tel: (+44) (0) 1454 642220
Fax: (+44) (0) 1454 642222
Email: pubs-dept-sec@endocrinology.org

ONLINE JOURNALS via
www.endocrinology.org & www.bioscientifica.com

Society for Endocrinology (limited by guarantee)
Reg. in England no. 349408. Reg. Charity no. 266813

BioScientifica Ltd
Reg. in England no. 3190519

22 Apex Court
Woodlands, Bradley Stoke
Bristol BS32 4JT
United Kingdom

CONTENIDO:

INTRODUCCION.....	1
CAPITULO 1.....	4
REVISION DE LITERATURA.....	4
Generalidades.....	4
Estructura y desarrollo de los folículos ováricos.....	6
Control neuroendocrino de la reproducción.....	9
Ovulación.....	17
Otras hormonas y factores que afectan la ovulación, la esteroidogénesis y el desarrollo folicular.....	22
CAPITULO 2.....	27
La inmunización contra testosterona bloquea el proceso ovulatorio en gallinas de postura sin afectar el desarrollo folicular.	
Abstract.....	28
1. Introduction.....	29
2. Materials and methods.....	29
<i>2.1 Testosterone active immunization</i>	
<i>2.2 Testosterone passive immunization</i>	
<i>2.3 Statistical analyses</i>	
3. Results.....	31
<i>3.1 Testosterone active immunization</i>	
<i>3.2 Testosterone passive immunization</i>	
4. Discusión.....	33
References.....	35
CAPITULO 3.....	37
El uso de un antagonista de testosterona (Flutamida) bloquea la ovulación y los picos preovulatorios de progesterona, LH y estradiol en gallinas de postura.	

Abstract.....	38
Introduction.....	38
Material and Methods.....	39
<i>Experimental animals</i>	
<i>Experimental design</i>	
<i>Radioimmunoassay</i>	
<i>Statistical analyses</i>	
Results.....	39
<i>Experiment one</i>	
<i>Expeeriment two</i>	
Discussion.....	40
References.....	42
CAPITULO 4.....	44
<p>La testosterona, induce directamente la producción de progesterona e interactúa con concentraciones fisiológicas de LH para aumentar la producción de progesterona por las células de la granulosa de la gallina doméstica (<i>Gallus domesticus</i>).</p>	
Abstract.....	45
1. Introduction.....	46
2. Material and methods.....	47
2.1 <i>Materials and reagents</i>	
2.2 <i>Granulosa cell isolation</i>	
2.3 <i>Cell culture</i>	
2.4 <i>Hormone measurement</i>	
2.5 <i>Determination of granulosa cell number</i>	
2.6 <i>Experimental procedures</i>	
2.6.1 <i>Effect of time, testosterone and LH on progesterone production</i>	
2.6.2 <i>Testosterone and LH dose response within physiological concentrations</i>	

2.6.3 *Effect of testosterone antagonist (2-hydroxyflutamide) on progesterone production*

2.7 *Statistical analyses*

3. Results.....	51
3.1 <i>Effect of time, testosterone and LH on progesterone production</i>	
3.2 <i>Testosterone and LH dose response within physiological concentrations</i>	
3.3 <i>Effect of testosterone antagonist (2-hydroxyflutamide) on progesterone production</i>	
4. Discussion.....	54
References.....	58
CAPITULO 5.....	62
Testosterona estimula la producción de progesterona por las células de la granulosa en gallinas (<i>Gallus domesticus</i>), dependiendo del grado de madurez del folículo.	
INTRODUCTION.....	63
MATERIAL AND METHODS.....	65
ANIMALS	
GRANULOSA CELLS ISOLATION	
CELL CULTURE	
HORMONE MEASUREMENT	
EXPERIMENTAL PROCEDURES	
STATISTICAL ANALYSES	
RESULTS.....	67
DISCUSION.....	72
REFERENCES.....	75

CAPITULO 6.....	78
Respuesta del eje hipotálamo-hipofisario-gonadal al estímulo de progesterona, GnRH y hCG, en gallinas de postura tratadas contra testosterona.	
INTRODUCCION.....	78
MATERIAL Y METODOS.....	80
<i>Animales</i>	
<i>Tratamientos</i>	
<i>Muestreo sanguíneo</i>	
<i>Medición hormonal</i>	
<i>Diseño experimental</i>	
<i>Análisis de resultados</i>	
RESULTADOS.....	85
<i>Primer estudio</i>	
<i>Segundo estudio</i>	
<i>Tercer estudio</i>	
DISCUSION.....	91
CAPITULO 7.....	97
DISCUSION GENERAL	
REFERENCIAS.....	104

INTRODUCCION:

En la gallina doméstica, un incremento en las concentraciones plasmáticas de progesterona (P_4), originado por el folículo mayor y los subsecuentes folículos grandes amarillos, induce la liberación preovulatoria de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) (Fraser y Sharp 1978) y de la hormona luteinizante (LH) (Wilson y Sharp 1975; Etches y Cunningham 1976; Wilson y Cunningham 1984; Etches 1996), desencadenando la ovulación. Este incremento en las concentraciones plasmáticas de P_4 y LH, que ocurren 3 a 6h antes de la ovulación, es precedido por incrementos en las concentraciones plasmáticas de testosterona (T) y estradiol (E_2) (Johnson y van Tienhoven 1980a; Etches y Cheng 1981). En el caso del E_2 , se ha establecido que no participa directamente en la retroalimentación positiva de la liberación de LH (Furr y Smith 1975; Wilson y Sharp 1976a), pero que es necesario para sensibilizar el hipotálamo a la acción estimuladora de la P_4 (Wilson y Sharp 1976). Por otra parte, el papel de la liberación preovulatoria de T en el proceso ovulatorio ha sido sugerido por el hecho de que es posible inducir la ovulación y un pico preovulatorio de LH mediante la inyección de T en gallinas de postura que tienen un folículo preovulatorio (Fraps 1955; Wilson y Sharp 1976a; Croze y Etches 1980): Además, es posible bloquear la ovulación mediante la inmunización pasiva contra T (Furr y Smith 1975) o mediante la administración de acetato de ciproterona, un antagonista esteroidal de los receptores de andrógenos (Luck 1982). Sin embargo, solamente ha sido posible inducir la ovulación con T si esta hormona se administra a dosis suprafisiológicas, por lo que se le ha atribuido un papel farmacológico (Croze y Etches 1980) y se ha asumido que la T no tiene un papel relevante en la ovulación de las gallinas.

En la figura 1 se esquematiza la relación temporal de las hormonas relacionadas con el proceso ovulatorio de las gallinas de postura.

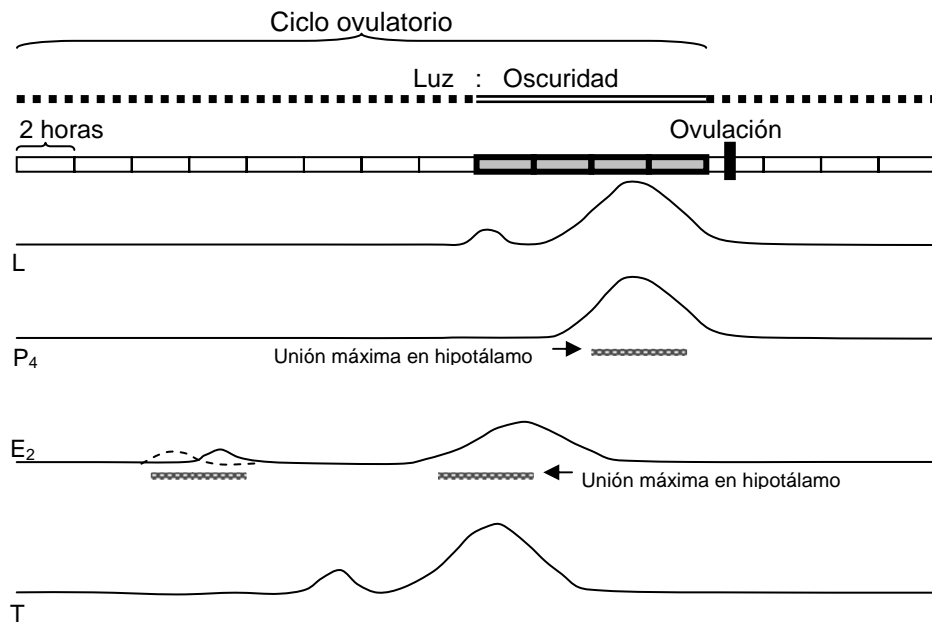


Figura 1: Relación temporal de las hormonas involucradas en el proceso ovulatorio de las gallinas de postura. En este esquema se ejemplifican la ocurrencia de los incrementos de las concentraciones plasmáticas de LH, progesterona (P₄), estradiol (E₂) y testosterona (T), en el primer ciclo ovulatorio de una secuencia, cuando los animales son mantenidos en un esquema de 16 horas luz:8 horas oscuridad. Así mismo se muestra el periodo en el que se ha descrito la ocurrencia de las máximas uniones de las hormonas en su sitio mas importante de acción dentro del proceso ovulatorio.

El objetivo de los trabajos que se presentan en esta tesis fue incrementar el entendimiento del significado funcional de la liberación preovulatoria de T en el proceso ovulatorio de las aves, tomando como modelo a las gallinas de postura.

Los primeros dos trabajos (capítulos 2 y 3) se encaminaron a determinar la acción de la T *in vivo* sobre la ovulación y las concentraciones hormonales que la preceden. Al cabo de estos trabajos se mostró que la T es necesaria para que ocurra la ovulación y la presentación de los picos preovulatorios de las hormonas asociadas con la misma.

El hallazgo de que en ambos estudios la falta de acción de la T abatiera la secreción preovulatoria de la P₄ nos planteó dos posibilidades: La primera sugería que la T tuviera una acción local sobre la producción de la P₄ a nivel ovárico, mientras que la segunda nos indicaba que la T podría estar actuando en algún

punto del hipotálamo, la hipófisis o la gónada para favorecer la liberación de la LH, ya fuera inducida por la P₄ o por una acción propia de la T.

Al tratar de responder si la T tiene un efecto local sobre la producción de P₄ por las células de la granulosa, encontramos que la información de la literatura es contradictoria asumiendo tanto efectos estimulatorios (Phillips *et al.* 1985; Sasanami y Mori 1999) como inhibitorios (Johnson *et al.* 1988; Lee y Bhar 1989 y 1990). Para resolver esta controversia realizamos dos estudios *in vitro* (Capítulos 4 y 5) que probarían el efecto de concentraciones fisiológicas de la T en sobre la producción de P₄ por las células de la granulosa, así como el efecto del tiempo de colección de las células y el tiempo de cultivo.

Finalmente, el último estudio tuvo por objetivo establecer el sitio de acción de la T dentro del eje hipotálamo-hipófisis-gónada, mediante el bloqueo de la acción de T y la aplicación de P₄, GnRH y hCG.

CAPITULO 1

REVISION DE LITERATURA:

Generalidades:

La gallina doméstica es un ave de origen asiático, de la familia *phaisanidae*, del orden *galliforme* y del género *Gallus Gallus domesticus*. Las gallinas poseen 39 pares de cromosomas y las hembras son el sexo cromosómico heterogamético (ZW), mientras que los machos son homogaméticos (ZZ).

La reproducción en las gallinas domésticas presenta un patrón estacional controlado por el fotoperiodo. Estos animales se reproducen durante los días largos del año (Sharp 1993; Etches 1990). Al igual que en otras especies estacionales, esta restricción de la época reproductiva se acentúa en las regiones más alejadas del ecuador, donde los cambios del fotoperiodo son más evidentes.

En muchas de las aves de vida libre la disponibilidad de alimentos y las condiciones climáticas pueden ser también determinantes para la restricción de las épocas reproductivas (Sharp 1996). Esto implica una diferencia con las gallinas dedicadas a la producción de huevo, para las cuales (debido a las condiciones en las que son mantenidas) no existen otros factores medioambientales que interfieran en el inicio y cese de la estación reproductiva. Lo anterior ha permitido que en las explotaciones comerciales se manipule la cantidad de horas luz por día para incrementar la producción de huevo, reiniciar los ciclos de postura después de la pelecha, así como para retrasar el inicio de la postura (North 1986).

Se ha demostrado que en la gallina los días largos pueden ser tanto estimulatorios, como inhibitorios. Esto último por un efecto de fotorrefractoriedad en el que la exposición prolongada a fotoperiodos largos ocasiona la disminución de la secreción de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH), una falla en la producción de gonadotropinas y por lo tanto, una regresión ovárica (Nicholls *et al.* 1988; Sharp 1993). Todo lo anterior ocurre en respuesta a una retroalimentación inhibitoria de los esteroides ováricos a nivel hipotalámico,

sensibilidad que debe cambiar para lograr el reinicio de la actividad reproductiva en el siguiente ciclo (Nicholls *et al.* 1988). Generalmente, este efecto de fotorrefractoriedad se observa al final de un año de postura y es apreciable por la disminución del porcentaje de ovoposición. Los días cortos se consideran neutros ya que ni estimulan ni inhiben el proceso reproductivo (Sharp 1993). Se ha estipulado que 11-12 horas diarias de luz son suficientes para estimular la reproducción, pero tradicionalmente se han manejado esquemas que van de 14 a 18 horas de luz por 6 a 10 de oscuridad (North 1986; Etches 1996). Por otro lado, se ha visto que cuando los animales son expuestos a regímenes de 14L:14O la ovoposición ocurre ininterrumpidamente cada 27-28 horas (Etches 1996).

En el caso de las aves, aparentemente la percepción de la luz por el ojo no es importante para el control del proceso reproductivo, ya que aves cegadas continúan presentando patrones estacionales idénticos a los de animales intactos (Wilson 1990; Etches 1996), sugiriéndose la existencia de un mecanismo extraocular (Wilson 1990). Apoyando la existencia de dicho mecanismo extraocular se ha propuesto que la luz pasa por el cráneo de los animales a la porción conocida como complejo infundibular nuclear, directamente hasta fotorreceptores hipotalámicos que traducen el estímulo de los fotones en un mensaje nervioso que actúa sobre las neuronas productoras de GnRH, induciendo su secreción (Etches 1996). Del mismo modo, y a diferencia de otras especies estacionales, la pinealectomía no causa el bloqueo de los cambios reproductivos inducidos por la luz, sugiriendo que la melatonina y la glándula pineal no tienen un papel relevante en el control del fotoperiodo en estos animales (Sharp 1993). A pesar de ello, en el caso de las aves se ha visto que la melatonina es un producto de la glándula pineal, y que también puede ser sintetizada en la retina ocular (Etches 1996; Bernard *et al.* 1999), además de que se ha manifestado la expresión del receptor específico a melatonina (Mel_{1c}) en el hipotálamo de las gallinas (en Ubuka *et al.* 2005). Recientemente el papel de la melatonina en el control de la reproducción aviar se ha vuelto controversial, ya que se mostró que la melatonina, originada tanto en la glándula pineal como en la retina ocular, actúa

induciendo directamente la liberación de GnIH (un neuropéptido, de reciente descubrimiento, inhibidor de la secreción de GnRH) (Ubuka *et al.* 2005). Así mismo, se ha concluido que la melatonina controla la expresión de GnIH en respuesta al fotoperiodo, incrementando su liberación en los días cortos, cuando la secreción de melatonina es mayor (Ubuka *et al.* 2005). Por otro lado, se ha establecido la presencia de receptores a melatonina en las células de la granulosa y se les relaciona con una disminución en la producción de progesterona (P₄) inducida por LH (Murayama *et al.* 1997).

Estructura y desarrollo de los folículos ováricos:

Durante el desarrollo embrionario de la gran mayoría de las aves únicamente se desarrollan el ovario y el oviducto izquierdos, como una respuesta a la hormona inhibidora de los conductos de Müller (AMH) (Carré-Eusebe *et al.* 1997) y a los estrógenos circulantes (Bruggeman *et al.* 2002). La AMH es secretada por las células de la granulosa del ovario y actúa inhibiendo el desarrollo del ovario y el conducto de Müller derechos (Carré-Eusebe *et al.* 1997), mientras que los estrógenos ováricos protegen al ovario y oviducto izquierdos para que logren desarrollarse (Bruggeman *et al.* 2002), aparentemente debido a una distribución asimétrica de receptores a estradiol, la cual es más abundante en los órganos izquierdos (MacLaughlin *et al.* 1983). Una vez desarrollado el oviducto, se conforma por tres secciones: infundíbulo, mágnium e istmo; y se continúa con la glándula de la cáscara y la vagina, para desembocar en la cloaca.

El ovario tiene dos funciones esenciales, una endocrina (por la producción, principalmente, de las hormonas esteroideas) y otra de producción de los ovocitos. El ovocito contiene el material genético materno que se fusionará con el del macho durante la fertilización, y que compone una estructura denominada disco germinal. El resto del ovocito corresponde a la yema o vitelo. El folículo ovárico no sintetiza ningún componente de la yema, únicamente tiene mecanismos especializados (endocitosis mediada por receptores) para captar inmunoglobulinas, vitaminas y productos hepáticos (proteínas y lípidos). Estos últimos son sintetizados en

respuesta al estradiol (E_2) circulante y transportados al ovario por vía sanguínea. La función hepática es por lo tanto esencial para la adecuada reproducción de las aves ya que debe sintetizar de novo 8g de lipoproteínas por día para la formación de la yema (Etches 1996).

En una gallina en postura el ovario pesa de 45 a 55g y esta compuesto por un gran número de folículos en diferentes etapas de desarrollo. Los folículos ováricos se dividen en cinco categorías, de acuerdo a su tamaño y madurez:

- *Folículos pequeños blancos*: son folículos con diámetro menor a 2mm.
- *Folículos grandes blancos*: con diámetros entre 2 y 4mm.
- *Folículos pequeños amarillos*: entre 4 y 8mm de diámetro.
- *Folículos grandes amarillos*: a este grupo también se le conoce como folículos yemosos o preovulatorios. Dentro de esta categoría normalmente hay entre 5 y 7 folículos, con diámetros desde 9 y hasta 35mm.
- *Folículos postovulatorios*: este grupo corresponde a los remanentes foliculares de la ovulación.

Los primeros tres grupos foliculares también se conocen como *folículos prejerárquicos* y son folículos susceptibles de sufrir atresia. El crecimiento de estos folículos ocurre muy lentamente (Johnson 1990 y 1993). La atresia se ha definido como un proceso que forma parte normal del desarrollo de los folículos prejerárquicos. En aves se ha visto que los folículos pequeños en atresia tienen una mayor proporción de células en apoptosis que de células en mitosis (Kitamura *et al.* 2002). Así mismo, se ha sugerido que el proceso de atresia folicular se inicia con la apoptosis de las células de la granulosa (Bridgham y Johnson 2002).

A los folículos grandes amarillos se les denomina como *folículos jerárquicos*, ya que en ellos existe una jerarquía muy bien establecida. Cada uno de los folículos se designa con un número decreciente de acuerdo a su tamaño (F1 el mayor, F2 el siguiente, etc.). Una vez que un folículo es seleccionado para entrar a esta categoría no es susceptible de sufrir atresia (Gilbert *et al.* 1983; Johnson 1996). Cada día el folículo mayor (F1) es ovulado, mientras que otro nuevo es integrado a la jerarquización. El reclutamiento de nuevos folículos a la jerarquización ocurre de

un conjunto de 10 a 15 folículos con diámetros de 6-8mm. En este grupo de folículos jerárquicos el crecimiento ocurre rápidamente, así el folículo preovulatorio entra a la categoría de jerárquico 9 días (7-10d) antes de ser ovulado (Johnson 1990 y 1993). La falta de atresia en los folículos jerárquicos se explica en parte debido a que la P_4 actúa en forma autocrina estimulando la sobrevivencia de las células de la granulosa. Adicionalmente, la hormona folículo estimulante (FSH) controla algunos mecanismos de sobrevivencia celular independientes de P_4 (Mussche y D'Herde 2001).

Los folículos postovulatorios son estructuras que poseen todas las capas celulares que formaron al folículo, ya que al momento de la ovulación el ovocito es expulsado sin ninguna célula que lo rodee, únicamente cubierto por la membrana perivitelina. Estos folículos postovulatorios tardan 6-8 días en involucionar completamente (Johnson 1990 y 1993) y su granulosa permanece esteroideogénicamente activa hasta por 24 horas después de la ovulación, aunque las cantidades hormonales que produce son mínimas (Huang y Nalbandov 1979). Los folículos ováricos están compuestos por tres capas, que se diferencian de acuerdo a su composición celular y su función (Etches 1996):

- La capa más interna es la *granulosa*. Sus células están en contacto íntimo con el ovocito. En los folículos pequeños la granulosa esta formada por varias capas de células que adquieren su capacidad esteroideogénica al momento del reclutamiento folicular. Conforme avanza el desarrollo estas células forman una monocapa con gran capacidad proliferativa (Johnson 1990). Existen dos indicadores importantes de la actividad de las células de la granulosa al momento de la selección folicular. Primero, en estas células se presenta gran actividad del factor activador del plasminógeno, la cual decrece en el F1. Segundo, hay gran proliferación celular, que va disminuyendo conforme se avanza en la jerarquía (Johnson 1993).
- La capa media es la *teca interna*, que esta compuesta esencialmente por células esteroideogénicas típicas con abundantes gotas de lípidos en el citoplasma (Hernández-Vértiz *et al.* 1993).

- La última capa es la *teca externa*, la cual, a diferencia de la estructura equivalente de los mamíferos, posee islotes de células indiferenciadas y aromatasas positivas (Hernández-Vértiz *et al.* 1993).

Control neuroendocrino de la reproducción:

Los procesos reproductivos en las aves están controlados por las interacciones endocrinas del eje hipotálamo-hipofisiario-gonadal.

El hipotálamo de las aves posee algunos cientos de neuronas productoras de GnRH. Los cuerpos de estas células se concentran en el área preóptica, mientras que sus terminaciones se ubican en la eminencia media, donde liberan su contenido directamente hacia el sistema porta hipotálamo-hipofisiario (Sterling y Sharp 1982; Johnson *et al.* 1985; Wilson *et al.* 1990).

El desarrollo del patrón de secreción hipotalámico de GnRH en hembras (tónico y cíclico) es inducido por los estrógenos embrionarios (Sayag *et al.* 1989), lo que constituye una diferencia importante con los mamíferos. Por otro lado, el E₂, al ser aromatizado en el hipotálamo a partir de la testosterona (T), es responsable de inducir el comportamiento sexual masculino a nivel central (Balthazart y Ball 1995).

En el caso de las aves se han identificado dos isoformas de GnRH. La GnRH-I es la que ejerce el control de la reproducción, al estimular la secreción de las gonadotropinas por la hipófisis. El papel de la GnRH-II no está bien establecido, pero se cree que no interviene en el proceso reproductivo y que su acción es como neurotransmisor (Sharp *et al.* 1990; Wilson *et al.* 1990). La producción de GnRH-I está influenciada por diferentes hormonas, entre ellas la P₄, que induce su secreción por un mecanismo indirecto debido a que las células productoras de GnRH no poseen receptores para ella (Sterling *et al.* 1984). Aparentemente, el mecanismo indirecto por el cual P₄ es capaz de inducir la liberación de GnRH-I es mediante el bloqueo de la dopamina y la 5-hidroxitriptamina (Sharp *et al.* 1989), que naturalmente inhiben la secreción de GnRH-I (Sharp *et al.* 1984). Por su parte, el E₂ puede estimular o inhibir la secreción de GnRH. Antes de que se alcance la pubertad, la acción del E₂ es inhibitoria (Rozenbom *et al.* 1993). Posteriormente, la

acción del E₂ se vuelve positiva al incrementar la capacidad hipotalámica de unión de P₄ en células no productoras de GnRH, favoreciendo la acción estimuladora de esta última sobre la secreción de GnRH (Kawashima *et al.* 1979). Así mismo, el E₂ contribuye a la inducción de la secreción de GnRH causada por la norepinefrina (Li *et al.* 1994).

Otras hormonas que participan en la inducción de la liberación de GnRH son: la epinefrina y la norepinefrina (Li *et al.* 1994; Sharp *et al.* 1998), mientras que aparentemente los opioides inhiben su secreción (Sharp *et al.* 1998).

Recientemente se identificó en codornices un decapeptido hipotalámico capaz de inhibir la liberación de GnRH, por lo cual se le denominó hormona inhibidora de gonadotropinas (GnIH). El sitio de secreción de GnIH es en neuronas del núcleo paraventricular. La GnIH parece ser un importante regulador de la reproducción en aves y es el primer neuropéptido hipotalámico inhibidor de GnRH descrito en vertebrados (en Ubuka *et al.* 2005).

La hipófisis anterior posee los gonadotropos, que son un grupo de células epiteliales glandulares encargadas de la producción de las gonadotropinas: LH y FSH. La actividad secretora de los gonadotropos es directamente estimulada por la GnRH-I, por lo que existen receptores específicos para la GnRH-I en la hipófisis, con máximas capacidades de unión entre 16-14h y 8-6h preovulación (Kawashima *et al.* 1992). La hipófisis también posee receptores para P₄, E₂ y T (Kawashima *et al.* 1978a; 1987 y 1989). La capacidad de unión de los receptores para GnRH-I se incrementa por P₄, E₂ y 5 α -dihidrotestosterona, y es mayor en hembras en postura (Kawashima *et al.* 1992).

La producción de la FSH parece no presentar incrementos significativos durante el ciclo ovulatorio (Lovell *et al.* 2000), detectándose elevaciones menores 15-14h antes de la ovulación (Scanes *et al.* 1977). Sus concentraciones son mayores en hembras sexualmente maduras y se incrementan en respuesta a GnRH y P₄ (Scanes *et al.* 1977). Sharp *et al.* (1990) mostraron que la secreción de la FSH depende de GnRH-I.

Se ha informado sobre la presencia de receptores para la FSH en la teca y la granulosa de folículos de todos los tamaños, con concentraciones mayores en los folículos prejerárquicos (6-8mm) al momento de la transición hacia la jerarquía, que disminuyen conforme los folículos maduran (patrón inverso al mostrado por los receptores para LH) (Bahr y Johnson 1984; Yamamura *et al.* 2001; You *et al.* 1996). Adicionalmente, se ha determinado que la concentración de los receptores de FSH es menor en los folículos atrésicos (You *et al.* 1996).

Debido a que se encontró que la aplicación de la FSH 14h antes de la ovulación aceleró la esteroidogénesis en la pared folicular, pero no causó un incremento correspondiente en las concentraciones de las hormonas esteroideas en la circulación general (Imai y Nalbandov 1978); y a que en cultivos *in vitro* se mostró que la FSH no fue capaz de inducir la secreción de las hormonas esteroideas en los folículos prejerárquicos (Robinson *et al.* 1988), se ha sugerido que en las aves la FSH no regula la esteroidogénesis directamente (Johnson 1996). Sin embargo, lo anterior ha sido revocado por el hecho de que la FSH ovina fue capaz de estimular la producción de P_4 por las células de la granulosa de los folículos F3 y F4 cultivadas *in vitro* (Hertelendy *et al.* 1982). Así como por que la FSH induce la expresión de P450_{scc} (colesterol desmolasa) y P450_{17 α} (17 α -hidroxilasa) en las células de la granulosa, para el inicio de la producción de P_4 (You *et al.* 1996; Hernández y Bahr 2003). Adicionalmente, Tilli *et al.* (1991) y Li y Johnson (1993) consideran a la FSH como un factor primario para iniciar la esteroidogénesis por las células granulosas y refuerzan esta consideración por el hecho de que las células de la granulosa de los folículos prejerárquicos no son responsivos a la LH (Tilli *et al.* 1991). Por lo tanto, la FSH se considera como una de las hormonas responsables de la entrada de los folículos a la jerarquía folicular. Adicionalmente, las máximas uniones de FSH se presentan en el estroma ovárico y los folículos pequeños (Etches y Cheng 1981) que son los principales sitios productores de E_2 (Armstrong 1984), lo cual haría suponer que la FSH estimula la producción de dicho esteroide como ocurre en mamíferos.

Aparentemente, otras funciones de la FSH son: reclutar y promover el crecimiento de los folículos pequeños (Imai 1973; Palmer y Bahr 1992), inducir la maduración de los folículos pequeños (Bahr y Johnson 1984; Zhang *et al.* 1997) e inducir la diferenciación de las células de la granulosa (Johnson 1996; Zhang *et al.* 1997). Adicionalmente, la FSH estimula la proliferación de las células de la granulosa posiblemente contribuyendo al crecimiento folicular (Velázquez *et al.* 1997; McElroy *et al.* 2004).

Para que la FSH pueda actuar es necesario que active el sistema adenilato ciclasa (Calvo y Bahr 1983; You *et al.* 1996) para estimular la producción de AMPc (Tilly *et al.* 1991). Por otro lado se ha sugerido que PKC puede antagonizar estos efectos estimulatorios de FSH sobre AMPc (Tilly *et al.* 1991).

La secreción de la LH por la hipófisis anterior es estimulada por la GnRH-I (Sharp *et al.* 1998; Johnson y van Tienhoven 1981), en respuesta a la retroalimentación positiva ejercida por P₄ (Johnson *et al.* 1985; Sharp *et al.* 1990; Wilson *et al.* 1990). El pico de LH ocurre 4-8h antes de la ovulación y dura aproximadamente 6h (Wilson y Sharp 1973; Johnson y van Tienhoven 1980a; Wilson *et al.*, 1983). Adicionalmente, la secreción de la LH presenta un ritmo circadiano que inicia con el comienzo de la oscuridad y tiene una duración de 8 a 10h, lapso de tiempo que es conocido como el periodo abierto (Wilson y Sharp 1973; Wilson *et al.* 1983).

La síntesis de LH esta estimulada por P₄ (Williams y Sharp 1978; Johnson y van Tienhoven 1980), norepinefrina y epinefrina (Sharp *et al.* 1998), mientras que la inhiben la prolactina (durante la incubación, Richard-Yris *et al.* 1998), dopamina y 5 α -hidroxitriptamina (Sharp *et al.* 1998).

Existen receptores para LH en la granulosa desde el momento en que los folículos entran a la jerarquía (9mm), y la expresión del RNAm de los receptores para LH aumenta con la maduración de los folículos (Johnson *et al.* 1996; Yamamura *et al.* 2001). En teca, la expresión de los receptores de LH es mínima, pero detectable en todos los folículos, y también se incrementa con la maduración, pero disminuye en el F1 (Johnson *et al.* 1996; Yamamura *et al.* 2001).

La función esencial de la LH es inducir la ovulación (Wilson y Cuningham 1984; Etches 1993). Adicionalmente, la LH actúa en la maduración folicular (Cuningham *et al.* 1984) y la esteroidogénesis. Robinson y colaboradores mostraron en dos estudios diferentes que la LH es la hormona que estimula la esteroidogénesis en folículos pequeños y grandes (Robinson y Etches 1986; Robinson *et al.* 1988). Así mismo, Imai y Nalbandov (1978) mostraron que la administración de LH exógena promueve la secreción de P_4 por el folículo preovulatorio y de E_2 por el F3.

Nakamura *et al.* (1991) mostraron que la respuesta de los folículos F1 y F4-6 a la LH, tanto en granulosa como en teca, es mediada por el sistema AMPc-adenilatociclasa.

En aves se ha establecido una teoría de tres células para la secreción de las hormonas esteroides (Porter *et al.* 1998). En ella se propone que el principal producto de secreción de la granulosa es la P_4 , el de la teca interna es la T y el de la teca externa es el E_2 . Adicionalmente, Rodríguez-Maldonado *et al.* (1996) sugieren que existe un mecanismo de cooperación entre ambas capas de la teca, donde la interna produce T como precursor para que la externa produzca E_2 .

Se ha determinado que la capacidad de los folículos para secretar a los esteroides varía de acuerdo al grado de desarrollo o madurez folicular (Porter *et al.* 1998; Hernández-Vértiz *et al.* 1993; Rodríguez-Maldonado *et al.* 1996). De este modo, los folículos prejerárquicos liberan las mayores cantidades de estrógenos (Armstrong 1984; Robinson y Etches 1986) porque los pequeños folículos amarillos y el estroma ovárico poseen el 50% de la capacidad aromatasa del ovario (Armstrong 1984). Estos folículos también secretan cantidades mínimas de andrógenos y son incapaces de liberar P_4 , ya que sus células de la granulosa son incompetentes por falta de la expresión de P450_{scc} (Tilly *et al.* 1991a). Contrariamente, los folículos preovulatorios secretan las mayores cantidades de P_4 (Robinson y Etches 1986), capacidad que va aumentando con la maduración folicular por lo que el folículo preovulatorio es la mayor fuente de la P_4 preovulatoria (Yu *et al.* 1992). Esta capacidad para secretar el pico preovulatorio de P_4 por el folículo F1 es inducida por la LH mediante la activación del sistema

adenilato ciclasa, sugiriéndose que éste es el folículo más sensible a la estimulación por la LH (Calvo y Bahr 1983). Como ya se explicó, el cambio en la capacidad de producción de P_4 entre los folículos prejerárquicos y jerárquicos ocurre una vez que los folículos son seleccionados y entran a la jerarquía folicular, gracias a que las células de la granulosa adquieren la capacidad de producir y secretar P_4 (Tilly *et al.* 1991; Yu *et al.* 1996; Hernández y Bahr 2003). Simultáneamente, los folículos grandes amarillos van incrementando sus secreciones de T, pero el que mayores cantidades secreta es el F3 debido a que el F1 pierde la capacidad de transformar P_4 a andrógenos 12 horas antes de la ovulación (Robinson y Etches 1986). En forma contraria, la habilidad para secretar estrógenos por los folículos jerárquicos va disminuyendo gradualmente y es casi nula en el folículo preovulatorio (Armstrong 1984).

En el ovario se han identificado tanto la vía $\Delta 4$ como la $\Delta 5$ para la biosíntesis de esteroides, y su expresión cambia con el desarrollo folicular (Robinson y Etches 1986; Imataka *et al.* 1989; Nitta *et al.* 1993) (figura 2).

En las células de la teca de los folículos prejerárquicos la producción de las hormonas esteroides ocurre por la vía $\Delta 5$ (Lee *et al.* 1998). En estos folículos, debido a la incapacidad de la granulosa para sintetizar P_4 , la teca externa es capaz de producir esteroides C21 y C19 como precursores para lograr la producción y secreción de E_2 (Kowalski *et al.* 1991; Tilly *et al.* 1991; Imataka *et al.* 1998). Contrariamente en las células de la granulosa la esteroidogénesis ocurre por la vía $\Delta 4$ (Lee *et al.* 1998), siendo por lo tanto, la vía de acción predominante en los folículos jerárquicos.

En ambos casos la esteroidogénesis es estimulada por el sistema adenilato ciclasa, en el cual el AMPc induce la activación de PKA (Kowalski *et al.* 1991; Lee y Bahr 1994). Por otro lado, la funcionalidad de la PKC como estimulador de la esteroidogénesis en aves no ha sido establecida. Se ha sugerido que la PKC puede bloquear al sistema adenilato ciclasa (Kowalski *et al.* 1991), sin embargo, existe evidencia de que la T incrementa la secreción de la P_4 por las células de la

granulosa, gracias a un efecto estimulador sobre la expresión de PKC (Sasanami y Mori 1999).

Las principales enzimas esteroideogénicas expresadas en los diferentes tipos celulares son (Rodríguez-Maldonado *et al.* 1996; Gómez *et al.* 1998; Johnson 1993):

- Granulosa: 3β -HSD, 17β -HSD, 5β -reductasa y P450scc (esta última al adquirir competencia).
- Teca Interna: 3β -HSD, 17β -HSD, 5β -reductasa, P450scc y P45017c (17α hidroxilasa) (esta última para producción de androstenediona y T).
- Teca Externa: 3β -HSD, 17β -HSD, Aromatasa (las 3 disminuyen con maduración), 20β -reductasa y P450scc.

Esteroidogénesis en aves

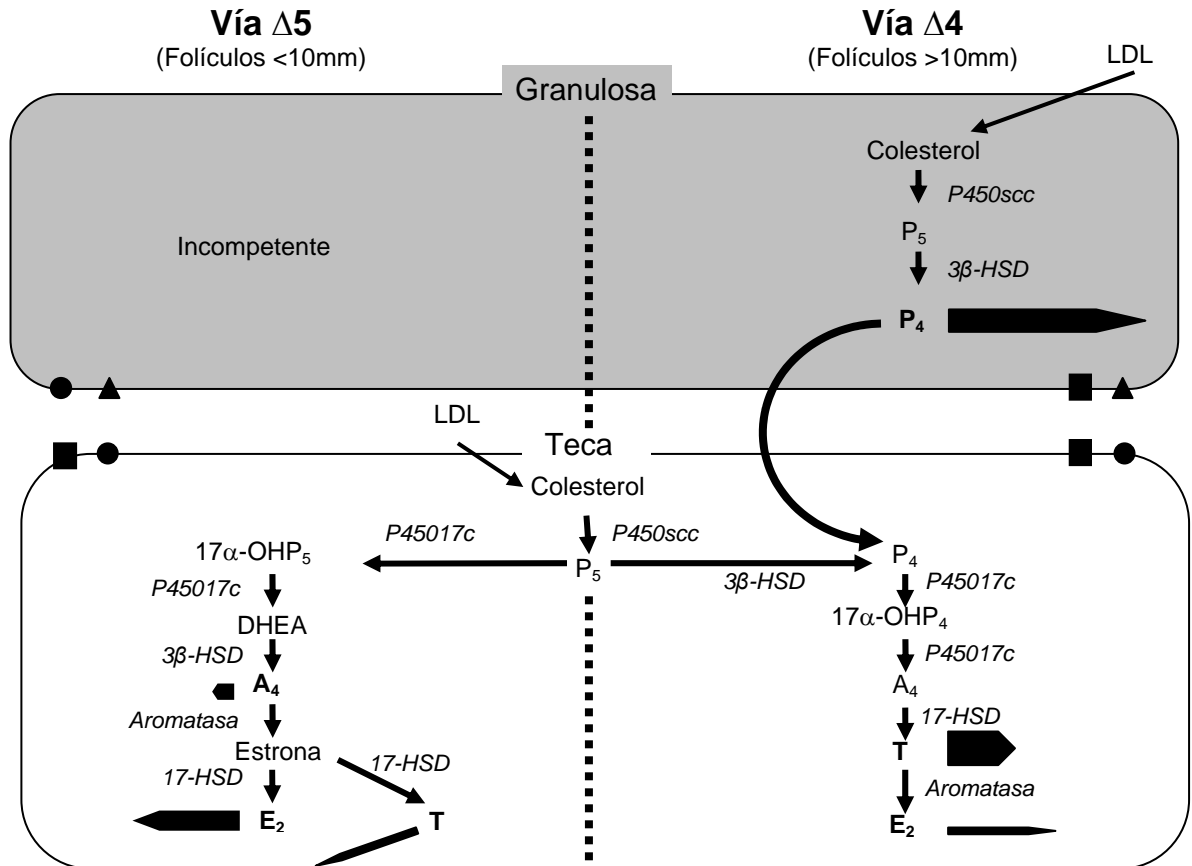


Figura 2: Esteroidogénesis en aves. Lado izquierdo: biosíntesis de esteroides en los folículos prejerárquicos (< a 10mm) mediante la vía $\Delta 5$. Lado derecho: biosíntesis de esteroides en los folículos jerárquicos (> a 10mm) mediante la vía $\Delta 4$. Abreviaturas: LDL= lipoproteínas de baja densidad, **Hormonas:** P_5 = pregnenolona, P_4 = progesterona, $17\alpha-OHP_5$ = 17 α -hidroxipregnenolona, $17\alpha-OHP_4$ = 17 α -hidroxiprogesterona, DHEA= dihidroepiandrosterona, A_4 = androstenediona, E_2 = estradiol, **Enzimas:** $P450scc$ = colesterol desmolasa, $3\beta-HSD$ = 3β -hidoxiesteroide deshidrogenasa, $P45017c$ = 17 α -hidroxilasa, $17-HSD$ = 17-hidroxiesteroide deshidrogenasa, **Receptores:** ■= LH, ●= FSH, ▲= VIP.

Ovulación:

En las aves el proceso ovulatorio se encuentra muy relacionado con la ovoposición, en la cual el huevo ya formado es expulsado por la cloaca. Esta relación consiste en que dentro de un ciclo ovulatorio, que en el caso de las gallinas domésticas esta formado por 3 a 10 ovulaciones con sus subsecuentes ovoposiciones (North 1984; Etches 1990), cada ovulación ocurre 15 a 60min después de la ovoposición del huevo formado con el ovocito ovulado el día anterior (Wilson y Cunningham 1984; Etches 1996). Entre una secuencia ovulatoria y otra hay un día de no ovulación, después del cual se inicia un nuevo ciclo.

La duración de los ciclos ovulatorios esta regulada por dos factores: el tiempo transcurrido entre ovoposiciones subsecuentes, que tiene un intervalo de 24 a 27h (Wilson y Cunningham 1984) y el hecho de que la ovulación esta restringida a un período de 8 a 10h del día en consecuencia a una limitación temporal de la liberación de LH (Wilson y Cunningham 1984; Etches 1996). Así, cuando la maduración folicular tarda más de 24h la ovulación se va recorriendo cada día; hasta que la ovoposición ocurre en un momento del día cuando ya no es posible desencadenar la liberación preovulatoria de LH y el ciclo ovulatorio finaliza (Etches 1990). La selección genética ha reducido el tiempo entre ovoposiciones a intervalos menores a 24h, alargando con ello la duración de los ciclos.

Se ha observado que la FSH no interviene en el proceso ovulatorio de las gallinas, ya que Imai (1973) demostró que la oFSH es incapaz de inducir la ovulación.

Contrariamente, la P_4 se considera como el esteroide ovárico responsable de la ovulación, ya que induce la liberación de LH. Lo anterior se concluyó porque inyecciones periféricas de P_4 inducen incrementos en las concentraciones plasmáticas de LH, excepto cuando se aplica 4h antes de la ovulación (Wilson y Sharp 1975). Así mismo, la aplicación subcutánea de P_4 induce picos plasmáticos de P_4 y LH semejantes a los fisiológicos (Etches y Cuningham 1976). Sin

embargo, cuando la P_4 es inyectada en sistema nervioso central induce la liberación de LH únicamente por su aplicación hipotalámica (Ralph y Fraps 1960). Las áreas preóptica, tuberal y lámina terminal del hipotálamo, así como en la hipófisis anterior poseen receptores específicos a la P_4 (Kawashima *et al.* 1978a y 1979; Sterling *et al.* 1987; Askews *et al.* 1997). Adicionalmente, se ha observado que las uniones máximas de P_4 ocurren 21-18h y 6-3h antes de la ovulación tanto en hipotálamo, como en hipófisis en gallinas en postura (Kawashima *et al.* 1979 y 1994). También se demostró que las uniones de P_4 son menores en hembras que no están poniendo (Kawashima *et al.* 1979 y 1994) y en animales incubando (Askews *et al.* 1997). Así mismo, se mostró que las uniones máximas de P_4 son incrementadas por E_2 (Kawashima *et al.* 1979a; Balthazart *et al.* 1980; Askews *et al.* 1997). Kawashima *et al.* (1979a), describieron este efecto estimulador sobre la unión máxima de P_4 por acción de la T a nivel hipofisiario, mientras que Balthazart *et al.* (1980) también lo determinaron en hipotálamo de patos, sugiriéndose que dicha acción se debía a su aromatización local a E_2 .

En el sistema nervioso central la P_4 es metabolizada a 5α y 5β -dihidroprogesterona. Solo la 5α -dihidroprogesterona es capaz de inducir la liberación de LH, sin ser la responsable del pico preovulatorio, mientras que la 5β -dihidroprogesterona presenta acciones en el comportamiento reproductivo (Sharp y Massa 1980).

Con la inmunolocalización de anticuerpos para receptores de P_4 de gallinas, se comprobó que dichos receptores existen en las células de la granulosa y de la teca (Yoshimura y Bahr 1991). Adicionalmente, se ha visto que la LH incrementa las concentraciones de los receptores de P_4 ováricos (Yoshimura *et al.* 1995a).

Las concentraciones plasmáticas de P_4 deben su producción y secreción a las células de la granulosa de los folículos jerárquicos (Robinson y Etches 1986; Yu *et al.* 1992), en respuesta a la inducción de la LH, ya que entre ambas hormonas existe un mecanismo de retroalimentación positiva (Etches y Cunningham 1976; Imai y Nalbandov 1978; Johnson *et al.* 1985). Las máximas concentraciones de P_4

se observan 6-4h antes de la ovulación (Kappauf y van Tienhoven 1972; Johnson y van Tienhoven 1980a).

Basándose en el hecho de que el folículo preovulatorio pierde la capacidad de transformar la P_4 a andrógenos 12h antes de la ovulación (Robinson y Etches 1986), se han propuesto dos explicaciones para la secreción del pico preovulatorio de P_4 : Primero, que T inhibe la secreción de P_4 , por lo que al disminuir la producción de T se incrementa la síntesis de P_4 . Segundo, que el hecho de que la P_4 deje de transformarse a T hace que las concentraciones de P_4 se incrementen. Para intentar comprobar la primera opción, se han realizado estudios *in vitro* determinando el papel de la T sobre la producción de P_4 por las células de la granulosa. Los resultados de estos estudios han sido controversiales. Sasanami y Mori (1999) mostraron que $1\mu\text{g/ml}$ de T estimula la producción de P_4 , en presencia o ausencia de LH, vía proteína cinasa C e indirectamente incrementando la sensibilidad a LH. En contraste, otros autores han encontrado efectos negativos de T sobre la producción de P_4 . Johnson *et al.* (1988), utilizando células del folículo preovulatorio, encontraron que los andrógenos (T, androstenediona y DHT) suprimen agudamente la producción de P_4 basal e inducida por LH en una forma dosis dependiente, cuando se agregaron a concentraciones de 1×10^{-7} a $1 \times 10^{-5}\text{M}$. Similarmente, Lee y Bhar (1989, 1990) propusieron que T y DHT (1 y $10\mu\text{M}$, respectivamente) suprimen la producción de P_4 al reducir las concentraciones de $P_{450\text{scc}}$ y actuando como competidores inhibitorios de su actividad. Por otro lado, se ha observado que la P_4 inhibe la producción de androstenediona por las células de la teca en los folículos maduros (Woolveridge y Peddie 1997).

El E_2 presenta un primer incremento en sus concentraciones 18-20h preovulación (Wilson y Cunningham 1984), mientras que su pico máximo ocurre 8h antes de la ovulación (Johnson y van Tienhoven 1980a). El E_2 es producido por las células de la teca externa, principalmente por los folículos pequeños (Armstrong 1984) y su producción es inducida por LH (Robinson y Etches 1986; Robinson *et al.* 1988; Nakamura *et al.* 1991).

Se ha visto que el E₂ no participa en la retroalimentación positiva a LH (Wilson y Sharp 1976a; Furr y Smith 1975). Aunado ha ello, se ha encontrado que la ovulación no siempre es acompañada por el pico preovulatorio de E₂ (Lague *et al.* 1975). No obstante, se ha concluido que en gallinas ovariectomizadas el E₂ actúa como un sensibilizador hipotalámico para la retroalimentación positiva de P₄ a LH (Wilson y Sharp 1976).

La presencia de receptores a estradiol en las áreas preóptica y la eminencia media del hipotálamo, así como en la hipófisis anterior, fue propuesta por Kawashima *et al.* (1987). Adicionalmente, se encontró que las uniones máximas de E₂ en dichas áreas son mayores en gallinas en postura 11-8h y 21h preovulación (Kawashima *et al.* 1993). Más recientemente, Griffin *et al.* (2001) describieron la presencia de dos transcritos para RNAm de cER α en las mismas áreas hipotalámicas e hipofisarias. En las células de la granulosa y de la teca también se ha mostrado la presencia de receptores para E₂ por inmunohistoquímica, cuya concentración disminuye con la maduración folicular y es ausente en el F1 y el folículo postovulatorio (Yoshimura *et al.* 1995).

Estudios *in vitro* mostraron que el E₂ puede disminuir la secreción de P₄, basal e inducida por LH, por un efecto que puede considerarse sinérgico con T (Johnson *et al.* 1988). Adicionalmente, Lee y Bahr (1989, 1990) sugieren que este efecto es debido a que los estrógenos impiden la conversión de pregnenolona a P₄, por la inhibición competitiva de 3 β -HSD.

Por otro lado, el E₂ tiene acciones muy importantes desde el punto de vista reproductivo en otros órganos: en músculo oviductal promueve formación de receptores a P₄ (Toft y O'Malley 1972) y el desarrollo de la inervación galaninérgica (Ubuka *et al.* 2001). Así mismo, en el hígado promueve la secreción de la yema (Etches 1996; Walzem *et al.* 1999).

La T, al igual que E₂, presenta dos incrementos en sus concentraciones; el primero 14-12h preovulación (Wilson y Cunningham 1984), mientras que el segundo, y más significativo, ocurre 8-10 h antes de la ovulación (Etches y Cunningham 1977; Johnson y van Tienhoven 1980a).

La secreción principal de T ocurre por las células de la teca interna (Porter *et al.* 1989) y es inducida por LH (Robinson y Etches 1986; Robinson *et al.* 1988; Nakamura *et al.* 1991). Esta producción puede ser inhibida por la P₄ (Woolveridge y Peddie 1997).

Kawashima *et al.* (1989) mostraron que T presenta sitios de unión en hipotálamo e hipófisis. También se ha descrito la inmunolocalización de receptores para T utilizando un anticuerpo contra receptores humanos, en la granulosa y la teca de los pequeños folículos blancos, el F3 y el F1, pero no en el estroma ovárico. Las concentraciones de dichos receptores para T no presentan diferencias entre los folículos colectados 4 y 10h preovulación (Yoshimura *et al.* 1993).

A pesar de que la ovulación siempre es precedida por un pico de T su papel en este proceso no se ha logrado determinar (Wilson y Cunningham 1984; Etches 1996). Más aún, Wilson y Sharp (1976) mostraron que no T es necesaria como sensibilizador para la acción de P₄ en gallinas ovariectomizadas. Por otro lado, solamente es posible inducir la ovulación mediante la aplicación exógena de T cuando se utilizan dosis suprafisiológicas, por un efecto dosis dependiente que es considerado como un efecto farmacológico (Croze y Etches 1980, Johnson y van Tienhoven 1981). Así mismo, Croze y Etches (1980) comprobaron que T es el único andrógeno al que se le puede considerar biológicamente activo en gallinas. Sin embargo, Furr y Smith (1975) mostraron que la inmunización pasiva contra T 6-12h antes de la ovulación causaba un bloqueo de la misma. Adicionalmente, en un estudio realizado en gallos se demostró que células hipofisarias respondían liberando LH después de la incubación con T, efecto que no se observó con P₄ y E₂ (Kawashima *et al.* 1978). No obstante, en estudios *in vivo* Johnson y van Tienhoven (1981) mostraron que inyecciones intraventriculares de T fueron incapaces de causar la liberación de LH y la ovulación.

La figura 3 resume las acciones de las principales hormonas involucradas con el proceso ovulatorio de las gallinas.

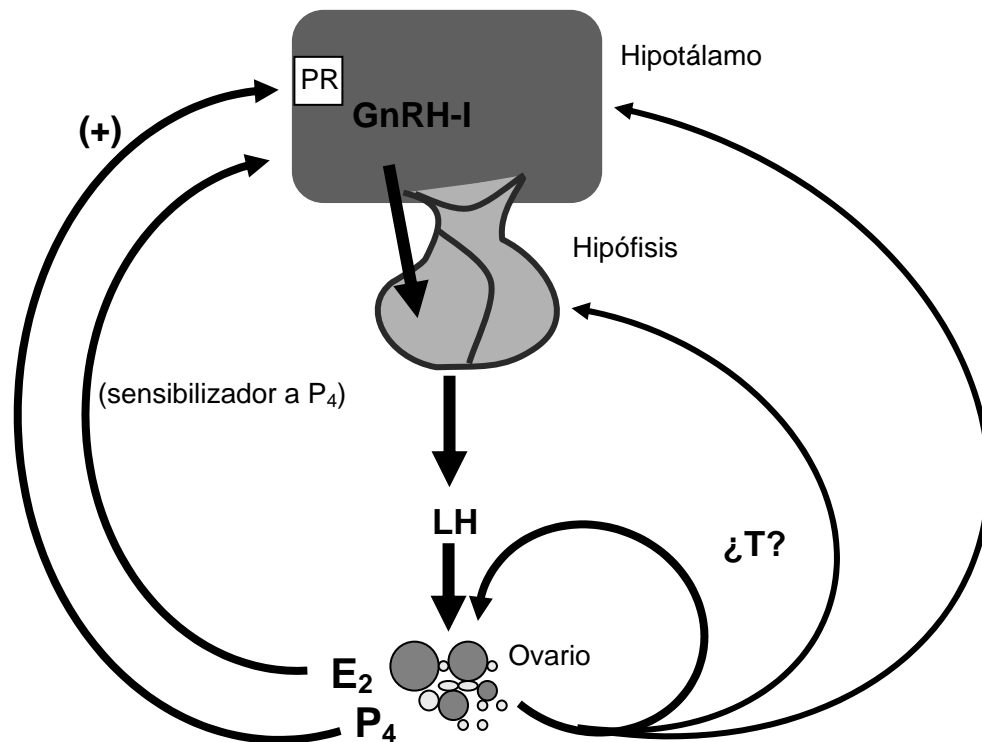


Figura 3: Resumen general de la acción hormonal en el proceso ovulatorio de las gallinas de postura. Se indica que la progesterona (P₄) estimula la liberación de la GnRH-I por el hipotálamo, para causar la liberación de LH. Entre la P₄ y la LH existe un mecanismo de retroalimentación positiva. El estradiol (E₂) se requiere como un sensibilizador hipotalámico para la acción de la P₄, al estimular la formación de receptores a progesterona. Mientras que la acción de la testosterona (T) no se ha establecido claramente sugiriéndose que podría ser en cualquiera de los componentes del eje hipotálamo-hipófisis-ovario.

Otras hormonas y factores que afectan la ovulación, la esteroidogénesis y el desarrollo folicular

Inhibina:

Inhibina es una hormona peptídica producida por los folículos una vez que entran a la categoría de jerárquicos. Su producción aumenta conforme progresa la maduración (F3<<F1) (Lovell *et al.* 1998; Johnson, 1996). No se observan cambios aparentes en las concentraciones de inhibina durante el ciclo ovulatorio (Johnson 1993; Vanmonfort *et al.* 1994), pero su producción es inhibida por la LH (Chen y Johnson 1997; Safi *et al.* 1998), y sus concentraciones muestran una correlación negativa con el porcentaje de postura (Wang y Johnson 1993).

Entre las múltiples acciones de la Inhibina se ha descrito que, por sí sola, interviene en el reclutamiento de los folículos amarillos a la jerarquía folicular (Safi *et al.* 1998; Lovell *et al.* 2001) y en la diferenciación celular (Safi *et al.* 1998). En las aves la acción de Inhibina como moduladora endocrina de FSH parece ser a largo plazo, ya que solo se observa una correlación negativa entre sus concentraciones y las de FSH, cuando se ha ocasionado la regresión o remoción de los folículos (Johnson 1993; Vanmonfort *et al.* 1994). Es más probable que inhibina actúe disminuyendo la sensibilidad de los folículos a la FSH (Wang y Johnson 1993).

Activina:

La activina es producida por las células de la teca (Davis *et al.* 2001). Entre sus acciones, regula la maduración y crecimiento folicular, al disminuir la expresión de RNAm para receptores de LH en las células de la granulosa (Davis *et al.* 2001).

Factor de crecimiento parecido a la insulina tipo I (IGF-I):

La producción del factor de crecimiento parecido a la insulina tipo I (IGF-I) es llevada a cabo principalmente por los folículos jerárquicos (Onagbesan *et al.* 1999). El IGF-I funciona como un factor paracrino, ya que es producido por las células de la teca y actúa en las de la granulosa, las cuales expresan receptores a IGF-I (Armstrong y Hogg 1996). La secreción de IGF-I es inducida por LH, GH y FSH, esta última hormona siempre y cuando interactúe con GH (Onagbesan *et al.* 1999).

La participación de IGF-I es regulando la diferenciación de las células de la granulosa y la sensibilidad de las mismas a FSH y LH. Se asume que de este modo, IGF-I asegura la ovulación de un solo folículo, manteniendo una *maduración folicular regulada* (Onagbesan *et al.* 1999a).

Por otro lado, se ha visto que IGF-I estimula la producción de P_4 por la granulosa y de androstenediona por la teca, mientras que inhibe la de E_2 (Onagbesan *et al.* 1999).

Factor de crecimiento parecido a la insulina tipo II (IGF-II):

El factor de crecimiento parecido a la insulina tipo II (IGF-II) es producido principalmente por las células de la teca de los folículos pequeños (Armstrong y Hogg 1996; Onagbesan *et al.* 1999). Debido a que IGF-II promueve la proliferación de la granulosa y evita la atresia folicular, su expresión es importante al momento de la selección hacia la jerarquía (Armstrong y Hogg 1996).

IGF-II incrementa la producción de androstenediona por la teca, mientras que inhibe la de E₂ (Onagbesan *et al.* 1999).

Factor de crecimiento epidérmico (EGF):

El factor de crecimiento epidérmico (EGF) es producido por la granulosa, principalmente de los folículos mayores (Volantine *et al.* 1998). También es producido por el disco germinal donde estimula la proliferación e inhibe la diferenciación de las células de la granulosa (Volantine *et al.* 1998). La granulosa expresa receptores a EGF, cuya concentración disminuye con la maduración folicular (Onagbesan y Peddie 1998). LH y FSH favorecen la formación de los receptores a EGF (Onagbesan y Peddie 1998). EGF tiene dos acciones principales. Primero, previene la diferenciación de las células de la granulosa al bloquear la acción del péptido intestinal vasoactivo y de FSH, regulando con ello la proliferación de la granulosa (aumenta el activador del plasminógeno) y la selección folicular (Johnson 1993; Hernández y Bahr 2003), por lo tanto inhibe la producción de P₄ (Johnson 1993 y 1996; Volantine *et al.* 1998). Segundo, EGF evita la apoptosis de las células de la granulosa (Volantine *et al.* 1998).

Factor de crecimiento transformante (TGF):

Existen el factor de crecimiento transformante (TGF) α y el β , ambos se producen por la teca y la granulosa de los folículos jerárquicos y su secreción aumentan según la maduración del folículo (Onagbesan *et al.* 1994). La acción de TGF es autocrina/paracrina, ya que la granulosa expresa receptores a EGF/TGF α , que se

incrementan por la maduración (Onagbesan *et al.* 1996). Se ha encontrado que el $TGF\alpha$ tiene actividad mitogénica, estimulando la producción de prostaglandinas, mientras que el $TGF\beta$ inhibe la producción de prostaglandinas actuando como un modulador de la acción de $TGF\alpha$ (Li *et al.* 1996). Adicionalmente, $TGF\alpha$ bloquea la producción de P_4 inducida por LH por las células de la granulosa, al inhibir la expresión del RNAm para $P450scc$ (Johnson 1990 y 1993).

Péptido intestinal vasoactivo (VIP):

El péptido intestinal vasoactivo (VIP) es producido y tiene sus acciones tanto a nivel del sistema nervioso central, como a nivel ovárico.

A nivel central, las terminaciones nerviosas de las células productoras de VIP se encuentran en la eminencia media (Sharp *et al.* 1984). VIP actúa estimulando directamente la hipófisis para inducir la liberación de prolactina, por ello su producción es muy importante durante la incubación (Sharp *et al.* 1984; Sharp *et al.* 1998). La liberación del VIP es estimulada por 5-hidroxitriptamina, así como por dopamina (Sharp *et al.* 1998). Esta última hormona ha mostrado también ser inhibitoria (Sharp *et al.* 1998).

A nivel ovárico VIP actúa parácrinamente, ya que es producido por la teca y su acción es en la granulosa (Johnson 1996). Se ha determinado la presencia de sus receptores en granulosa, los cuales incrementan su afinidad con la maduración del folículo (Kawashima 1995). Se le ha relacionado con el desarrollo folicular, ya que se ha visto que VIP es capaz de señalar el folículo que se va a seleccionar e inhibir la acción del activador del plasminógeno (Johnson 1996). VIP también se asocia con la esteroidogénesis, debido a que estimula la producción de P_4 en granulosa y de androstenodiona en teca (Johnson 1990).

Prolactina (PRL):

La prolactina (PRL) es una hormona producida en la hipófisis anterior por un grupo de células epiteliales glandulares conocidas como lactotopos. En el caso de las aves la regulación de la secreción de PRL se debe al control estimulador ejercido

por el VIP, esto constituye una diferencia con los mamíferos en los que la secreción de PRL ocurre cuando cesa la inhibición que ejerce dopamina sobre las células productoras de PRL (Sharp *et al.* 1998).

Las concentraciones de PRL son elevadas durante la incubación y la fotorrefractoriedad (Sharp *et al.* 1998). Durante estos periodos hay una correlación negativa entre las concentraciones de PRL y LH; junto con una expresión disminuida de RNAm para GnRH-I (Sharp *et al.* 1998). Adicionalmente, se ha establecido que cuando a las hembras que están incubando se les impide el acceso a sus nidos y se les retiran los huevos, las concentraciones plasmáticas de PRL descienden mientras que las de LH y E₂ se incrementan (El Halawani *et al.* 1980; Richard-Yris *et al.* 1998).

A nivel ovárico se ha determinado que existe una correlación negativa entre las concentraciones plasmáticas de PRL con E₂ y P₄ (Reddy *et al.* 2002). Aparentemente la acción sobre P₄ es porque PRL incrementa los niveles de la enzima HSD (Reddy *et al.* 2002).

Activador del plasminógeno (AP):

El activador del plasminógeno (AP) es un factor que se produce en las células de la granulosa (F6-8mm) por estímulo de EGF (Johnson 1993; Jackson *et al.* 1994). También se ha determinado producción de AP por las células de la teca, aunque en concentraciones muy pequeñas (Johnson 1990). El pico preovulatorio de LH suprime la actividad del AP (Jackson *et al.* 1994, Tischkau *et al.* 1996), al igual que T, 5 α -DHT y P₄ en las células de la granulosa (Johnson 1990). El AP actúa en la granulosa controlando su maduración y diferenciación (Johnson 1990). También, el AP es secretado por el disco germinal, donde además de ejercer las acciones mencionadas en la granulosa, promueve el crecimiento folicular. El estigma también produce AP, para promover la remodelación celular necesaria para la ovulación (Jackson *et al.* 1993).

CAPITULO 2

La inmunización contra testosterona bloquea el proceso ovulatorio en gallinas de postura sin afectar el desarrollo folicular.

Artículo publicado:

Animal Reproduction Science 86 (2005) 143–151

Testosterone immunization blocks the ovulatory process in laying hens without affecting ovarian follicular development

P.L. Rangel, A. Lassala, C.G. Gutierrez*

Departamento de Reproducción, Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad Nacional Autónoma de México, Av. Universidad 3000, México DF 04510, México

Received 16 March 2004; received in revised form 6 July 2004; accepted 15 July 2004

Reimpresión autorizada por Elsevier, referencia FCR/RangelUNAMBG7-06.



ELSEVIER

Animal Reproduction Science 86 (2005) 143–151

ANIMAL
REPRODUCTION
SCIENCE

www.elsevier.com/locate/anireprosci

Testosterone immunization blocks the ovulatory process in laying hens without affecting ovarian follicular development

P.L. Rangel, A. Lassala, C.G. Gutierrez*

Departamento de Reproducción, Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad Nacional Autónoma de México, Av. Universidad 3000, México DF 04510, Mexico

Received 16 March 2004; received in revised form 6 July 2004; accepted 15 July 2004

Abstract

The role of testosterone in the ovulatory process in hens has been largely neglected. The aim of the present study was to evaluate if testosterone plays an important role on the ovulatory process in laying hens. The effect of active and passive immunization against testosterone on ovarian follicular development and oviposition was studied. Egg laying percentage was evaluated in hens actively immunized against testosterone-BSA (T-AI; $n = 6$) or BSA (BSA-AI; $n = 6$). Oviposition was reduced as antibody titer increased in T-AI hens ($r = -0.67$; $P < 0.01$). Ovarian structures were assessed in three animals from each group. Follicles reached preovulatory size in both groups, nonetheless, in T-AI hens follicles at different stages of regression indicated that ovulation was blocked by treatment. In the remaining animals, preovulatory concentrations of progesterone and testosterone were determined. A preovulatory surge release of progesterone, preceded by a testosterone peak, was observed in the BSA-AI group ($P < 0.05$). In contrast, progesterone in T-AI animals remained at basal concentrations. Whereas, testosterone concentrations were significantly greater in T-AI as compared with BSA-AI animals ($P < 0.05$). Finally, to study the effect of passive immunization on oviposition, hens were passively immunized (PI) on four occasions, on alternate days with anti-T serum (T-PI; $n = 10$) or anti-BSA serum (BSA-PI; $n = 8$). During the 13-day period that preceded treatment, oviposition averaged 94.1%. Forty-eight hours after the first immunization, no egg was laid by 8 out of the 10 T-PI hens. During the 10 days following the first passive immunization, there was a reduction in the laying percentage that was significantly greater in T-PI hens (reduction of 52% in T-PI versus 29% in

* Corresponding author. Tel.: +52 55 56 22 58 60.

E-mail address: ggcarnos@servidor.unam.mx (C.G. Gutierrez).

P-BSA, $P < 0.01$). In summary, these studies show that testosterone immunization hampers egg-laying without affecting ovarian follicular development, suggesting that testosterone has an important role in the ovulatory process in laying hens.

© 2004 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Follicle; Hens; Immunization; Ovulation; Testosterone

1. Introduction

In laying hens, ovulation is induced by a single preovulatory surge of luteinizing hormone (LH) (Wilson and Sharp, 1973), which is restricted to a period of 8–10 h of the day (Wilson et al., 1983; Wilson and Cunningham, 1984; Etches, 1996). The pre-ovulatory surge of LH occurs approximately 6 h before ovulation (Etches and Cunningham, 1977), and is induced by an increase in progesterone (P_4) concentration (Etches and Cunningham, 1976; Williams and Sharp, 1978; Wilson and Cunningham, 1984; Etches, 1996). Treatment with P_4 at any time during the ovulatory cycle, except during the 4 h that precede ovulation, increases plasma LH concentrations (Wilson and Sharp, 1975). Furthermore, Wilson and Sharp (1976a) demonstrated a positive feedback effect of P_4 on both tonic and acute LH secretion, after pre-treatment with estradiol (E_2) and P_4 .

An increase in E_2 and testosterone (T) precedes the P_4 surge (Johnson and van Tienhoven, 1980b; Etches and Cheng, 1981; Wilson and Cunningham, 1984), but estradiol administration does not result in an LH increase during the ovulatory cycle (Wilson and Sharp, 1976b). However, in ovariectomized hens estradiol is necessary to prime the hypothalamus for P_4 action (Wilson and Sharp, 1976a). In contrast, despite early indications that T might be involved in the ovulatory process in hens (Furr and Smith, 1975), its specific role has not been determined (Wilson and Cunningham, 1984; Etches, 1996), for example T has failed to stimulate LH release in E_2 - P_4 primed ovariectomized hens when administered at physiological doses (Wilson and Sharp, 1976a). The purpose of the present work was to evaluate the role of T on the ovulatory mechanism in laying hens.

2. Materials and methods

2.1. Testosterone active immunization

Twelve Dalling hens (*Gallus domesticus*) in their second laying cycle (98 weeks old), and weighing between 1.4 and 2.2 kg, were housed in individual cages, exposed to a 14L:10D photoperiod (lights on at 4:00 am) and randomly divided into two groups. Testosterone actively immunized (T-AI; $n = 6$) hens were treated intramuscularly with 0.5 mg of T-BSA (testosterone3-(*O*-carboxy-methyl)oxime:BSA, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA). Control animals (BSA-AI; $n = 6$) were immunized against 0.5 mg of BSA (Sigma Chemical Co.). The immunogen was diluted in 0.5 ml of physiological saline solution (SS) and emulsified 1:1 (v:v) in Freund's incomplete adjuvant (Sigma Chemical Co.). Hens were immunized on four occasions. Intervals between immunizations were 4 weeks for the

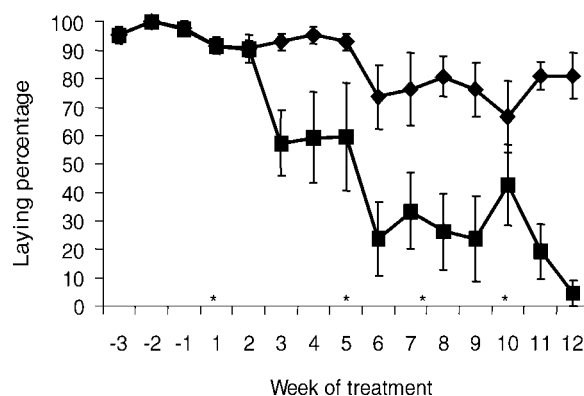


Fig. 1. Mean (\pm S.E.M.) weekly laying percentage in hens actively immunized against testosterone (■) or bovine serum albumin (◆). The (*) indicates when the immunization occurred.

first three and at 2-week intervals between the third and last immunizations (Fig. 1). Each hen received 1 ml of the emulsion, divided in five IM injections in the pectoral muscle. Oviposition was recorded daily. A blood sample was taken to measure antibody titers at each immunization.

Three animals from each group were slaughtered 2 weeks after the last immunization to record the ovarian structures. A blood sample was collected weekly, from the radial vein and serum was separated by centrifugation and stored at -20°C . Serum binding activity was assessed in a liquid phase RIA at a serum final dilution of 1:7000, using tritiated hormones (Amersham Life Science, Little Chalfont, Buckinghamshire, UK), as described by Jeffcoate (1981). Binding of serum antibodies against: testosterone, androstenedione, 5α -dihydrotestosterone, 17-hydroxyprogesterone, E_2 , P_4 and cortisol (Amersham Life Science) were evaluated using samples from the week 11 of treatment (1 week after the fourth immunization).

In the remaining six animals (T-AI; $n = 3$ and BSA-AI; $n = 3$), 5 days after the last immunization, blood samples were drawn every 2 h during an 18 h period, starting 4 h before the onset of darkness. A sterile Teflon 20 G \times 32 mm catheter (Becton Dickinson, Izcalli, Estado de México, México) with a luer-lock stopper (PRN stopper, Becton Dickinson) was introduced into the radial vein. In each sampling, 2.5 ml of blood were taken using 3 ml vacutainers with sodium heparin (Becton Dickinson), plasma was separated by centrifugation and aliquoted. The cellular package was resuspended in 2.5 ml of sterile saline solution with 0.5 mg/ml of gentamicin (Bruluart, Tultitlan, Estado de México, México), stored at 4°C , and reintroduced to the hen before the following sample was drawn, using a sampling protocol similar to that reported by Ruschkowski et al. (1993). Cannulae were kept patent by flushing 0.5 ml of heparinized saline solution (50 UI of sodium heparin per ml of SS, PISA, Guadalajara, Jalisco, México). Plasma concentrations of T and P_4 were measured by a solid phase RIA (Coat-a-Count, Diagnostic Products Corporation, Los Angeles, CA, USA). Sensitivity of the assays was 2 and 10 pg for T and P_4 , respectively. The intra-assay CV was 1.7% for T and 1.5% for P_4 . While validating the assay, protein interference was observed and was corrected when plasma samples were heat treated. This interference was

particularly problematic in testosterone-immunized hens where concentrations of testosterone were above the detection limit of the assay, indicating that it was also due to specific testosterone antibodies. Thus, samples were diluted 1:1 (v:v) with distilled water and heated at 60 °C in a water bath for 20 min, to denature the antibodies and steroid binding proteins contained in the serum (Lewis and Elder, 1985).

2.2. Testosterone passive immunization

Eighteen Dalling hens in their first production cycle (30 weeks old, weighing 1.4–2.2 kg) were used. Animals were caged individually, under a 14L:10D photoperiod schedule, and oviposition was registered daily. Hens were assigned to two groups after allowing an adaptation period of 1.5 weeks. Hens were passively immunized with 0.5 ml of antiserum into the radial vein against either T (T-PI; $n = 10$) or BSA (BSA-PI; $n = 8$) on 3 alternate days. One animal of the BSA-PI group died during treatment and data from this animal were excluded from the analysis. Antisera for testosterone and BSA were obtained from pooling serum of hens of the first experiment.

2.3. Statistical analyses

The effect of active immunization on the weekly laying percentage and testosterone and P_4 concentrations were analyzed by ANOVA for repeated measurements, in a model that included the effect of treatment, the animal nested within treatment, time and the interaction between time and treatment. The effect of treatment was tested using animal nested within treatment as an error term. The association between weekly laying percentage and antibody titer was evaluated by correlation analysis.

The effect of passive immunization on daily oviposition was analyzed by chi-square test. One animal of the BSA-PI died during treatment and was excluded from the analysis.

3. Results

3.1. Testosterone active immunization

The average weekly laying percentage before treatment was 95.3 ± 2.6 for T-AI and BSA-AI animals (Fig. 1). Two weeks after immunization, oviposition decreased significantly in T-AI hens (42.0 ± 4.5 ; $P < 0.05$) and remained below that observed for control hens throughout the study (Fig. 1). Furthermore, ovulation was completely blocked in three out of six T-AI hens from the week 8 of treatment. In contrast, the average oviposition in BSA-AI remained over 80.8% (± 1.2) throughout the study ($P > 0.05$).

There was an increase in the antibody titer after the second and third immunizations, showing a negative correlation with laying percentage ($r = -0.67$; $P < 0.05$). The sera binding activity to steroids is shown in Table 1. Sera from T-AI had greater binding to testosterone and 5α -dihydrotestosterone as compared with that of BSA-AI treated animals. Binding percentage to other steroids did not exceed 10% (Table 1). Sera from hens of BSA-AI group had negligible binding to the steroids tested ($< 0.4\%$).

Table 1

Binding percentages to testosterone, androstenedione, dihydrotestosterone (DHT), 17-OH-progesterone (17-OH-P4), estradiol, progesterone (P4) and cortisol in serum of hens actively immunized against testosterone (T-AI) or bovine serum albumin (BSA-AI)

Animal	Binding percentage (B/B0)						
	Testosterone	Androstenedione	DHT	17-OH-P4	Estradiol	P4	Cortisol
Hen 1 (T-AI)	10.4	0.7	6.6	0.0	0.0	0.1	0.0
Hen 2 (T-AI)	73.9	1.8	45.9	5.4	0.1	10.0	0.0
Hen 3 (T-AI)	39.2	0.1	29.8	0.0	0.0	3.2	0.0
Average T-AI	41.2	0.9	27.4	1.8	0.0	4.5	0.0
Hen 4 (BSA-AI)	0.2	0.1	0.3	0.0	0.0	0.0	0.0
Hen 5 (BSA-AI)	0.4	0.0	0.2	0.0	0.0	0.0	0.4
Hen 6 (BSA-AI)	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Average BSA-AI	0.2	0.0	0.2	0.0	0.0	0.0	0.1

Data were evaluated using samples from the week 11 of treatment.

Post-mortem examination revealed normal follicular development in both groups, with follicles reaching the preovulatory stage. Hens of the BSA-AI group also had ovulated eggs within the oviduct and ovulatory sites on the ovary. In contrast, hens in the T-immunized group did not have ovulatory sites and had yellow-yolky atretic ovarian follicles, suggesting that these were preovulatory non-ovulated follicles in different stages of atresia (Table 2).

A preovulatory surge of P₄ preceded by one of T was observed in control hens (Fig. 2A). In addition, a follicle was ovulated and an egg laid 2 days later. In contrast, in the T-AI group, T concentrations were greater (over 20-fold, $P < 0.05$) as compared with BSA-AI during all the sampling period, and a T surge was not observed ($P > 0.05$) (Fig. 2B). Basal P₄ concentrations did not differ between groups (T-AI, 0.30–0.59 ng/ml as compared with BSA-AI, 0.23–0.89 ng/ml; $P > 0.05$). In the T-AI hens the P₄ surge was, however, not observed (Fig. 2B; $P < 0.05$) and oviposition did not occur.

3.2. Testosterone passive immunization

Average egg laying percentage in the 13-day period preceding passive immunization was 94.1% ($P > 0.10$). Forty-eight hours after antiserum treatment oviposition ceased in 8

Table 2

Ovarian structures found during post-mortem examination of laying hens actively immunized against testosterone (T-AI) or bovine serum albumin (BSA-AI)

Animal	Ovulation sites	Eggs in oviduct	Yellow yolky follicles (>10mm)	Size of the F1 follicle (cm)	Atretic yellow yolky follicles
Hen 1 (T-AI)	1	Yes	5	3.5	3
Hen 2 (T-AI)	0	No	6	3.75	6
Hen 3 (T-AI)	0	No	5	3.5	3
Hen 4 (BSA-AI)	1	Yes	4	2.94	0
Hen 5 (BSA-AI)	3	Yes	5	3.5	0
Hen 6 (BSA-AI)	5	Yes	4	3.24	0

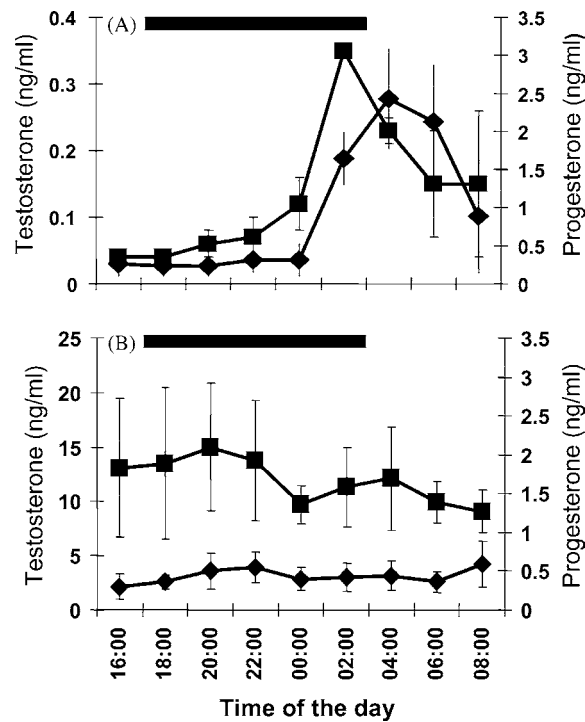


Fig. 2. Mean (\pm S.E.M.) of testosterone (■) and progesterone (◆) concentrations in hens actively immunized against bovine serum albumin (panel A, BSA-AI) or testosterone (panel B, T-AI). The period of darkness is indicated by the black bar.

of the 10 T-PI, whereas it only ceased in 1 out of the 7 hens of the BSA-PI group. In the 10 days that followed, laying percentage decreased in both groups. However, this decline was greater for hens of the T-PI group (52% in T-PI compared with 29% in BSA-PI; $P < 0.01$).

4. Discussion

The present study showed that T immunization inhibits ovulation in laying hens without affecting follicular development to the preovulatory stage. Weekly laying percentage decreased when animals were actively immunized against T and serum antibody titer was negatively correlated with weekly laying percentage. Similarly, passive immunization against T acutely blocked ovulation and reduced egg laying below the concentrations observed for control animals. Thus, these results indicate a role of T in the events that precede ovulation in hens.

The mechanism by which T is involved in ovulation is not straightforward. At physiological concentrations T does not seem to have an effect on the release of LH or ovulation in hens (Croze and Etches, 1980). An increase in T concentrations has, however, been shown to precede the preovulatory surge of P_4 (Johnson and van Tienhoven, 1980a; Wilson and

Cunningham, 1984). In the previous study, T concentrations in T-AI2 hens did not show a pre-ovulatory surge and were over 20-fold greater as compared with that of control animals. Nonetheless, circulating concentrations of free T must have been less in vivo as T was non-detectable in serum until after T antibodies had been denatured before hormone assay. Thus, it appears that an episodic release of T is necessary for the P₄ surge release to occur in hens.

The decline in P₄ concentrations could be due to a paracrine effect of T at the ovary altering steroid production within the follicle. Sasanami and Mori (1999) showed that T stimulated P₄ output by cultured granulosa cells in the presence or absence of LH via the protein kinase C second messenger system, and indirectly by increasing the sensitivity to LH. The present results together with the evidence presented above, therefore, support the existence of an intrafollicular system of steroid production control.

The effect of immunization on ovulation could also have been mediated at a central level. Hypothalamic concentration of P₄ receptors change during the ovulatory cycle in laying hens, reaching its maximum between 18 and 8 h before ovulation (Kawashima et al., 1979a). This interval coincides with the peak in plasma concentrations of T and estradiol (Johnson and van Tienhoven, 1980b; Wilson and Cunningham, 1984). In addition, in ovariectomized hens P₄ was unable to induce LH release unless it was preceded by estradiol-17 β (E₂) administration (Wilson and Sharp, 1976a). Indeed, E₂ (Kawashima et al., 1979a) and T (Kawashima et al., 1979b; Balthazart et al., 1980) increased the hypothalamic and pituitary cytoplasmic concentration of P₄ receptor in hens. These results suggest that this effect was mediated by E₂ or T aromatisation to E₂ within the brain, because four times smaller doses of estradiol caused a greater increase in P₄ receptor and the non-aromatisable androgen 5 α -dihydrotestosterone failed to increase P₄ receptor concentrations (Balthazart et al., 1980). Hence, E₂ and T (through its aromatisation to E₂) seem to prime the hypothalamus for the stimulating action of P₄ in laying birds.

Despite the lack of ovulation in T immunized hens, follicular development progressed to the ovulatory stage (above 30 mm, Table 2) and the presence of regressing pre-ovulatory follicles was observed. Thus, T immunization did not affect gonadotropin support to developing follicles. The, atresia in large yellow follicles is an interesting result because it does not occur normally (Gilbert et al., 1983; Johnson, 1996). Atresia of large yellow follicles has, however, been artificially induced following administration of sub-ovulatory doses of LH (Fraps and Dury, 1942). These data indicate, therefore, that testosterone immunization could affect the ovulatory gonadotropin surge.

Testosterone immunization produced enhanced binding of T and 5 α -dihydrotestosterone. Binding of non-androgen steroids was minimal. In hens of the BSA-PI group, a reduction in egg laying was observed. It was, however, not statistically significant and most likely caused by animal handling and immunization stress. In contrast, both passive and active immunization against testosterone provoked a reduction in egg production. A disruption in ovulation in hens caused by a passive immunization against testosterone agrees with a previous report from Furr and Smith (1975). While passive immunization against E₂ does not delay or block ovulation (Furr and Smith, 1975), P₄ immunization has yielded conflicting results. Furr and Smith (1975) observed a delay in and ovulation blockage after passive immunization against P₄. In contrast, Montes et al. (1994) immunized hens with P₄-BSA monthly for a whole year without inhibiting oviposition. Thus, we do not believe that the

results observed in the present study are due to the effect of antiserum against any other steroid than T.

In conclusion, passive and active immunizations against T inhibit ovulation without affecting follicular development in hens. The present study demonstrates an important role of T in the ovulatory process in laying hens. Further studies are needed to determine the specific action of T at hypothalamus or ovary that induce this inhibition of ovulation.

Acknowledgements

The authors wish to thank Mr. R. Chavira, Mrs. C. Murcia and Ms. S. Rojas for their help in hormonal assays; and Dr. E. Avila and Dr. E. Sánchez for their support with the animal care. This work was supported by PAPIIT grant IN206803.

References

- Balthazart, J., Blaustein, J.D., Cheng, M.F., Feder, H.H., 1980. Hormones modulate the concentration of cytoplasmic progesterone receptors in the brain of male ring doves (*Streptopelia risoria*). *J. Endocrinol.* 86, 251–261.
- Croze, F., Etches, R.J., 1980. The physiological significance of androgen-induced ovulation in the hen. *J. Endocrinol.* 84, 163–171.
- Etches, R.J., 1996. *Reproduction in Poultry*. CAB International, Cambridge, UK.
- Etches, R.J., Cheng, K.W., 1981. Changes in the plasma concentrations of luteinizing hormone, progesterone, oestradiol and testosterone and in the binding of follicle-stimulating hormone to theca of follicles during the ovulatory cycle of the hen (*Gallus domesticus*). *J. Endocrinol.* 91, 11–22.
- Etches, R.J., Cunningham, F.J., 1976. The interrelationship between progesterone and luteinizing hormone during the ovulatory cycle of the hen (*Gallus domesticus*). *J. Endocrinol.* 71, 51–58.
- Etches, R.J., Cunningham, F.J., 1977. The plasma concentrations of testosterone and LH during the ovulatory cycle of the hen (*Gallus domesticus*). *Acta Endocrinol.* 84, 357–366.
- Fraps, R.M., Dury, A., 1942. The occurrence of regression in ovarian follicles of the hen following administration of a luteinizing extract. *Anat. Rec.* 84, 521–522.
- Furr, B.J., Smith, G.K., 1975. Effect of antisera against gonadal steroids on ovulation in the hen *Gallus domesticus*. *J. Endocrinol.* 66, 303–304.
- Gilbert, A.B., Perry, M.M., Waddington, D., Hardie, M.A., 1983. Role of atresia in establishing the follicular hierarchy in the ovary of the domestic hen (*Gallus domesticus*). *J. Reprod. Fertil.* 69, 221–227.
- Jeffcoate, S.L., 1981. *Efficiency and Effectiveness in the Endocrine Laboratory*. Academic Press, London.
- Johnson, A.L., 1996. The avian ovarian hierarchy: a balance between follicle differentiation and atresia. *Poult. Avian Biol. Rev.* 7, 99–110.
- Johnson, A.L., van Tienhoven, A., 1980a. Hypothalamo-hypophyseal sensitivity to hormones in the hen. I. Plasma concentrations of LH, progesterone, and testosterone in response to central injections of progesterone and R5020. *Biol. Reprod.* 23, 910–917.
- Johnson, A.L., van Tienhoven, A., 1980b. Plasma concentrations of six steroids and LH during the ovulatory cycle of the hen, *Gallus domesticus*. *Biol. Reprod.* 23, 386–393.
- Kawashima, M., Kamiyoshi, M., Tanaka, K., 1979a. Cytoplasmic progesterone receptor concentrations in the hen hypothalamus and pituitary: difference between laying and nonlaying hens and changes during the ovulatory cycle. *Biol. Reprod.* 20, 581–585.
- Kawashima, M., Kamiyoshi, M., Tanaka, K., 1979b. Effects of progesterone, estradiol and testosterone on cytoplasmic progesterone receptor concentrations in the hen hypothalamus and pituitary. *Biol. Reprod.* 21, 639–646.
- Lewis, J.G., Elder, P.A., 1985. An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for plasma cortisol. *J. Steroid Biochem.* 22, 673–676.

- Montes, P., Murcia, M., Zarco, Q., 1994. Producción de anticuerpos antiprogesterona a partir de yema de huevo de gallinas y de suero sanguíneo de conejos, para ser utilizados en radioinmunoanálisis. *Vet. Mex.* 25, 117–125.
- Ruschkowski, S.R., Robinson, F.E., Cheng, K.M., Hart, L.E., 1993. Comparison of two multiple blood sampling regimens using an indwelling vascular access device for investigations of the hen's ovulatory cycle and calcium metabolism. *Poultry Sci.* 72, 172–184.
- Sasanami, T., Mori, M., 1999. Effects of oestradiol-17 β and testosterone on progesterone production in the cultured granulosa cells of Japanese quail. *Brit. Poult. Sci.* 40, 536–540.
- Williams, J.B., Sharp, P.J., 1978. Control of the preovulatory surge of luteinizing hormone in the hen (*Gallus domesticus*): the role of progesterone and androgens. *J. Endocrinol.* 77, 57–65.
- Wilson, S.C., Cunningham, F.J., 1984. Endocrine control of the ovulation cycle. In: Cunningham, F.J., Lake, P.E., Hewitt, D. (Eds.), *Reproductive Biology of Poultry*. British Poultry Science Ltd., Cambridge, pp. 29–49.
- Wilson, S.C., Sharp, P.J., 1973. Variations in plasma LH during the ovulatory cycle of the hen, *Gallus domesticus*. *J. Reprod. Fertil.* 35, 561–564.
- Wilson, S.C., Sharp, P.J., 1975. Changes in plasma concentrations of LH after injection of progesterone at various times during the ovulatory cycle of the domestic hen (*Gallus domesticus*). *J. Endocrinol.* 67, 59–70.
- Wilson, S.C., Sharp, P.J., 1976a. Induction of luteinizing hormone release by gonadal steroids in the ovariectomized domestic hen. *J. Endocrinol.* 71, 87–98.
- Wilson, S.C., Sharp, P.J., 1976b. Effects of androgens, oestrogens and deoxycorticosterone acetate on plasma concentrations of luteinizing hormone in laying hens. *J. Endocrinol.* 69, 93–102.
- Wilson, S.C., Jennings, R.C., Cunningham, F.J., 1983. An investigation of diurnal and cyclic changes in the secretion of luteinizing hormone in the domestic hen. *J. Endocrinol.* 98, 137–145.

CAPITULO 3

El uso de un antagonista de testosterona (Flutamida) bloquea la ovulación y los picos preovulatorios de progesterona, LH y estradiol en gallinas de postura.

Artículo publicado:

Reproduction (2006) 131 1109–1114

REPRODUCTION RESEARCH

Testosterone antagonist (flutamide) blocks ovulation and preovulatory surges of progesterone, luteinizing hormone and oestradiol in laying hens

P L Rangel¹, P J Sharp² and C G Gutierrez¹

¹Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, Cd. Universitaria,

04510 Mexico and ²Roslin Institute (Edinburgh), Roslin, Midlothian EH25 9PS, UK

Correspondence should be addressed to C G Gutierrez; Email: gccarlos@servidor.unam.mx

© Society for Reproduction and Fertility (2006), Reimpresión autorizada.

Testosterone antagonist (flutamide) blocks ovulation and preovulatory surges of progesterone, luteinizing hormone and oestradiol in laying hens

P L Rangel¹, P J Sharp² and C G Gutierrez¹

¹Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, Cd. Universitaria, 04510 Mexico and ²Roslin Institute (Edinburgh), Roslin, Midlothian EH25 9PS, UK

Correspondence should be addressed to C G Gutierrez; Email: ggcarlos@servidor.unam.mx

Abstract

The preovulatory release of luteinizing hormone (LH) in the domestic hen occurs after the initiation of a preovulatory surge of testosterone. The objective of this study was to determine whether this testosterone surge has functional significance in the endocrine control of ovulation. Groups of laying hens ($n=10-22$) were treated with the androgen receptor antagonist, flutamide, at 8 h intervals for 24 h at doses of 0, 31.25, 62.5, 125 and 250 mg. All doses reduced egg laying ($P<0.001$), with the highest dose being the most effective. In a second study, laying hens ($n=9$) were treated with 250 mg flutamide at 8 h intervals for 24 h with a control group being given placebo ($n=10$). Blood samples were taken for hormone measurements at 2 h intervals for 18 h starting 4 h before the onset of darkness. The percentage of hens laying per day did not differ between groups before treatment (control, 88% vs flutamide, 86%). Ovulation was blocked in all hens treated with flutamide within 2 days while the control hens continued to lay at the pretreatment rate (80%). Preovulatory surges of plasma testosterone, progesterone, oestradiol and LH were observed in control hens but with the exception of testosterone, flutamide treatment blocked the progesterone, oestradiol and LH surges. LH concentrations declined progressively with time in the flutamide-treated hens. It is concluded that inhibition of testosterone action blocks egg laying and the preovulatory surges of progesterone, luteinizing hormone and oestradiol demonstrating a key role for the preovulatory release of testosterone in the endocrine control of ovulation in the domestic hen.

Reproduction (2006) **131** 1109–1114

Introduction

In the domestic hen, an increase in plasma progesterone, originating from the mature and maturing preovulatory ovarian follicles induces a preovulatory release of luteinizing hormone (LH) (Wilson & Sharp 1975a, Etches & Cunningham 1976, Wilson & Cunningham 1984, Etches 1996), by stimulating the release of gonadotrophin-releasing hormone (Fraser & Sharp 1978). The increase in plasma progesterone and LH 3–6 h before ovulation is preceded by increased plasma testosterone and plasma oestradiol (Johnson & van Tienhoven 1980a, Etches & Cheng 1981). Oestradiol does not participate directly in the positive feedback control of LH release (Furr & Smith 1975, Wilson & Sharp 1976a), but it is necessary to prime the hypothalamus to allow the positive feedback action of progesterone (Wilson & Sharp 1976b). A role for the preovulatory release of testosterone in the ovulatory process is suggested by the finding that injection of testosterone in laying hens with mature preovulatory follicles induces ovulation (Fraps 1955,

Croze & Etches 1980) and a preovulatory-like release of LH (Wilson & Sharp 1976a), while blockage of testosterone action by passive immunization (Furr & Smith 1975, Rangel *et al.* 2005) or active immunization against testosterone (Rangel *et al.* 2005) blocks ovulation. Further, active immunization against testosterone induces atresia of preovulatory yellow yolky follicles, but does not prevent their development (Rangel *et al.* 2005), while chronic treatment with the steroidal androgen receptor antagonist, cyproterone acetate, blocks ovulation and induces ovarian regression (Luck 1982). Fraps (1955) found that, while injection of hens with mature preovulatory follicles with progesterone induced ovulation within 8 h, injection with testosterone induced ovulation after more than 9 h, and suggested that testosterone must first be converted to an “active substance” before ovulation could be induced. Croze and Etches (1980) found that ovulation could only be induced using doses of testosterone which produced unphysiologically high plasma concentrations, and

suggested that the preovulatory release of testosterone has "a preparatory or priming action on the hypothalamo-pituitary-ovarian system which facilitates the preovulatory release of LH". Our hypothesis is that blocking the action of the preovulatory surge of testosterone, with its specific antagonist flutamide (a non-steroidal androgen receptor antagonist; Mainwaring *et al.* 1987), will halt the predicted oviposition and the preovulatory surges of plasma testosterone, progesterone, oestradiol and LH in the laying hen. This study will increase our understanding of the functional significance of the preovulatory surge of testosterone. In the chicken, flutamide is known to be biologically active since administration *in ovo* changes sexual dimorphism in body weight and muscle characteristics of embryos (Henry & Burke 1999) and post-hatching chicks (Burke 1996).

Materials and Methods

Experimental animals

Eighteen-month-old laying hens (*Gallus domesticus*, Hi-Line, supplied by Hi-Line México) beginning the second laying year were housed in individual cages with water and food *ad libitum*, under a 16 h light:8 h dark schedule (light on at 04 00 h) and ovipositions were recorded daily.

Experimental design

Experiment one

A dose-response study was carried out to determine whether flutamide (Flubest, BEST Laboratories, México D.F.) suppresses ovulation in laying hens. Hens were assigned to five groups ($n=10-22$) and received flutamide orally at doses of 0, 31.25, 62.5, 125 or 250 mg, three times daily at 07 00, 15 00 and 23 00 h. Pills of flutamide were administered orally. The effect of flutamide on ovulation was determined by the occurrence or absence of oviposition 2 days after the beginning of the treatment.

Experiment two

The second experiment determined the effect of the dose of flutamide found in the first experiment to inhibit oviposition on the preovulatory surges of testosterone, oestradiol, progesterone and LH. Nine laying hens (flutamide-treated group) received an oral dose of 250 mg of flutamide every 8 h for 24 h and the control group ($n=10$) was fed a placebo. Blood samples were taken from each hen through a teflon 20G×32 mm sterile catheter (Becton Dickinson, Izcalli, Estado de México, México) inserted into a radial vein. The catheters were kept patent by flushing with 0.5 ml saline solution containing heparin (50 UI/ml, PISA, Guadalajara, Jalisco, Mexico) following the removal of a blood sample. The hens were bled every 2 h for 18 h, starting 4 h before the onset of darkness. In each occasion 2.5 ml

of blood was taken, using 3 ml vacutainers containing 45 IU of sodium heparin. After centrifugation plasma was collected and the blood cells were resuspended in 2.5 ml of sterile physiological saline solution with 0.5 mg/ml of gentamicin (Bruhuart, Tultitlan, Estado de Mexico, Mexico). The blood cells were stored at 4 °C, and returned to the hens before the next blood sample was taken.

Radioimmunoassays

Testosterone, progesterone and oestradiol were measured by RIA (Coat-a-Count, Diagnostic Products Corporation, Los Angeles, CA, USA). The sensitivities of the assays were 0.04 ng, 0.01 ng and 2.5 pg for testosterone, progesterone and oestradiol respectively. The intra-assay coefficients of variations were 2.5%, 1.2% and 2.6% for the testosterone, progesterone and oestradiol assays respectively. LH was measured as described by Sharp *et al.* (1987) with a sensitivity of 0.036 ± 0.09 ng/ml and an intra-assay CV of 7.6%. All samples were measured in a single assay for each hormone.

Statistical analyses

The effect of different doses of flutamide on the proportion of hens laying an egg 2 days after treatment was analysed by Fisher's exact test.

A testosterone surge was defined as an increase in testosterone concentrations two standard deviations above the mean concentration of the preceding 4 h. Hormone concentrations data were standardised to the beginning of the testosterone surge (time 0). The surge of progesterone, oestradiol and LH was defined as for testosterone, compared against the mean concentration of time 0 and -2 . Data were analysed by analysis of variance for repeated measurements, after logarithmic (natural log of testosterone, progesterone and LH) or square root (oestradiol) transformation of the data to correct for heterogeneity of the variance. Independent variables were the treatment, the hen nested within treatment, time and the interaction between time and treatment. Differences between treatments were analysed using the hen nested within treatment as an error term. Oviposition was evaluated by a Chi-square test, considering as the pretreatment period from 10 days before to 1 day after treatment. The post treatment period corresponds to the second day after treatment. Two out of ten control hens did not ovulate and were excluded from the hormonal analysis.

Results

Experiment one

Flutamide caused a reduction in egg laying at all doses compared with the control group ($\chi^2 = 21.9$; $P < 0.001$

(Table 1)). The treatment with the highest dose of flutamide (250 mg) resulted in the greatest reduction in egg laying and was therefore used for experiment 2.

Experiment two

The rate of egg laying in the 12 day period that preceded treatment was 88% and 86% for control and flutamide groups respectively ($P > 0.05$). Two days after treatment, all nine flutamide-treated hens failed to lay eggs while eight of the ten control hens laid (80%).

Changes in concentration of plasma hormones were aligned in relation to the time at which plasma testosterone concentrations began to increase, designated time zero (Fig. 1). Before this time concentrations of plasma testosterone, progesterone, oestradiol and LH concentrations did not differ ($P > 0.05$) between the flutamide-treated and control groups (Fig. 1).

The eight control hens that ovulated had simultaneous surges of plasma testosterone, progesterone, oestradiol and LH (Fig. 1; B,C,D) while the two control hens that did not ovulate did not have these surges (data not shown). In the flutamide-treated hens, the testosterone surge occurred in all animals, and it did not differ ($P > 0.05$) from that observed in the eight control hens which ovulated (Fig. 1; A). In contrast, progesterone, oestradiol and LH preovulatory surges did not occur in the flutamide-treated hens (Fig. 1B,C,D). Furthermore, in flutamide-treated hens basal concentrations of progesterone (Fig. 1, B) and oestradiol (Fig. 1, C) did not change with time ($P > 0.05$), whilst LH concentrations were significantly lower after hour 0 ($P < 0.05$) (Fig. 1; D).

Discussion

This study demonstrates that in the domestic hen acute blockage of testosterone action during the ovulatory cycle, by the inhibition of its specific receptor with flutamide, blocks egg laying and the associated preovulatory surges of progesterone, oestradiol and LH. It therefore appears that flutamide treatment may block ovulation by preventing the preovulatory surges of progesterone and oestradiol. This conclusion is consistent with the finding that inhibition of testosterone action by passive or active immunisation against testosterone

prevents oviposition in laying hens (Furr & Smith 1975, Rangel *et al.* 2005).

Earlier studies suggested that testosterone must first be converted to an "active substance" before it can induce ovulation (Fraps 1955) or act to prime the hypothalamo-pituitary-ovarian system to facilitate the preovulatory release of LH (Croze & Etches 1980). The possibility that testosterone must be first converted to an "active substance" to exert a direct stimulatory effect on LH release is unlikely since all evidence points to progesterone being the principal steroid directly inducing the preovulatory release of LH (Wilson & Sharp 1975a, 1976a, Johnson & van Tienhoven 1980b) and progesterone is not a metabolite of testosterone (Norman & Litwack 1997). The possibility that testosterone primes the hypothalamo-pituitary-ovarian system to facilitate the preovulatory release of LH therefore merits closer analysis. A combination of oestrogen and progesterone treatment primes the hypothalamo-pituitary system of the ovariectomised hen to make it responsive to the stimulatory action of progesterone on LH release (Wilson & Sharp 1976b). It has not been established whether testosterone might mimic the priming effect of oestrogen. However, it seems unlikely that the preovulatory increase in plasma testosterone is solely responsible for priming the hypothalamo-pituitary system for the stimulatory action of progesterone on LH release since the base-line plasma concentrations of oestrogen in the flutamide-treated hens were not depressed and should have been adequate to exert a priming effect on the hypothalamo-pituitary system (Fig. 1C). It is therefore possible that the preovulatory peak of testosterone may act to prime the ovary to facilitate the preovulatory release of progesterone.

The principal ovarian source of progesterone for the preovulatory surge is the granulosa cell layer of the mature preovulatory follicle, with subsidiary contributions from the granulosa layer of the next most mature preovulatory follicle (Bahr *et al.* 1983). These granulosa cells are targets for testosterone since they contain nuclear androgen receptors (Yoshimura *et al.* 1993) and when granulosa cells are cultured with testosterone for 48 h basal progesterone production is increased (Phillips *et al.* 1985). Sasanami & Mori (1999) confirmed this observation using Japanese quail granulosa cells and further demonstrated that incubation of granulosa cells

Table 1 Percentage of hens laying eggs 48 h of beginning treatment with a testosterone antagonist (flutamide) at different doses, three times daily for one day.

Flutamide dose (three times per day)	Animals per group	Percentage of animals laying an egg 2 days after treatment
0 mg	10	90%
31.25 mg	16	68.8%
62.5 mg	16	31.3%
125 mg	12	41.7%
250 mg	22	13.6%

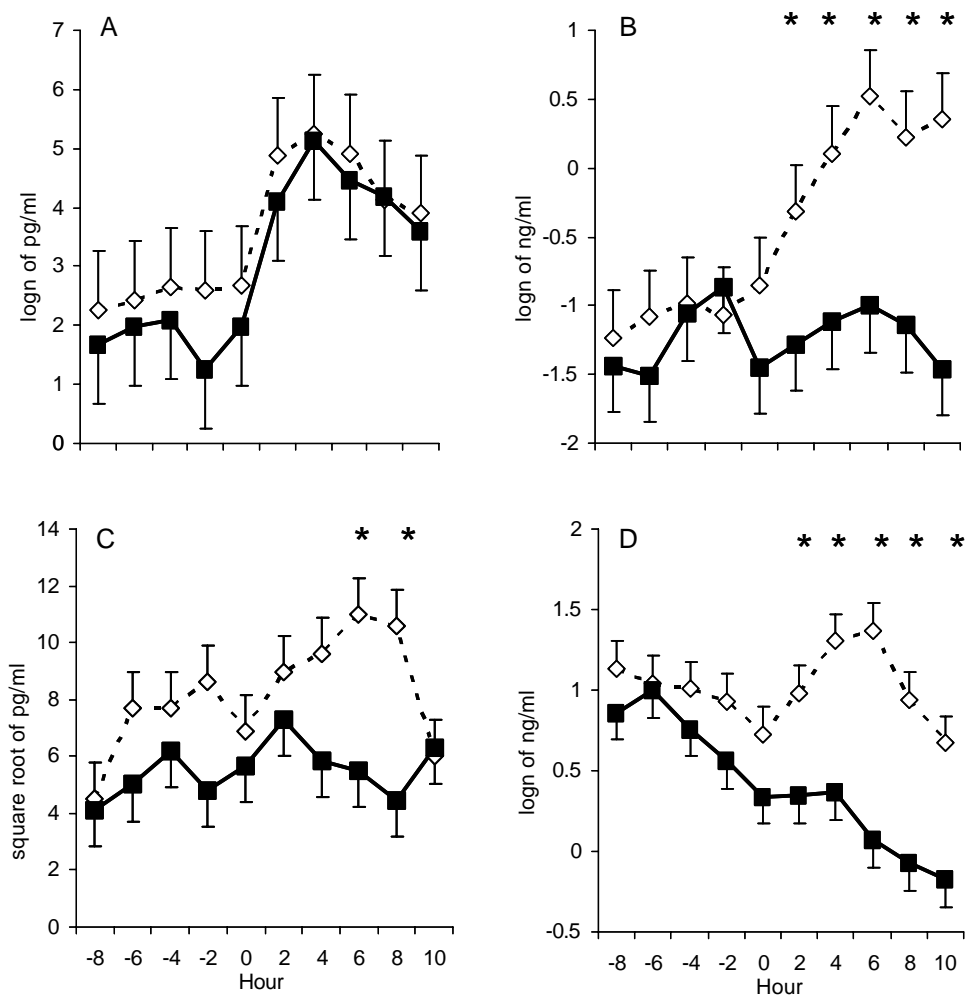


Figure 1 Testosterone (A), progesterone (B), oestradiol (C) and LH (D) concentrations in laying hens treated with 250 mg of flutamide (—■—), three times daily for one day, and in control hens (- -◇- -). Time 0 corresponds to the start of the testosterone peak. Values are least square means (\pm S.E.M.). Differences between treatments are indicated by an asterisk ($P < 0.05$).

for 66 h with testosterone enhances LH-stimulated progesterone production. This chronic stimulatory action of testosterone contrasts with studies showing that progesterone production from granulosa cells taken from F1 follicles 1.5–3.5 h after ovulation and before they are capable of ovulation is inhibited by treatment with testosterone or oestradiol (Johnson *et al.* 1988, Lee & Bahr 1989, 1990). This inhibitory effect of testosterone is thought to be part of the mechanism controlling follicular maturation which is characterised by a progressive decrease in androgens and oestrogen in the thecal layer (Bahr *et al.* 1983). In non-mature preovulatory follicles these steroids are thought to diffuse from the theca into the granulosa layer to inhibit P450 cholesterol side chain cleavage and 3β hydroxysteroid dehydrogenase to inhibit the synthesis of progesterone (Lee & Bahr 1990). As a preovulatory follicle matures, concentrations of testosterone and oestrogen in the thecal layer decrease and consequently their inhibitory effects on progesterone

synthesis in the granulosa cells decrease, allowing granulosa cell progesterone production to increase in preparation for ovulation. The inhibitory action of testosterone on granulosa cell progesterone production can be reconciled with its stimulatory actions if the response of granulosa cells to testosterone is related to their developmental stage. Granulosa cells from follicles which are capable of ovulation, in contrast to those from follicles which are not capable of ovulation, may respond to testosterone by increasing basal progesterone secretion and responsiveness to the stimulatory action of LH on progesterone production. It therefore seems plausible as suggested by Croze and Etches (1980) that the preovulatory increase in plasma testosterone facilitates the preovulatory release of LH by priming granulosa cells in the maturing preovulatory follicle to increase baseline progesterone secretion and responsiveness to LH. Similarly, *in vitro* studies with rat granulosa cells also suggest an androgen receptor-mediated stimulation of

progesterone production (Hillier *et al.* 1977), while Welsh *et al.* (1982) showed that androgens facilitate progesterone biosynthesis induced by follicle-stimulating hormone (FSH) by enhancing the action of the 3 β -HSD enzyme. Furthermore, Schomberg *et al.* (1978) demonstrated that implants of flutamide in pig ovarian interstitium decreases progesterone secretion by isolated granulosa cells *in vitro*. These observations show that in mammals testosterone plays a stimulatory role in progesterone production by granulosa cells, and the present findings in the chicken are consistent with this mechanism.

The absence of a preovulatory increase in LH in the flutamide-treated hens may be a consequence of the blockage of a 'priming' effect on of the preovulatory increase in testosterone on the granulosa cells of the largest preovulatory follicle, preventing an increase in responsiveness to the ability of LH to stimulate progesterone production. The absence of an increase in progesterone release would in turn result in the failure of the development of the positive feedback action of progesterone on LH release, and the generation of a preovulatory LH surge. The absence of a preovulatory LH surge may have removed a stimulus for oestrogen production (Robinson & Etches 1986) and account for the absence of a preovulatory increase in plasma oestrogen in the flutamide-treated hens.

The increase in plasma testosterone seen in the flutamide-treated hens in the absence of a preovulatory-like release of LH release may be a consequence of the failure of testosterone produced by the thecal cells in the maturing follicle to inhibit progesterone synthesis in the granulosa cells, resulting in an increased substrate for further testosterone synthesis. It is suggested that the initial increase in plasma testosterone preceding a preovulatory release of LH may occur at the developmental stage of the preovulatory follicle when the decreasing testosterone produced by the theca ceases to inhibit granulosa progesterone synthesis resulting in a transitory increase in substrate for granulosa testosterone production. This increase in testosterone production may then 'prime' the granulosa cells making them more responsive to LH to initiate the preovulatory release of LH. A transient increase in plasma testosterone seen before the sustained increase in preovulatory testosterone (Williams & Sharp 1978) is consistent with this view.

The progressive decrease in plasma LH seen in the flutamide-treated hens may be a consequence of a stress response that is obscured in hens by the preovulatory increase in plasma LH. This conclusion is consistent with the finding that plasma LH concentrations tend to fall in chickens in which blood samples are removed frequently through indwelling brachial cannulae (Wilson & Sharp 1975b).

To our knowledge, the pharmacology of flutamide in avian species has not been determined. In humans, chronic administration of flutamide can cause liver

abnormalities (Chabner *et al.* 2003). Nonetheless, we assume that the effects on egg laying and hormone profiles observed in these studies were due to the direct action of flutamide on androgen receptors. The former, is based on the fact that we used an acute treatment limited to the period of time where the final maturation and ovulation of the F1 will occur (Etches 1990), thus reducing the possible side effects of flutamide on other endocrine or metabolic pathways. Finally, animals resume egg laying a few days after treatment and continue to lay eggs until the end of the laying period, indicating that the liver continues to function normally.

In conclusion, testosterone antagonist (flutamide) blocks ovulation and the preovulatory surges of progesterone, LH and oestradiol in laying hens, demonstrating a key role for testosterone in the ovulatory process in hens.

Acknowledgements

This work was supported by the International Foundation for Science (grantee B-3648-1) and by Papiit, UNAM. Rangel PL was sponsored by a Conacyt student grant.

The authors wish to thank C Murcia and S Rojas for their help in hormonal assays; A Lassala, A Rodríguez, C García and E Sánchez for their help during the animal handling and sampling period; Dr G Martín for his help in the writing process.

References

- Bahr JM, Wang S-C, Huang MY & Calvo FO 1983 Steroid concentrations in isolated theca and granulosa layers of preovulatory follicles during the ovulatory cycle of the domestic hen. *Biology of Reproduction* **29** 326–334.
- Burke WH 1996 Effects of an *in ovo* injections of an anti-androgen on embryonic and posthatching growth of broiler chicks. *Poultry Science* **75** 648–655.
- Chabner BA, Ryan DP, Paz-Ares L, García-Carbonero R & Calabresi P 2003 Farmacos antineoplásicos. In *Goodman & Gilman. Las bases farmacológicas de la terapéutica* Vol II, pp 1405–1476. Eds Hardman and Limbird, Editor Consultor Goodman Gilman. México, McGraw Hill.
- Croze F & Etches RJ 1980 The physiological significance of androgen-induced ovulation in the hen. *Journal of Endocrinology* **84** 163–171.
- Etches RJ 1990 The ovulatory cycle of the hen. *Critical Reviews in Poultry Biology* **2** 293–319.
- Etches RJ 1996 The ovary. In *Reproduction in Poultry*, pp 125–166. Ed. RJ Etches. Cambridge: Cab International.
- Etches RJ & Cheng KW 1981 Changes in plasma concentrations of luteinizing hormone, progesterone, oestradiol and testosterone and in the binding of follicle stimulating hormone to the theca of follicles during the ovulation cycle of the hen (*Gallus domesticus*). *Journal of Endocrinology* **91** 11–22.
- Etches RJ & Cunningham FJ 1976 The interrelationship between progesterone and luteinizing hormone during the ovulatory cycle of the hen (*Gallus domesticus*). *Journal of Endocrinology* **71** 51–58.
- Fraps RM 1955 Egg production and fertility in poultry. In *Progress in the Physiology of Farm Animals* Vol II, pp 671–740. Ed. J Hammond. London: Butterworths.
- Fraser HM & Sharp PJ 1978 Prevention of positive feedback in the hen by antibodies to luteinizing hormone releasing hormone. *Journal of Endocrinology* **76** 181–182.

- Furr BJ & Smith GK** 1975 Effect of antisera against gonadal steroids on ovulation in the hen *Gallus domesticus*. *Journal of Endocrinology* **66** 303–304.
- Henry MH & Burke WH** 1999 The effects of *in ovo* administration of testosterone or an anti-androgen on growth of chick embryos and embryonic muscles characteristics. *Poultry Science* **78** 1006–1013.
- Hillier SG, Knazek RA & Ross GT** 1977 Androgenic stimulation of progesterone production by granulosa cells from preantral ovarian follicles: Further *in vitro* studies using replicate cell cultures. *Endocrinology* **100** 1539–1549.
- Johnson AL & van Tienhoven A** 1980a Plasma concentrations of six steroids and LH during the ovulatory cycle of the hen, *Gallus domesticus*. *Biology of Reproduction* **23** 386–393.
- Johnson AL & van Tienhoven A** 1980b Hypothalamo-hypophyseal sensitivity to hormones in the hen. I. Plasma concentrations of LH, progesterone, and testosterone in response to central injections of progesterone and R5020. *Biology of Reproduction* **23** 910–917.
- Johnson PA, Green C, Lee HT & Bahr JM** 1988 Inhibition of progesterone secretion from granulosa cells by estradiol and androgens in the domestic hen. *Endocrinology* **123** 473–477.
- Lee HT & Bahr JM** 1989 Inhibitory sites of androgens and estradiol in progesterone biosynthesis in granulosa cells of the domestic hen. *Endocrinology* **125** 760–765.
- Lee HT & Bahr JM** 1990 Inhibition of the activities of P450 cholesterol side-chain cleavage and 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase and the amount of P450 cholesterol side-chain cleavage by testosterone and estradiol-17 β in progesterone biosynthesis in hen granulosa cells. *Endocrinology* **126** 779–786.
- Luck MR** 1982 Effects of an anti-androgen in the laying hen (*Gallus domesticus*). *Journal of Reproduction & Fertility* **64** 381–385.
- Mainwaring WIP, Freeman SN & Harper B** 1987 Pharmacology of antiandrogens. In *Pharmacology and Clinical Uses of Inhibitors of Hormone Secretion and Action*, pp 106–131. Eds BJA Furr & AE Wakeling. London: Bailliere Tindall.
- Norman AW & Litwack G** 1997 Biosynthesis of Steroids. In *Hormones*, 2nd edn, pp 65–74. Eds AW Norman & G Litwack. San Diego: Academic Press.
- Phillips A, Scanes CG & Hahn DW** 1985 Effect of androgens and gonadotrophins on progesterone secretion of chicken granulosa cells. *Comparative Biochemistry and Physiology* **81A** 847–852.
- Rangel PL, Lassala IA & Gutierrez CG** 2005 Testosterone immunization blocks the ovulatory process in laying hens without affecting ovarian follicular development. *Animal Reproduction Science* **86** 143–151.
- Robinson FE & Etches RJ** 1986 Ovarian steroidogenesis during the follicular maturation in the domestic fowl (*Gallus domesticus*). *Biology of Reproduction* **33** 1096–1105.
- Sasanami T & Mori M** 1999 Effects of oestradiol-17 β and testosterone on progesterone production in the cultured granulosa cells of Japanese quail. *British Poultry Science* **40** 536–540.
- Schomberg DW, Williams RF, Tyrey L & Ulberg LC** 1978 Reduction of granulosa cell progesterone secretion *in vitro* by intraovarian implants of antiandrogen. *Endocrinology* **102** 984–987.
- Sharp PJ, Dunn IC & Talbot RT** 1987 Sex differences in the LH responses to chicken LHRH-I and II in the domestic fowl. *Journal of Endocrinology* **115** 323–331.
- Welsh TH, Jones PBC, Ruiz de Galarreta CM, Fanjul LE & Hsueh AJW** 1982 Androgen regulation of progestin biosynthetic enzymes in FSH-treated rat granulosa cell *in vitro*. *Steroids* **40** 691–700.
- Williams JB & Sharp PJ** 1978 Control of the pre-ovulatory surge of luteinising hormone in the hen (*Gallus domesticus*): the role of progesterone and androgens. *Journal of Endocrinology* **77** 57–65.
- Wilson SC & Cunningham FJ** 1984 Endocrine control of the ovulation cycle. In *Reproductive Biology of Poultry*, pp 29–49. Eds FJ Cunningham, PE Lake & D Hewitt. Cambridge: British Poultry Science Ltd.
- Wilson SC & Sharp PJ** 1975a Changes in plasma concentrations of LH after injection of progesterone at various times during the ovulatory cycle of the domestic hen (*Gallus domesticus*). *Journal of Endocrinology* **67** 59–70.
- Wilson SC & Sharp PJ** 1975b Episodic release of luteinizing hormone in the domestic fowl. *Journal of Endocrinology* **64** 77–86.
- Wilson SC & Sharp PJ** 1976a Effects of androgens, oestrogens and deoxycorticosterone acetate on plasma concentrations of luteinizing hormone in laying hens. *Journal of Endocrinology* **69** 93–102.
- Wilson SC & Sharp PJ** 1976b Induction of luteinizing hormone release by gonadal steroids in the ovariectomized domestic hen. *Journal of Endocrinology* **71** 87–98.
- Yoshimura Y, Chang C, Okamoto T & Tamura T** 1993 Immunolocalization of androgen receptor in the small, preovulatory, and post ovulatory follicles of laying hens. *General and Comparative Endocrinology* **91** 81–89.

Received 12 December 2005

First decision 25 January 2006

Revised manuscript received 21 February 2006

Accepted 7 March 2006

CAPITULO 4

La testosterona, induce directamente la producción de progesterona e interactúa con concentraciones fisiológicas de LH para aumentar la producción de progesterona por las células de la granulosa de la gallina doméstica (*Gallus domesticus*).

Artículo enviado para su publicación a la revista: Animal Reproduction Science

Testosterone directly induces progesterone production and interacts with physiological concentrations of LH to increase granulosa cell progesterone production in laying hens (*gallus domesticus*).

Small title: Autocrine action of testosterone on hen granulosa cells

Rangel PL^a, Rodríguez A^a, Gutierrez CG^{a,*}

^a Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México. Av. Universidad 3000, CP 04510, México D.F., México.

*** Corresponding author. Tel: 00-52-5556225860, Fax: 00-52-56225935**

Email address: gqcarlos@servidor.unam.mx (CG Gutierrez)

Abstract

Blocking testosterone action with immunization or with a specific antagonist blocks the preovulatory surge of progesterone and ovulation in laying hens. Thus, testosterone may stimulate progesterone production in a paracrine fashion within the ovary. To test this hypothesis, we evaluated the effects of testosterone and its interaction with LH on the production of progesterone by granulosa cells in culture. Hen granulosa cells obtained from preovulatory follicles were cultured in 96 well plates. The effects of testosterone (0 to 100ng/ml) and/or LH (0 to 100ng/ml) were evaluated. LH stimulated progesterone production in a dose response manner up to 10ng/ml ($p < 0.01$). Testosterone, up to 10ng/ml, increased progesterone production in a dose response manner in the absence of LH and at all doses of LH up to 1ng/ml ($p < 0.001$). However, at supraphysiological concentrations of LH (10 and 100ng/ml) there was no further increase in progesterone production caused by testosterone ($p > 0.05$). Finally, the addition of 2-hydroxyflutamide (0 to 1000 μ g/ml)

to hen granulosa cells cultured with 10ng/ml of testosterone reduced progesterone production in a dose response manner ($p < 0.001$). In conclusion, testosterone stimulates progesterone production in preovulatory follicle granulosa cells and interacts with physiological concentrations of LH to increase progesterone production. In addition, testosterone stimulation on granulosa cells is specific since it is diminished by a testosterone antagonist.

Key words: Hens; testosterone; progesterone production; granulosa cells.

1. Introduction

It was recently shown that testosterone is indispensable for the preovulatory release of progesterone and LH that induces ovulation in laying hens. Active and passive immunization against testosterone blunts the progesterone preovulatory surge and blocks ovulation in laying hens without affecting follicular development to the preovulatory stage (Rangel et al., 2005). In addition, a specific testosterone antagonist, flutamide, acutely blocks ovulation in laying hens and the preovulatory surge of progesterone and LH in laying hens (Rangel et al., 2006). It is therefore possible that the preovulatory peak of testosterone is needed to prime the ovary to facilitate the preovulatory release of progesterone that will induce the LH surge.

In avian species steroidogenesis follows a three cells model, in which granulosa cells mainly produce progesterone, inner theca cells produce testosterone and outer theca cells produce oestradiol (Porter et al., 1989). In addition, secretion of steroid is dependent on the developmental degree of the follicle (Hernández-Vértiz et al., 1993). The white (small and large) and the small yellow follicles (non hierarchical follicles) essentially produce oestrogens (Armstrong, 1984; Robinson and Etches, 1986). In contrast, the hierarchical follicles (yellow large follicles) produce large amounts of progesterone and testosterone (Robinson and Etches, 1986; Gómez et al., 1998).

An autocrine role of testosterone on granulosa cell progesterone production within the ovary has been previously suggested. Sasanami and Mori (1999) showed that

1µg/ml of testosterone directly stimulated progesterone output by cultured granulosa cells both in the presence and in the absence of LH, and indirectly by increasing the sensitivity to LH (100ng/ml). In contrast, other authors have found negative effects of testosterone on progesterone production by granulosa cells. Johnson et al. (1988) found that androgens (testosterone, androstenedione and dihydrotestosterone) acutely suppressed *in vitro* basal and LH-stimulated progesterone production by preovulatory follicle granulosa cells in a dose-related manner in concentrations that ranged from 1×10^{-7} to 1×10^{-5} M. Similarly, Lee and Bahr (1989, 1990) reported that androgens (testosterone and DHT at concentrations of 1 and 10µM) suppressed progesterone production by reducing the amount of P450 cholesterol side-chain cleavage enzyme (P450scc) and by acting as a competitive inhibitor of its activity. Therefore, there is controversial evidence about the role of testosterone on progesterone production in hen granulosa cells *in vitro*. However, all the previous reports used testosterone and LH in concentrations that exceed those found *in vivo*. In mammalian granulosa cells in culture it has been shown that hormones that are stimulatory at physiological concentrations acts in an inhibitory fashion when used at supraphysiological concentrations (Campbel et al., 1996; Gutierrez et al., 1997). Thus the differences in response to testosterone stimulation could be related, at least in part, to paradoxical responses of the cells to non-physiological concentrations of the hormones tested. We therefore hypothesized that testosterone stimulates progesterone production by F1 granulosa cells. Furthermore, we also tested the effect of physiological concentrations of LH and its interaction with testosterone on progesterone production of hen granulosa cells *in vitro*.

2. Material and methods

2.1 Materials and reagents

Dulbecco's phosphate buffer saline (DPBS 10X) and M199 (medium 199 with Earle's salts) were purchased from Gibco (Gibco, BRL Life Technologies, Grand Island NY, USA). hepes, tripan-blue, MTT (3-(4,5-dimethylthiazole-2-yl)-2,5-

diphenyl tetrazolium bromide), N-N-dimethyl-formamide, hydrochloric acid, trypsin type II, pen-strep (containing 10,000 IU penicillin and 10mg streptomycin per ml), ABTS (2,2'-azino-bis(3-ethylbenz-thiazoline acid), sodium hydroxide 1N, citric acid, EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid), sodium azide, sodium phosphate dibasic, sodium phosphate monobasic, hydrofluoric acid, acetic acid, tween 20 (polyoxyethylene-sorbitan monolaurate), BSA (bovine serum albumin, fraction V), testosterone, insulin (bovine pancreatic insulin) and sodium chloride were purchased from Sigma (Sigma Chemical Co. Ltd., St Louis MO, USA). Sodium dodecyl sulphate (SDS) was purchased from BIO-RAD (Bio-Rad Hercules CA, USA). New born calf serum was purchased from EQUITECH-BIO (Equitech-Bio, Inc. Ingram TX, USA) [progesterone, testosterone and oestradiol concentrations were undetectable in denatured serum]. Ninety six well culture plates (Nunclon Surface and MaxiSorp Surface, Nun-Immuno plates) were purchased from Nunc Brand Products (Roskilde, Denmark). Bottle top filters (0.22 μ m cellulose acetate), Cell culture dishes (60mm x 15mm polystyrene and 35mm x 10mm polystyrene) and Pauster pipettes were purchased from Corning (Corning Inc. Corning NY, USA). 2-hydroxyflutamide was kindly provided by Schering-Plough (Schering-Plough México). Ovine LH (oLH 26 NIADDK) was obtained from the National Hormone & Peptide Program (NHPP), NIDDK. Progesterone antibodies, standards and conjugates for the ELISA were kindly provided by Dr. C. Munro (Davis University CA, USA). Progesterone antibodies cross reactivity was 21 and 29% against 11 α -hydroxyprogesterone and 5 α -pregnane-3,20dione, and below 0.5% for other steroids (Munro and Stabenfeldt, 1984).

2.2 Granulosa cell isolation

Leghorn laying hens in the middle of their second laying year (22 months old) were housed in individual cages with water and food *ad libitum*, under a 16h light:8h dark schedule. Daily oviposition was individually registered. Animals were slaughtered by anaesthetic overdose at the middle of their ovulatory sequence. The F1 preovulatory follicles were dissected out immediately in the morning when the cell culture was set up, and placed individually in sterile saline physiological

solution at room temperature. The granulosa cell layer was isolated from the theca as described by Gilbert et al. (1977), with some modifications. Briefly, the yolk was drained through an incision made in the follicular wall, after which the follicle was inverted and shaken in sterile physiological solution. The granulosa layer detached from the follicle and was recovered from the bottom of the solution. Once isolated, granulosa cells were disaggregated at 37°C for 15min under continuous agitation in 5ml of digesting solution [1mg of trypsin type II in 1ml of DPBS]. After incubation, the cells were dispersed by flushing them with a Pasteur pipette. The enzymatic solution was quenched by the addition of 1ml of new born calf serum. Cells were washed by centrifugation during 3min at 1000rpm, at 22°C. The cell pellet was diluted in 5ml of DPBS without trypsin, and dispersed cells were washed twice more with DPBS. Finally, cells were resuspended in culture medium. Viable cell number was determined with a hemocytometer using trypan blue dye exclusion at 0.4%. Cell viability was estimated above 90% in all cases. Each cell culture was performed with cells coming from a single F1.

2.3 Cell culture

Granulosa cells were inoculated in 96-well culture plates at a final concentration of 50,000 cells per well and cultured in a humidified atmosphere with 5% CO₂ and 95% air at 41°C in 250 µl of medium. The cell culture medium was M199 containing 1.1g of hepes, new born calf serum at a final concentration of 10%, 100UI/ml of penicillin, 75UI/ml streptomycin and 10ng/ml of insulin.

2.4 Hormone measurement

Progesterone production was measured from the media by ELISA. The sensitivity of the assays was 1pg, the intra-assay coefficient of variation was below 1.03% and the interassay CV was below 15%. The concentration of progesterone was expressed as progesterone produced by 10,000 granulosa cells.

2.5 Determination of granulosa cell number

Cell concentrations per well after culture were determined by MTT stain (Berridge and Tan, 1993). Briefly, after the removal of 175µl of the spent media 20µl of MTT solution [5mg MTT per 1ml of culture medium] were added and incubated for 24h.

Viable cells transformed the MTT to formazan giving them a blue staining (Slater et al., 1963). Formazan was released from the cells when lysing them with the addition of 100µl of lysis buffer [5ml of distilled water, 5ml of N-N-dimethylformamide, 250µl of HCL 1N, 250µl of acetic acid 1N and 1g of SDS, pH 4.7] and incubation at room temperature for 4 hours. Cell number was directly related to the absorbance of the medium when read with a spectrophotometer at 630nm. A regression equation was fitted to calculate the relationship between absorbance and cell number.

2.6 Experimental procedures

2.6.1 Effect of time, testosterone and LH on progesterone production

A 2x3x2 factorial design was initially used to test the effects of LH (0 and 100ng/ml), testosterone (0, 10 and 100ng/ml) and time in culture (0-24 h and 24-48 time period) on progesterone production by granulosa cells from F1 follicles. After 24h of culture, 175µl of media were extracted (0-24 time period) and changed for the same volume of fresh culture medium and cells were incubated another 24 hours (24-48 time period). Four cultures were made, each containing 16 replicates per treatment.

2.6.2 Testosterone and LH dose response within physiological concentrations

A 4x6 factorial design was followed to test the effect of physiological concentrations of testosterone and LH on F1 granulosa cell progesterone production. Hormonal concentrations tested were 0, 0.1, 1 and 10ng/ml for testosterone and 0, 0.01, 0.1, 1, 10 and 100ng/ml for LH. Cultures lasted 24h after which 175µl of media were harvested. Six cultures were made, each containing 4 replicates per treatment.

2.6.3 Effect of testosterone antagonist (2-hydroxyflutamide) on progesterone production

To determine if the stimulatory action of testosterone on granulosa cells is mediated through its specific receptor, the effects of 2-hydroxyflutamide (0 to 1000µg/ml) were tested on granulosa cells cultured for 24 hours with 10ng/ml of testosterone in six cultures each containing 16 replicates per treatment.

2.7 Statistical analyses

Data are presented as means \pm standard error of the mean (SEM). The effects of treatments (testosterone, LH, 2-hydroxyflutamide and time in culture) were analyzed by analysis of variance allowing for variation due to culture (random effect). To correct for heterogeneity of variance, data were analysed after logarithmic transformation of progesterone produced by 10,000 cells.

3. Results

3.1 Effect of time, testosterone and LH on progesterone production

Hen granulosa cells produced large amounts of progesterone in both time periods (0-24 and 24-48) of culture. However, progesterone production in the first 24h of culture was significantly higher ($p < 0.01$) than during the 24-48h period (Fig. 1). Furthermore, no interaction between testosterone or LH with time in culture was observed ($p > 0.10$), thus for the effect of testosterone and LH only data from 0-24 hour period of culture are shown.

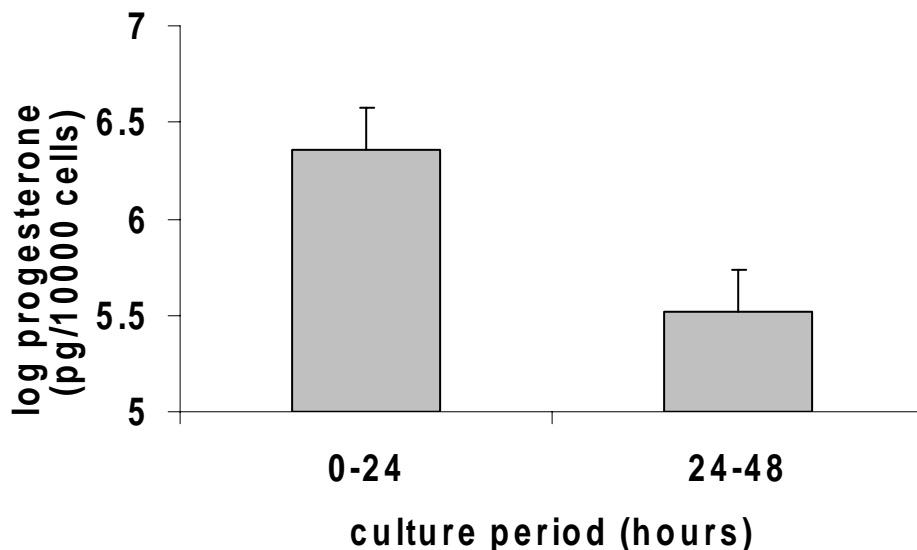


Fig. 1 Pool progesterone production by 10,000 granulosa cells from the F1 follicle of laying hens, after 0-24 or 24-48 hours of *in vitro* culture. Values are means of natural logarithm \pm SEM of 4 cultures, each containing 96 replicates per time period. Progesterone production differ ($p < 0.01$) between time periods.

Testosterone stimulated granulosa cell progesterone production cultured in the absence of LH (Fig. 2). There was no difference ($p>0.05$) in progesterone production between the testosterone concentrations tested. When the cells were cultured with 100ng/ml of LH there was an increase in progesterone production, but in this case the addition of testosterone did not stimulate progesterone production any further (testosterone by LH interaction, $p<0.01$; Fig. 2).

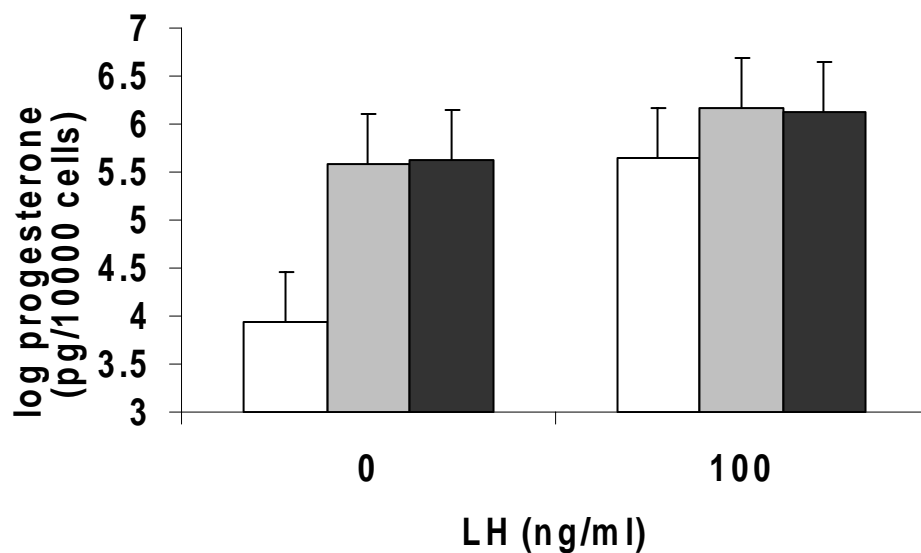


Fig. 2. Progesterone production by F1 granulosa cells cultured *in vitro* for 24 hours with LH (0 or 100ng/ml), testosterone (0, □; 10, ■ or 100, ■ ng/ml) or both. Values are means \pm SEM of 4 cultures, each containing 16 replicates per treatment.

3.2 Testosterone and LH dose response within physiological concentrations

Progesterone production by F1 granulosa cells was stimulated by LH in a dose response manner, up to the dose of 100ng/ml ($p<0.001$). At doses of LH equal or below 1ng/ml, the addition of testosterone increased progesterone production in a dose response manner ($p<0.001$). However, concentrations of 10ng/ml or more of LH induced a high progesterone production which was not further stimulated with the addition of testosterone (Fig. 3).

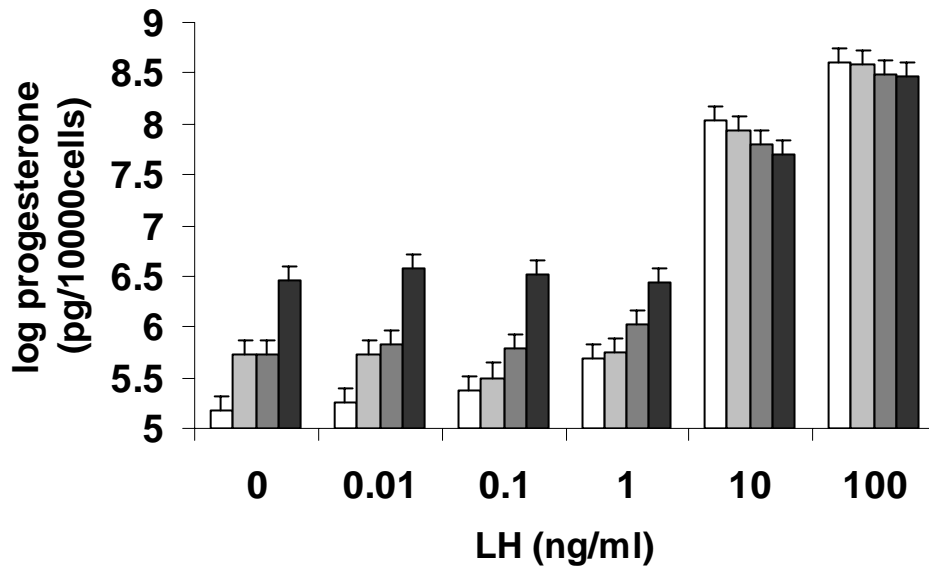


Fig. 3. Progesterone production by F1 granulosa cells cultured *in vitro* for 24 hours with LH (0, 0.01, 0.1, 1, 10 or 100ng/ml), testosterone (0, □; 0.1, ■; 1, ■ or 10, ■ ng/ml) or both. Values are means \pm SEM of 6 cultures, each containing 4 replicates per treatment.

3.3 Effect of testosterone antagonist (2-hydroxyflutamide) on progesterone production

Progesterone production by F1 granulosa cells was increased two fold by the addition of 10ng/ml of testosterone (449 vs 1012 \pm 230pg). The antagonist, 2-hydroxyflutamide, caused a decrease in progesterone production in a dose response manner ($p < 0.001$; Fig. 4).

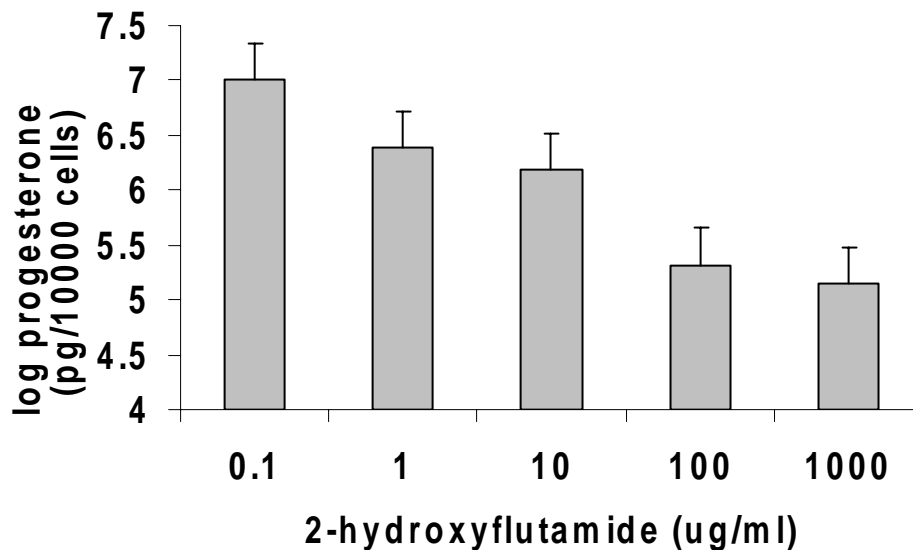


Fig. 4. Progesterone production by F1 granulosa cells cultured *in vitro* for 24 hours with testosterone (10ng/ml) and 2-hydroxyflutamide (0.1, 1, 10, 100 or 1000µg/ml). Values are means ± SEM of 6 cultures, each containing 16 replicates per treatment.

4. Discussion

These studies demonstrate that testosterone stimulate progesterone production of hen preovulatory follicle granulosa cells. Furthermore, this effect was observed when testosterone was administered alone or in combination with physiological concentrations of LH. Additionally, the stimulatory effect of testosterone on progesterone production is specific as it was blocked by its antagonist.

The results of these studies highlight a possible paracrine role for testosterone in stimulating the increase in progesterone release by the preovulatory follicle before ovulation. Sasanami and Mori (1999), working with a pool of granulosa cells of the three largest follicles showed that testosterone at high concentrations (1µg/ml) increased progesterone output in the Japanese quail. Similarly, androgens have been shown to stimulate progesterone biosynthesis by intact follicles in ewes and cows and by granulosa cells from pig, rat and mice in culture (Hillier et al., 1977; Gore-Langton and Armstrong, 1994). In addition, Welsh et al. (1982) showed that androgens facilitate the FSH induced progesterone biosynthesis by enhancing the action of 3β-HSD in rats. These observations show that in mammals testosterone

plays a stimulatory role in progesterone production by granulosa cells. Our results together with the evidences presented above indicate that testosterone in mammals and avian species may act as a paracrine stimulator of progesterone production in granulosa cells.

Nonetheless, Johnson et al. (1988) and Lee and Bahr (1989, 1990) reported an inhibitory action of testosterone and oestradiol on progesterone production of granulosa cells taken from F1 follicles before they are capable of ovulation (1.5-3.5h after ovulation). This inhibitory effect of testosterone was postulated to be part of the mechanism controlling follicular maturation which is characterised by a progressive decrease in androgens and oestrogen secretion by the thecal layer (Bahr et al., 1983). In non-mature preovulatory follicles these steroids are thought to diffuse from the theca into the granulosa layer to inhibit P450 cholesterol side chain cleavage and 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase to inhibit the synthesis of progesterone (Lee and Bahr, 1990). According to that view, as the preovulatory follicle matures, concentrations of testosterone and oestrogen in the thecal layer decrease and consequently their inhibitory effects on progesterone synthesis in the granulosa cells decrease allowing granulosa cell progesterone production to increase in preparation for ovulation. Thus, the stimulatory and inhibitory actions of testosterone on granulosa cell progesterone production can be reconciled if the response of granulosa cells to testosterone is related to their developmental stage. Granulosa cells from follicles which are capable of ovulation, in contrast to those from follicles which are not capable of ovulation, may respond to testosterone by increasing basal progesterone secretion and responsiveness to the stimulatory action of LH on progesterone production. In these studies follicles were collected the morning of the day of culture. Hence, follicles were in all cases a few hours away from being ovulated and therefore they matured and at a time when a stimulatory action of testosterone on progesterone production would be expected. Testosterone appears to be indispensable for ovulation, and for the preovulatory surges of progesterone and LH to occur in birds. We recently demonstrated *in vivo* that inhibition of testosterone activity in laying hens, either by immunisation

(Rangel et al., 2005) or by the use of a specific antagonist (Rangel et al., 2006), blocks ovulation, as well as progesterone and LH preovulatory surges. Flutamide is a specific non-steroidal androgen receptor antagonist (Mainwaring et al., 1987). In the chicken, flutamide is known to be biologically active since administration *in ovo* changed sexual dimorphism in body weight and muscle characteristics of embryos (Henry and Bruke, 1999) and post-hatching chicks (Burke, 1996). In avian species, the main ovarian source of progesterone for the preovulatory surge is the granulosa cell layer of the mature preovulatory follicle, with lower contributions from the granulosa layer of the next most mature preovulatory follicles (Bahr et al., 1983). These granulosa cells contain nuclear androgen receptors (Yoshimura et al., 1993), and as shown here the flutamide metabolite, 2-hydroxyflutamide inhibited the testosterone stimulation of progesterone production in these cells. Similar observations were drawn by Schomberg et al. (1987), who showed a decrease in progesterone secretion granulosa cells isolated from pigs treated with a flutamide implant. Thus, these evidences reinforce our contention of a stimulatory role of testosterone on granulosa cell progesterone production. Further, it indicates a specific action of testosterone via its specific receptor.

In the present study, granulosa cells produced large amounts of progesterone when cultured for 48h. Similarly, other investigators have used long term culture periods for avian granulosa cells and have found steroid output by the cells to be sustained (Phillips et al., 1985; Sasanami and Mori, 1999). However, there was a significant reduction in progesterone production from the first 24h period (0-24h) to the second 24h period of culture (24-48h). The decline in progesterone production questions the significance of culturing avian granulosa cells, collected from the ovulatory follicle, for periods longer than 24h since the F1 follicle remains *in situ* as the preovulatory follicle for only 24 to 28 hours (Johnson, 1990; Etches, 1996). Additionally, no significant endocrine function has been found for the postovulatory follicle, even when it has been suggested that this structure remains steroidogenically active for 24h after ovulation but its steroid production is really poor (Etches, 1996). Furthermore, in reports were cells were cultured for more

than 24 hours (Phillips et al., 1985; Sasanami and Mori, 1999) the culture media was not changed before the end of the study, consequently the progesterone could have been produced during the first 24 hours of culture. Therefore, it does not seem to be physiologically sound to culture granulosa cells, coming from preovulatory follicles, for periods longer than 24 hours.

We found that granulosa cells responded with increased progesterone production to doses of LH (0.1-10ng/ml) and testosterone (0.1-10ng/ml) that fell within or below the physiological range reported for hens. Indeed, circulating concentrations of LH range between 1 and 5ng/ml (Wilson and Sharp, 1976; Wilson and Cunningham, 1984; Rangel et al., 2006). In this study, 1ng/ml of LH significantly increased progesterone production and still permitted for the stimulatory action of testosterone to be shown. However, LH at concentrations of 10ng/ml and above provoked maximum progesterone output and masked the action of testosterone. Shahabi *et al.* (1975) reported testosterone concentrations in the follicular wall of laying hens between 25 and 225ng per gram of tissue. Therefore, the testosterone concentrations used in our studies are within the physiological range. Furthermore, Castoria *et al.* (2003) showed that the effect of testosterone is dependent on its concentration. They found that high testosterone concentrations (10nM) inhibited DNA synthesis and the entry of fibroblasts (NIH3T3 cells) into the cell cycle, whereas low concentrations (1pM) stimulated the S-phase entry. Further, we believe that the optimization of cell culture conditions is achieved not when maximum output of the response hormone is yield, but when cell response to trophic hormones is achieved within physiological concentrations and still allows for the study of their interaction with other factors known or suspected to act at the cell level.

In conclusion, testosterone stimulates progesterone production by F1 granulosa cells in laying hens, when administered alone or with physiological concentrations of LH; this effect is due to the specific interaction of testosterone with its receptors since its specific antagonist results in decreased progesterone production.

Acknowledgements

The authors wish to thank Dr S. Ulloa and Schering-Plough, México, for donation of the 2-hydroxyflutamide. We thank Dr. Parlow and the NIDDK for the ovine LH and Dr. Munro for progesterone antibodies. This work was supported by PAPIIT IN206803, UNAM. Rangel PL was sponsored by a CONACYT student grant.

References

- Armstrong, D.G. 1984 Ovarian aromatase activity in the domestic fowl (*Gallus domesticus*). J Endocrinol. 100, 81-86.
- Bahr, J.M., Wang, S.C., Huang, M.Y., Calvo, F.O. 1983 Steroid concentrations in isolated theca and granulosa layers of preovulatory follicles during the ovulatory cycle of the domestic hen. Biol Reprod. 29, 326-334.
- Berridge, M.V., Tan, A.S. 1993 Characterization of the cellular reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): Subcellular location, substrate dependence, and involvement of mitochondrial electron transport in MTT reduction. Arch Biochem Biophys. 303, 474-482.
- Burke, W.H. 1996 Effects of an *in ovo* injections of an anti-androgen on embryonic and posthatching growth of broiler chicks. Poultry Sci. 75, 648-655.
- Campbell, B.K., Scaramuzzi, R.J., Webb, R. 1996 Induction and maintenance of oestradiol and immunoreactive inhibin production with FSH by ovine granulosa cells cultured in serum-free media. J Reprod Fertil. 106, 7-16.
- Castoria, G., Lombardi, M., Barone, M.V., Bilancio, A., Di Domenico, M., Bottero, D., Vitale, F., Migliaccio, A. & Auricchio, F. 2003 Androgen-stimulated DNA synthesis and cytoskeletal changes in fibroblasts by a non-transcriptional receptor action. J Cell Biol. 161, 547-556.
- Etches, R.J. 1996 Reproduction in poultry. CAB International, Cambridge, UK.
- Gilbert, A.B., Evans, A.J., Perry, M.M., Davidson, M.H. 1977 A method for separating the granulosa, the basal lamina and the theca of the preovulatory ovarian follicle of the domestic fowl (*Gallus domesticus*). J Reprod Fertil. 50, 178-191.

- Gómez, Y., Velázquez, P.N., Juárez-Oropeza, M.A., Pedernera, E. 1998 Steroid metabolism in granulosa and theca interna cells from preovulatory follicles of domestic hen (*Gallus domesticus*). Anim Reprod Sci. 52, 81-91.
- Gore-Langton, R.E., Armstrong, D.T. 1994 Follicular steroidogenesis and its control. In: Knobil E and Neill JD (Eds.), The Physiology of Reproduction, Second Edition, Raven Press, pp 571-627.
- Gutierrez, C.G., Campbell, B.K., Webb, R. 1997 Development of a long-term bovine granulosa cell culture system: Induction and maintenance of oestradiol production, response to follicle-stimulating hormone, and morphological characteristic. Biol Reprod. 56, 608-616.
- Henry, M.H., Burke, W.H. 1999 The effects of *in ovo* administration of testosterone or an anti-androgen on growth of chick embryos and embryonic muscles characteristics. Poultry Sci. 78, 1006-1013.
- Hernández-Vértiz, A., González del Pliego, M., Velázquez, P., Pedernera, E. 1993 Morphological changes in the theca layer during the maturation of the preovulatory ovarian follicle of the domestic fowl (*Gallus domesticus*). Gen Comp Endocr. 92, 80-87.
- Hillier, S.G., Knazek, R.A., Ross, G.T. 1977 Androgenic stimulation of progesterone production by granulosa cells from preantral ovarian follicles: Further *in vitro* studies using replicate cell cultures. Endocrinology. 100, 1539-1549.
- Johnson, A.L. 1990 Steroidogenesis and actions of steroids in the hen ovary. Critical Reviews in poultry biology. 2, 319-346.
- Johnson, P.A., Green, C., Lee, H.T., Bahr, J.M. 1988 Inhibition of progesterone secretion from granulosa cells by estradiol and androgens in the domestic hen. Endocrinology. 123, 473-477.
- Lee, H.T., Bahr, J.M. 1990 Inhibition of the activities of P450 cholesterol side-chain cleavage and 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase and the amount of P450 cholesterol side-chain cleavage by testosterone and estradiol-17 β in progesterone biosynthesis in hen granulosa cells. Endocrinology. 1267, 79-786.

- Lee, H.T., Bahr, J.M. 1989 Inhibitory sites of androgens and estradiol in progesterone biosynthesis in granulosa cells of the domestic hen. *Endocrinology*. 125, 760-765.
- Mainwaring, W.I.P., Freeman, S.N., Harper, B. 1987 Pharmacology of antiandrogens. In: Furr BJA and Wakeling AE (Eds.), *Pharmacology and clinical uses of inhibitors of hormone secretion and action.*, Bailliere Tindall, pp 106-131.
- Munro, C. and Stabenfeldt, G. 1984 Development of a microtitre plate enzyme immunoassay for the determination of progesterone. *J Endocrinol*. 101, 41-49.
- Phillips, A., Scanes, C.G., Hahn, D.W. 1985 Effect of androgens and gonadotrophins on progesterone secretion of chicken granulosa cells. *Comp Biochem Physiol*. 81A, 847-852.
- Porter, T.E., Hargis, B.M., Silsby, J.L., El Halawani, M.E. 1989 Differential steroid production between theca interna and theca externa cells: a three-cell model for follicular steroidogenesis in avian species. *Endocrinology*. 125, 109-116.
- Rangel, P.L., Lassala, I.A., Gutierrez, C.G. 2005 Testosterone immunization blocks the ovulatory process in laying hens without affecting ovarian follicular development. *Anim Reprod Sci*. 86, 143-151.
- Rangel, P.L., Sharp, P.J., Gutierrez, C.G. 2006 Testosterone antagonist flutamide blocks ovulation and preovulatory surges of progesterone, luteinizing hormone and oestradiol in laying hens. *Reproduction*. 131, 1109-1114.
- Robinson, F.E., Etches, R.J. 1986 Ovarian steroidogenesis during the follicular maturation in the domestic fowl (*Gallus domesticus*). *Biol Reprod*. 33, 1096-1105.
- Sasanami, T., Mori, M. 1999 Effects of oestradiol-17 β and testosterone on progesterone production in the cultured granulosa cells of Japanese quail. *Brit Poultry Sci*. 40, 536-540.
- Schomberg, D.W., Williams, R.F., Tyrey, L., Ulberg, L.C. 1978 Reduction of granulosa cell progesterone secretion in vitro by intraovarian implants of antiandrogen. *Endocrinology*. 102, 984-987.
- Shahabi, N.A., Northon, H.W., Nalbandov, A.V. 1975 Steroid levels in follicles and the plasma of hens during the ovulatory cycle. *Endocrinology*. 96, 962-968.

- Slater, T.F., Swyer, B., Strauli, U. 1963 Studies on succinate-tetrazolium reductase system. III. Points of coupling of four different tetrazolium salts. *Biochim Biophys Acta*. 19, 477-482.
- Welsh, T.H., Jones, P.B.C., Ruiz de Galarreta, C.M., Fanjul, L.E., Hsueh, A.J.W. 1982 Androgen regulation of progestin biosynthetic enzymes in FSH-treated rat granulosa cell *in vitro*. *Steroids*. 40, 691-700.
- Wilson, S.C., Cunningham, F.J. 1984 Endocrine control of the ovulation cycle. In: Cunningham FJ, Lake PE and Hewitt D (Eds.), *Reproductive biology of poultry*, Brit Poultry Sci LTD, London, pp 29-49.
- Wilson, S.C., Sharp, P.J. 1976 Induction of luteinizing hormone release by gonadal steroids in the ovariectomized domestic hen. *J Endocrinol*. 71, 87-98.
- Yoshimura, Y., Chang, C., Okamoto, T., Tamura, T. 1993 Immunolocalization of androgen receptor in the small, preovulatory, and post ovulatory follicles of laying hens. *Gen Comp Endocr*. 91, 81-89.

CAPITULO 5

Testosterona estimula la producción de progesterona por las células de la granulosa en gallinas (*Gallus domesticus*), dependiendo del grado de madurez del folículo.

Artículo en preparación

Testosterone stimulates progesterone production by granulosa cell in hens (*Gallus domesticus*), depending on the degree of maturation of the follicle.

Rangel PL^a, Rodríguez A^a, Rojas S^a, Sharp PJ^b and Gutierrez CG^a

^a Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México. Av. Universidad 3000, CP 04510, México D.F., México. ^b Roslin Institute, (Edinburgh), Roslin, Midlothian EH25 9PS, UK.

KEY WORDS

Hens, testosterone, progesterone production, granulosa cells.

INTRODUCTION

Blockage of testosterone action by passive (Furr & Smith 1975, Rangel *et al.* 2005) or active immunisation against testosterone (Rangel *et al.* 2005) blocks ovulation and the preovulatory surge of progesterone in laying hens. In addition, chronic treatment with an androgen receptor antagonist blocks ovulation (Luck 1982, Rangel *et al.* 2006) and the preovulatory surges of progesterone, LH and oestradiol (Rangel *et al.* 2006). Therefore, testosterone may be needed at the hypothalamus and/or the pituitary to promote the release of GnRH or LH, or at the ovarian level, as a stimulator for progesterone secretion.

The main ovarian source of progesterone for the preovulatory surge is the granulosa cell layer of the mature preovulatory follicle, with subsidiary contributions from the granulosa layer of the next most mature preovulatory follicle (Bahr *et al.* 1983). The fact that testosterone may act within the ovary to stimulate progesterone production is supported by the decrease in progesterone release after testosterone action is blocked by a specific antagonist (Rangel *et al.* 2005, Rangel *et al.* 2006). Further, Sasanami and Mori (1999) showed that 1µg/ml of testosterone stimulated progesterone output by cultured granulosa cells and increased the sensitivity to LH. Similarly, Rangel *et al.* (Chapter 4) found that

testosterone stimulates progesterone production alone or interacting with physiological concentrations of LH in granulosa cells cultures and this stimulation is specific as the incubation with a specific androgen antagonist inhibits testosterone stimulated progesterone production. It suggests that the preovulatory peak of testosterone may act by priming the ovary to facilitate the preovulatory release of progesterone.

Nonetheless, some negative effects have been found for testosterone in granulosa cell progesterone production. Johnson *et al.* (1988) showed that androgens (testosterone, androstenedione and DHT) acutely suppressed *in vitro* basal and LH-stimulated progesterone production of preovulatory follicle granulosa cells in a dose-related manner when added at concentrations that ranged from 1×10^{-7} to 1×10^{-5} M. Similarly, Lee and Bhar (1989, 1990) proposed that androgens (testosterone and DHT at concentrations of 1 and $10 \mu\text{M}$) suppress progesterone production by reducing the amount of P450 cholesterol side-chain cleavage (P450scc), and by acting as a competitive inhibitor of its activity.

In our previous study (Chapter 4) we incubated the F1 granulosa cells for 24 hours and observed a positive effect of testosterone on progesterone production which agrees with the finding that granulosa cells cultured with testosterone for 48h, increased basal progesterone production (Phillips *et al.* 1985) and enhances LH-stimulated progesterone production by granulosa cells cultured for 66h (Sasanami & Mori, 1999) with testosterone. This chronic stimulatory action of testosterone contrasts with studies showing that progesterone production from granulosa cells taken from F1 follicles 1.5-3.5h after ovulation and before they are capable of ovulation, is inhibited by treatment with testosterone or oestradiol (Johnson *et al.* 1988; Lee & Bahr 1989; 1990). This inhibitory effect of testosterone is thought to be part of the controlling follicular maturation mechanism which is characterized by a progressive decrease in androgens and oestrogen production from the thecal layer (Bahr *et al.* 1983). In non-mature preovulatory follicles, these steroids are thought to diffuse from the theca into the granulosa layer to inhibit P450 cholesterol side chain cleavage and 3β hydroxysteroid dehydrogenase to inhibit the synthesis

of progesterone (Lee & Bahr 1990). As a preovulatory follicle matures, concentration of testosterone and oestrogen in the thecal layer decreases and consequently their inhibitory effects on progesterone synthesis in the granulosa cells decreases allowing granulosa cell progesterone production to increase in preparation for ovulation. Thus, it appears that the stimulatory action of testosterone on progesterone production depends on the degree of maturation of the follicles.

Our hypothesis to be tested is that the stimulatory action of testosterone on laying hen granulosa cell progesterone production depends on the degree of granulosa cells maturation being inhibitory when granulosa cells are immature and stimulatory when cells are mature.

MATERIAL AND METHODS

ANIMALS: Leghorn laying hens in the middle of their first laying cycle were housed in individual cages with water and food *ad libitum*, under a 14h light:14h dark schedule. Daily oviposition was individually registered. Animals were slaughtered by cervical dislocation between 1 and 4 or 11 and 14 hours after oviposition.

GRANULOSA CELLS ISOLATION: The F1, F3 and F4 preovulatory follicles from each animal were placed individually in sterile physiological solution at room temperature. The granulosa cell layer was isolated from the theca as previously described (Gilbert *et al.* 1977; Chapter 4). After isolation granulosa cells were resuspended in culture medium (medium M199 with hepes, new born calf serum at a final concentration of 10%, 100UI/ml of penicillin, 75UI/ml streptomycin and 10ng/ml of insulin), and viable cell number was determined with a hemocytometer using trypan blue dye exclusion at 0.4%.

CELL CULTURE: Granulosa cells were inoculated in 96-well culture plates at a final concentration of 50,000 cells per well and cultured in a humidified atmosphere with 5% CO₂ and 95% air at 41°C in 250µl of medium, during 24h. The cell culture

medium was M199 1.1g of Hepes, new born calf serum at a final concentration of 10%, 100UI/ml of penicillin, 75UI/ml streptomycin and 10ng/ml of insulin.

HORMONE MEASUREMENT: Progesterone production was measured from the medium extracted after each culture by ELISA. Progesterone antibodies, standards and conjugates for the ELISA were kindly provided by Dr. C. Munro (University of Davis California, USA). The sensitivity of the assays was 4.7pg, an intra-assay coefficient of variation was below 19% for the low control and below 3% for the medium control; inter-assay coefficient of variation was 17% for the low control and 6% for the medium control. The concentration of progesterone was expressed as progesterone produced by 10,000 cells.

EXPERIMENTAL PROCEDURES:

Effect of testosterone, follicle size and time after oviposition on progesterone production by granulosa cells after 24 hours of culture: The effect of testosterone (0, 1, 10 and 100ng/ml) and time after oviposition (1-4h or 11-14h) on progesterone production by granulosa cells from the F1, F3 and F4 follicles were evaluated after 24h of culture. When the culture period finished 175µl of media were extracted and cellular concentration per well was determined by MTT stain (Berridge & Tan 1993). Briefly, after the removal of 175µl of the spent media 20µl of MTT solution [5mg MTT (3-(4,5-dimethylthiazole-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) per 1ml of culture medium] were added and incubated for 24h. Viable cells transformed the MTT to formazan giving them a blue staining (Slater *et al.* 1963). Formazan was released from the cells when lysing them with the addition of 100µl of lysis buffer [5ml of distilled water, 5ml of N-N-dimethyl-formamide, 250µl of HCL 1N, 250µl of acetic acid 1N and 1g of SDS, pH 4.7] and incubation at room temperature for 4h. Cell number was directly related to the absorbance of the medium when read with a spectrophotometer at 630nm. A regression equation was fitted to calculate the relation between absorbance and cell number.

Nine cultures were made for the F1, five for the F3 and four for the F4 follicles. Each culture contains 24 replicates per treatment.

Effect of testosterone, follicle size and time after oviposition on progesterone production by granulosa cells after 3 hours of culture: The effect of testosterone (0, 1, 10 and 100ng/ml) and time after oviposition (1-4h or 11-14h) on progesterone production by granulosa cells from the F1, F3 and F4 follicles were evaluated after 3h of culture. When the culture period finished the culture was stopped and the media was frozen immediately. Four cultures were made for each follicle (F1, F3 and F4) of each group, containing 24 replicates per treatment.

STATISTICAL ANALYSES: Data are presented as means, or least square means \pm the standard error of the mean (SEM). The effects of treatments (cell maturation, testosterone and follicle size) were evaluated by analysis of variance allowing for variation due to culture (random effect). To correct for heterogeneity of variance, data were analysed after logarithmic transformation of progesterone produced by 10,000 cells.

RESULTS

Effect of testosterone, follicle size and time after oviposition on progesterone production by granulosa cells after 24 hours of culture:

In the F1 granulosa cells testosterone stimulated progesterone production at all the doses tested ($p < 0.01$). No differences were observed between progesterone production by granulosa cells coming from follicles that were obtained between 1-4h or 11-14h after oviposition ($p > 0.01$) (Fig. 1: A).

In the F3 follicles testosterone increased progesterone production at all doses ($p < 0.01$), without differences between 1ng/ml vs 10ng/ml and 10ng/ml vs 100ng/ml ($p > 0.01$) (Fig. 1: B). When cells were cultured without testosterone progesterone production in the F3 follicle was lower in cells collected 1-4h after oviposition, than in cells collected 11-14h after oviposition ($p < 0.01$), but no differences were observed between time of collection when testosterone was added to the culture ($p > 0.01$) (Fig. 1: B).

In the F4 follicle testosterone increased progesterone production in a dose response manner ($p < 0.01$) up to 10ng/ml ($p > 0.01$) (Fig. 1: C). F4 follicle

progesterone production was lower in cells collected 1-4h, than in cells collected 11-14h after oviposition when they were cultured without testosterone ($p < 0.01$) (Fig. 1: C), and this difference remained until 10ng/ml of testosterone were added to the culture (Fig. 1: C).

Finally, pool progesterone production of the F4 was significantly lower than in the F1 and the F3 follicle cultures without testosterone ($p < 0.01$), and no differences in pool progesterone production was observed between F1 and F3 granulosa cells cultured without testosterone ($p > 0.01$). Nonetheless, when testosterone was added to the culture, differences in progesterone production between follicle sizes disappeared ($p > 0.01$) (Fig. 1: A, B, C), with the exception of F4 cells, that at 1ng/ml of testosterone produced less progesterone than the F3 granulosa cells ($p < 0.01$) (Fig. 1: B, C).

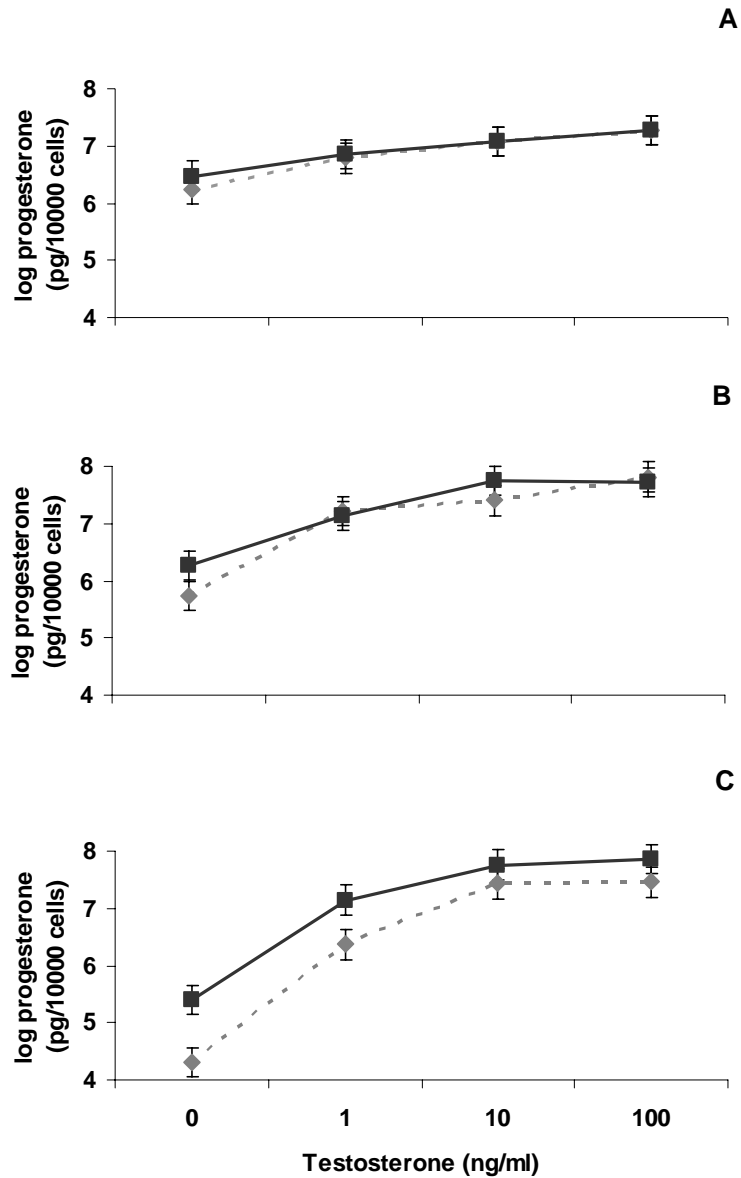


Fig. 1. Progesterone production by hen granulosa cells cultured *in vitro* for 24 hours with testosterone (0, 1, 10 or 100ng/ml). Granulosa cells were obtained from the F1 (A), F3 (B) or F4 (C) follicles, at 1-4h (---◆---) or 11-14h (—■—) after oviposition. Values are least square means \pm SED (0.26) for comparing testosterone with the same follicle size and time after oviposition, of nine cultures for the F1, five for the F3 and four for the F4 follicles, each containing 24 replicates per treatment.

Effect of testosterone, follicle size and time after oviposition on progesterone production by granulosa cells after 3 hours of culture:

Progesterone production by F1 granulosa cells collected 1-4h after ovulation were stimulated only by high concentrations (100ng/ml) of testosterone ($p < 0.01$). In contrast, progesterone production by cells collected 11-14h after ovulation showed a stimulatory response to ten fold lower testosterone concentrations (10ng/ml; $p < 0.01$) (Fig. 2: A).

In the F3 granulosa cells collected 1-4h and 11-14h after ovulation progesterone production was stimulated with 10ng/ml of testosterone ($p < 0.01$) (Fig. 2: B), but in cells coming from follicles 11-14h after ovulation no differences between 10 and 100ng/ml were observed ($p > 0.01$). In F3 granulosa cells, progesterone production was lower in cells collected 1-4h after oviposition, than in cells collected 11-14h after oviposition, when cells were cultured with or without testosterone ($p < 0.01$) (Fig. 2: B), with the exception of progesterone production stimulated by 10ng/ml of testosterone, as no difference was observed between cells collected 1-4h after oviposition and 11-14h after oviposition ($p > 0.01$) (Fig. 2: B).

In the F4 granulosa cells, testosterone increased progesterone production in a dose response manner ($p < 0.01$) (Fig. 2: C). However, in cells collected 11-14h after oviposition no differences in progesterone production was observed between doses of 10 and 100ng/ml of testosterone ($p > 0.01$). Within the F4 granulosa cells, progesterone production was significantly lower in cells collected 1-4h after oviposition ($p < 0.01$), independently to the addition of testosterone (Fig. 2: B).

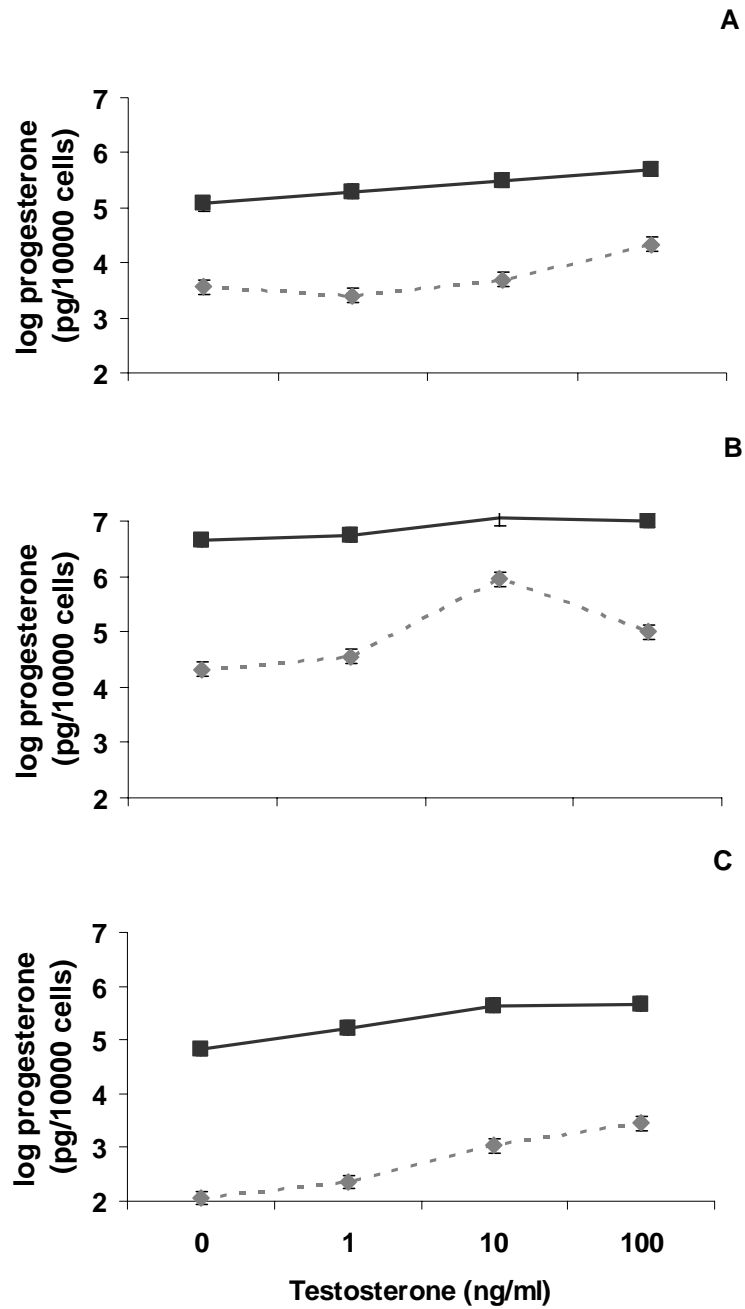


Fig. 2. Progesterone production by hen granulosa cells cultured *in vitro* for 3 hours with testosterone (0, 1, 10 or 100ng/ml). Granulosa cells were obtained from the F1 (A), F3 (B) or F4 (C) follicles, 1-4h (---◆---) or 11-14h (—■—) after oviposition. Values are means \pm SED (0.13), for comparing testosterone with the same follicle size and time after oviposition, of 4 cultures, each containing 24 replicates per treatment.

Granulosa cells progesterone production differ according to the time after oviposition ($p < 0.01$). Cells from follicles collected 11-14h after oviposition produced significantly larger amounts of progesterone than cells collected 1-4h after oviposition ($p < 0.01$). Similarly, F3 cells produced more progesterone than F4 cells. However, cells of the immediately larger follicle collected 1-4h after oviposition produced less progesterone than cells collected 11-14h after oviposition of the immediately smaller follicle (Fig. 3).

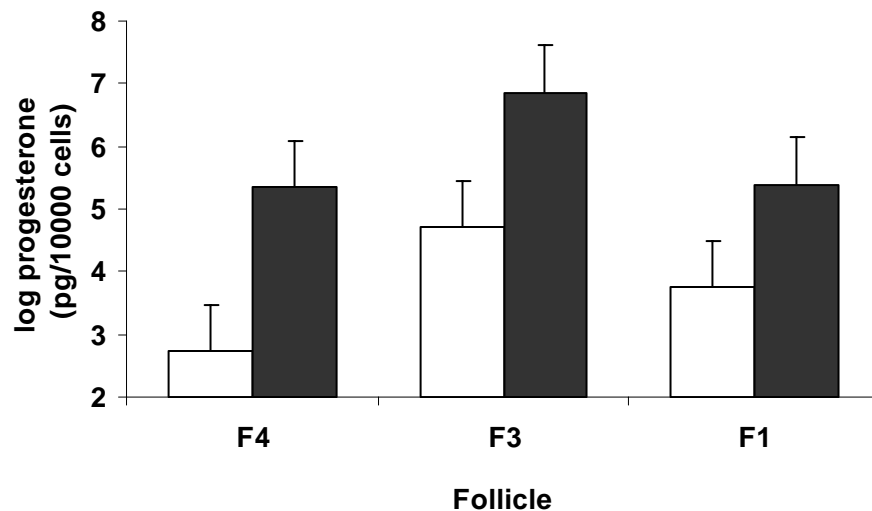


Fig. 3. Pool progesterone production by hen granulosa cells cultured *in vitro* for 3 hours. Granulosa cells were obtained from the F1, F3 or F4 follicles, at 1-4h (□) or 11-14h (■) after oviposition. Values are means of 4 cultures, of each group.

DISCUSSION:

The results of these studies confirm a role for physiological concentrations of testosterone in stimulating the increase in progesterone release by hen granulosa cells. This observation agrees with a previous work in which we demonstrated that testosterone, acting via its specific receptor, stimulating progesterone production by preovulatory follicle granulosa cells and interacts with physiological concentrations of LH to increase progesterone production (Rangel *et al.* in revision).

Although we saw that testosterone caused a higher stimulation of progesterone production by granulosa cells collected 11 to 14h after oviposition than by cells collected 1 to 4h after oviposition, we did not observe the negative effect of testosterone on progesterone production by granulosa cells reported previously by Johnson *et al.* (1988) and by Lee and Bahr (1989,1990). Additionally, when 100ng/ml of testosterone was added to the granulosa cells culture, no further increase was observed in progesterone production. The differences between our results and previous reports are probably due to the concentration used for the culture, which in our case is well below that used by Johnson *et al.* (1988) and Lee and Bahr (1989,1990). This suggestion is supported by the finding that in mammalian granulosa cells cultured *in vitro*, hormones that are stimulatory at physiological concentrations become inhibitory when used at supraphysiological concentrations (Campbell *et al.* 1996, Gutierrez *et al.* 1997). Furthermore, a report that testosterone action depends on its concentration was made by Castoria *et al.* (2003) when he cultured fibroblasts (NIH3T3 cells) with testosterone, and found that high testosterone concentrations (10nM) inhibited DNA synthesis and the entry into the cell cycle, whereas low concentrations (1pM) stimulated the S-phase entry. Thus the differences in response to testosterone stimulation could be related, at least in part, to paradoxical responses of the cells to non-physiological concentrations of the hormones tested.

We observed that the greater production of progesterone was made by the F3 follicle, and no differences were observed in concentrations between F1 and F4 follicles. This observation confirms a previous report from Shahabi *et al.* (1975) which found that during an ovulatory cycle the F1 produces less progesterone than the F2 and F3 follicles, except 8 to 4h before ovulation (20h after ovulation), when the preovulatory release occurred. Additionally, in all follicular sizes we observed that progesterone secretion is higher when cells were collected 11-14h after oviposition (closer to the next ovulation period), than when cells were collected 1-4h after oviposition. It is possible that this different secretion pattern is caused by the peak of LH secretion, which occurs closer to the 11-14h after oviposition period

of time (Wilson and Sharp 1973; Wilson *et al.* 1983). It is well known that LH stimulates progesterone production (Johnson *et al.* 1985; Sharp *et al.* 1990; Wilson *et al.* 1990, Chapter 4). Furthermore, Bahr and Johnson (1984) previously reported that the ability of the granulosa cells to produce and secrete progesterone is regulated by the maturation state of the follicle, which in turn is determined by the ability of the follicle to respond to LH. This observation suggests that progesterone secretion has a circadian rhythm of secretion, which caused a higher progesterone production near the period of LH release.

When hen granulosa cells were cultured only for 3h the responsiveness to testosterone was greater in mature (collected 11-14h after oviposition) than in immature (collected 1-4h after oviposition) cells. Furthermore, progesterone production by granulosa cells collected 11-14h after oviposition cultured for 3h was similar than those obtained after 24h of culture. Nonetheless, no difference in progesterone production was observed between immature and mature granulosa cells when culture time was 24h; this lack of difference could be due to the long period time of culture, since 24h is the normal time that a follicle remains in each size within the normal follicular hierarchy (Johnson 1990 and 1993), and it is possible that cells collected 1-4h after oviposition mature during the culture period. These results suggested that mature granulosa cells (collected 11-14h after oviposition) produced greater concentrations of progesterone than immature cells, and that a long period of culture (24h) is not needed to observe a cellular response to the direct effect of testosterone to induced progesterone production.

In conclusion, progesterone production by hen granulosa cells is stimulated by testosterone at physiological concentrations, and a higher response is observed in granulosa cells collected 11 to 14h after oviposition, than in cells collected 1 to 4h after oviposition.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors wish to thank Sr Guillermo Rodriguez for his support with the animal care. This work was supported by the International Foundation for Science grant B-3648-1. Rangel PL was sponsored by a CONACYT student grant.

REFERENCES

- Bahr JM & Johnson AL** (1984) Regulation of the follicular hierarchy and ovulation. *The Journal of Experimental Zoology* **232** 495-500
- Bahr JM, Wang S-C, Huang MY & Calvo FO** (1983) Steroid concentrations in isolated theca and granulosa layers of preovulatory follicles during the ovulatory cycle of the domestic hen. *Biology of Reproduction* **29** 326-334
- Berridge MV & Tan AS** (1993) Characterization of the cellular reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): Subcellular location, substrate dependence, and involvement of mitochondrial electron transport in MTT reduction. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **303** 474-482
- Campbell BK, Scaramuzzi RJ & Webb R** (1996) Induction and maintenance of oestradiol and immunoreactive inhibin production with FSH by ovine granulosa cells cultured in serum-free media. *Journal of Reproduction and Fertility* **106** 7-16
- Castoria G, Lombardi M, Barone MV, Bilancio A, Di Domenico M, Bottero D, Vitale F, Migliaccio A & Auricchio F** (2003) Androgen-stimulated DNA synthesis and cytoskeletal changes in fibroblasts by a non-transcriptional receptor action. *The Journal of Cell Biology* **161** 547-556
- Gilbert AB, Evans AJ, Perry MM & Davidson MH** (1977) A method for separating the granulosa, the basal lamina and the theca of the preovulatory ovarian follicle of the domestic fowl (*Gallus domesticus*). *Journal of Reproduction and Fertility* **50**:178-191
- Gutierrez CG, Campbell BK & Webb R** (1997) Development of a long-term bovine granulosa cell culture system: Induction and maintenance of oestradiol

production, response to follicle-stimulating hormone, and morphological characteristic. *Biology of Reproduction* **56** 608-616

Johnson AL (1990) Steroidogenesis and actions of steroids in the hen ovary. *Critical Reviews in Poultry Biology* **2** 319-346

Johnson AL (1993) Regulation of follicle differentiation by gonadotrophins and growth factor. *Poultry Science* **72** 867-873

Johnson PA, Green C, Lee HT & Bhar JM (1988) Inhibition of progesterone secretion from granulosa cells by estradiol and androgens in the domestic hen. *Endocrinology* **123** 473-477

Johnson PA, Johnson AL & van Tienhoven A (1985) Evidence for a positive feedback interaction between progesterone and luteinizing hormone in the induction of ovulation in the hen, *Gallus domesticus*. *General and Comparative Endocrinology* **58** 478-485

Lee HT & Bhar JM (1989) Inhibitory sites of androgens and estradiol in progesterone biosynthesis in granulosa cells of the domestic hen. *Endocrinology* **125** 760-765

Lee HT & Bhar JM (1990) Inhibition of the activities of P450 cholesterol side-chain cleavage and 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase and the amount of P450 cholesterol side-chain cleavage by testosterone and estradiol-17 β in progesterone biosynthesis in hen granulosa cells. *Endocrinology* **126** 779-786

Phillips A, Scanes CG & Hahn DW (1985) Effect of androgens and gonadotrophins on progesterone secretion of chicken granulosa cells. *Comparative Biochemistry and Physiology* **81A** 847-852

Rangel PL, Lassala IA & Gutierrez CG (2005) Testosterone immunization blocks the ovulatory process in laying hens without affecting ovarian follicular development. *Animal Reproduction Science* **86** 143-151

Rangel PL, Rodriguez A & Gutierrez CG (in revision) Testosterone induces progesterone production and interacts with physiological concentrations of LH to increase granulosa cell progesterone production in hens (*Gallus domesticus*).

- Rangel PL, Sharp PJ & Gutierrez CG** (2006) Testosterone antagonist flutamide blocks ovulation and preovulatory surges of progesterone, luteinizing hormone and oestradiol in laying hens. *Reproduction* **131** 1109–1114
- Sasanami T & Mori M** (1999) Effects of oestradiol-17 β and testosterone on progesterone production in the cultured granulosa cells of Japanese quail. *British Poultry Science* **40** 536-540
- Shahabi NA, Northon HW & Nalbandov AV** (1975) Steroid levels in follicles and the plasma of hens during the ovulatory cycle. *Endocrinology* **96** 962-968
- Sharp PJ, Talbot RT, Main GM, Dunn IC, Fraiser HM & Huskisson NS** (1990) Physiological roles of chicken LHRH-I and -II in the control of gonadotrophin release in the domestic chicken. *Journal of Endocrinology* **124** 291-299
- Slater TF, Swyer B & Strauli U** (1963) Studies on succinate-tetrazolium reductase system. III. Points of coupling of four different tetrazolium salts. *Biochimica et Biophysica Acta* **19** 477-482
- Wilson SC, Chairil RA, Cunningham FJ & Gladwell RT** (1990) Changes in the hypothalamic contents of LHRH-I and -II and in pituitary responsiveness to synthetic chicken LHRH-I and -II during the progesterone-induced surge of LH in the laying hen. *Journal of Endocrinology* **127** 487-496
- Wilson, SC & Sharp PJ** (1973) Variations in plasma LH during the ovulatory cycle of the hen, *Gallus domesticus*. *Journal of Reproduction and Fertility* **35**:561–564
- Wilson SC, Jennings RC & Cunningham FJ** (1983) An investigation of diurnal and cyclic changes in the secretion of luteinizing hormone in the domestic hen. *Journal of Endocrinology* **98**:137–145
- Yoshimura Y, Chang C, Okamoto T & Tamura T** (1993) Immunolocalization of androgen receptor in the small, preovulatory, and post ovulatory follicles of laying hens. *General and Comparative Endocrinology* **91**, 81-89

CAPITULO 6

Respuesta del eje hipotálamo-hipofisiario-gonadal al estímulo de progesterona, GnRH y hCG, en gallinas de postura tratadas contra testosterona.

Respuesta del eje hipotálamo-hipofisiario-gonadal al estímulo de progesterona, GnRH y hCG, en gallinas de postura tratadas contra testosterona.

INTRODUCCION:

En los capítulos 2 y 3 se mostró que el bloqueo de la acción de testosterona mediante un antagonista o la inmunización activa y pasiva interrumpe la ovulación en aves de postura. En dichos estudios también se encontró que el tratamiento contra la testosterona bloqueó la ovulación y los picos de progesterona (P_4), estradiol (E_2) y LH que preceden a la ovulación. El bloqueo de esteroides gonadales y de LH hipofisiaria sugiere que la testosterona puede estar actuando en cualquier nivel del eje hipotálamo-hipófisis-gónada.

En aves la secreción de LH por la pituitaria anterior es estimulada por la GnRH-I (Sharp *et al.* 1998; Johnson y van Tienhoven 1981), en respuesta a la retroalimentación positiva ejercida por P_4 (Johnson *et al.* 1985; Sharp *et al.* 1990; Wilson *et al.* 1990). Existiendo entre LH y P_4 un mecanismo de retroalimentación positiva (Etches y Cunningham 1976; Imai y Nalbandov 1978; Johnson *et al.* 1985). Demostrándose que aplicaciones exógenas de LH promueven la secreción de P_4 (Imai y Nalbandov 1978), mientras que las de P_4 inducen incrementos en las concentraciones plasmáticas de LH (Wilson y Sharp 1975; Etches y Cunningham 1976). Sin embargo, cuando la P_4 es inyectada en el sistema nervioso central induce la liberación de LH únicamente cuando su aplicación es hipotalámica (Ralph y Fraps 1960).

A pesar de que un pico de testosterona (T) también precede siempre a la ovulación, su papel en el proceso ovulatorio no se ha logrado determinar (Wilson y Cunningham 1984; Etches 1996). Más aún, Wilson y Sharp (1976) sugirieron que T no es necesaria como sensibilizador para la acción de P_4 en gallinas ovariectomizadas. Por otro lado, dosis suprafisiológicas de T inducen la ovulación, considerándolo como un efecto farmacológico (Croze y Etches 1980, Johnson y van Tienhoven 1981). Croze y Etches (1980) observaron que T es el único

andrógeno al que se le puede considerar biológicamente activo en gallinas. Adicionalmente, Furr y Smith (1975) mostraron que la inmunización pasiva contra T 6-12h antes de la ovulación causaba un bloqueo de la misma y Kawashima *et al.* (1978) mostraron que células hipofisiarias de gallo respondían liberando LH después de la incubación con T, efecto que no se observó cuando se preincubaron con P₄ o E₂. No obstante, en estudios *in vivo* Johnson y van Tienhoven (1981) mostraron que inyecciones intraventriculares de T fueron incapaces de causar la liberación de LH y la ovulación.

En los capítulos 4 y 5 demostramos que la testosterona estimula directamente la producción de progesterona por las células de la granulosa, pero no se ha excluido la posibilidad de que también actué a otros niveles.

En el presente trabajo se realizaron varios experimentos para establecer la capacidad de respuesta de los componentes del eje hipotálamo-hipofisario-gonadal en el control del mecanismo de ovulación de las gallinas de postura, cuando los animales se encontraban bajo un tratamiento para bloquear de la acción de testosterona.

MATERIAL Y METODOS:

Animales: Se utilizaron gallinas de postura de las líneas Highland y Hi-line. Las edades de los animales utilizados fueron 28 semanas (primer ciclo de postura; para primer estudio y segunda fase del tercer estudio) ó 92 semanas (segundo ciclo de postura; para segundo estudio y primera fase del tercer estudio). Los animales fueron alojados en jaulas individuales con agua y alimento a libre acceso, bajo esquemas de iluminación de 16h luz:8h oscuridad (primer estudio), ó 14h luz:14h oscuridad (segundo y tercer estudio).

Los trabajos fueron realizados en el área de reproducción en aves del Departamento de Reproducción, en la FMVZ.

Cuatro semanas después de tener a las gallinas alojadas bajo las condiciones descritas, y una vez que se contaba con un registro de postura diario e individual, los animales fueron divididos aleatoriamente en cinco grupos por estudio. En los

estudios 2 y 3 se contó con un registro exacto de la hora de postura mediante un circuito cerrado de televisión y una videocasetera de tiempo intermitente, con lo cual se estimó la hora esperada de la próxima postura. Para estimar la hora de postura se evaluaron los registros individuales de las dos semanas previas. En forma general se observó que la hora de postura permanecía constante, presentando intervalos de 22 a 24h entre ovoposiciones, De este modo se seleccionaban los animales que habían tenido intervalos mas constantes. La hora de postura subsecuente se estimó agregando 22 ó 24h a la última postura, según el caso.

Tratamientos: El bloqueo de la testosterona se realizó por inmunización pasiva (segundo estudio) ó por bloqueo con un antagonista (Flutamida, primer y tercer estudios). En el caso de la inmunización pasiva se empleó un antisuero anti-testosterona producido en borrego. El suero hiperinmune se aplicó en 2 ocasiones, la primera 10h antes de la hora estimada de postura y la segunda 6h antes de la hora estimada de postura, aplicando en cada ocasión un total de 5ml de antisuero (3ml por vía intramuscular y 2ml por vía endovenosa). El tratamiento con la flutamida se llevó a cabo administrando, por vía oral, una dosis total por animal de 750mg de flutamida (Flubest, BEST Laboratories, México D.F.; para el estudio 1 ó Eulexin, Schering-plough, México; para el estudio 3). En el primer estudio se administraron 250mg de flutamida cada 8 horas (7:00, 15:00 y 23:00h), mientras que en el segundo y tercer estudio, donde se conocía la hora estimada de postura, la dosificación de flutamida se realizó dando 500mg de flutamida 20h antes de la hora esperada de postura y 250mg 10h antes de la hora esperada de postura.

Los tratamientos con las hormonas exógenas (GnRH, hCG y P4) se realizaron en animales previamente tratados para inhibir la acción de la testosterona. Cuando no se disponía de una estimación de la hora de postura (primer estudio) los tratamientos se aplicaron siempre 4 horas después de iniciada la oscuridad (a las 20:00h). En el segundo y tercer estudio los tratamientos se administraron 8h antes de la hora estimada de postura.

Los tratamientos de las hormonas exógenas consistieron en:

Hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH): A los animales de estos grupos se le aplicó una inyección intramuscular de 10µg/Kg de acetato de fertirelin (Ovalyse, Pharmacia and Upjohn. México D.F.). Con este grupo se probó la capacidad de la hipófisis de responder a una dosis de GnRH, para desencadenar un pico preovulatorio de LH.

Gonadotropina coriónica humana (hCG): A estos animales se les aplicaron 300UI de hCG (Choluron, Intervet, Holanda) por vía endovenosa. Con este grupo se evaluó la capacidad del folículo ovulatorio de responder a una dosis de hCG, ya sea ovulando o produciendo progesterona.

Progesterona (P₄): Estos animales recibieron intramuscularmente 0.75mg de progesterona (Progesterona, Fort Dodge. México D.F.). En este grupo se probó la respuesta hipotalámica de los animales a una dosis de progesterona, medida indirectamente por la secreción de un pico preovulatorio de LH.

Los animales testigo de cada estudio recibieron un placebo en la misma forma que el tratamiento contra testosterona correspondiente al estudio.

Cabe aclarar que las dosis de las hormonas exógenas, así como la vía de aplicación de las mismas, fueron tomadas de trabajos previos en aves, en los que se encontró que eran efectivas para causar la ovulación o los incrementos de las hormonas directamente estimuladas. Confiando en esto y debido al número de animales que se manejaron durante los sangrados, no se incluyeron grupos de animales tratados con las hormonas exógenas sin el tratamiento para bloquear la acción de la testosterona.

Muestreo sanguíneo: El mismo día del tratamiento, todos los animales fueron sometidos a un muestreo sanguíneo cada 2h, el cual, dependiendo del estudio inició 2h antes del inicio del periodo de oscuridad (primer estudio) ó 10 horas antes de la hora estimada de postura (segundo y tercer estudios). Para dicho muestreo los animales se canularon y se utilizó un protocolo de muestreo similar al utilizado en los capítulos 2 y 3.

Medición hormonal: Las concentraciones plasmáticas de testosterona y progesterona se determinaron por radioinmunoanálisis de fase sólida, con kits de

DPC Coat-a-Count (Diagnostic Products Corporation. Los Angeles, CA. USA), cuya sensibilidad fue de 0.02ng y 0.05ng, respectivamente. Las mediciones de LH se realizaron según el método descrito por Sharp *et al.* (1987), con una sensibilidad de 0.036 ± 0.09 ng/ml.

Diseño experimental:

Primer estudio: Se utilizaron 39 gallinas Highland, distribuidas de la siguiente manera: Grupo flutamida (n=8), Grupo flutamida + GnRH (n=8), Grupo flutamida + hCG (n=8), Grupo flutamida + P4 (n=8) y Grupo control (n=7).

El muestreo sanguíneo se realizó por un periodo de 18h cada 2h, el cual inició 2h antes del inicio del periodo de oscuridad (16:00h).

Los coeficientes de variación intraensayo fueron de 4.4%, 3.2% y 7.6%. para testosterona, progesterona y LH.

Segundo estudio: Se repitió el estudio con las siguientes modificaciones: en lugar de utilizar flutamida se optó por una inmunización pasiva, ya que la inmunización había bloqueado la ovulación en un estudio previo (capítulo 2). Sin embargo, en este caso no se contaba con antisuero de gallina y en su lugar se usó suero de borrego inmunizado contra testosterona. Por otro lado, los animales se alojaron en una cámara de fotoperiodo provista con un circuito cerrado de televisión con la finalidad de realizar un registro exacto de la hora de ovoposición, lo que permite estimar la hora de ovulación (Wilson y Cunningham 1984; Etches 1996). Los animales fueron puestos en un fotoperiodo de 14h luz:14h oscuridad debido a que está documentado que bajo este esquema los animales ponen alrededor del final del periodo de oscuridad y no presentan un día de no postura (Etches 1996). Finalmente, la progesterona se diluyó en alcohol absoluto para facilitar su dosificación.

Especificaciones: Se utilizaron 30 gallinas Hi-line divididas aleatoriamente y distribuidas de la siguiente forma: grupo inmunizado (n=6), grupo inmunizado + GnRH (n=6), grupo inmunizado + hCG (n=6), grupo inmunizado + P4 (n=6) y grupo control (n=6).

El muestreo sanguíneo inició 10h antes de la hora estimada de postura de cada animal y concluyó 2h después de la hora de postura.

Los coeficientes de variación intraensayo fueron de 5.8% y 7.7% para testosterona y progesterona respectivamente.

Tercer estudio: Se decidió repetir el estudio utilizando una flutamida de marca comercial (Eulexin, Schering-plough, México).

Este estudio se dividió en dos fases, en la primera los animales recibieron el tratamiento de flutamida y de las hormonas exógenas, a la vez que se sometieron al sangrado para la determinación hormonal. En la segunda fase a los animales se les administró el tratamiento de flutamida y de las hormonas exógenas, y únicamente se evaluó el efecto sobre la postura.

Primera Fase: Se utilizaron 30 gallinas Hi-line, a mitad de su segundo ciclo de postura, divididas aleatoriamente y distribuidas de la siguiente manera: grupo flutamida (n=8), grupo flutamida + GnRH (n=8), grupo flutamida + hCG (n=8), grupo flutamida + P4 (n=8), grupo control (n=7).

Los coeficientes de variación intraensayo fueron de 8.3% y 7.6% para testosterona y progesterona.

Segunda fase: Se utilizaron 28 gallinas a mitad de su primer ciclo de postura, las cuales fueron divididas aleatoriamente y distribuidas de la siguiente manera: grupo flutamida (n=5), grupo flutamida + GnRH (n=6), grupo flutamida + hCG (n=6), grupo flutamida + P4 (n=5), grupo control (n=12).

Análisis de resultados: El efecto del tratamiento sobre la postura se evaluó comparando el porcentaje de postura entre los 8 días previos al tratamiento (incluida la postura ocurrida 24 horas después del sangrado, cuando los animales se encontraban en un fotoperiodo de 16h luz:8h oscuridad, o hasta la postura que determinaba el final del periodo de sangrado, en aquellos animales mantenidos en un fotoperiodo de 14h luz:14h oscuridad) (postura pretratamiento) y la postura correspondiente al efecto agudo del tratamiento, que se determinó por la postura ocurrida 2 días después del tratamiento, para el fotoperiodo de 16h luz:8h oscuridad; o por la postura ocurrida en las 28h siguientes al término del sangrado,

para los animales mantenidos en fotoperiodo de 14h luz:14h oscuridad. Para todo lo anterior se utilizó una prueba de modelos lineales mixtos generalizados, que comparaba el efecto del tratamiento por el tiempo, sobre el porcentaje de postura. Los datos fueron sometidos a una transformación logit para su evaluación. Se evaluó la presentación del pico hormonal de progesterona, testosterona y LH, mediante un análisis descriptivo.

RESULTADOS:

Primer estudio: El porcentaje de postura de todos los grupos fue similar en el período pretratamiento (87.5 a 74.4%; Figura 1). En el grupo control la postura permaneció sin cambios significativos en respuesta al tratamiento ($p > 0.05$). Contrariamente, en el grupo Flutamida se observó una reducción al 50% de postura en respuesta al tratamiento ($p < 0.05$). Los grupos GnRH y P4 presentaron el mismo porcentaje de postura que el grupo flutamida en respuesta al tratamiento ($p > 0.05$), mientras que el grupo hCG presentó una reducción significativamente mayor (11.7% de postura; $p < 0.05$).

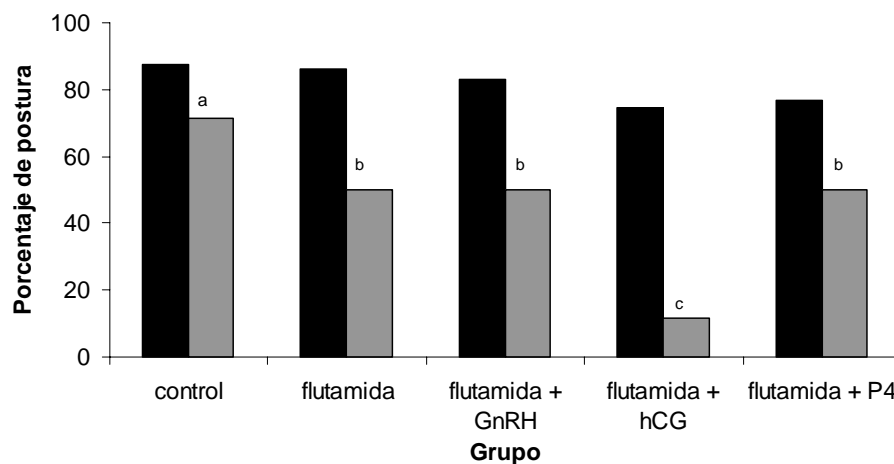


Figura 1: Porcentaje de postura en gallinas de primer ciclo de postura, tratadas con o sin flutamida más diferentes hormonas exógenas (GnRH, hCG o P₄). La postura pretratamiento (■) corresponde a un periodo de 8 días que incluye el día del tratamiento y el día siguiente al mismo. La postura en respuesta al tratamiento (■) corresponde al huevo puesto entre las 24 y las 48h posteriores a la aplicación del tratamiento. Literales diferentes en el mismo periodo de postura indica diferencias entre grupos.

El cuadro 1 muestra la ocurrencia de picos hormonales en los diferentes grupos experimentales. Puede observarse que en los animales que ovularon del grupo control se presentaron incrementos preovulatorios de testosterona, progesterona y LH. En contraste, los animales del grupo flutamida que no ovularon, presentan únicamente incrementos de testosterona. Esta presentación de incrementos en las concentraciones de testosterona en animales que no ovularon se repitió en todos los grupos que recibieron el tratamiento de flutamida independientemente del tratamiento exógeno que se aplicó, aunque ocurrió con menor frecuencia.

Dentro de los grupos tratados con las hormonas exógenas todos los animales que ovularon (independientemente del tratamiento exógeno que recibieron) presentaron incrementos preovulatorios de progesterona, testosterona y LH, los cuales fueron similares a los ocurridos en los animales del grupo control que ovularon. La excepción fue en las concentraciones de progesterona del grupo P4, ya que en este caso los niveles hormonales se encontraron más elevados al compararlos con los del resto de los grupos. En forma general esto ocurrió en los tres estudios, por lo que únicamente se describirán en forma detallada las observaciones de aquellos animales que no ovularon.

En el grupo GnRH no se vieron incrementos de LH en los animales que no ovularon, y los niveles de progesterona tampoco presentaron incrementos en dichos animales. Dentro del grupo hCG solamente 1 animal que no ovuló tuvo incrementos en las concentraciones de progesterona y LH. Finalmente, en el grupo de P4, todos los animales tuvieron concentraciones elevadas de progesterona, y en este caso se encontró que el tratamiento exógeno fue capaz de causar una retroalimentación positiva a LH en dos animales que no ovularon.

Cuadro 1: Presentación de picos hormonales en gallinas de primer ciclo de postura, tratadas con o sin flutamida más diferentes hormonas exógenas (GnRH, hCG o P₄). El número de posturas corresponde a las ovoposiciones en respuesta al tratamiento (entre las 24 y las 48 horas postratamiento). T= testosterona, P4= progesterona y LH= hormona luteinizante.

Grupo	Animales por grupo	Posturas		T	P4	LH
		ocurrencia	#			
Control	5	si	5	5	5	5
Flutamida	4	no	4	3	0	0
Flutamida + GnRH	8	si	4	4	4	4
		no	4	1	0	0
Flutamida + hCG	8	si	1	1	1	1
		no	7	2	1	1
Flutamida + P4	8	si	4	4	4	4
		no	4	1	4	2

Segundo estudio: El porcentaje de postura de todos los grupos fue similar en el período pretratamiento (86.8 a 100%; $p < 0.05$) (Figura 2). En los grupos control e inmunizado la postura permaneció sin cambios significativos en respuesta al tratamiento ($p > 0.05$), lo que demostró que la inmunización pasiva contra testosterona no fue efectiva. Adicionalmente, en los grupos hCG y P4 no se observó disminución significativa en el porcentaje de postura en respuesta al tratamiento ($p > 0.05$). Únicamente en el grupo GnRH se observó disminución significativa en el porcentaje de postura en respuesta al tratamiento ($p < 0.05$).

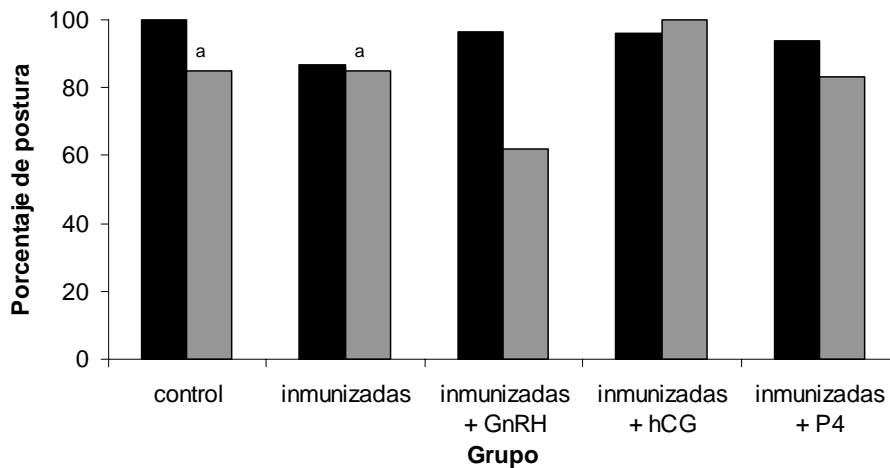


Figura 2: Porcentaje de postura en gallinas de segundo ciclo de postura, inmunizadas o no contra testosterona, más diferentes hormonas exógenas (GnRH, hCG o P₄). La postura pretratamiento (■) corresponde a un periodo de 8 días que incluye el día del tratamiento y el día siguiente al mismo. La postura en respuesta al tratamiento (▒) corresponde al huevo puesto entre las 24 y las 48h posteriores a la aplicación del tratamiento. Literales diferentes en el mismo periodo de postura indica diferencias entre grupos.

Los resultados de la ocurrencia de picos hormonales en los diferentes grupos experimentales no se muestran, debido a que no existió respuesta a la inmunización pasiva contra testosterona.

Tercer estudio:

Primera fase: En el grupo hCG hubo un animal que no pudo canularse durante el sangrado, sin embargo, sus datos fueron incluidos en las comparaciones de postura ya que se encontraba medicado adecuadamente. Además, de los animales de dicho grupo que se sangraron (n=5), dos tuvieron que ser excluidos de las comparaciones hormonales y de postura debido a que la ovoposición el día del tratamiento ocurrió completamente desfasada con la hora estimada, por lo cual la aplicación hormonal no se realizó en el momento debido. Por lo anterior, este grupo (hCG) quedó con una n de 4 para las comparaciones de postura y una n de 3 para las mediciones hormonales.

El porcentaje de postura de todos los grupos fue similar en el período pretratamiento (87.5 a 100%) (Figura 3). En el grupo control dicho porcentaje permaneció sin cambios en respuesta al tratamiento ($p < 0.05$), mientras que en los

grupos tratados con flutamida los porcentajes de postura en respuesta al tratamiento fueron estadísticamente menores a los porcentajes pretratamiento ($p < 0.05$). El porcentaje de postura en respuesta al tratamiento en el grupo GnRH fue significativamente mayor cuando se le comparó con el grupo flutamida ($p > 0.05$).

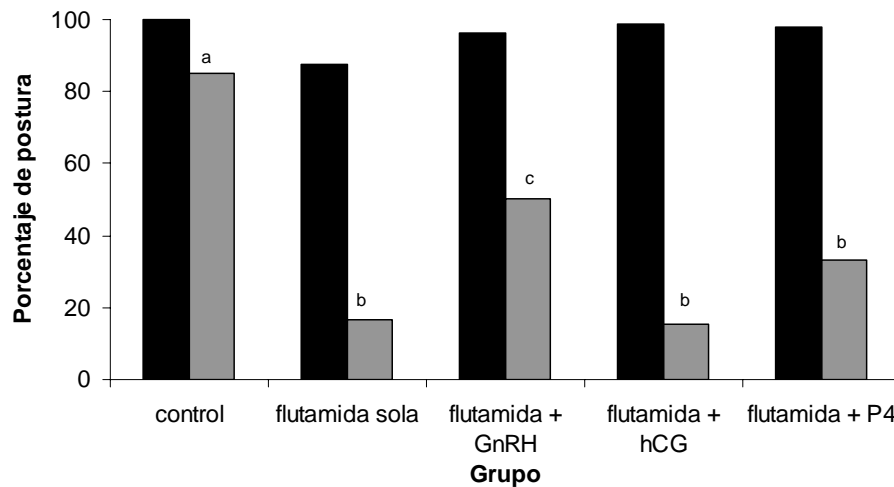


Figura 3: Porcentaje de postura en gallinas de segundo ciclo de postura, tratadas con o sin flutamida, más diferentes hormonas exógenas (GnRH, hCG o P₄). La postura pretratamiento (■) corresponde a un periodo de 8 días que incluye el día del tratamiento y el día siguiente al mismo. La postura causada por el efecto agudo del tratamiento (■) corresponde al huevo puesto en las 28h posteriores al término del muestreo sanguíneo. Literales diferentes en el mismo periodo de postura indica diferencias entre grupos.

El cuadro 2 muestra la ocurrencia de los picos hormonales en los diferentes grupos experimentales. En el grupo control pudo verse que los animales ovularon en respuesta a incrementos preovulatorios de testosterona y progesterona, mientras que los animales del grupo flutamida que no ovularon únicamente presentaron incrementos de testosterona. Esta ocurrencia de incrementos en las concentraciones de testosterona en los animales que no ovularon se repitió en los grupos GnRH y P₄, pero no ocurrió en el grupo hCG. En cuanto a las concentraciones de progesterona se vieron incrementos en todos los animales del grupo P₄, mientras que ningún animal que no ovuló de los grupos GnRH y hCG presentó incrementos en las concentraciones de progesterona.

Cuadro 2: Presentación de picos hormonales en gallinas de segundo ciclo de postura, tratadas con o sin flutamida más diferentes hormonas exógenas (GnRH, hCG o P₄). El número de posturas corresponde a las ovoposiciones en respuesta al tratamiento. T= testosterona y P₄= progesterona.

Grupo	Animales por grupo	Posturas		T	P ₄
		ocurrencia	#		
Control	5	si	5	4	5
Flutamida	5	no	0	3	0
Flutamida + GnRH	6	si	3	3	3
		no	3	2	0
Flutamida + hCG	3	si	1	1	1
		no	2	2	2
Flutamida + P ₄	6	si	2	2	2
		no	4	3	3

Segunda fase: El porcentaje de postura pretratamiento fue similar en todos los grupos (95.1 a 99.6%) (Figura 4). La postura en el grupo control se mantuvo sin cambios en respuesta al tratamiento ($p > 0.05$). En todos los grupos tratados con flutamida se observó una reducción significativa en el porcentaje de postura en respuesta al tratamiento ($p < 0.05$), con la excepción del grupo P₄ en el cual la postura en respuesta al tratamiento permaneció sin cambios significativos ($p > 0.05$). Sin embargo, al comparar la postura en respuesta al tratamiento entre los grupos control y flutamida no se observó diferencia estadísticamente significativa ($p > 0.05$).

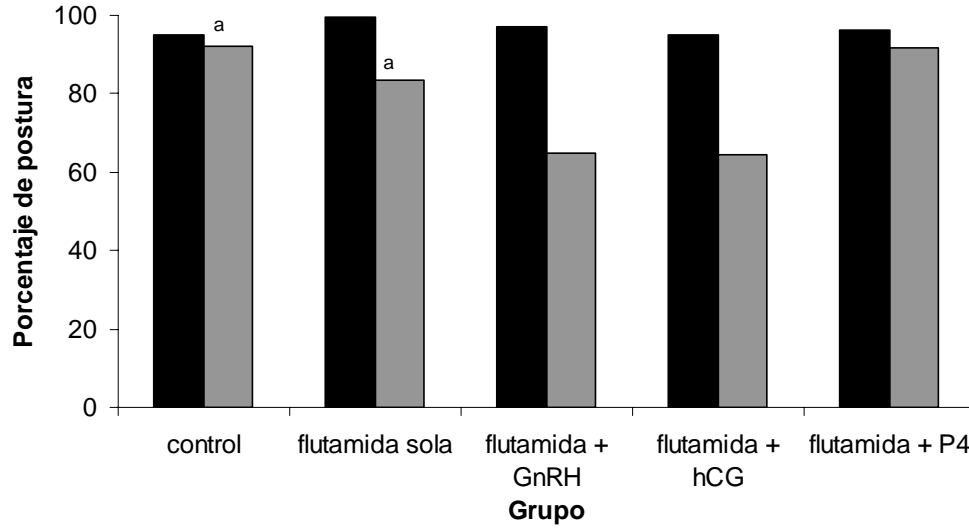


Figura 4: Porcentaje de postura en gallinas de primer ciclo de postura, tratadas con o sin flutamida, más diferentes hormonas exógenas (GnRH, hCG o P₄). La postura pretratamiento (■) corresponde a un periodo de 8 días que incluye el día del tratamiento y el día siguiente al mismo. La postura causada por el efecto agudo del tratamiento (▒) corresponde al huevo puesto en las 28h posteriores al término del muestreo sanguíneo. Literales diferentes en el mismo periodo de postura indica diferencias entre grupos.

DISCUSION:

El uso de la inmunización pasiva contra testosterona con suero de borrego inmunizado contra testosterona fue ineficaz para bloquear la ovulación del grupo inmunizado en el segundo estudio, esto ocasionó que los datos hormonales no pudieran utilizarse y este estudio no ayudará a llegar a una conclusión del sitio de acción de la testosterona en el eje hipotálamo-hipofisario-gonadal de las gallinas. Sin embargo, este segundo estudio sirvió para ver que la estimación de la hora de postura era correcta y que con el periodo de sangrado realizado se detectaban adecuadamente los picos preovulatorios de las hormonas esteroides.

El efecto del tratamiento con flutamida sobre el proceso ovulatorio de las gallinas es fácil de evaluar mediante la observación de la postura correspondiente a la ovulación ocurrida el día del tratamiento, es decir la postura ocurrida 2 días después del tratamiento, para el fotoperiodo de 16h luz:8h oscuridad; o la ocurrida en las 28h siguientes al término del sangrado, para el fotoperiodo de 14h luz:14h oscuridad. En el primer estudio, a pesar de que el tratamiento con flutamida causó

una reducción significativa en el porcentaje de postura, esta reducción fue mucho menor a lo observado en estudios previos (capítulo 3), donde el bloqueo de la postura se obtuvo en 100% de los animales. Por otro lado, el porcentaje de postura en respuesta al tratamiento fue el mismo para el grupo flutamida y para los grupos de GnRH y P4, lo cual hizo imposible determinar la acción de las hormonas exógenas sobre la ovulación causada por efecto del tratamiento. En contraste la primera fase del tercer estudio, nos permitió ver una respuesta apropiada al tratamiento con flutamida. Sin embargo, debido al pequeño número de la muestra en el grupo hCG y a que nos falta la información de las concentraciones de LH, para establecer si el hipotálamo fue capaz de responder liberando GnRH y la hipófisis liberando LH, no se puede concluir sobre el efecto de los tratamientos exógenos y la capacidad del hipotálamo, la hipófisis y las gónadas para responder a las hormonas. Con la segunda fase de ese tercer estudio esperábamos ampliar el número de observaciones del efecto del tratamiento sobre la postura. Sin embargo, a pesar de que se trabajó exactamente con las mismas condiciones y el mismo manejo que en la primera fase, los resultados fueron muy diferentes ya que el tratamiento de flutamida, aún cuando causó una reducción significativa en los porcentajes de postura en los grupos flutamida, GnRH y hCG, causó una reducción mucho menor que la observada en la primera fase y no hubo diferencias en la postura causada por el tratamiento entre los grupos control y flutamida. La respuesta al tratamiento de flutamida observada en esta segunda fase del tercer estudio tuvo un comportamiento similar a la del primer estudio.

Al analizar y comparar detenidamente ambas fases del tercer estudio encontramos que la única diferencia fue la edad de los animales, ya que las gallinas de la primera fase eran animales de segundo ciclo de postura y las de la segunda fase eran de primer ciclo de postura, edad que concuerda con la de los animales del primer estudio, en el cual la respuesta al tratamiento de flutamida también fue pobre. Esto nos indica que la edad de los animales causa una respuesta diferente al tratamiento de flutamida. Existen otras evidencias de

respuesta diferenciada dependiendo de la edad y el estado fisiológico de las aves. Kawashima *et al.* (1979), mostraron que hay una mayor concentración de receptores a progesterona, tanto en hipotálamo como en hipófisis, en gallinas que han iniciado la postura, cuando se les compara con gallinas antes de iniciar la postura. Así mismo, se ha observado que la respuesta a estradiol, para incrementar la concentración de receptores a progesterona en el hipotálamo, es mayor en gallinas maduras que en gallinas prepúberes (Kawashima *et al.* 1979a). Los hallazgos que tuvimos en estos estudios sugieren que las gallinas jóvenes se encuentran más sensibles a la acción hormonal o menos sensibles a los fármacos antagonistas, de modo que resulta difícil bloquear el proceso ovulatorio. Así mismo, la recuperación del bloqueo de la ovulación en los primeros días después del tratamiento (datos no mostrados) es más rápida que en las gallinas más jóvenes. Esto sugiere que los animales jóvenes tienen un sistema endocrino más sensible y fino que los animales más maduros.

En el caso del grupo P4, tanto en el primer como en el tercer estudio se observaron concentraciones elevadas de progesterona inmediatamente después de la aplicación hormonal. Lo cual es debido a la administración exógena de la progesterona. El efecto del tratamiento exógeno en este grupo se evaluaría indirectamente por la liberación de LH, parámetro que solo tenemos en el primer estudio. Los resultados de dicho estudio muestran que dos animales de los que no ovularon y que recibieron el tratamiento exógeno de progesterona, presentaron incrementos en las concentraciones de LH, respondiendo adecuadamente al tratamiento. Esto permite suponer que el hipotálamo y la hipófisis permanecen responsivos cuando la testosterona ha sido bloqueada. Cabe señalar que en los estudios previos (capítulo 3) ningún animal tratado con flutamida presentó incrementos en las concentraciones de LH, inclusive las concentraciones de esta hormona se encontraron por debajo de los niveles basales, reforzando la idea de que los incrementos observados en este estudio son debidos a la respuesta al tratamiento exógeno de progesterona. En el tercer estudio no disponemos de las

mediciones hormonales de progesterona, lo que hace imposible determinar la respuesta al tratamiento exógeno de progesterona.

Es probable que en el primer estudio no observáramos una mayor respuesta ovulatoria al tratamiento con progesterona ya que al no saber el momento exacto de la postura y la ovulación de los animales tratados, el tratamiento de progesterona podía estarse aplicando en un momento que ya no era capaz de causar el efecto de inducir la ovulación, esto ya que se ha demostrado que progesterona es incapaz de desencadenar la ovulación cuando se administra 4 horas antes de la ovulación esperada (Wilson y Sharp 1975). Adicionalmente, se ha establecido que el tratamiento con un exceso de progesterona resulta inhibitorio para el proceso ovulatorio en aves (Johnson y van Tienhoven 1980), y en este estudio fue muy difícil e inexacta la medición de la progesterona, ya que se encontraba en una presentación oleosa, mucho mas concentrada de lo que se requería. Sin embargo, en el tercer estudio tampoco observamos gran respuesta ovulatoria al tratamiento con progesterona, haciendo suponer que si se hubiera desencadenado la liberación de LH, el folículo preovulatorio ha perdido la capacidad de ovular cuando se ha bloqueado la acción de la testosterona.

El hecho de que en ausencia de la liberación preovulatoria de LH, la testosterona plasmática se incrementa en las gallinas tratadas con flutamida que no ovularon, ya había sido observado en el capítulo 3, y puede ser consecuencia de una falla en la testosterona producida por las células de la teca en el folículo maduro para inhibir la síntesis de progesterona por las células de la granulosa, lo que resulta en un sustrato aumentado para la posterior síntesis de testosterona. Se sugiere que el incremento inicial en la testosterona plasmática que precede a la liberación preovulatoria de LH puede ocurrir en la etapa de desarrollo del folículo preovulatorio, cuando la disminución de la testosterona producida por la teca cesa en inhibir la síntesis de progesterona por la granulosa resultante en un incremento del sustrato para la producción de testosterona por la granulosa. Este incremento en la producción de testosterona puede entonces “preparar” a las células de la granulosa, haciéndoles más responsivas a la LH para iniciar la liberación

preovulatoria de LH. Un incremento transitorio en la testosterona plasmática visto antes del incremento sostenido en la testosterona preovulatoria (Williams & Sharp 1978), es consistente con este punto de vista

La respuesta a evaluar en el grupo GnRH es el incremento en las concentraciones de LH, dato que solo se tiene en el primer estudio. En los animales tratados con GnRH no se vieron incrementos de LH en los animales que no ovularon, haciendo suponer que el tratamiento no fue efectivo para inducir la liberación de LH, lo anterior explica el que los niveles de progesterona no mostrarán incrementos en los animales que no ovularon. Esto hace suponer que el tratamiento con GnRH no fue efectivo. En el tercer estudio a pesar de que no se cuenta con los valores de LH, los animales del grupo GnRH que no ovularon tampoco presentaron incrementos en las concentraciones de progesterona, confirmando la suposición de que el tratamiento con GnRH no fue efectivo.

En algunos trabajos preliminares con flutamida (datos no mostrados), en los cuales realizamos ultrasonografías y sacrificio de animales para determinar el desarrollo folicular, pudimos ver que el tratamiento con el antagonista de testosterona causó un bloqueo del desarrollo folicular y una regresión de los folículos jerárquicos. Esto explica el hecho de que días después del tratamiento agudo con flutamida la postura en los animales tratados permaneciera bloqueada. Este hallazgo concuerda con el encontrado por Luck (1982), quien al emplear un antagonista de testosterona (acetato de cyproterona) encontró que bloqueaba la ovulación e inducía la atresia folicular. Una posible explicación a este fenómeno es que el bloqueo de testosterona interrumpió completamente la secreción de progesterona, que normalmente actúa como un factor autócrino/parácrino para promover la sobrevivencia de las células de la granulosa y evitar la apoptosis, haciendo que los folículos jerárquicos no sean susceptibles de sufrir regresión (Musche y D'Herde 2001). El bloqueo de la producción de progesterona por el empleo del antagonista de testosterona fue comprobado *in vitro*, mediante el empleo del metabolito de flutamida (capítulo 4). De este modo se explica que al

no haber producción de progesterona las células foliculares quedaron desprotegidas para sobrevivir y los folículos sufrieron regresión.

En conclusión, los presentes estudios nos hacen pensar que testosterona actúa a nivel del folículo preovulatorio para estimular la ovulación del mismo, probablemente haciéndolo responsivo a la LH. Sin embargo, en ninguno de los estudios se obtuvieron resultados concluyentes. Adicionalmente, el tercer estudio carece de la medición de LH, indispensable para confirmar los hallazgos del primer estudio.

Por otro lado, se pudo concluir que la edad de los animales modifica la respuesta al tratamiento de flutamida. Aparentemente los animales jóvenes deben ser más sensibles a la testosterona y por ello el tratamiento con su antagonista no es capaz de causar la inhibición de la postura que causa en los animales mayores. Esta observación puede apoyarse por el hecho de que en el primer estudio realizado en esta serie, en el cual la respuesta a la flutamida no fue la esperada, también se trabajó con animales de primer ciclo de postura, mientras que en un estudio previo (capítulo 3) habíamos encontrado un bloqueo de la postura en el 100% de los animales tratados con flutamida, cuando estos se encontraban a la mitad de su segundo ciclo de postura.

CAPITULO 7

DISCUSION GENERAL:

Los estudios de esta tesis muestran inequívocamente que la testosterona es una hormona esencial para el proceso ovulatorio de las gallinas de postura.

En el capítulo 2 se demostró que la inmunización activa y pasiva contra la testosterona bloqueó la ovulación sin afectar el desarrollo folicular y suprimió el pico de progesterona que precede a la ovulación. Así mismo, en el capítulo 3 se mostró que el bloqueo agudo de la acción de la testosterona, por la inhibición específica del receptor con su antagonista (flutamida), bloqueó la ovoposición y los picos preovulatorios de progesterona, LH y estradiol que normalmente se asocian con la ovulación. Lo anterior hace suponer que la testosterona es necesaria para que ocurra la ovulación y que su falta de acción modifica los patrones hormonales que preceden a la ovulación.

El papel de la testosterona en el proceso ovulatorio de las gallinas de postura no ha sido establecido claramente. En la gallina doméstica la ovulación es inducida por el pico preovulatorio de LH (Wilson y Cunningham 1984; Etches 1996), el cual a su vez es causado por un mecanismo de retroalimentación positiva con progesterona (Johnson y van Tienhoven 1980; Wilson y Sharp 1975; Etches y Cunningham 1976). Dentro de este proceso ovulatorio se ha establecido que el estradiol presenta incrementos 10 a 12h antes de la ovulación (Etches y Cunningham 1977; Johnson y van Tienhoven 1980; Etches y Cheng 1981) y es responsable de sensibilizar el hipotálamo a la progesterona (Wilson y Sharp 1976a). La testosterona también presenta incrementos simultáneos a los del estradiol (Etches y Cunningham 1977; Johnson y van Tienhoven 1980; Etches y Cheng 1981), sin embargo, no se requiere como un sensibilizador para progesterona en gallinas ovariectomizadas (Wilson y Sharp 1976a). No obstante, los resultados aquí presentados demuestran la necesidad de testosterona para la ovulación. Estudios previos habían sugerido que la testosterona debía convertirse

en una “sustancia activa” para poder inducir la ovulación (Fraps 1955), o que actuaba sensibilizando el sistema hipotálamo-hipófisis-gonadal para facilitar la liberación de LH (Croze y Etches 1980). La primera sugerencia es improbable, ya que toda la evidencia indica que la progesterona es el principal esteroide que directamente induce la liberación preovulatoria de LH (Wilson y Sharp 1975a, 1976; Johnson y van Tienhoven 1980a) y la progesterona no es un metabolito de la testosterona (Norman y Litwack 1997); lo que indica la necesidad de considerar y estudiar la segunda suposición.

Hay que recordar que no se ha establecido cómo la testosterona pueda ejercer una acción similar a la de los estrógenos a nivel hipotálamo-hipofisario. Más aún, a concentraciones fisiológicas la testosterona no tiene efecto para inducir la liberación de LH o la ovulación en gallinas (Croze y Etches 1980), y Wilson y Sharp (1976a) mostraron que la testosterona falló en estimular la liberación de LH en gallinas ovariectomizadas previamente tratadas con estradiol y progesterona. Por lo anterior, podría suponerse que el efecto de testosterona a nivel central fuese vía su aromatización a estradiol en el cerebro para promover la formación de receptores a progesterona. Las concentraciones hipotalámicas de receptores a progesterona cambian durante el ciclo ovárico y alcanzan sus máximas concentraciones 18 y 8 horas antes de la ovulación (Kawashima *et al.* 1979a), coincidiendo con los picos plasmáticos de testosterona y estradiol (Johnson y van Tienhoven 1980b; Wilson y Cunningham 1984). Ya se ha observado que el estradiol (Kawashima *et al.* 1979a) y la testosterona (Kawashima *et al.* 1979b, Balthazar *et al.* 1980) incrementan las concentraciones de receptores a progesterona a nivel del hipotálamo y la pituitaria en gallinas; pero se ha sugerido que la acción de la testosterona es únicamente mediante su transformación a estradiol, ya que las concentraciones de testosterona necesarias para incrementar los receptores de progesterona son 4 veces mayores a las de estradiol. Así mismo, el empleo de un andrógeno no aromatizable (5α -dihidrotestosterona) no causa aumento en las concentraciones de los receptores de progesterona (Balthazar *et al.* 1980). Esta evidencia hace suponer que la acción de testosterona

a nivel central (hipotálamo e hipófisis) no es una acción directa de la hormona, sino que requiere ser transformada para poder actuar.

La ausencia del incremento preovulatorio de LH en las gallinas tratadas con flutamida (capítulo 3) sugiere dos escenarios. El primero apoya el hecho de que testosterona vía su aromatización a estradiol sensibiliza el hipotálamo para la retroalimentación positiva de progesterona a LH, hecho ya discutido en el párrafo anterior. El segundo, plantea que el incremento preovulatorio de testosterona actúa a nivel ovárico, ya sea sensibilizando a las células de la granulosa para la secreción de progesterona en respuesta a LH (en cuyo caso, al no haber secreción de progesterona inducida por LH, no se puede desencadenar el mecanismo de retroalimentación positiva entre LH y progesterona), o por una acción directa de testosterona para estimular la secreción de progesterona por las células de la granulosa, hecho que estaría reforzado por los hallazgos encontrados en nuestros trabajos, donde el bloqueo de testosterona inhibe la secreción de progesterona (capítulos 2 y 3). Esta última opción nos condujo a la realización de los estudios *in vitro*, donde se tuvo como objetivo establecer si la testosterona tiene un papel en la secreción de progesterona por las células de la granulosa de las aves.

En los estudios *in vitro* (capítulos 4 y 5) vimos que la testosterona, por sí sola y en concentraciones fisiológicas, es capaz de estimular la producción de progesterona por las células de la granulosa del folículo preovulatorio, gracias a una acción mediada por receptores (capítulo 4); y que esta capacidad estimuladora cambia dependiendo de la madurez de las células de la granulosa, siendo más responsivas las células maduras que las inmaduras (capítulo 5). Entre las evidencias que soportan la existencia de un papel de testosterona a nivel ovárico se encuentran que: la principal fuente ovárica para la liberación preovulatoria de progesterona es la granulosa del folículo preovulatorio, con contribuciones menores por las células de la granulosa de los siguientes folículos grandes amarillos (Bahr *et al.* 1983); y que estas células de la granulosa poseen receptores nucleares a andrógenos (Yoshimura *et al.* 1993). Por otro lado, es

evidente que cuando las células de la granulosa son cultivadas con testosterona, por 48 (Phillips *et al.* 1985) ó 66 (Sasanami y Mori 1990) horas, se incrementa la producción basal, e inducida por LH, de progesterona. Estos resultados fueron corroborados en nuestros estudios (capítulo 4) cuando cultivamos las células de la granulosa durante 24 horas. En el periodo de cultivo de 24h, podemos considerar la acción estimuladora de testosterona como crónica, resultados que contrastan con los obtenidos cuando las células de la granulosa fueron colectadas 1.5 a 3.5h después de la ovulación y cultivadas por únicamente 3h donde se encontró un efecto inhibitorio de testosterona y estradiol sobre la producción de progesterona (Johnson *et al.* 1988; Lee y Bahr 1989; 1990). Lo anterior sugiere que cuando las células de la granulosa se encuentran en estado inmaduro, tienen disminuida su capacidad de responder a la acción estimuladora de testosterona para secretar progesterona y, que contrariamente, la testosterona las inhibe. Sin embargo, nosotros no encontramos un efecto inhibitorio de testosterona cuando cultivamos por 3h células de la granulosa maduras (colectadas 11-14h después de la ovoposición) y células inmaduras (colectadas 1-4h después de la ovoposición) (capítulo 5). No obstante, encontramos que la respuesta al estímulo de testosterona varió, de acuerdo al grado de madurez de las células, resultando una mayor producción de progesterona por las células maduras, cuando se les comparó con las células inmaduras (capítulo 5). Suponemos que la diferencia en el efecto de testosterona encontrada entre nuestros estudios y los de Johnson *et al.* (1988) y Lee y Bahr (1989; 1990), se debe a la concentración de testosterona usada en el cultivo. Dichos autores utilizaron dosis mucho mayores a las usadas en esta tesis y a las concentraciones fisiológicas de testosterona en las gallinas. Este hallazgo fue previamente descrito en mamíferos, cuando Campbell *et al.* (1996) y Gutiérrez *et al.* (1997) encontraron que concentraciones hormonales fisiológicas se comportaban como estimuladoras en células de la granulosa cultivadas *in vitro*, sin embargo, las mismas hormonas tenían un efecto inhibitorio cuando eran utilizadas a dosis suprafisiológicas. Por lo anterior, podemos concluir que testosterona estimula la secreción de progesterona por las células de la

granulosa cuando sus concentraciones se encuentran dentro de los rangos fisiológicos normales. En forma similar, estudios en mamíferos soportan la evidencia de un papel estimulador de testosterona sobre la producción de progesterona. Trabajos *in vitro* con células de la granulosa de ratas, sugirieron la existencia de una estimulación de andrógenos, medida por el receptor, sobre la producción de progesterona (Hillier *et al.* 1977). Así mismo, se ha demostrado que los andrógenos facilitan la biosíntesis de progesterona inducida por FSH, al estimular la acción de la enzima 3 β -HSD (Welsh *et al.* 1982). Adicionalmente, Schomberg *et al.* (1978) encontraron que implantes de flutamida en ovarios de cerdas, causaron un decremento en la producción de progesterona por las células de la granulosa aisladas y cultivadas *in vitro*. En el caso de este efecto estimulador de testosterona sobre las células de la granulosa de aves para producir progesterona, parece improbable que sea un efecto mediado por aromatización de los andrógenos a estrógenos, basándose en dos hechos. Primero, que las células de la granulosa, principalmente las de los folículos preovulatorios, carecen de actividad aromatasa (Armstrong 1984). Segundo, que previamente se había demostrado que el 17 β -estradiol (300ng/ml) fue incapaz de incrementar la producción de progesterona por las células de la granulosa de los folículos 1 y 3 de gallinas de postura, mientras que un andrógeno no aromatizable (5 α -dihidrotestosterona), en la misma concentración, incrementó la producción de progesterona por células cultivadas *in vitro* (Phillips *et al.* 1985). Todo lo anterior, apoya la existencia de un papel de testosterona en la producción de progesterona por las células de la granulosa, tanto en mamíferos como en aves.

Al concluir estos trabajos pudimos mostrar que testosterona tiene un papel esencial en el proceso ovulatorio de las gallinas y que una vía es mediante la inducción de la secreción de la progesterona por las células de la granulosa. Sin embargo, aún teníamos la inquietud de si la testosterona también estaría actuando a nivel central y de si *in vivo* podríamos mostrar la acción de la testosterona a nivel ovárico. Ello nos condujo a realizar el último estudio, donde

intentamos mostrar el sitio específico de acción de la testosterona en el proceso ovulatorio de las gallinas.

En el capítulo 6 no se pudo establecer un sitio único de acción de la testosterona en el eje hipotálamo-hipofisario-gonadal, pero los resultados nos hacen pensar que la testosterona actúa a nivel del folículo preovulatorio para que ocurra exitosamente la ovulación, probablemente haciéndolo responsivo a LH y promoviendo la liberación de la progesterona preovulatoria. Adicionalmente, se observó que la edad de los animales, modifica la respuesta al tratamiento con el antagonista de testosterona, siendo más sensibles al antagonista los animales de mayor edad.

Comparando los dos métodos usados para bloquear la acción de la testosterona en nuestros trabajos, observamos que mientras que la inmunización activa contra testosterona no afectó el desarrollo folicular (capítulo 2), la aplicación del antagonista de testosterona (flutamida) causó un bloqueo del desarrollo folicular inmediato (datos no mostrados). Este hallazgo concuerda con el encontrado por Luck (1982), quien al emplear un antagonista de testosterona (acetato de ciproterona) encontró que bloqueaba la ovulación e inducía la atresia folicular. Esto nos hace pensar que cuando se usa la inmunización se logra bloquear a la testosterona circulante. Sin embargo, no se puede inhibir por completo la que se encuentra a nivel ovárico, pudiendo actuar la testosterona necesaria para que continúe el desarrollo folicular. Por otro lado, el bloqueo de testosterona por su antagonista interrumpió completamente la secreción de progesterona, que normalmente actúa como un factor autócrino/parácrino para promover la sobrevivencia de las células de la granulosa y evitar la apoptosis, haciendo que los folículos jerárquicos no sean susceptibles de sufrir regresión (Musche y D'Herde 2001). El bloqueo de la producción de progesterona por el empleo del antagonista de testosterona fue comprobado *in vitro*, mediante el empleo del metabolito de flutamida (capítulo 4).

Un hallazgo importante de los estudios realizados se refiere al hecho de que las gallinas de postura respondan de manera diferente al antagonista específico

(flutamida) dependiendo de la edad de los animales (capítulo 6). Existen otras evidencias de respuesta diferenciada dependiendo de la edad y el estado fisiológico de las aves. Kawashima *et al.* (1979), mostraron que hay una mayor concentración de receptores a progesterona, tanto en hipotálamo como en hipófisis, en gallinas que han iniciado la postura, cuando se les compara con gallinas antes de iniciar la postura. Así mismo, se ha observado que la respuesta a estradiol, para incrementar la concentración de receptores a progesterona en el hipotálamo, es mayor en gallinas maduras que en gallinas prepúberes (Kawashima *et al.* 1979a). Por otro lado, Sharp y colaboradores (1992) mostraron que el desarrollo de la fotorrefractoriedad y la recuperación de la respuesta a la fotoestimulación son diferentes en animales de primer ciclo de postura (animales jóvenes) y en animales de segundo ciclo que fueron previamente pelechados. Los hallazgos que tuvimos en nuestros estudios sugieren que las gallinas jóvenes se encuentran más sensibles a la acción hormonal o menos sensibles a los fármacos antagonistas, de modo que resulta difícil bloquear el proceso ovulatorio. Adicionalmente, la recuperación del bloqueo de la ovulación en los primeros días después del tratamiento es más rápida que en las gallinas más jóvenes. Esto sugiere que los animales jóvenes tienen un sistema endocrino más sensible y fino que los animales más maduros.

En conclusión, los estudios realizados demuestran que la testosterona tiene un papel fundamental en el proceso ovulatorio de las gallinas, el cual se debe, en parte, a que tiene una acción estimuladora sobre la producción de progesterona por las células de la granulosa.

REFERENCIAS:

- Armstrong DG & Hogg CO** (1996) Insulin-like growth factor I (IGF-I) and type-I IGF receptor gene expression in the ovary of the laying hen. *Journal of Reproduction and Fertility* **106** 101-106
- Armstrong DG** (1984) Ovarian aromatase activity in the domestic fowl (*Gallus domesticus*). *Journal of Endocrinology* **100** 81-86
- Askew JA, Georgiou GC, Sharp PJ & Lea RW** (1997) Localization of progesterone receptor in brain and pituitary of the ring dove: influence of breeding cycle and estrogen. *Hormones and Behavior* **32** 105-113
- Bacon WL, Proudman JA, Foster DN & Renner PS** (1991) Pattern of secretion of luteinizing hormone and testosterone in the sexual mature turkey. *General and Comparative Endocrinology* **84** 447-460
- Bahr JM & Johnson AL** (1984) Regulation of the follicular hierarchy and ovulation. *Journal Experimental Zoology* **232** 495-500
- Bahr JM, Wang S-C, Huang MY & Calvo FO** (1983) Steroid concentrations in isolated theca and granulosa layers of preovulatory follicles during the ovulatory cycle of the domestic hen. *Biology of Reproduction* **29** 326-334
- Balthazart J & Ball G** (1995) Sexual differentiation of brain and behaviour in birds. *Trends Endocrinol Metab* **6** 21-29
- Balthazart J, Blaustein JD, Cheng MF & Feder HH** (1980) Hormones modulate the concentration of cytoplasmic progestin receptors in the brain of male ring doves (*Streptopelia risoria*). *Journal of Endocrinology* **86** 251-261
- Bernard M, Guerlotte J, Gréve P, Gréchez-Cassiau A, Iuvone MP, Zatz M, Chong NW, Klein D & Voisin P** (1999) Melatonin synthesis pathway: circadian regulation of the genes encoding the Key enzymes in the chicken pineal gland and retina. *Reproduction Nutrition Development* **39** 325-334
- Bridgham JT & Johnson AL** (2002) Avian TVB (DR5-like) death receptor expression in hen ovarian follicles. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **291** 226-232
- Bruggeman V, Van As P & Decuypere E** (2002) Developmental endocrinology of the reproductive axis in the chicken embryo. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A* **131** 839-846
- Calvo FO & Bahr JM** (1983) Adenylyl cyclase system of the small preovulatory follicles of the domestic hen: responsiveness to follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone. *Biology of Reproduction* **29** 542-547
- Campbell BK, Scaramuzzi RJ & Webb R** (1996) Induction and maintenance of oestradiol and immunoreactive inhibin production with FSH by ovine granulosa cells cultured in serum-free media. *Journal of Reproduction and Fertility* **106** 7-16
- Carré-Eusebe D, Oréal E, Clemente N, Rey R, Josso N & Picard JY** (1997) The chick anti-Müllerian hormone gene. In: Perspectives in avian endocrinology. Eds S Harvey & RJ Etches. Ed. Journal of Endocrinology Ltd, Bristol. pp 15-26
- Chen C & Johnson PA** (1997) Expression and regulation of mRNA for inhibin/activin α - and β_A -subunits in the granulosa layer of the two largest

preovulatory follicles during the ovulatory cycle. *General and Comparative Endocrinology* **107** 386-393

Croze F & Etches RJ (1980) The physiological significance of androgen-induced ovulation in the hen. *Journal of Endocrinology* **84** 163-171

Cunningham FJ, Wilson SC, Knight PG & Gladweel RT (1984) Chicken ovulatory cycle. *The Journal of Experimental Zoology* **232** 485-494

Davis AL, Brooks CF & Johnson PA (2001) Activin A gonadotropin regulation of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone receptor messenger RNA in avian granulosa cells. *Biology of Reproduction* **65** 1352-1358

El Halawani ME, Burke WH & Dennison PT (1980) Effect of nest deprivation on serum prolactin level in nesting female turkeys. *Biology of Reproduction* **23** 118-123

Etches RJ (1990) The ovulatory cycle in the hen. *Critical Reviews in poultry biology* **2** 293-313

Etches RJ (1996) Reproduction in poultry. Cab International, Cambridge. 318pag

Etches RJ & Cheng KW (1981) Changes in plasma concentrations of luteinizing hormone, progesterone, oestradiol and testosterone and in the binding of follicle stimulating hormone to the theca of follicles during the ovulation cycle of the hen (*Gallus domesticus*). *Journal of Endocrinology* **91** 11-22

Etches RJ & Cunningham FJ (1976) The interrelationship between progesterone and luteinizing hormone during the ovulatory cycle of the hen (*Gallus domesticus*). *Journal of Endocrinology* **71** 51-58

Etches RJ & Cunningham FJ (1977) The plasma concentrations of testosterone and LH during the ovulatory cycle of the hen (*Gallus domesticus*). *Acta Endocrinologica* **84** 357-366

Fraps RM (1955) Egg production and fertility in poultry. In: Progress in the physiology of farm animals Vol II. Ed. J Hammond Butterworths, London. pp 671-740

Fraser HM & Sharp PJ (1978) Prevention of positive feedback in the hen by antibodies to luteinizing hormone releasing hormone. *Journal of Endocrinology* **76** 181-182

Furr BJ & Smith GK (1975) Effect of antisera against gonadal steroids on ovulation in the hen *Gallus domesticus*. *Journal of Endocrinology* **66** 303-304

Gilbert AB, Perry MM, Waddington D & Hardie MA (1983) Role of atresia in establishing the follicular hierarchy in the ovary of the domestic hen (*Gallus domesticus*). *Journal of Reproduction and Fertility* **69** 221-227

Gómez Y, Velázquez PN, Juárez-Oropeza MA & Pedernera E (1998) Steroid metabolism in granulosa and theca interna cells from preovulatory follicles of domestic hen (*Gallus domesticus*). *Animal Reproduction Science* **52** 81-91

Griffin C, Flouriot G, Sharp PJ, Greene G & Gannon F (2001) Distribution analysis of the two chicken estrogen receptor-alpha isoforms and their transcripts in the hypothalamus and anterior pituitary gland. *Biology of Reproduction* **65** 1156-1163

Gutierrez CG, Campbell BK & Webb R (1997) Development of a long-term bovine granulosa cell culture system: Induction and maintenance of oestradiol

production, response to follicle-stimulating hormone, and morphological characteristic. *Biology of Reproduction* **56** 608-616

Hernandez AG & Bahr JM (2003) Role of FSH and epidermal growth factor (EGF) in the initiation of steroidogenesis in granulosa cells associated with follicular selection in chicken ovaries. *Reproduction* **125** 683-691

Hernández-Vértiz A, González del Pliego M, Velázquez P & Pedernera M (1993) Morphological Changes in the thecal layer during the maturation of the preovulatory ovarian of the domestic fowl (*Gallus domesticus*). *General and Comparative Endocrinology* **92** 80-87

Hertelendy F, Lintner F, Asem EK & Raab B (1982) Sinergistic effect of gonadotropin releasing hormone on LH-stimulated progesterone production in granulosa cells of the domestic fowl (*Gallus domesticus*). *General and Comparative Endocrinology* **48** 117-122

Huang ESR & Nalbandov AV (1979) Steroidogenesis of chicken granulosa and theca cells: *in vitro* incubation system. *Biology of Reproduction* **20** 442-453

Imai K & Nalbandov AV (1978) Plasma and follicular steroid levels of laying hens after the administration of gonadotropins. *Biology of Reproduction* **19** 779-784

Imai K (1973) Effects of avian and mammalian pituitary preparations on induction of ovulation in the domestic fowl, *Gallus domesticus*. *Journal of Reproduction and Fertility* **33** 91-98

Imataka H, Suzuki K, Inano H, Kohmoto K & Tamaoki BI (1989) Biosynthetic pathways of testosterone and estradiol-17 β in slices of the embryonic ovary and testis of the chicken (*Gallus domesticus*). *General and Comparative Endocrinology* **73** 69-79

Jackson JA, Tischkan SA, Zang P & Bahr JM (1994) Plasminogen activator production by the granulosa layer is stimulated by factor(s) produced by the theca layer and inhibited by the luteinizing hormone surge in the chicken. *Biology of Reproduction* **50** 812-819

Jackson JA, Zang P & Bahr JM (1993) Plasminogen activator activity in preovulatory follicles during the ovulatory cycle of the chicken. *Biology of Reproduction* **49** 1141-1146

Johnson AL (1990) Steroidogenesis and actions of steroids in the hen ovary. *Critical Reviews in Poultry Biology* **2** 319-346

Johnson AL (1993) Regulation of follicle differentiation by gonadotropins and growth factor. *Poultry Science* **72** 867-873

Johnson AL (1996) The avian ovarian hierarchy: a balance between follicle differentiation and atresia. *Poultry and Avian Biology Reviews* **7** 99-110

Johnson AL, Bridgham JT & Wagner B (1996) Characterization of chicken luteinizing hormone receptor (cLH-R) complementary deoxyribonucleic acid, and expression of cLH-R messenger ribonucleic acid in the ovary. *Biology of Reproduction* **55** 304-309

Johnson AL & van Tienhoven A (1980) Hypothalamo-hypophyseal sensitivity to hormones in the hen. I. Plasma concentrations of LH, progesterone, and testosterone in response to central injections of progesterone and R5020. *Biology of Reproduction* **23** 910-917

- Johnson AL & van Tienhoven A** (1980a) Plasma concentrations of six steroids and LH during the ovulatory cycle of the hen, *Gallus domesticus*. *Biology of Reproduction* **23** 386-393
- Johnson AL & van Tienhoven A** (1981) Hypothalamo-hypophyseal sensitivity to hormones in the hen. II. Plasma concentrations of LH, progesterone, and testosterone in response to peripheral and central injections of LHRH or testosterone. *Biology of Reproduction* **25** 153-161
- Johnson PA, Green C, Lee HT & Bhar JM** (1988) Inhibition of progesterone secretion from granulosa cells by estradiol and androgens in the domestic hen. *Endocrinology* **123** 473-477
- Johnson PA, Johnson AL & van Tienhoven A** (1985) Evidence for a positive feedback interaction between progesterone and luteinizing hormone in the induction of ovulation in the hen, *Gallus domesticus*. *General and Comparative Endocrinology* **58** 478-485
- Kappauf B & van Tienhoven A** (1972) Progesterone concentrations in peripheral plasma of laying hens in relation to the time of ovulation. *Endocrinology* **90** 1350-1355
- Kawashima M, Inagami M, Kamiyoshi M & Tanaka K** (1978) Effect of testosterone on the cock pituitary *in vitro* leading to the release of gonadotropins. *Japanese Poultry Science* **15** 170-176
- Kawashima M, Kamiyoshi M & Tanaka K** (1978a) A cytoplasmic progesterone receptor in hen pituitary and hypothalamic tissues. *Endocrinology* **102** 1207-1213
- Kawashima M, Kamiyoshi M & Tanaka K** (1979) Cytoplasmic progesterone receptor concentrations in the hen hypothalamus and pituitary: Difference between laying and nonlaying hens and changes during the ovulatory cycle. *Biology of Reproduction* **20** 581-585
- Kawashima M, Kamiyoshi M & Tanaka K** (1979a) Effects of progesterone, estradiol and testosterone on cytoplasmic progesterone receptor concentrations in the hen hypothalamus and pituitary. *Biology of Reproduction* **21** 639-646
- Kawashima M, Kamiyoshi M & Tanaka K** (1987) Presence of estrogen receptors in the hen hypothalamus and pituitary. *Endocrinology* **120** 582-588
- Kawashima M, Kamiyoshi M & Tanaka K** (1989) Presence of androgen receptors in the hen hypothalamus and pituitary. *Acta Endocrinologica* **120** 217-224
- Kawashima M, Kamiyoshi M & Tanaka K** (1993) Estrogen receptor binding in the hen hypothalamus and pituitary during the ovulatory cycle. *Poultry Science* **72** 839-847
- Kawashima M, Kamiyoshi M & Tanaka K** (1994) Changes in progesterone receptor binding of preoptic hypothalamus during an ovulatory cycle of the hen. *Poultry Science* **73** 855-863
- Kawashima M, Takahashi T, Yasuoka T, Kamiyoshi M & Tanaka K** (1995) A vasoactive intestinal peptide binding component in hen granulosa cells (43912). *PSEBM* **209** 387-391
- Kawashima M, Takeo H, Kamiyoshi M & Tanaka K** (1992) Luteinizing hormone-releasing hormone receptor binding of the hen pituitary: differences between

laying and nonlaying hens, effects of ovarian steroid hormones in vivo, and changes during an ovulatory cycle. *Poultry Science* **71** 1079-1086

Kitamura A, Yoshimura Y & Okamoto T (2002) Changes in the populations of mitotic and apoptotic cells in white follicles during atresia in hens. *Poultry Science* **81** 408-413

Kowalski KI, Tilly JL & Johnson AL (1991) Cytochrome P450 side-chain cleavage (P450_{scc}) in the hen ovary: regulation of P450_{scc} messenger RNA levels and steroidogenesis in theca cells of developing follicles. *Biology of Reproduction* **45** 955-966

Lague PC, van Tienhoven A & Cunningham FJ (1975) Concentrations of estrogens, progesterone and LH during the ovulatory cycle of the laying chicken (*Gallus domesticus*). *Biology of Reproduction* **12** 590-598

Lee HT & Bhar JM (1989) Inhibitory sites of androgens and estradiol in progesterone biosynthesis in granulosa cells of the domestic hen. *Endocrinology* **125** 760-765

Lee HT & Bhar JM (1990) Inhibition of the activities of P450 cholesterol side-chain cleavage and 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase and the amount of P450 cholesterol side-chain cleavage by testosterone and estradiol-17 β in progesterone biosynthesis in hen granulosa cells. *Endocrinology* **126** 779-786

Lee KA & Bhar JM (1994) Utilization of substrates for testosterone and estradiol-17 β production by small follicles of the chicken ovary. *Domestic Animal Endocrinology* **11** 307-314

Lee KA, Volentine KK & Bahr JM (1998) Two steroidogenic pathways present in the chicken ovary: theca layer prefers Δ 5 pathway and granulosa layer prefers Δ 4 pathway. *Domestic Animal Endocrinology* **15** 1-8

Li J, Simmons DL & Tsang BK (1996) Regulation of hen granulosa cell prostaglandin production by transforming growth factors during follicular development: involvement of cyclooxygenase II. *Endocrinology* **137** 2522-2529

Li Q, Tamakin L, Levantine P & Ottinger P (1994) Estradiol and androgen modulate chicken luteinizing hormone-releasing hormone-I release *in vitro*. *Biology of Reproduction* **51** 896-903

Li Z & Johnson AL (1993) Regulation of P450 cholesterol side-chain cleavage messenger ribonucleic acid expression and progesterone production in hen granulosa cells. *Biology of Reproduction* **49** 463-469

Lovell TM, Gladwell RT, Cunningham FJ, Groome NP & Knight PG (1998) Differential change in inhibin A, activin A and total α -subunit levels in granulosa and thecal layers of developing preovulatory follicles in the chicken. *Endocrinology* **139** 1164-1171

Lovell TM, Knight PG, Groome NP & Gladwell RT (2001) Changes in plasma inhibin A levels during sexual maturation in the female chicken and the effects of active immunization against inhibin α -subunit on reproductive hormone profile and ovarian function. *Biology of Reproduction* **64** 188-196

Lovell TM, Vanmonfort D, Bruggeman V, Decuypere E, Groome NP, Knight PG & Gladwell RT (2000) Circulating concentrations of inhibin-related proteins

during the ovulatory cycle of the domestic fowl (*Gallus domesticus*) and after induced cessation of egg laying. *Journal of Reproduction and Fertility* **119** 323-328

Luck MR (1982) Effects of an anti-androgen in the laying hen (*Gallus domesticus*). *Journal of Reproduction and Fertility* **64** 381–385

MacLaughlin DT, Hutson JM & Donahoe PK (1983) Specific estradiol binding in embryonic Müllerian ducts: a potential modulator of regression in the male and female chick. *Endocrinology* **113** 141-145

McElroy AP, Caldwell DJ, Proudman JA & Hargis BM (2004) Modulation of in vitro DNA synthesis in the chicken ovarian granulosa cell follicular hierarchy by follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone. *Poultry Science* **83** 500-506

Murayama T, Kawashima M, Takahashi T, Yasuoka T, Kawayama T & Tanaka K (1997) Direct action of melatonin on ovarian granulosa cells to lower responsiveness to luteinizing hormone. *PSEBM* **215** 386-392

Mussche S & D'Herde K (2001) Contribution of progesterone, follicle stimulating hormone and glucocorticoids in survival of serum-free cultured granulosa cell explants. *Journal of Endocrinology* **169** 321-331

Nakamura T, Funabashi M & Tanabe Y (1991) In vitro studies on steroidogenesis in the presence of pregnenolone as precursors by the follicular tissue of the domestic fowl (*Gallus domesticus*). *Journal of Steroid Biochemistry Molecular Biology* **38** 105-110

Nicholls TJ, Goldsmith AR & Dawson A (1988) Photorefractoriness in birds and comparison with mammals. *Physiological Reviews* **68** 133-176

Nitta H, Mason JI & Bahr JM (1993) Localization of 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase in the chicken ovarian follicle shifts from the theca layer to granulosa layer with follicular maturation. *Biology of Reproduction* **48** 110-116

Norman AW & Litwack G (1997) Biosynthesis of Steroids. In *Hormones*, 2nd ed. Eds AW Norman & G Litwack. Academic Press, San Diego. pp 65–74

North MO (1986) Manual de producción avícola. Manual Moderno, 2 ed. Distrito Federal. pp 856

Onagbesan OM, Decuypere E, Leenstra F & Ehlhardt DA (1999a) Differential effects of amount of feeding on cell proliferation and progesterone production in response to gonadotropins and insulin-like growth factor I by ovarian granulosa cells of breeder chickens selected for fatness or leanness. *Journal of Reproduction of Fertility* **116** 73-85

Onagbesan OM, Gullick W, Woolveridge I & Peddie MJ (1994) Immunohistochemical localization of epidermal growth factor receptor, epidermal-growth-factor-like and transforming-growth-factor-alpha-like peptide in chicken ovarian follicles. *Journal of Reproduction of Fertility* **102** 147-153

Onagbesan OM & Peddie MJ (1998) The expression of transforming growth factor alpha receptor protein and its activation in chicken ovarian granulosa cells of maturing follicles. *Histochemical Journal* **30** 647-656

Onagbesan OM, Vleugels B, Buys N, Bruggeman V, Safi M & Decuypere E (1999) Insulin-like growth factors in the regulation of avian ovarian functions. *Domestic Animal Endocrinology* **17** 299-313

- Onagbesan OM, Woolveridge I & Peddie MJ** (1996) Characterization of transforming growth factor- α receptors in the avian ovary: alterations in ligand binding to granulosa cells during follicular maturation. *Journal of Endocrinology* **149** 171-179
- Palmer SS & Bahr JM** (1992) Follicle stimulating hormone increase serum oestradiol-17, number of growing follicles and yolk deposition in aging hens (*Gallus domesticus*) with decreased egg production. *British Poultry Science* **33** 403-414
- Phillips A, Scanes CG & Hahn DW** (1985) Effect of androgens and gonadotrophins on progesterone secretion of chicken granulosa cells. *Comparative Biochemistry and Physiology* **81A** 847-852
- Porter TE, Hargis BM, Silsby JL & El Halawani ME** (1989) Differential steroid production between theca interna and theca externa cell: A three-cell model for follicular steroidogenesis in avian species. *Endocrinology* **125** 109-115
- Ralph CL & Fraps RM** (1960) Induction of ovulation in the hen by injection of progesterone into the brain. *Endocrinology* **66** 269-272
- Rangel PL, Lassala IA & Gutierrez CG** (2005) Testosterone immunization blocks the ovulatory process in laying hens without affecting ovarian follicular development. *Animal Reproduction Science* **86** 143-151
- Rangel PL, Sharp PJ & Gutierrez CG** (2006) Testosterone antagonist flutamide blocks ovulation and preovulatory surges of progesterone, luteinizing hormone and oestradiol in laying hens. *Reproduction* **131** 1109-1114
- Reddy IJ, David CG, Sarma PV & Khub Singh** (2002) The possible role of prolactin in laying performance and steroid hormone secretion in domestic hen (*Gallus domesticus*). *General and Comparative Endocrinology* **127** 249-255
- Richard-Yris MA, Guémené D, Lea RW, Sharp PJ, Bédécarrats G, Forasté M & Wauters AM** (1998) Behaviour and hormone concentrations in nest deprived and nesting hens. *British Poultry Science* **39** 309-317
- Robinson FE & Etches RJ** (1986) Ovarian steroidogenesis during follicular maturation in the domestic fowl (*Gallus domesticus*). *Biology of Reproduction* **35** 1096-1105
- Robinson FE, Etches RJ, Anderson-Langmuir CE, Burke WH, Cheng KW, Cunningham FJ, Ishii S, Sharp PJ & Talbot RT** (1988) Steroidogenic relationships of gonadotrophins hormones in the ovary of the hen (*Gallus domesticus*). *General and Comparative Endocrinology* **69** 455-466
- Rodríguez-Maldonado E, Velásquez PN, Juárez-Oropeza MA & Pedernera E** (1996) Steroid metabolism in theca externa cells from preovulatory follicles of domestic hen (*Gallus domesticus*). *General and Comparative Endocrinology* **101** 173-179
- Rozenboim I, Snapir N, Arnon E, BenAyreh R, Burke WH, Sharp PJ Koch Y & Robinzon B** (1993) Precocious puberty in tamoxifen-treated cockerels: hypothalamic gonadotrophin-releasing hormone-I and plasma luteinizing hormone, prolactin, growth hormone and testosterone. *British Poultry Science* **34** 533-342
- Ruschkowski SR, Robinson FE, Cheng KM & Hart L.E** (1993) Comparison of two multiple blood sampling regimens using an indwelling vascular access device

for investigations of the hen's ovulatory cycle and calcium metabolism. *Poultry Science* **72** 172–184

Safi M, Buys N, Onagbesan OM, Vleugels B & Decuypere E (1998) Quantification of inhibin/activin α and β_A subunit messenger ribonucleic acid by competitive reverse transcription in chicken granulosa cells during follicular development. *Biology of Reproduction* **59** 1047-1054

Sasanami T & Mori M (1999) Effects of oestradiol-17 β and testosterone on progesterone production in the cultured granulosa cells of Japanese quail. *British Poultry Science* **40** 536-540

Sayag N, Snapir N, Robinzon B, Arnon E, El Halawani ME & Grimm VE (1989) Embryonic sex steroids affect mating behaviour and plasma LH in adult chickens. *Physiology and Behaviour* **45** 1107-1112

Scanes CG, Godden PM & Sharp PJ (1977) An homologous radioimmunoassay for chicken follicle-stimulating hormone: observations on the ovulatory cycle. *Journal of Endocrinology* **73** 473-481

Sharp PJ (1993) Photoperiodic control of reproduction in the domestic hen. *Poultry Science* **72** 897-905

Sharp PJ (1996) Strategies in avian breeding cycles. *Animal Reproduction Science* **42** 505-513

Sharp PJ, Dawson A & Lea RW (1998) Control of luteinizing hormone and prolactin secretion in birds. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C* **119** 275-282

Sharp PJ, Dunn IC & Cerolini S (1992) Neuroendocrine control of reduced persistence of egg-laying in domestic hens: evidence for the development of photorefractoriness. *Journal of Reproduction and Fertility* **94** 221–235

Sharp PJ, Dunn IC & Talbot RT (1987) Sex differences in the LH responses to chicken LHRH-I and II in the domestic fowl. *Journal of Endocrinology* **115** 323–331

Sharp PJ & Massa R (1980) Conversion of progesterone to 5 α and 5 β -reduced metabolites in the brain of the hen and its potential role in the induction of the preovulatory release of luteinizing hormone. *Journal of Endocrinology* **86** 459-464

Sharp PJ, Talbot RT, Main GM, Dunn IC, Fraiser HM & Huskisson NS (1990) Physiological roles of chicken LHRH-I and -II in the control of gonadotrophin release in the domestic chicken. *Journal of Endocrinology* **124** 291-299

Sharp PJ, Talbot RT, Sterling RJ & Hall TR (1984) Aspects of the neuroendocrine control of ovulation and broodiness in the domestic chicken. *The Journal of Experimental Zoology* **232** 475-483

Sharp PJ; Talbot RT & Macnamee MC (1989) Evidence for the involvement of dopamine and 5-hydroxytryptamine in the regulation of the preovulatory release of luteinizing hormone in the domestic hen. *General and comparative Endocrinology* **76** 205-213

Sterling RJ & Sharp PJ (1982) The localisation of LH-RH neurones in the diencephalons of the domestic hen. *Cell Tissue Research* **222** 283-298

Sterling RJ, Gasc JM, Sharp PJ, Tuohimaa P & Baulieu EE (1984) Absence of nuclear progesterone receptor in LH releasing hormone neurones in laying hens. *Journal of Endocrinology* **102** R5-R7

Sterling RJ, Gasc JM, Sharp PJ, Renoir JM, Tuohimaa P & Baulieu EE (1987) The distribution of nuclear progesterone receptor in the hypothalamous and forebrain of the domestic hens. *Cell Tissue Research* **248** 201-205

Tilly JL, Kowalski KI & Johnson AL (1991) Stage of ovarian follicular development associated with the initiation of steroidogenic competence in avian granulosa cells. *Biology of Reproduction* **44** 305-314

Tilly JL, Kowalski KI & Johnson AL (1991a) Cytochrome P450 side-chain cleavage (P450scc) in the hen ovary. II. P450scc messenger RNA, immunoreactive protein, and enzyme activity in developing granulosa cells. *Biology of Reproduction* **45** 967-474

Tischkau SA, Jackson JA, Finnigan-Buinick C & Bahr JM (1996) Granulosa layer: primary site of regulation of plasminogen activator messenger ribonucleic acid by luteinizing hormone in the avian ovary. *Biology of Reproduction* **55** 75-79

Toft DO & O'Malley BW (1972) Target tissue receptors for progesterone: the influence of estrogen treatment. *Endocrinology* **90** 1041-1045

Ubuka T, Bentley GE, Ukena K, Wingfield JC & Tsutsui K (2005) Melatonin induces the expression of gonadotropin-inhibitory hormone in th avian brain. *PNAS* **102** 3052-3057

Ubuka T, Sakamoto H, Li D, Ukena K & Tsutsui K (2001) Developmental changes in galanin in lumbosacral sympathetic ganglionic neurons innervating the avian uterine oviduct and galanin induction by sex steroids. *Journal of Endocrinology* **170** 357-368

Vanmonfort D, Berghman LR, Rombauts L, Verhoeven G & Decuyper E (1994) Changes of immunorreactive inhibin, follicle-stimulating hormone, luteinizing hormone and progesterone in plasma after short-term food deprivation and during the ovulatory cycle of the domestic hen. *General and Comparative Endocrinology* **95** 117-124

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

Volantine KK, Yao H & Bahr JM (1998) Epidermal growth factor in the germinal disc and its potential role in follicular development in the chicken. *Biology of Reproduction* **59** 522-526

Walzem RL, Hansen RJ, Williams DL & Hamilton RL (1999) Estrogen induction of VLDL₂ assembly in egg-laying hens. *Journal Nutrition* **129** 467S-472S

Wang SY & Johnson PA (1993) Increase in ovarian α -inhibin gene expression and plasma immunoreactive inhibin level is correlated with a decrease in ovulation rate in the domestic hen. *General and Comparative Endocrinology* **91** 52-58

Williams JB & Sharp PJ (1978) Control of the preovulatory surge of luteinizing hormone in the hen (*Gallus domesticus*): The role of progesterone and androgens. *Journal of Endocrinology* **77** 57-65

- Wilson FE** (1990) Extraocular control of seasonal reproduction in female tree sparrows (*Spizella arborea*). *General and Comparative Endocrinology* **77** 397-402
- Wilson SC & Cunningham FJ** (1984) Endocrine control of the ovulation cycle. In Reproductive biology of poultry Eds FJ Cunningham, PE Lake and D Hewitt. British Poultry Science LTD, Cambridge. pp 29-49
- Wilson SC & Sharp PJ** (1973) Variations in plasma LH levels during the ovulatory cycle of the hen, *Gallus domesticus*. *Journal of Reproduction and Fertility* **35** 561-564
- Wilson SC & Sharp PJ** (1975) Changes in plasma concentrations of LH after injection of progesterone at various times during the ovulatory cycle of the domestic hen (*Gallus domesticus*). *Journal of Endocrinology* **67** 59-70
- Wilson SC & Sharp PJ** (1976) Induction of luteinizing hormone release by gonadal steroids in the ovariectomized domestic hen. *Journal of Endocrinology* **71** 87-98
- Wilson SC & Sharp PJ** (1976a) Effects of androgens, oestrogens and deoxycorticosterone acetate on plasma concentrations of luteinizing hormone in laying hens. *Journal of Endocrinology* **69** 93-102
- Wilson SC, Chairil RA, Cunningham FJ & Gladwell RT** (1990) Changes in the hypothalamic contents of LHRH-I and -II and in pituitary responsiveness to synthetic chicken LHRH-I and -II during the progesterone-induced surge of LH in the laying hen. *Journal of Endocrinology* **127** 487-496
- Wilson SC, Jennings RC & Cunningham FJ** (1983) An investigation of diurnal and cyclic changes in the secretion of luteinizing hormone in the domestic hen. *Journal of Endocrinology* **98** 137-145
- Wodveridge I & Peddie MJ** (1997) The inhibition of androstenedione production in mature thecal cells from the ovary of the domestic hen (*Gallus domesticus*): evidence for the involvement of progestins. *Steroids* **62** 214-220
- Yammamura N, Takeishi M, Goto H, Tagami M, Mizutani T, Miyamoto K, Doi O & Kamiyoshi M** (2001) Expression of messenger RNA for gonadotropin receptor in the granulosa layer during the ovulatory cycle of hens. *Comparative Biochemistry y Physiology* **129** 327-337
- Yoshimura Y & Bahr JM** (1991) Localization of progesterone receptors in pre- and postovulatory follicles of the domestic hen. *Endocrinology* **128** 323-330
- Yoshimura Y, Chang C, Okamoto T & Tamura T** (1993) Immunolocalization of androgen receptor in small preovulatory and postovulatory follicles of laying hens. *General and Comparative Endocrinology* **91** 81-89
- Yoshimura Y, Okamoto T & Tamura T** (1995) Changes in localization of ovarian immunoreactive estrogen receptor during follicular development in hens. *General and Comparative Endocrinology* **100** 368-374
- Yoshimura Y, Okamoto T & Tamura T** (1995a) Effects of luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone on the progesterone receptor induction in chicken granulosa cells *in vivo*. *Poultry Science* **74** 147-151
- You S, Bridgham JT, Foster DN & Johnson AL** (1996) Characterization of the chicken follicle-stimulating hormone receptor (cFSH-R) complementary

deoxyribonucleic acid, and expression of cFSH-R messenger ribonucleic acid in the ovary. *Biology of Reproduction* **55** 1055-1062

Yu MW, Robinson FE & Etches RJ (1992) Quantification of ovarian steroidogenesis in the domestic fowl by incubation of intact large follicles. *Poultry Science* **71** 346-351

Zhang C, Shimada K, Saito N & Kansaku N (1997) Expression of messenger ribonucleic acids of luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone receptors in granulosa and theca layers of chicken preovulatory follicles. *General and Comparative Endocrinology* **105** 402-409