

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA
Y ZOOTECNIA

COMPLEMENTACIÓN ENDOCRINA DE ESTEROIDES GONADALES
PARA LA PROMOCIÓN DEL DESARROLLO FOLICULAR Y LA
OVULACIÓN *IN VIVO* EN GALLINAS DE POSTURA

TESIS
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

MÉDICA VETERINARIA ZOOTECNISTA

PRESENTA

KARINA GUTIÉRREZ SÁNCHEZ

Asesores:

Dra. Lucía Eliana Rangel Porta
Dr. Carlos G. Gutiérrez Aguilar



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.

DEDICATORIA

A mis padres por todo el apoyo que me han dado durante toda mi vida, les estaré eternamente agradecida, y tengan por seguro que haré todo lo posible para que se sientan muy orgullosos de mi. Éste es un logro suyo y mío.

Los quiere Karina.

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer por brindarme parte de su tiempo y de sus conocimientos a la Dra. Lucía Rangel Porta, Dr. Carlos Gutiérrez Aguilar, Dra. Ana Rodríguez Cortes y Dra. Susana Rojas Maya, a mi amiga MVZ Alejandra Sánchez Quintero y a todos los que participaron en el proyecto ya que sin su apoyo no hubiera podido concluir mi trabajo.

CONTENIDO

	Página
RESUMEN.....	1
INTRODUCCIÓN.....	2
MATERIAL Y MÉTODOS.....	8
RESULTADOS.....	12
DISCUSIÓN.....	20
REFERENCIAS.....	25

RESUMEN

GUTIÉRREZ SÁNCHEZ KARINA. Complementación endócrina de esteroides gonadales para la promoción del desarrollo folicular y la ovulación *in vivo* en gallinas de postura (Bajo la dirección de: Dra. Lucía Eliana Rangel Porta y Dr. Carlos G Gutiérrez Aguilar).

Se evaluó la complementación endócrina entre los folículos jerárquicos mayores (28 a 35mm; F1 a F3) y menores (10 a 25mm; F4 a F7) en gallinas de postura. Las gallinas se dividieron en cuatro grupos: control (n=9), control operado (n=8), grupo con folículos F1 al F3 (n=18; ooforectomía de F4 a F6) y grupo con folículos F4 al F6 (n=10; ooforectomía de F1 a F3). Se tomaron muestras de sangre cada 2 horas desde 2 horas postcirugía y hasta la ovoposición. En el grupo con folículos F1 a F3, la remoción de los folículos jerárquicos menores causó la interrupción de la ovulación. En ambos grupos con remoción folicular se causó regresión de los folículos jerárquicos y la postura reinició en 6.5 días sin diferencia entre grupos ($p>0.05$). El pico de estradiol ocurrió en todos los grupos tratados. Por el contrario, en los grupos donde se extrajeron folículos no se presentaron picos de testosterona, progesterona y LH. También se vió que la presentación de los picos de progesterona y LH son dependientes de la presencia del pico de testosterona ($p<0.01$). Se concluye que el pico de estradiol es independiente de la presencia de picos de testosterona, progesterona y LH, sugiriéndose que estradiol no juega un papel directo en el proceso de ovulación. Existe una complementación entre los folículos jerárquicos, para la ocurrencia de los picos preovulatorios de testosterona, progesterona y LH ($p<0.01$). Así mismo, se encontró que la complementación endócrina entre los folículos jerárquicos mantiene el desarrollo folicular y la ovulación.

Introducción

La ovulación de las gallinas está determinada por la interacción entre el ritmo circadiano de secreción hormonal y un sistema fisiológico que controla el desarrollo folicular (1).

El proceso reproductivo en aves domésticas difiere sustancialmente de otros animales domésticos, porque el ave debe ovular un solo óvulo a intervalos frecuentes (2).

En gallinas de postura existen ciclos ovulatorios de 2 a 10 folículos, que se suceden uno tras otro sin interrupción hasta que ocurre un día de no ovulación y pasado este descanso reinician con una nueva serie, durando un ciclo de postura 52 semanas (3). En estos ciclos ovulatorios el intervalo entre ovoposiciones es de 24 a 28 horas (1). Contrariamente, en otras especies de aves una serie ovulatoria puede concluir con la ovulación de solamente uno o dos folículos. Ello plantea la interrogante de si en gallinas se requiere del desarrollo de 5 a 7 folículos jerárquicos, para que se mantenga el desarrollo folicular y se promueva la ovulación.

El ovario de la gallina ponedora contiene 3 grupos foliculares:

- ❖ Folículos pequeños llamados prejerárquicos, los cuales se subdividen en tres subgrupos de acuerdo a su tamaño y color: folículos pequeños blancos (SWF, <1mm), folículos grandes blancos (LWF, 2-5mm) y folículos pequeños amarillos (SYF, 5-10mm) (4).

- ❖ Folículos grandes o jerárquicos, que también son conocidos como preovulatorios. En ésta categoría hay de 5 a 7 folículos con un diámetro de 9 a 35mm. Estos folículos preovulatorios están ordenados jerárquicamente de forma que el folículo más grande (F1) será el primero en ovularse, el segundo más grande (F2) será ovulado al día siguiente, el tercero más grande (F3) se ovulará 2 días después y así sucesivamente (4).
- ❖ Folículos postovulatorios, que son remanentes foliculares de la ovulación (5).

Entre las diferencias de los folículos prejerárquicos y los jerárquicos, se encuentran que los primeros sufren atresia comúnmente (4), que no cuentan con células de la granulosa maduras capaces de secretar progesterona y que secretan grandes cantidades de estradiol (4). Mientras que los folículos jerárquicos ya cuentan con células de la granulosa que activamente secretan progesterona y la capacidad secretora de sus células de la teca disminuye gradualmente (6).

Para la ovulación en las aves, se requiere un aumento en la concentración plasmática de progesterona que estimula la liberación de LH, existiendo entre ambas hormonas un efecto de retroalimentación positiva que dá como resultado la ovulación del folículo preovulatorio (F1) (7). El pico de LH ocurre 6 a 8 horas antes de la ovulación, en forma simultánea al pico de progesterona (7). Adicionalmente, se ha encontrado que la forma en la que la progesterona logra inducir la secreción de LH por la pituitaria anterior es por la estimulación de la liberación de GnRH-I (7,8). Además de las actividades en el proceso ovulatorio, se ha propuesto que la acción de GnRH y gonadotropinas es esencial para la esteroidogénesis, el desarrollo folicular y la maduración de los folículos. Encontrándose que al inyectar

GnRH aumentan los niveles plasmáticos de LH y progesterona e induce una ovulación prematura (9). Así mismo, se ha asociado el incremento de LH con el aumento en las concentraciones de testosterona y estradiol y con cada pico preovulatorio de LH se estimula la esteroidogénesis en cada fase del desarrollo ovárico (5). Palmer y Bahr 1992, encontraron que una inyección de FSH porcina combinada con FSH aviar estimuló significativamente el crecimiento de los folículos pequeños e incrementó la concentración de estrógenos (10). Sin embargo, aunque se ha encontrado que *in vitro* FSH estimula a los folículos pequeños para que secreten estrógenos, LH fue un estimulador más potente de la esteroidogénesis (10). Otras acciones que se han sugerido para FSH son que participa en el crecimiento folicular y en el mantenimiento de la jerarquía folicular, además de que induce el ingreso de los folículos prejerárquicos hacia la categoría de jerárquicos, una vez que han alcanzado un tamaño entre 9 y 10mm (11). Esta entrada a la categoría de folículos jerárquicos es provocado por la proliferación y maduración de las células de la granulosa, la cual consiste en la acumulación de AMPc en las células de la granulosa, y aumento en el funcionamiento del citocromo P450scc (side-chain- cleavage), para la secreción de progesterona (6). Otras funciones de FSH son: aumento en la deposición de yema, disminución de folículos atrésicos y rápido crecimiento de los folículos jerárquicos pequeños (12). Este último efecto sobre los folículos pequeños se evidenció por que una inyección de FSH en gallinas hipofisectomizadas con regresión ovárica, restauró el crecimiento de los folículos pequeños (10).

En cuanto a la secreción de las hormonas esteroides, en aves se ha establecido una teoría de tres células. Esta teoría propone como principal producto de secreción de las células de la granulosa a la progesterona, de las células de la teca interna a la testosterona y de la teca externa al estradiol (13). Adicionalmente, la producción y secreción de las hormonas esteroides varía de acuerdo al tamaño folicular. Así, los folículos jerárquicos secretan esencialmente progesterona y su secreción se va incrementando conforme el folículo aumenta de tamaño, siendo el folículo mayor el responsable de secretar el pico preovulatorio de progesterona (1). Por otro lado, los folículos pequeños producen las mayores cantidades de DHEA, estradiol, androstenediona, y testosterona (5), producción que esta estimulada por la presencia de LH (5). Así mismo, se ha observado que cuando los folículos pequeños comienzan a secuestrar yema su secreción de estrógenos disminuye (14), y que otra fuente importante de estrógenos es el estroma ovárico (15).

Se han propuesto diferentes acciones de los esteroides a nivel ovárico en aves. De la acción de progesterona, por un lado, se ha sugerido que actúa como un factor autócrino/parácrino para la supervivencia de las células de la granulosa aisladas de folículos preovulatorios de codornices japonesas, ya que disminuye el índice de apoptosis de éstas células *in vitro* (16). Sin embargo, en un estudio *in vivo* con codornices japonesas se encontró que inyecciones de progesterona mayores a 30 mg/kg/día de forma continua, incrementaron el número de folículos atrésicos sin causar que el número de folículos jerárquicos se viera afectado, haciendo suponer que la baja en la producción de huevo causada por progesterona, puede deberse a la regresión folicular (17). Con respecto a la acción

del estradiol se ha sugerido que los estrógenos producidos en el ovario tienen, entre otras funciones el papel de sensibilizar al hipotálamo para que sea receptivo a la acción de la progesterona (1). En cuanto a la acción de testosterona, se hizo un trabajo donde al inmunizar gallinas contra testosterona, se encontró que hubo regresión de folículos preovulatorios pero no se afectó el desarrollo folicular (18). Adicionalmente, se ha encontrado que en células de la granulosa de los folículos preovulatorios de gallinas, la testosterona en concentraciones fisiológicas, con o sin LH, estimula la producción de progesterona (19).

Hipótesis

Establecer si en las aves existe una complementación autócrina en el ovario para la producción de las hormonas esteroideas, el desarrollo folicular y la ovulación. Suponiendo que los folículos jerárquicos menores (F4, F5, etc) complementan a los folículos jerárquicos mayores (F1, F2, F3) y viceversa; haciendo por lo tanto necesario que las aves desarrollen un conjunto de folículos jerárquicos para lograr el desarrollo folicular y la ovulación.

Luego entonces, se supone que la remoción de los folículos jerárquicos menores (F4, F5, etc) y por lo tanto la ausencia de su aporte endócrino (E_2 y T) causa la falla en la ovulación, y la regresión de los folículos jerárquicos mayores (F1, F2, F3).

Objetivo

Evaluar *in vivo* la complementación endocrina entre los folículos jerárquicos mayores (28 a 35mm; F1 a F3) y los folículos jerárquicos menores (10 a 25mm; F4 a F7) para mantener el desarrollo folicular y desencadenar la ovulación en gallinas de postura, mediante la remoción folicular.

MATERIAL Y MÉTODOS

El estudio se realizó con gallinas de postura de la línea Hy-line, a mitad de su primer ciclo de postura. Los animales fueron alojados en jaulas individuales con agua y comida a libre acceso, bajo un esquema de 16h luz:8h oscuridad, en el palomar de la FMVZ, UNAM. Diariamente la hora de postura se registró, para estimar la hora de ovulación, considerando que normalmente la ovulación se lleva a cabo 15 a 60 minutos después de ocurrida la ovoposición (3).

Para realizar las cirugías, los animales recibieron anestesia inhalada con halotano a una dosis del 4% para la inducción y del 3% para mantenimiento de la anestesia (20). El retiro de los folículos jerárquicos de las gallinas se hizo mediante la técnica de ooforectomía, que consiste en realizar el retiro de los folículos por una celiotomía lateral izquierda y una retracción lateral y ventral del proventrículo con la finalidad de visualizar y tener acceso al ovario (21). Dichas cirugías se llevaron a cabo en un laboratorio del Departamento de Reproducción.

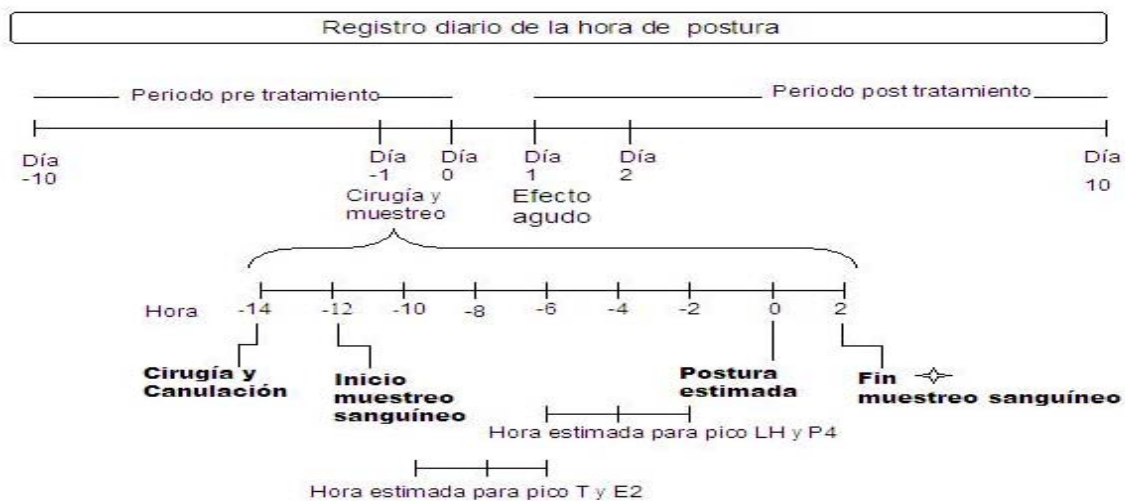
Las gallinas fueron divididas aleatoriamente en cuatro grupos: Grupo control (n=9), animales sin cirugía. Grupo control operado (n=8), se les realizó una laparotomía exploratoria para visualizar el ovario. Grupo con folículos jerárquicos mayores F1 a F3 (n=18), a los animales de este grupo se les retiraron los folículos mayores a 10mm de diámetro, con excepción de los folículos F1, F2 y F3. Grupo con folículos jerárquicos menores F4 a F6 (n=10), a este grupo se le retiraron los folículos F1, F2 y F3.

La figura 1 ejemplifica las actividades realizadas durante el estudio. Brevemente, todas las cirugías se realizaron 14 horas antes de la hora estimada de postura y

simultáneamente los animales fueron canulados en la vena radial del ala según lo descrito por Rangel, *et al*, (2006) (19), para la toma de muestras sanguíneas y la medición de las hormonas esteroideas y de LH.

El muestreo sanguíneo inició 12 horas antes de la hora estimada de postura y finalizó 2 horas después de ocurrida la ovoposición, con intervalos de 2 horas entre cada muestra, sabiendo que un muestreo de estas proporciones no causa daño en los animales ni cambios en las concentraciones hormonales (22). Las muestras se tomaron en tubos Vacutainer de 3ml con heparina sódica y se centrifugaron inmediatamente para separar el plasma y el paquete celular. El paquete celular fue resuspendido en 2.5ml de solución salina estéril con 0.5mg/ml de gentamicina (Bruluart, Tultitlán, Estado de México, México) y almacenado a 4°C, hasta ser reintroducido a la gallina en el siguiente muestreo. Las cánulas se mantuvieron viables con 0.5ml de solución salina heparinizada (50 UI de heparina sódica por ml de Solución Salina, PISA, Guadalajara, Jalisco, México).

Fig 1. Resumen de las actividades realizadas durante el estudio



✦ El muestreo concluyó 2 horas después de la hora de postura estimada si ésta coincidió con la postura real o se adelantó la ovoposición a la cirugía. En los casos en los que la postura se retrazo el sangrado continuó hasta 2 horas después de ocurrida la ovoposición.

Con el objetivo de desnaturalizar a la proteína ligadora que pudo haber estado unida a las hormonas esteroidales, antes de realizar su medición, las muestras fueron diluidas con agua desionizada y calentadas a una temperatura de 60°C por 10 minutos en baño maría, una vez realizado ésto se procedió a utilizar los kits comerciales.

La medición de progesterona y testosterona se hizo por radioinmunoanálisis de fase sólida, con kits comerciales de DPC Coat-a-Count (Diagnostic Products Corporation. Los Ángeles, CA. USA), cuya sensibilidad es de 0.05ng y 0.06ng para testosterona y progesterona respectivamente. Estradiol fue medido por ELISA con el kit comercial Estradiol EIA (International Immuno-Diagnostics, CA. USA) cuya sensibilidad es 5.98 pg. LH se midió en el Reino Unido por el Dr. Peter Sharp en el 60% de las muestras, este ensayo tuvo una sensibilidad de 0.036 ng/ml y se efectuó según el método previamente descrito por el Dr. Sharp y colaboradores (23).

El efecto del tratamiento sobre la ovulación del F1 fue determinado, para los grupos control, control operado y con folículos F1-F3 por la postura de un huevo el día siguiente al muestreo ya que los huevos son puestos aproximadamente 24 horas después de haber ocurrido la ovulación, por el tiempo que tarda el huevo en su formación (1).

El porcentaje de ovoposición fue evaluada antes de la cirugía por la prueba de ji cuadrada, considerando como periodo pre tratamiento 10 días que incluyeron la postura del día de la cirugía. El reinicio de la ovoposición después de las cirugías se analizó por la prueba Kruskal Wallis para determinar las diferencias entre los grupos.

Para determinar la frecuencia de picos de cada hormona, se utilizó la prueba de ji cuadrada; para ello se definió como pico al incremento de la concentración hormonal que correspondió a dos desviaciones estándar por arriba de la media de las cuatro horas precedentes y cuya elevación se mantuvo por lo menos en dos muestras. Los datos hormonales se analizaron por un análisis de varianza para mediciones repetidas donde las variables independientes fueron el tratamiento, la gallina anidada en el tratamiento, el tiempo y la interacción entre el tiempo y el tratamiento para conocer el perfil hormonal. Finalmente, la independencia entre los picos de estradiol, testosterona, progesterona y LH se analizó por ji cuadrada.

RESULTADOS

El porcentaje de postura en los 10 días previos al tratamiento fue 93.81 ± 3.21 y no mostró diferencias ($p > 0.05$) entre grupos.

La cirugía sin la extirpación de los folículos (grupo control operado) no redujo el porcentaje de postura comparado con la postura previa a la cirugía o con el grupo control ($p > 0.05$). En contraste, en los grupos donde se extirparon los folículos F1 a F3 y los folículos F4 a F6, la ovoposición se redujo a cero ($p < 0.01$) el día del efecto agudo.

El grupo control operado continuó ovopositando continuamente en los 13 días posteriores de la cirugía y no mostró una diferencia significativa con respecto a la postura pretratamiento ($p > 0.05$) (Fig 2, panel A). El reinicio de ovulación entre los grupos con folículos F1 a F3 y con folículos F4 a F6 no mostró diferencias entre ambos grupos ($p > 0.05$), siendo 6.9 ± 3.48 días en el grupo con folículos F1 a F3 (Fig. 1, panel B) y 6.1 ± 1.91 días en el grupo con folículos F4 a F6. (Fig. 2, panel C).

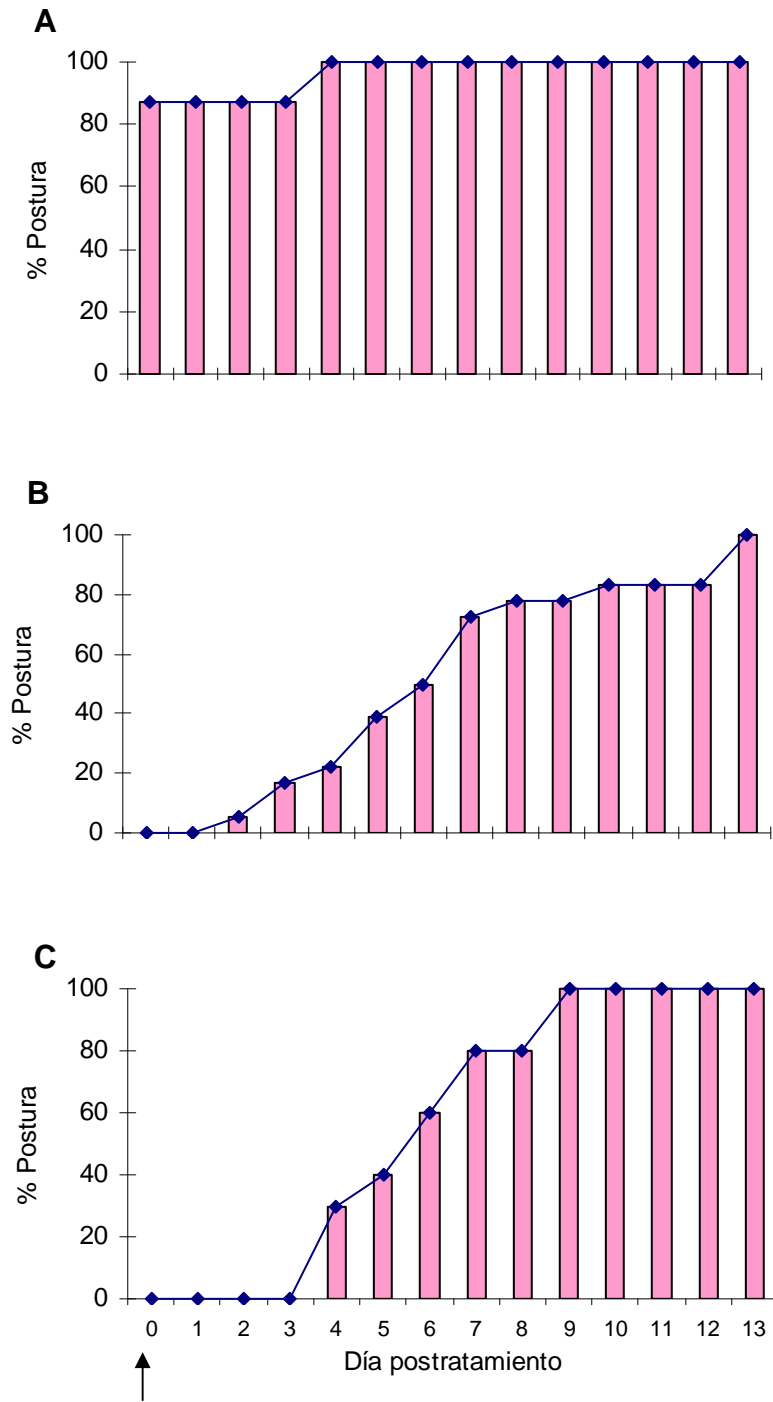


Fig 2. Porcentaje acumulado de postura postratamiento en gallinas, después de la cirugía y la extirpación folicular, donde el panel A corresponde al grupo control operado (n=8) el panel B corresponde al grupo con folículos F1 a F3 (n=18) y el panel C al grupo con folículos F4 a F6 (n=10). La flecha indica el día correspondiente al efecto agudo del tratamiento.

El cuadro 1 muestra la frecuencia de presentación de picos hormonales. Entre los grupos control y control operado en ningún caso se encontraron diferencias estadísticas ($p>0.05$) en la presentación de picos hormonales. Cuando se evaluó la frecuencia de picos entre los grupos que fueron sometidos a la cirugía, el porcentaje de gallinas que presentaron picos de estradiol no difirió entre grupos con ooforectomía y el control operado ($p>0.05$). En contraste, la frecuencia de picos de testosterona, progesterona y LH fueron afectados por la ooforectomía ($p<0.01$). En el caso de testosterona, los grupos a los que se les extrajeron los folículos tuvieron una proporción menor de gallinas que mostraron elevación hormonal en comparación con el grupo control operado ($p<0.01$). Esta misma reducción se observó para progesterona y LH, ya que los grupos donde se retiraron folículos tuvieron significativamente menos picos en comparación con el control operado ($p<0.01$).

Cuadro 1. Porcentaje de presentación de picos de estradiol (E2), testosterona (T), progesterona (P), hormona luteinizante (LH). Letras diferentes en la misma columna muestran diferencia estadística ($p < 0.01$).

Grupo	Pico			
	E2	T	P4	LH
Control (n= 9)	100% a	100% a	100% a	100% a (n= 6)
Control operado (n= 8)	75% a b	87.50% a	75% a	85.71% a (n= 7)
Con folículos F1 a F3 (n= 18)	61.11% b	5.56% b	11.11% b	33.33% b (n= 6)
Con folículos F4 a F6 (n= 10)	60% b	0% b	0% b	0% b (n= 8)

La figura 3 muestra el perfil hormonal que presentaron los diferentes grupos durante este estudio, de los animales que presentaron pico. En aquellos animales que no tuvieron picos, las hormonas se mantuvieron en niveles basales (información no mostrada). Los picos de testosterona y progesterona solo se presentaron en los grupos control y control operado.

La figura 4 muestra el perfil hormonal individual de algunas gallinas en los diferentes tratamientos.

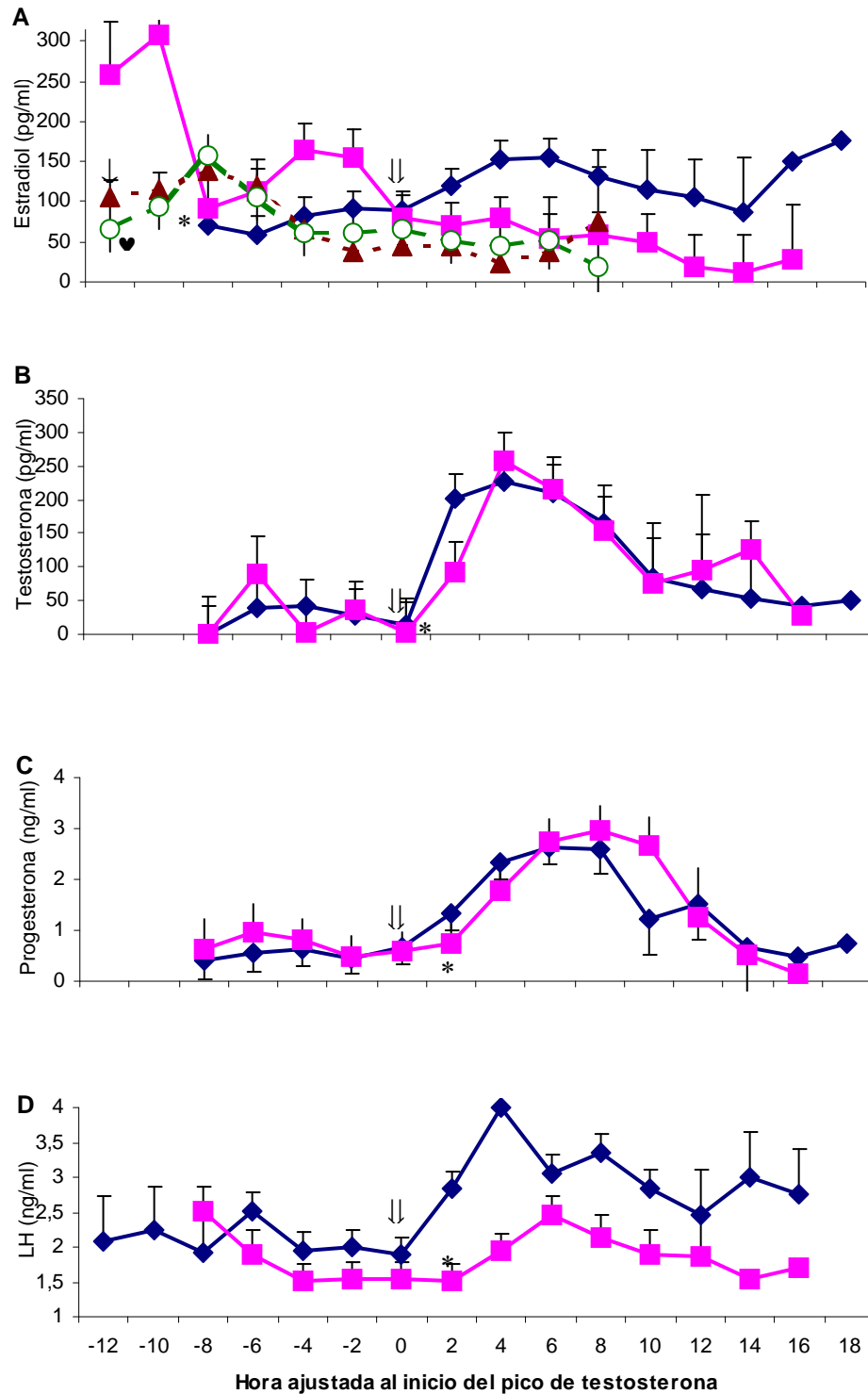


Fig 3. Perfil hormonal de estradiol (panel A), testosterona (panel B), progesterona (panel C) y LH (panel D), en los animales ◆ control, ■ control operado, ▲ con folículos F1 a F3 y ○ con folículos F4 a F6. La hora del muestreo se ajustó al momento de inicio del pico de testosterona (hora 0) y en los grupos donde no hubo pico de testosterona se ajustó en base al momento cuando ocurrió el pico en el grupo control operado. El inicio del pico preovulatorio se indica por: ↓↓ control, * control operado, ↓ con folículos F1 a F3 y ♥ con folículos F4 a F6.

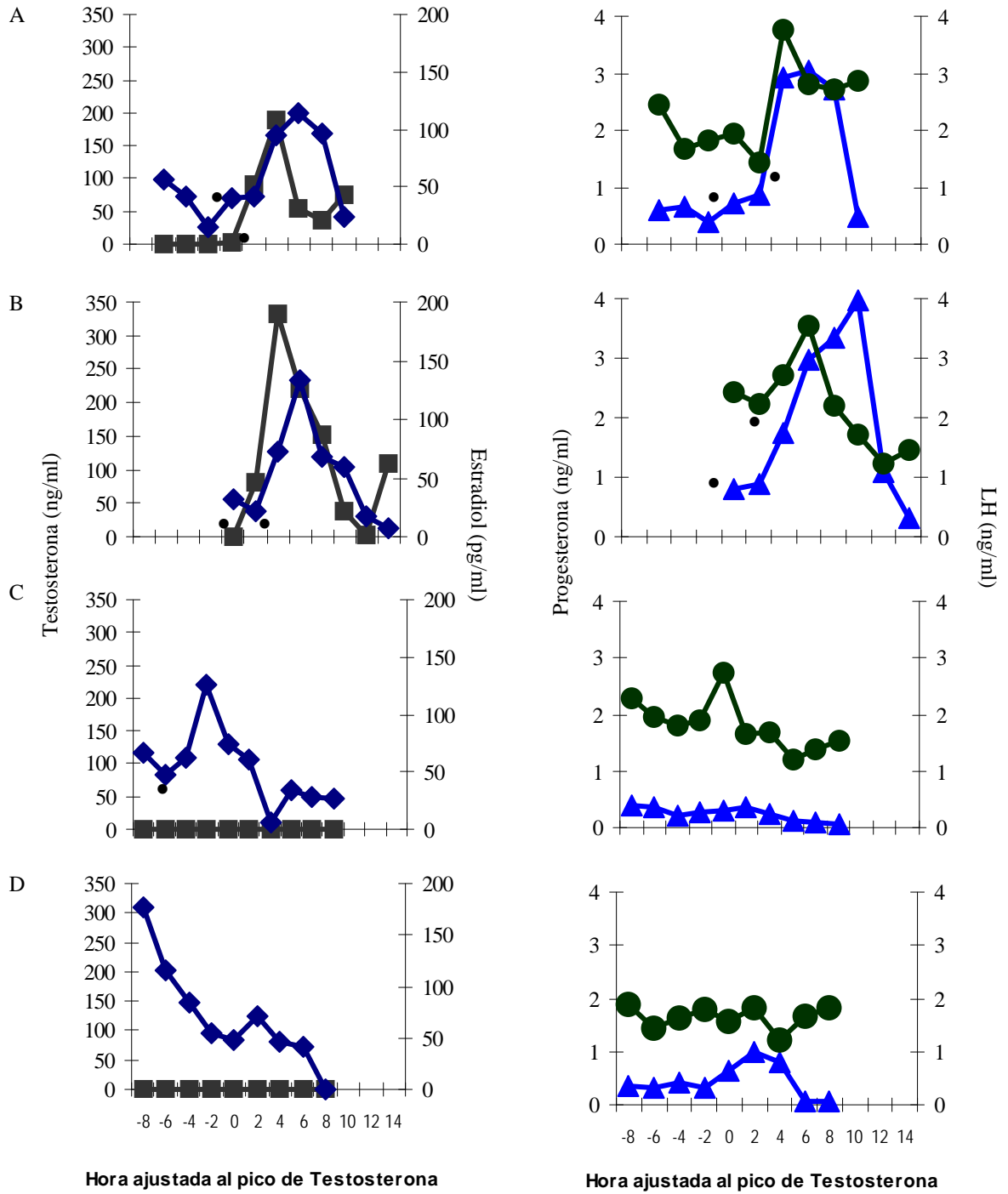


Fig 4. Perfil hormonal individual, grupo control (panel A), control operado (panel B), con folículos F4 a F6 (panel C) y con folículos F1 a F3 (panel D), donde —■— representa testosterona, —◆— estradiol, —▲— progesterona y —●— LH. Indicando el momento donde inicia el pico hormonal con •.

El estudio para saber la complementariedad en la secreción hormonal de las secreciones foliculares por medio del análisis de su dependencia (cuadro 2) mostró que la presentación del pico de testosterona, progesterona y LH fue independiente de la presencia del pico de estradiol ($p>0.05$) ya que si ocurre el pico de estradiol pueden o no suceder los picos de testosterona, progesterona y LH.

Cuadro 2. Dependencia existente entre la presentación del pico de estradiol y los picos de testosterona, progesterona y LH.

Pico Estradiol	Testosterona		Progesterona		LH	
	Si	No	Si	No	Si	No
Si	42.42%	57.58%	45.45%	54.55%	54.55%	45.45%
No	25%	75%	16.67%	83.33%	40%	60%
	$p>0.05$		$p>0.05$		$p>0.05$	

Contrariamente, la relación entre la frecuencia de presentación del pico de testosterona es muy alta con progesterona y LH ($p<0.01$) (cuadro 3) ya que: si ocurre el pico de testosterona ocurren los picos de progesterona y LH, mientras que la ausencia de testosterona, se relaciona con la falta de presentación de los picos de progesterona y LH (cuadro 3).

Cuadro 3. Dependencia existente entre la presentación del pico de testosterona con el de progesterona y el de LH.

		Progesterona		LH	
		Si	No	Si	No
Testosterona	Si	88.24%	11.76%	92.31%	7.69%
	No	7.14%	92.86%	14.29%	85.71%
		p<0.01		p<0.01	

Finalmente, el cuadro 4 muestra que la relación progesterona: LH es altamente significativa ($p<0.01$) y la presencia del pico de una de estas hormonas siempre estuvo asociado a la presencia de la otra.

Cuadro 4. Dependencia existente entre el pico de progesterona y LH

Cuadro 4

		LH	
		Si	No
Progesterona	Si	100%	0%
	No	0%	100%
		p<0.01	

Discusión

El presente estudio mostró que en las gallinas de postura existe una complementación entre los folículos jerárquicos, para la ocurrencia de los picos preovulatorios de testosterona, progesterona y LH, lo cual no ocurre con la presentación del pico de estradiol. Adicionalmente, se comprobó que la presentación de los picos de progesterona y LH son dependientes de la presencia del pico de testosterona.

La alta correlación encontrada entre la presentación del pico preovulatorio de testosterona y el de progesterona concuerda con los resultados encontrados por Rangel y colaboradores (2006) (19) cuando al bloquear el pico preovulatorio de testosterona mediante el empleo de un antagonista específico, bloquearon el incremento de progesterona y LH y por lo tanto la ovulación. Adicionalmente, la testosterona actúa localmente a nivel folicular estimulando la secreción de progesterona a través de las células de la granulosa del folículo preovulatorio más grande F1 (24). Estos resultados sugieren que el incremento preovulatorio de testosterona ocurre gracias a la complementación endócrina entre los folículos jerárquicos mayores (F1 a F3) y menores (F4 a F6) y que su ocurrencia es indispensable para la presentación del pico preovulatorio de progesterona.

Dado que se ha visto que el pico preovulatorio de progesterona tiene un efecto de retroalimentación positiva con el de LH (25), la relación que se observó en la presentación de los picos de testosterona y LH, puede ser indirecta, ya que al no existir el pico de testosterona no se desencadena el pico de progesterona y por lo tanto no se pudo dar el pico de LH. La relación indirecta que pudiera existir entre

testosterona y LH se apoya con lo encontrado por Wilson y Sharp (1976) (26) donde se vió que testosterona no induce directamente la liberación de LH. Por lo que podemos concluir que testosterona interviene en la secreción del pico preovulatorio de progesterona y ésta a su vez en el pico preovulatorio de LH y no ocurre de manera directa una relación entre testosterona y LH.

En cuanto a la ocurrencia del pico de testosterona se ha sugerido que los folículos que secretan más testosterona son los F4 a F2 (27), sin embargo, en ninguno de los grupos con extracción folicular (grupo con folículos F1 a F3 y grupo con folículos F4 a F6) se observó el incremento preovulatorio de testosterona. Nuestros resultados difieren de lo sugerido por Robinson y Etches (1986) donde el folículo F3 es el mayor productor de testosterona (5), ya que en el grupo con folículos F1 a F3 no se presentó el pico de testosterona. Por otro lado, se ha propuesto que LH estimula la esteroidogénesis (4), y es posible que la falta del incremento de LH en ambos grupos haya favorecido la ausencia del pico de testosterona. Nuestros resultados sugieren que la ocurrencia del incremento preovulatorio de testosterona requiere la presencia de todos los folículos jerárquicos y el pico preovulatorio no depende exclusivamente de la secreción de un folículo.

La falta de relación entre la presentación del pico de estradiol y la ovulación mostrada en este estudio concuerda con lo descrito por Laguë (1975), quien encontró que en gallinas la ovulación puede ocurrir independientemente de la presencia o ausencia de un incremento preovulatorio de estradiol (25). Esta evidencia nos ayuda a sugerir que estradiol tiene un papel de largo plazo y no

agudo en el proceso ovulatorio y ello se refuerza por su acción como inductor en la formación de receptores a progesterona a nivel hipotalámico (28).

Por otro lado, los resultados de este estudio en cuanto a la presentación del pico de estradiol nos muestran que este pico preovulatorio no depende de los folículos jerárquicos menores en su totalidad (F4 a F6), ya que el grupo de animales a los que se les retiraron los folículos jerárquicos menores presentaron incremento de estradiol en un 61.11%, esto puede explicarse por los resultados de los estudios de Armstrong (1984) (15) y Porter (13) quienes encontraron que la actividad aromatasa esta concentrada en un 50% en el estroma ovárico y los folículos prejerárquicos (15) y que el 85% del estradiol secretado por el ovario es derivado del estroma ovárico y de los folículos pequeños (4). Adicionalmente, Liu *et al* (2001) (29) mencionan que los folículos prejerárquicos participan en la secreción de estradiol junto con los jerárquicos menores, y se ha propuesto que la producción de estradiol va disminuyendo conforme los folículos crecen y es nula en el folículo preovulatorio (15). Todo lo anterior nos permite suponer que no existe complementación endócrina de estradiol entre los folículos jerárquicos menores y los folículos jerárquicos mayores.

Con respecto a los picos de testosterona, progesterona y LH se observó que la ausencia de los folículos jerárquicos menores disminuyó la ocurrencia de los mismos, sugiriéndose que secreciones de estos folículos son necesarias para la continuación del desarrollo folicular y la ovulación. Podemos mencionar como una secreción importante de estos folículos a activina A (30), de la cual se han sugerido como funciones el mantener viables a los folículos jerárquicos y el intervenir en el reclutamiento folicular (30). Esta evidencia apoyaría la conclusión

de que la ausencia de los folículos jerárquicos menores ocasionó la regresión de los folículos jerárquicos mayores y por consiguiente no se pudo presentar la ocurrencia de los picos de testosterona, progesterona y LH.

El tiempo de reinicio de postura pos tratamiento en el grupo con folículos F1 a F3 nos permite sugerir la ocurrencia de atresia folicular ocasionada por la falta de los folículos jerárquicos complementarios. Lo anterior se apoya por el hecho de que el tiempo promedio que tardaron las gallinas en reiniciar postura (6.9 ± 3.42 días) es similar al tiempo que dura la fase de crecimiento rápido de los folículos, desde que entran a la categoría de jerárquicos hasta la ovulación (7 a 11 días) (4). Podemos sugerir que los folículos jerárquicos mayores requieren de la complementación endócrina de los folículos jerárquicos menores para continuar su desarrollo y ovulación, por lo tanto, sugerimos que la ovulación se recuperó hasta que los nuevos folículos reclutados en la categoría de jerárquicos se desarrollaron.

En cuanto al tiempo de reinicio de postura en el grupo al que se le quitaron los folículos F1 a F3, parece indicar que en este grupo también ocurrió atresia folicular, pues el tiempo no presentó diferencia con el grupo con folículos F1 a F3 (6.9 días para el grupo con folículos F1 a F3 contra 6.1 días del grupo con folículos F4 a F6 respectivamente). Sin embargo, en un estudio previo se observó que la extirpación de los folículos jerárquicos mayores no inhibió el desarrollo de los jerárquicos menores (31), pues al retirar los folículos F1-F4 se interrumpió la postura únicamente por un lapso de 3-4 días. Una posible explicación a lo observado en nuestro trabajo es que la regresión de los folículos jerárquicos menores causada por la remoción de los folículos jerárquicos mayores pudo ser

ocasionada por la abrupta ausencia de progesterona que se ha visto que ayuda a la sobrevivencia celular (16) y la falta de LH que estimula la esteroidogénesis y la maduración folicular (4).

El reinicio de la postura puede explicarse por que al retirar los folículos jerárquicos debió disminuir la concentración de inhibina, y se menciona que existe una correlación negativa entre inhibina y FSH (32). Aunado a esto, IGF-I es secretada por los folículos jerárquicos y promueve la proliferación de las células de la granulosa (33), favoreciendo el reclutamiento folicular de la categoría de prejerárquicos a la de jerárquicos (11), lo que puede explicar que se reiniciará la postura en un periodo promedio de 6.1 a 6.9 días.

Finalmente los resultados de la comparación entre el grupo control y el grupo control operado, tanto de la ovulación, como de los perfiles hormonales nos permiten decir que la cirugía no causó ningún efecto detrimental sobre el ambiente endócrino y la ovulación.

Se puede concluir que, los folículos prejerárquicos aportan el estradiol del incremento preovulatorio, aún con la ausencia de los folículos jerárquicos. Adicionalmente, tanto los folículos jerárquicos mayores como los folículos jerárquicos menores se requieren unos a otros para continuar con su desarrollo. Finalmente, suponemos que para la adecuada secreción de testosterona es necesaria la presencia de todo el rango de folículos jerárquicos en el ovario, al igual que para que se pueda presentar la ovulación ya que al no haber testosterona no hay pico de progesterona y por consiguiente tampoco de LH.

Referencias

- 1) Etches RJ. The Ovulatory Cycle of The Hen. Critical reviews in poultry biology 1990; 2: 293-313.
- 2) Hafez E.S.E, Hafez B. Reproducción e inseminación artificial en animales. 7th ed. Estados Unidos de América: Mc Graw Hill, 2000.
- 3) Etches RJ. Reproduction in Poultry. United Kingdom: CAB International, 1996.
- 4) Johnson AL. Steroidogenesis And Actions of Steroids in The Hen Ovary. Critical reviews in poultry biology 1990; 2: 319- 346.
- 5) Robinson FE, Etches RJ. Ovarian Steroidogenesis during Follicular Maturation in the Domestic Fowl (*Gallus domesticus*). Biol Reprod 1986; 35: 1096-1105.
- 6) Tilly JL, Kowalski KI, Johnson AL. Cytochrome P450 Side-Chain Cleavage (P450scc) in the Hen Ovary. II. P450scc Messenger RNA, Immunoreactive Protein, and Enzyme Activity in Developing Granulosa Cells. Biol Reprod 1991; 45: 967-974.
- 7) Johnston AL, Van Tienhoven A. Hypophyseal Sensitivity to Hormones in the Hen. II Plasma Concentration of LH, Progesterone, and Testosterone. Biol Reprod 1981; 25: 153- 161.
- 8) Johnson PA, Johnson AL, Van Tienhoven A. Evidence for a positive feedback interaction between progesterone and luteinizing hormone in the induction of ovulation in the hen (*Gallus domesticus*) Gen Comp Endocrinol 1985; 58: 478-485.

- 9) Hertelendy F, Linter F, Asem EK, Raab B. Synergistic Effect of Gonadotropin Releasing Hormone on LH-Stimulated Progesterone Production in Granulosa Cells of the Domestic Fowl (*Gallus domesticus*). Gen Comp Endocrinol 1982; 48: 117-122.
- 10) Lee K.A, Bahr J.M. Utilization of substrates for testosterone and Estradiol-17B Production by small follicles of the chicken Ovary. Domest Anim Endocrinol 1994; 11: 307-314.
- 11) Li Z, Johnson AL. Regulation of P450 Cholesterol Side-Chain Cleavage Messenger Ribonucleic Acid Expression and Progesterone Production in Hen Granulosa Cells. Biol Reprod 1993; 49: 463-469.
- 12) Mc Elroy AP, Caldwell DJ, Proudman JA, Hargis. Modulation of In Vitro DNA Synthesis in the Chicken Ovarian Granulosa Cell Follicular Hierarchy by Follicle-Stimulating Hormone and Luteinizing Hormone. Poul Sci 2004; 83: 500-506.
- 13) Porter FE, Hargis BM, Silsby JL, Halawani ME. Differential Steroid Production between Theca Interna and Theca Externa Cells: A Three-Cell Model for Follicular Steroidogenesis in Avian Species. Endocrinology 1989; 125: 109-116.
- 14) Oguike MA, Igboeli G, Ibe SN, Ironkwe MO. Physiological and endocrinological mechanisms associated with ovulatory cycle and induced-moulting in the domestic chicken- a Review. World Poultry Sci J 2005; 61: 625-632.
- 15) Amstrong DG. Ovarian aromatase activity in the domestic fowl. (*Gallus domesticus*). J Endocrinol 1984; 100: 81-86.
- 16) Mussche S, D'Herde K. Contribution of progesterone, follicle stimulating hormone and glucocorticoids in survival of serum-free cultured granulosa cell explants. J Endocrinol 2001; 169: 321-331.

- 17) Liu HK, Bacon WL. Effect of Chronic Progesterone Injection on Egg Production in Japanese Quail. *Poul Sci* 2004; 83: 2051-2058.
- 18) Rangel PL, Lassala A, Gutiérrez CG. Testosterone immunization blocks the ovulatory process in laying hens without affecting ovarian follicular development. *Anim Reprod Sci* 2005; 86: 143-151.
- 19) Rangel PL, Sharp PJ, Gutiérrez CG. Testosterone antagonist (flutamide) blocks ovulation and preovulatory surges of progesterone, luteinizing hormone and oestradiol in laying hens. *Reproduction* 2006; 131: 1109- 1114.
- 20) Carpenter JW. *Exotic Animal Formulary*. 3rd ed. Estados Unidos de América: ELSEVIER SAUNDERS, 2005.
- 21) Ritchie B.W. *Avian Medicine: Principles and applications*. United State of America: Wingers Publishing, 1994.
- 22) Ruschkowski SR, Robinson FE, Cheng KM, Hart LE. Comparison of two multiple blood sampling regimens using an indwelling vascular access device for investigations of the hen's ovulatory cycle and calcium metabolism. *Poul Sci* 1993; 72: 172-184.
- 23) Sharp PJ, Dunn IC, Talbot RT. Sex differences in the LH responses to chicken LHRH-I and II in the domestic fowl. *J Endocrinol* 1987, 115: 323-331.
- 24) Rangel PL, Rodríguez A, Gutiérrez CG. Testosterone directly induces progesterone production and interacts with physiological concentrations of LH to increase granulosa cell progesterone production in laying hens (*Gallus domesticus*). *Anim Reprod Sci* 2007, 102: 56-65.

- 25) Lagüe PC, Van Tienhoven A, Cunningham FJ. Concentration of Estrogens, Progesterone and LH During the Ovulatory Cycle of the Laying Chicken (*Gallus domesticus*). Biol Reprod 1975, 12: 590-598.
- 26) Wilson SC, Sharp PJ. Induction of Luteinizing Hormone Release by Gonadal Steroids in the ovariectomized Domestic Hen. J Endocrinol 1976, 71: 87-98.
- 27) Sechman A, Lakota P, Wojtysiak D, Hrabia A, Mika M, Lisowski M, Czekalski, Rzasa J, Kapkowska E, Bednarczyk M. Sex Steroids Level in Blood Plasma and Ovarian Follicles of the Chimeric Chicken. J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med 2006, 10: 501-508.
- 28) Kawashima M, Kamiyoshi M, Tanaka K. Presence of Estrogen Receptors in the Hen Hypothalamus and Pituitary. Endocrinology 1987, 120: 582-588.
- 29) Liu HK, Long DW, Bacon WL. Concentration Change Patterns of Luteinizing Hormone and Progesterone and Distribution of Hierarchical Follicles in Normal and Arrested Laying Turkey Hens. Poul Sci 2001, 80: 1509-1518.
- 30) Lovell TM, Gladwell RT, Cunningham FJ, Groome NP, Knight PG. Differential Changes in Inhibin α , Activin α , and Total α Subunit Levels in Granulosa and Theca Layers of Developing Preovulatory Follicles in the Chicken. Endocrinology 1998, 139: 1164-1171.
- 31) Johnson PA, Shu-Yin W, Brooks C. Characterization of Source and Levels of Plasma Immunoreactive Inhibin during the Ovulatory Cycle of the Domestic Hen. Biol Reprod 1993, 48: 262-267.

32) Lovell TM, Knight PG, Groome NP, Gladwell RT. Changes in plasma Inhibin A During Sexual Maturation in the Female Chicken and the Effects of Active Immunization Against Inhibin α Subunit on Reproductive Hormone Profiles and Ovarian Function. *Biol Reprod* 2001, 64: 188-196.

33) Onagbesan GM, Decuypere E, Leenstra F, Ehlhardt DA. Differential effects of amounts of feeding on cell proliferation and progesterone production in response to gonadotrophins and insulin like growth factor I by ovarian granulosa cell of broilers breeder chickens selected for fatness or leanness. *J Reprod Fertil* 1999, 116: 73-85.