

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

DESARROLLO FOLICULAR EN PALOMAS MENSAJERAS
(*Columba livia*) Y SU CORRELACION CON PROGESTERONA,
TESTOSTERONA Y ESTRADIOL EN SUERO Y HECES.

TESIS
PARA OBTENER EL TITULO DE

MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

PRESENTA

JOAQUIN QUINTANA ROMERO

ASESORES:

MVZ LUCÍA E. RANGEL PORTA
MVZ CARLOS GUTIÉRREZ AGUILAR

México D.F.

2010



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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 toda mi familia y amigos por estar a mi lado y darme su apoyo, y muy en especial a mis padres por todos los sacrificios que hicieron hacia mi persona para poder obtener este logro.

AGRADECIMIENTOS

A la UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO por darme la oportunidad de forjarme en sus aulas y hacer de mi un profesional.

A mis padres por estar a mi lado siempre que los necesite gracias por su cariño y comprensión.

Rafael por ser mi hermano y mi compañero de muchas aventuras a lo largo de mi vida.

Mis abuelos maternos y paternos (†) porque desde niño me criaron y mucho de lo que soy se lo debo a ellos gracias.

Cynthia por estar a mi lado gran parte de la carrera y darme su cariño espero no defraudarte.

A todos mis tíos por sus consejos y ayuda que me brindaron en mi vida estudiantil.

A mis primas y primos porque sin en realidad yo pude ustedes también pueden.

Dra. Lucy gracias por permitirme realizar este trabajo.

A las personas que sin su ayuda no seria posible realizar este trabajo: Dra. Anita, Dr. Mario, Dra. Susi y Dr. Carlos, Gracias.

A mis grandes amigos: Jorge, Memo, Héctor, Esther, Diego y Maru por permitirme conocerlos y regalarme su amistad.

Un agradecimiento muy especial a todas las palomas que fueron parte muy importante en este trabajo y demostrarme lo hermosas que son.

CONTENIDO

	Pagina
RESUMEN	1
1. INTRODUCCION	2
2. REVISION DE LITERATURA	2
2.1 Fotoperiodo.....	3
2.2 Estructuras ováricas.....	4
2.3 Control neuroendocrino del desarrollo folicular y la ovulación.....	6
2.4 Esteroidogénesis.....	7
2.5 Progesterona.....	8
2.6 Estrógenos.....	8
2.7 Andrógenos.....	9
3. HIPOTESIS	10
4. MATERIAL Y MÉTODOS	11
4.1 Animales.....	11
4.2 Procedimiento.....	11
4.3 Toma de muestras.....	12
4.4 Análisis Hormonal.....	13
4.5 Enzimoinmunoensayo (ELISA).....	14
5. ANALISIS ESTADISTICO	16
6. RESULTADOS	17
7. DISCUSIÓN	20
8. CONCLUSIONES	23

9. REFERENCIAS.....	24
INDICE DE FIGURAS Y CUADROS.	
Figura 1. Etapas en el desarrollo folicular del ovario en gallina.....	5
Figura 2. Esquema del folículo grande amarillo con sus estructuras....	6
Figura 3. Diseño experimental para la evaluación de la actividad reproductiva antes y después de la ovulación.....	12
Cuadro 1. Sensibilidad y Coeficiente de variación (CV) de las pruebas de ELISA para cada hormona. P ₄ =progesterona, T=testosterona, E ₂ =estradiol.....	15
Grafica 1. Concentraciones hormonales por paloma de progesterona, testosterona y Estradiol en los diferentes días del ciclo ovulatorio.....	18
Cuadro 2. Correlaciones entre las concentraciones hormonales en suero, en heces y el desarrollo folicular en palomas. Valores en negro presentan correlaciones significativas (p<0.05), P ₄ =progesterona, T=testosterona, E ₂ =estradiol, FGB=folículos grandes blancos, FPA=folículos pequeños amarillos y FGA=folículos grandes amarillos...	19

RESUMEN

QUINTANA ROMERO JOAQUIN. Desarrollo folicular en palomas (*Columba livia*) y su relación con los niveles hormonales de progesterona, estradiol y testosterona en sangre y heces. (Asesores: Dra. Lucía E. Rangel Porta y Dr. Carlos Gutiérrez Aguilar).

El presente estudio tuvo como objetivo determinar el crecimiento folicular en palomas (*Columba livia*) y relacionarlo con los patrones de secreción de las hormonas esteroides en sangre y heces, utilizando una muestra por animal. Se emplearon 36 hembras de palomas mensajeras que previamente hubieran tenido una nidada. Las palomas fueron aisladas en jaulas individuales por un periodo de 15 días. Una vez que no estuvieran ovulando se introdujo un macho por jaula para estimular el desarrollo folicular y la ovulación. Simultáneamente se inicio la toma de muestras sanguíneas y de heces, así como el sacrificio de 3 animales por día, para identificar las estructuras ováricas por observación directa de los ovarios y medición de los folículos. Para medir la relación existente entre las hormonas esteroides y la cantidad de folículos se utilizó la correlación de Pearson. Los resultados muestran una correlación positiva entre progesterona y testosterona, tanto en suero como en heces. Por su parte estradiol en sangre presentó una correlación positiva con el número de los folículos pequeños amarillos y folículos grandes blancos mostrando que ambos folículos son necesarios para la síntesis y producción de esta hormona. Contrariamente, hubo una correlación negativa, aunque no significativa, entre estradiol y progesterona, sugiriendo que el incremento de una hormona causa el decremento en la otra. Finalmente, se observó gran variación en las concentraciones hormonales con respecto al día del desarrollo folicular, sugiriéndose la necesidad de realizar mediciones repetidas para poder estimar el estado de desarrollo folicular mediante los niveles circulantes y excretados de las hormonas esteroides en las aves.

1. INTRODUCCIÓN

La mayoría de la información sobre la fisiología reproductiva de las aves tiene sus bases en estudios realizados en gallinas, pavos y codornices. Sin embargo dichas especies tienen en común presentar una acción reproductiva casi todo el año, caracterizada por ciclos ovulatorios de 3 a 10 huevos consecutivos seguidos por un día de no postura y reinicio de un nuevo ciclo (Etches; 1990). Esta actividad reproductiva difiere con algunas especies de aves en las que hay épocas reproductivas limitadas en el año y que pueden presentar la ovulación de solo 1 ó 2 huevos por ciclo ovulatorio. Ello nos plantea la interrogante de si en especies que ovulan únicamente 2 huevos los patrones de secreción de las hormonas esteroides son similares a los de las gallinas y si estos pueden ayudar a estimar el desarrollo folicular y la ovulación.

2. REVISION DE LITERATURA

La paloma mensajera pertenece a la familia *Columbidae* y es un ave originaria de África, que era utilizada por los faraones egipcios para comunicarse (Martínez; 1991). Son animales monógamos de hábitos diurnos, que pueden estar solas o en parvadas, y que tienen un promedio de vida de 10 años (Del Hoyo; 1997). La más importante diferencia con el resto de las palomas es su capacidad de orientación, la cual le permite regresar a su palomar desde una distancia de 800 km a una velocidad de 90 km/hora (Martínez; 1991).

Esta especie pone solo 2 huevos (39mm de longitud) por ciclo ovulatorio, siendo el tiempo promedio de postura entre un huevo y otro, de 40 a 44 horas (Sturkie's; 2000). Los machos y hembras ayudan a la construcción del nido para que posteriormente presenten una incubación de 17 a 18 días (Del Hoyo; 1997). Cuando los huevos son retirados prematuramente del nido el intervalo de una postura a otra es de 10 días alargándose en las épocas no reproductivas (Askew; 1997).

Dentro de los primeros 5 días de vida los recién nacidos son alimentados con una sustancia lechosa que sus padres forman en el buche (leche de paloma) para luego pasar a una alimentación sólida a base de granos, los pichones son asistidos por sus padres hasta cerca de los 30 días. Salen del nido entre los 35 ó 37 días de edad y alcanzan la madurez sexual a los 6 meses (Askew; 1997).

2.1 Fotoperiodo

Las palomas son animales estacionales cuyo ciclo reproductivo se restringe a la primavera y el verano (Chemineau; 1986, Etches; 1993), siendo la luz el estímulo ambiental principal para que se manifieste la actividad reproductiva, al favorecer la secreción de GnRH y por tanto el desarrollo folicular y la ovulación (Hill; 1979). Al igual que en otras especies estacionales, esta restricción de la época reproductiva se acentúa en las regiones más alejadas del Ecuador, sin embargo, debe considerarse que en el Ecuador muchas de las aves de vida libre dependen de otras condiciones como son la disponibilidad de alimentos y de el clima favorable (Pankhurs; 1989).

En aves que están bajo un ambiente controlado como es el caso de las gallinas de postura, se han manejado esquemas de 16 a 18 horas de luz por 8 a 6 horas de obscuridad, con la finalidad de estimular el incremento en la producción de huevo (Etches; 1996). Sin embargo se ha demostrado que en aves principalmente migratorias, los días largos pueden ser inhibitorios al final de la época reproductiva debido a un efecto llamado fotorefractariedad, el cual ocasiona la disminución de la secreción de GnRH y por consecuencia la regresión ovárica (Sharp; 1993).

Por ultimo, se han estudiado algunos factores que son importantes para que ocurra la ovulación, entre los cuales se menciona la presencia y el canto del macho, así como la convivencia de otras hembras estimuladas por éste (Barfield; 1971). Además, las palomas hembras que fueron expuestas al comportamiento de cortejo de machos sin castrar, mostraron un desarrollo completo de los ovarios, mientras que la exposición a animales castrados no estimuló el desarrollo (Erickson; 1970).

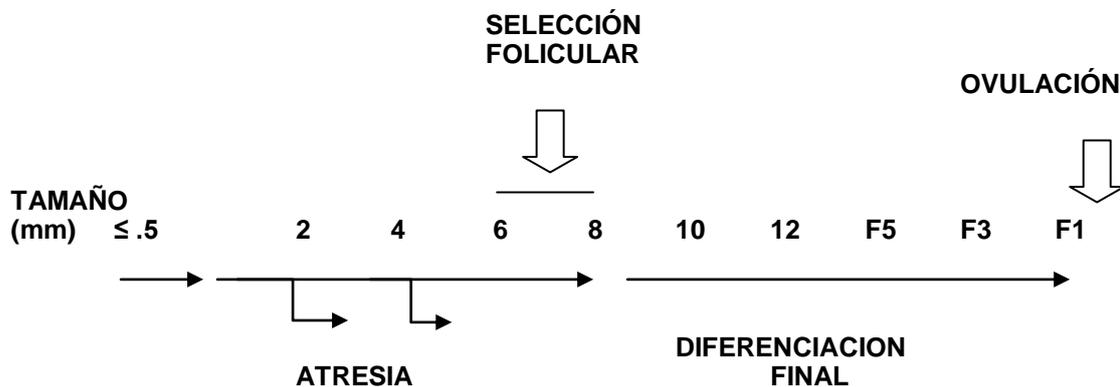
2.2 Estructuras ováricas

Las palomas, como la mayoría de las aves, únicamente desarrollan el ovario y el oviducto izquierdos durante la fase embrionaria, como una respuesta a la hormona inhibidora de los conductos de Müller (AMH) (Carre-Eusebe *et al*;

1997). Sin embargo en 5% de las palomas y en los pericos pueden desarrollarse ambos ovarios (Sturkie`s; 2000).

Una vez alcanzada la etapa reproductiva la apariencia del ovario es de racimo de uvas. En gallinas el ovario recibe irrigación de la arteria ovárica y es innervado por las fibras colinérgicas y adrenérgicas (Gilbert; 1969). Antes de la madurez sexual el ovario presenta folículos pequeños (<2000 folículos) que se pueden localizar a simple vista, de los cuales una pequeña cantidad (250 a 500 folículos) madurarán y serán ovulados (Sturkie`s; 2000). En gallinas una vez que los folículos alcanzan los 6-8mm serán reclutados para entrar a la categoría de folículos jerárquicos, en la cual normalmente hay entre 5 y 7 folículos (Sturkie`s; 2000). El desarrollo de un folículo desde que entra a esta categoría, hasta que ocurre la ovulación, dura aproximadamente 7 a 9 días (Figura 1) antes de ser ovulado, por tanto aumenta su tamaño de 8mm a 40mm los últimos 6-8 días antes de la ovulación (Johnson; 1996). Mientras que en palomas se menciona un crecimiento de 5 mm a 16 mm en un periodo de 5 a 7 días antes de la ovulación y solamente se reclutarán 2 folículos en la categoría de jerárquicos (Cuthbert; 1945).

Figura 1. Etapas en el desarrollo folicular del ovario en gallina. Adaptado de Johnson; (1993)



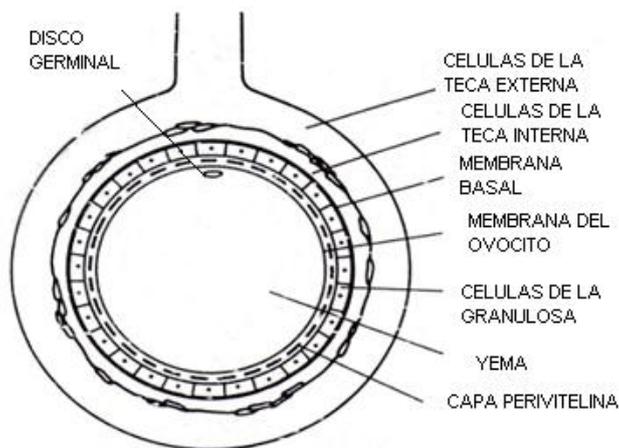
Los folículos ováricos según su tamaño y madurez se dividen en folículos prejerárquicos y folículos jerárquicos, los cuales tienen la capacidad de secretar hormonas esteroides. En gallinas estos folículos están clasificados como (Johnson; 1990):

- ❖ Folículos pequeños blancos (menor a 2 mm)
 - ❖ Folículos grandes blancos (2 – 4 mm)
 - ❖ Folículos pequeños amarillos (5 – 10 mm)
 - ❖ Folículos grandes amarillos (>10 mm)
- } Folículos prejerárquicos
 ⇨ Folículos jerárquicos

En palomas no se ha determinado una clasificación en el tamaño folicular dado que en este aspecto ha sido poco estudiado y no se han encontrado referencias exactas sobre su clasificación.

El folículo ovárico consta de algunas capas de tejido que rodean al ovocito y la yema, las cuales se representan en la figura 2. Mostrando la presencia de una capa de células de la granulosa, la cual es rodeada por una membrana basal seguida de tejido de la teca interna y de la teca externa que contiene células esteroideogénicas (Etches; 1996).

Figura 2. Esquema del folículo grande amarillo con sus estructuras. Adaptado de Sturkie`s; (2000)



2.3 Control neuroendocrino del desarrollo folicular y la ovulación

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

El hipotálamo secreta la GnRH-I (Hormona liberadora de gonadotropinas), la cual promueve la liberación de la hormona luteinizante (LH) y la hormona folículo estimulante (FSH) por la adenohipofisis (Sturkie`s; 2000).

La secreción de LH causada por la GnRH es resultado de la retroalimentación positiva ejercida por la Progesterona (P_4) (Sharp *et al*; 1998, Johnson *et al*; 1985). La LH sirve para estimular la producción de los esteroides foliculares, (Etches; 1996) y su función principal es inducir la ovulación (Wilson y Cunningham; 1984), Ocurriendo el pico preovulatorio 4 a 6 hrs antes de la ovulación (Armstrong; 1985). Algunos trabajos mencionan un aumento adicional 14 a 11 horas antes de la ovulación (Etches y Cheng; 1981). Adicionalmente, el tratamiento de LH 14 a 11 horas antes de la 1ª ovulación de una secuencia resulta en una ovulación prematura (Gilbert; 1981).

Por otro lado, la FSH parece no presentar incrementos significativos durante el ciclo ovulatorio (Lovell *et al*; 2000), detectándose elevaciones menores 14 a 15 horas antes de la ovulación (Scanes *et al*; 1977). Sin embargo, en un estudio realizado por Imai y Nalbandov (1978) se encontró que la FSH aplicada 14 horas antes de la ovulación aceleró la esteroidogénesis en la pared folicular, pero no causó un aumento en las concentraciones de las hormonas esteroideas en la circulación general. Tilly *et al* (1991), así como Li y Johnson (1993), consideran que la FSH es un factor primario para iniciar la esteroidogénesis por las células de la granulosa ya que estas células de los folículos prejerarquicos no responden a la LH. Adicionalmente, se ha propuesto que FSH recluta y promueve el crecimiento de los folículos pequeños (Imai; 1973, Palmer y Bahr; 1992), induce la maduración de los folículos pequeños (Bahr y Johnson; 1984, Zhang *et al*; 1997) y la diferenciación de las células de la granulosa (Johnson; 1996, Zhang *et al*; 1997). Así mismo, FSH es la hormona responsable de la entrada de los folículos a la jerarquía folicular (Tilly *et al*; 1991, Li y Johnson; 1993) y estimula la proliferación de las células de la granulosa posiblemente contribuyendo al crecimiento folicular (Velázquez *et al*; 1997, McElroy *et al*; 2004).

2.4 Esteroidogénesis

El paso inicial para que el colesterol sea transformado en un esteroide, es convertirlo en pregnenolona, esta reacción es producida por un sistema enzimático llamado citocromo P-450 desmolasa (sc) (Strauss *et al*; 1981). A

su vez, la pregnenolona es la llave esteroidogénica de todas las clases de esteroides producidos por los folículos (Hall; 1984). En aves la producción de las hormonas esteroides puede explicarse por una teoría de 3 células, donde la Progesterona es secretada principalmente por las células de la granulosa, la Testosterona por las células de la teca interna y Estradiol por las células de la teca externa (Porter; 1989).

Adicionalmente, la secreción de las hormonas esteroides en aves varía de acuerdo al estado de desarrollo y madurez folicular. Así, los folículos pequeños blancos (FPB) y los folículos grandes blancos (FGB) producen andrógenos como precursores para que los folículos pequeños amarillos (FPA) produzcan estradiol (Robinson y Etches; 1986, Armstrong; 1984). Por otro lado, se ha visto que la capacidad de los folículos prejerárquicos para producir E_2 disminuye cuando entran a la categoría de jerárquicos, siendo casi nula cuando se aproxima la ovulación (Bahr *et al*; 1984).

En los folículos jerárquicos o en los folículos grandes amarillos (FGA), la progesterona es producida por la capa de la granulosa, representando la principal hormona secretada que resulta en el pico preovulatorio de progesterona. Además, en estos folículos jerárquicos la producción de esteroides por las células de la granulosa y de la teca están bajo el control de la LH que actúa vía adenilato ciclasa/cAMP segundo mensajero (Bahr y Calvo; 1984).

2.5 Progesterona

La P_4 es producida por las células de la granulosa de los folículos jerárquicos (FGA), en respuesta a la oleada preovulatoria de LH (Robinson y Etches; 1986). A su vez el incremento en la concentración plasmática de la P_4 aumenta la secreción de GnRH dentro del sistema hipotálamo-pituitario-gonadal (Etches; 1990), permitiendo un aumento en la secreción de LH por lo que se establece un mecanismo de retroalimentación positiva entre ambas hormonas (Johnson *et al*; 1985). Por otro lado, las máximas concentraciones de P_4 se observan 4 a 6hrs antes de la ovulación (Kappauf y Van Tienhoven; 1972).

Adicionalmente, diversos estudios han propuesto que la testosterona puede estimular la producción de progesterona tanto *in vivo* (Rangel *et al*; 2006a) como *in vitro* (Sasanami y Mori; 1999). Además, existen receptores de esta hormona en las células de la granulosa, de la teca y en las células epiteliales germinales de los folículos jerárquicos (Isola *et al*; 1987, Yoshimura and Bahr; 1991).

2.6 Estrógenos

Los principales estrógenos que han sido aislados de los ovarios y de las heces de gallinas son el 17 β -estradiol y la estrona (Johnson; 1990). Las concentraciones de E₂ presentan un primer incremento 18 a 20 hrs (Wilson y Cunningham; 1984) y un pico máximo 8 a 10 hrs antes de la ovulación (Johnson y Van Tienhoven; 1980). Sin embargo, se ha visto que la ovulación puede ocurrir en ausencia del incremento plasmático de estrógenos (Lague *et al*; 1975), y se ha propuesto que éstos actúan a nivel de hipotálamo para sensibilizar a P₄ (Wilson y Sharp; 1976).

Por otro lado, los estrógenos participan en la regulación del metabolismo del calcio para la formación de la cáscara, en la inducción de sus propios receptores en oviducto, y en la inducción de receptores de progesterona en el ovario y en el tracto reproductivo (Pageaux *et al*; 1983, Isola *et al*; 1987).

2.7 Andrógenos

Los andrógenos más importantes son la 5 α -dehidrotestosterona (DHT) y la testosterona, que son producidos por la teca interna de los folículos prejerárquicos y jerárquicos, alcanzando su máxima producción en el folículo F4 de gallinas (Short; 1960). La testosterona presenta dos incrementos preovulatorios, el primero 14 a 12 horas (Wilson y Cunningham; 1984), y el segundo, y más significativo, 8 a 10 horas (Johnson y Van Tienhoven; 1980).

El papel que juegan los andrógenos en el control neuroendocrino es poco conocido, pero se ha determinado que la ovulación puede ser inducida por inyecciones de andrógenos (Wilson y Sharp; 1973). Sin embargo, las concentraciones plasmáticas de este esteroide necesario para inducir la ovulación son más altas que las normales, lo que sugiere que es más un efecto

farmacológico que fisiológico (Sturkie`s; 2000). A pesar de ello, la administración *in vivo* de suero antitestosterona o de un antagonista de testosterona bloquean la ovulación (Rangel *et al*; 2005, Rangel *et al*; 2006b), mientras que el tratamiento con testosterona promueve la ovulación *in vitro* (Tanaka e Inoue; 1990), todo lo cual sugiere un efecto directo de la testosterona en el proceso ovulatorio de las aves.

3. HIPÓTESIS

Las concentraciones de progesterona, testosterona y estradiol en sangre y heces de palomas están correlacionadas entre sí y con el grado de desarrollo folicular, pudiendo servir como estimadores del momento de la ovulación.

4. MATERIAL Y MÉTODOS

Esta investigación se realizó en el Departamento de Reproducción de la Facultad de Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México.

4.1 Animales

Se utilizaron 36 hembras de palomas mensajeras de la raza JANSSEN con una edad aproximada de 24 meses y con al menos una nidada previa al estudio. Para que las palomas no se encontrarán en fase reproductiva, a pesar de que el trabajo se realizó en primavera, las hembras se aislaron de los machos 21 días antes del inicio del experimento; alojándolas individualmente en nidos de madera con las siguientes dimensiones: largo 60 cm, alto 30 cm y ancho 30cm.

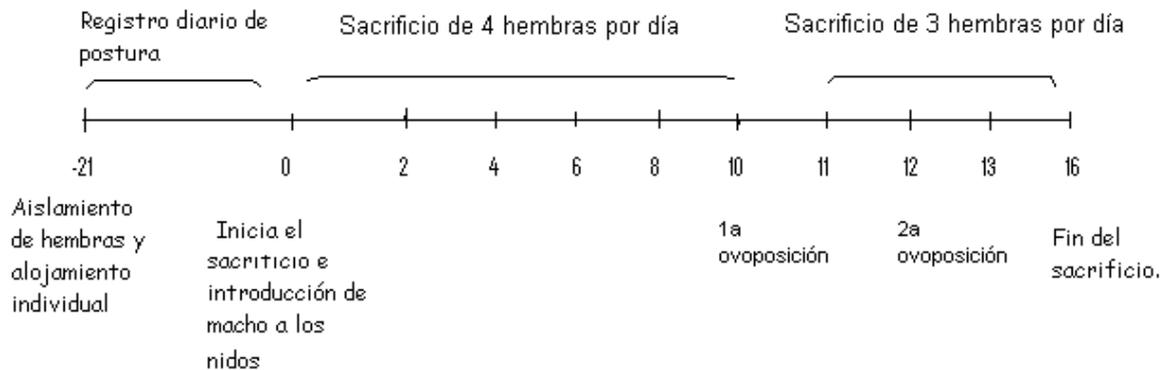
Los animales recibieron alimento y agua a libre acceso, y diariamente se les cambió la cama de los nidos y se revisó la postura. Las condiciones de alojamiento y manejo fueron congruentes con los lineamientos establecidos por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio (CICUAE).

Una vez que se comprobó que las hembras no presentaban ovulación y postura por lo menos durante 15 días, se inició el estudio.

4.2 Procedimiento

Dado que la paloma tiene un promedio de 10 días de desarrollo folicular antes de que ocurra la postura (Askew; 1997).El experimento se inicio con los muestreos en el día 0, que también correspondió al día de la introducción de los machos (uno al azar a cada nido). Este manejo se realizó para estimular la actividad reproductiva (Chemineau; 1986). A partir del día 0 y hasta el día 10, que correspondió a la primera ovoposición se sacrificaron 4 hembras cada tercer día. Después del día 10 se sacrificaron 3 hembras y el muestreo se hizo diariamente hasta el día 13 y se tomó una última muestra el día 16 (Figura 3).

Figura 3. Diseño experimental para la evaluación de la actividad reproductiva antes y después de la ovulación.



4.3 Toma de muestras

Antes del sacrificio se tomaron muestras de heces poniendo a las palomas en jaulas individuales y esperando el momento en que los animales defecaran naturalmente, aproximadamente se recolecto por hembra un promedio de 3.5 gr de heces. Las excretas se recolectaron cuidadosamente con una espátula de acero inoxidable y se colocaron en un papel absorbente, donde se rodaron para eliminar lo más posible de los residuos de uratos.

Las heces se secaron en una estufa a 50°C durante 24 horas y posteriormente se pulverizaron en un mortero. Las muestras pulverizadas se identificaron con el número de animal y fecha, se colocaron en bolsas herméticas de plástico, y se congelaron a -20°C, hasta el momento que se analizaron.

Las palomas fueron sacrificadas por dislocación cervical como se establece en la NOM-033-ZOO-1995 y antes del sacrificio se obtuvieron muestras sanguíneas por punción cardiaca del ventrículo derecho; recuperando 10ml de sangre en tubos vacutainer con gel activador de la coagulación. Los tubos se centrifugaron por 15 minutos a 3000 g. El suero se separó y se almacenó en viales para congelarlo a -20°C, hasta la medición de hormonas por la técnica de ELISA.

Los ovarios fueron disecados y limpiados en solución salina fisiológica, las estructuras ováricas se identificaron midiendo los folículos con un vernier y clasificándolos en las siguientes categorías de acuerdo a su tamaño:

- ❖ Folículos pequeños blancos de 1 a 1.9mm.
- ❖ Folículos grandes blancos de 2 a 3.4mm.
- ❖ Folículos pequeños amarillos de 3.5 a 6.9mm.
- ❖ Folículos grandes amarillos mayores a 7mm.

4.4 Análisis Hormonal

Para la extracción de Progesterona en heces se utilizó el método descrito por Graham y Brown (1996), cuya metodología se describe brevemente:

- Se pesaron 1.8 a 2gr de heces secas y pulverizadas y se colocaron en tubos de ensaye de vidrio de 16 X 150mm.
- Las muestras se resuspendieron en 5ml de etanol al 90% (diluido en agua destilada) y se mantuvieron en ebullición durante 20min.
- Los tubos se centrifugaron a 500 g por 20min y el sobrenadante se vertió a otro tubo de ensaye.
- El precipitado se resuspendió en 5ml de etanol al 90% y se agitó durante un minuto en vórtex para repetir la centrifugación.
- El sobrenadante se mezcló con el anterior y ambos se evaporaron hasta la sequedad, colocándolos en una campana de extracción y manteniéndolos en baño María a 37°C.
- Los esteroides se resuspendieron en 1ml de metanol y la concentración hormonal se determinó mediante la prueba de ELISA.

Para la cuantificación de Testosterona y Estradiol se empleó el método de Tell y Lasley (1991), y se realizó de la siguiente manera:

- Se pesó 1gr de muestra seca y pulverizada en tubos de ensayo de vidrio.
- La muestra se diluyó con 1ml de buffer de fosfato al 0.1M y se equilibró por 12 horas a una temperatura de 4°C.
- Los tubos se centrifugaron a 500g por 20min.
- El sobrenadante se conservó en viales a -20°C hasta que se realizó la determinación hormonal.

4.5 Enzimoinmunoensayo (ELISA)

Las determinaciones de Estradiol, Testosterona y Progesterona se realizaron por ensayos de ELISA de tipo competitivo, tanto para las muestras de suero como para las de heces, se utilizaron los anticuerpos (Ac), conjugados y estándares donados por la Dra. Coralie Munro, de la Universidad de California Davis, USA.

Para cada hormona se utilizaron los siguientes anticuerpos: Estradiol Ac **R4972** a una concentración 1/10000 y Testosterona Ac **R156/7** a la concentración de 1/13000. En tanto que para la determinación de P₄ se utilizaron diferentes anticuerpos. Para heces se empleó el Ac **CL425** en una concentración de 1/8000, y para suero se usó el Ac **R8939**, en una dilución de 1/3000. Los conjugados (hormonas unidas a HRP [peroxidasa de rábano picante]) se utilizaron en las siguientes concentraciones: E₂ 1/30000, T 1/40000, P₄ 1/40000 para heces y 1/20000 para suero.

Los anticuerpos fueron diluidos en buffer de carbonatos a pH 9.6, se colocaron en placas Maxi sorp y se incubaron a 4°C por 12 horas para su adsorción.

El conjugado se diluyo en buffer de fosfatos (pH 7.0) y se incluyeron a las muestras para incubarlo por 2 horas a 30°C. Se utilizo como sustrato ABTS incubando a 30°C por 1 hora y deteniendo la reacción con ácido hidrofúrico. La concentración de las hormonas fue determinada en un espectrofotómetro de luz visible a 405nm.

En el cuadro 1 se presentan las sensibilidades y los coeficientes de variación que tuvieron las pruebas.

CUADRO 1 Sensibilidad y Coeficiente de variación (CV) de las pruebas de ELISA para cada hormona. P₄=progesterona, T=testosterona, E₂=estradiol

HORMONA	SUERO		HECES	
	Sensibilidad	CV	Sensibilidad	CV
P₄	0.35 ng/ml	0.18 %	0.31 ng/ml	9.65 %
T	0.75 pg/ml	0.1 %	0.90 pg/ml	0.37 %
E₂	0.06 pg/ml	0.1 %	0.16 pg/ml	0.2 %

5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para mostrar la relación existente entre los patrones hormonales detectados en heces y suero, con el tamaño folicular se hizo un análisis usando el método de correlación de Pearson con el programa estadístico SAS system, ya que la correlación que existe es un índice que mide la magnitud de la relación lineal entre 2 variables cuantitativas, así como el sentido, positivo o negativo, de dicha relación, indicando en qué grado 2 variables X e Y fluctúan simultáneamente, es decir cuánto aumenta X al aumentar Y (correlación positiva), o cuánto aumenta X al disminuir Y (correlación negativa).

$$r_{xy} = \frac{\sum x_i y_i}{n S_x S_y}$$

Donde:

R= es el coeficiente de Pearson

Xi e Yi = Puntuaciones diferenciales de cada par

N= número de casos

Sx y Sy = Desviaciones de cada variable

6. RESULTADOS

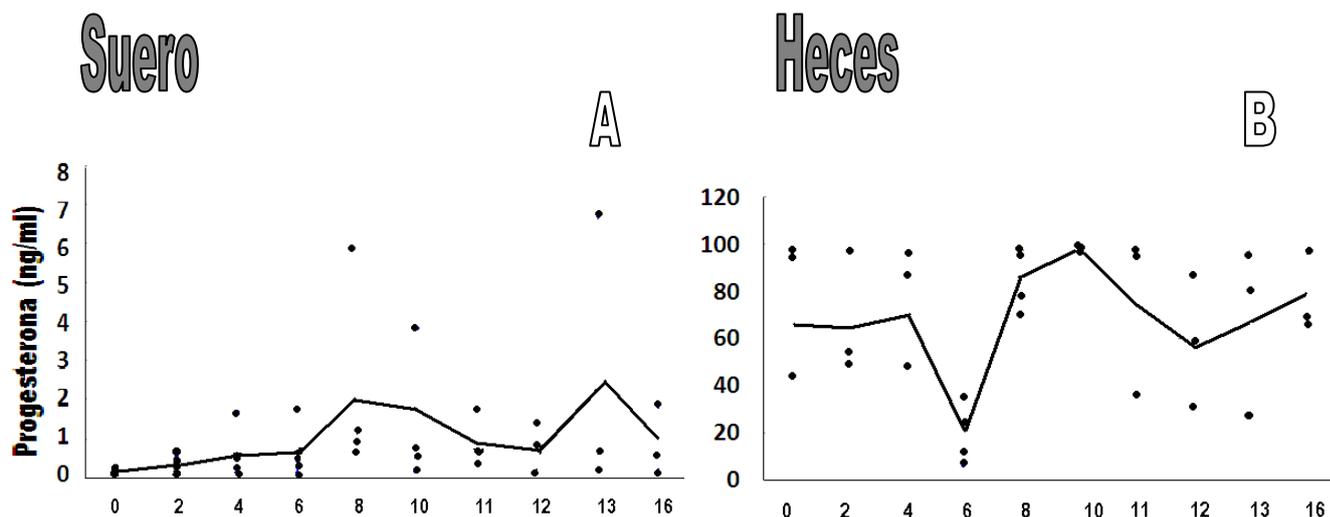
Al realizar las determinaciones hormonales la cantidad de heces no fue suficiente en todos los casos para medir las 3 hormonas esteroideas, sin embargo, se tuvo la precaución de que cuando menos hubiera 3 mediciones por día para cada hormona.

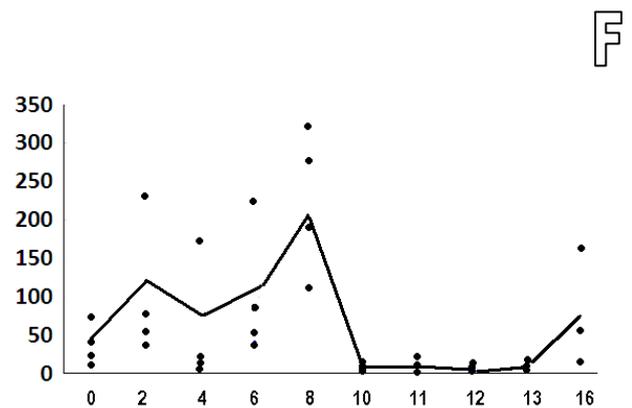
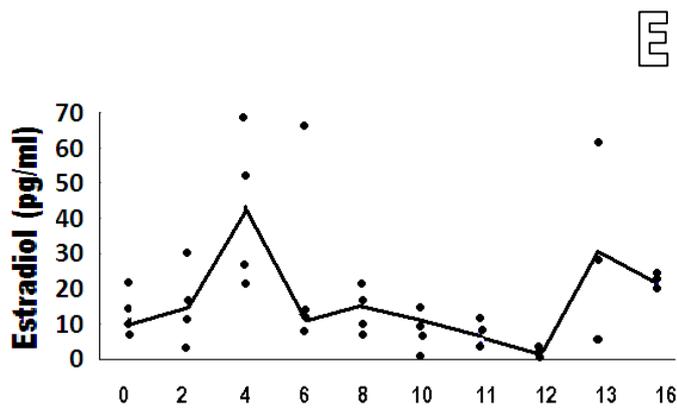
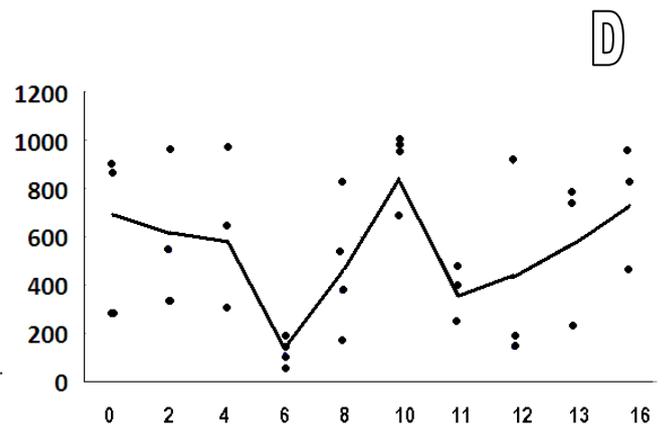
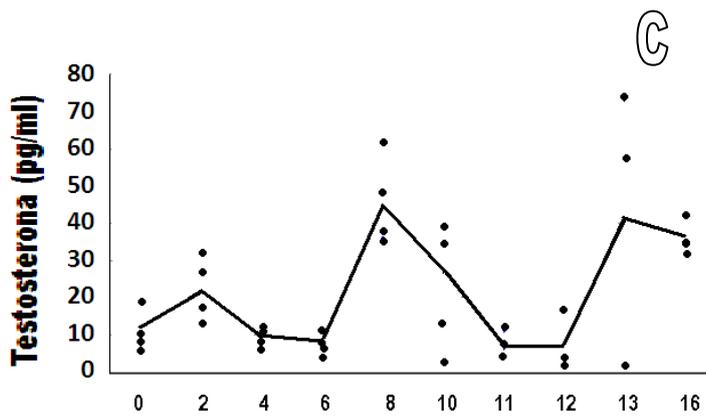
Los resultados de las concentraciones hormonales plasmáticas en heces indican una gran dispersión, por lo que no se detectaron claramente patrones de incremento o decremento en ellas, en relación con el día de la ovulación, lo cual, podemos apreciar en las gráficas donde se muestran los niveles promedio de las hormonas esteroideas por día de estudio (progesterona, Gráfica 1 paneles A y B; testosterona, paneles C y D; estradiol, paneles E y F). Sin embargo, los días 8 y 10, correspondientes a la primera y segunda ovulación se presentaron altos niveles de progesterona en suero, mientras que en heces el máximo aumento se encuentra el día 10.

Testosterona muestra cierta relación con lo visto con progesterona encontrando incrementos en suero el día 8 y en heces el día 10, indicando la dependencia de ambas hormonas.

En tanto que estradiol, muestra un incremento en suero el día 4 y en heces se observa hasta el día 8.

Gráfica 1. Concentraciones hormonales por paloma (●) de progesterona (paneles A y B), testosterona (C y D) y Estradiol (E y F) en los diferentes días del ciclo ovulatorio. Los paneles del lado izquierdo (A, C, E) muestran las determinaciones realizadas en suero, mientras que los del lado derecho (B, D, F) las obtenidas en heces. La línea muestra los valores promedio para cada día.





**Días del ciclo ovulatorio
10 = 1ª ovoposición**

**Días del ciclo ovulatorio
10 = 1ª ovoposición**

En el análisis estadístico se muestra la alta correlación (cuadro 2) de Testosterona en heces con Progesterona en heces (0.72, $P < 0.01$). Además, se encontraron correlaciones positivas de Testosterona en suero con Progesterona en suero (0.45, $P < 0.05$), Testosterona en suero con Testosterona en heces (0.35, $P < 0.05$), Progesterona en suero con Progesterona heces (0.27, $P < 0.05$) y Estradiol en suero con el número folículos grandes blancos (0.34, $P < 0.05$). Finalmente, aún cuando las correlaciones entre Estradiol y Progesterona no fueron significativas se hallaron relaciones negativas, sugiriendo que el incremento de una hormona causa el descenso de la otra (-0.13 en ambos casos, $p > 0.05$).

Cuadro 2. Correlaciones entre las concentraciones hormonales en heces, en suero y el desarrollo folicular en palomas. Valores en negro presentan correlaciones significativas ($p < 0.05$). P_4 =progesterona, T=testosterona, E_2 =estradiol, FGB=folículos grandes blancos, FPA=folículos pequeños amarillos y FGA=folículos grandes amarillos.

VARIABLES	P ₄ SUERO	P ₄ HECES	T SUERO	T HECES	E ₂ SUERO	E ₂ HECES	FGB	FPA	FGA
P ₄ SUERO									
P ₄ HECES	0.27								
T SUERO	0.45	0.40							
T HECES	0.11	0.72	0.35						
E ₂ SUERO	-0.13	0.05	0.32	0.22					
E ₂ HECES	0.07	-0.13	0.05	-0.13	0.26				
FGB	0.11	0.21	0.24	0.29	0.34	-0.16			
FPA	-0.27	-0.13	-0.21	-0.13	0.13	0.18	0.12		
FGA	-0.14	-0.16	-0.02	-0.15	0.12	0.25	-0.08	0.45	

En cuanto al desarrollo folicular, durante la necropsia de los animales se encontró que la cantidad tanto de los folículos grandes blancos (2mm a 3.4mm) como de los folículos pequeños amarillos (3.5mm a 6.9mm) permaneció constante durante los días del estudio. La presencia de folículos grandes amarillos (<7mm) se observó a partir del día 2, y éstos desaparecieron después de la segunda ovulación (día 10). Además, ningún animal presentó más de dos folículos reclutados en esta categoría.

7. DISCUSIÓN

El presente trabajo mostró que las concentraciones de progesterona y testosterona en sangre y heces, tienen una correlación positiva en palomas. Sin embargo, el empleo de muestreos sencillos tuvo mucha variación dentro de cada día relativo al momento de la ovulación, por lo que es probable que sean necesarias mediciones repetidas para estimar el estado de desarrollo folicular de las aves.

Los resultados de las concentraciones de progesterona, tanto en suero como en heces, mostraron altas correlaciones positivas con testosterona, lo cual concuerda con la literatura, ya que en aves los días que ocurre la ovulación se observan incrementos preovulatorios de ambas hormonas (Harvey; 1981). Adicionalmente, diversos trabajos han sugerido que testosterona estimula la producción de progesterona (Huang *et al*; 1979, Sasanami y Mori; 1999, Rangel *et al*; 2006a), y se ha observado que la falta de testosterona endógena causa la interrupción de la ovulación en gallinas y se relaciona con la ausencia del pico de progesterona (Rangel *et al*; 2005, Rangel *et al*; 2006b). Sin embargo, el bajo número de muestras y la gran variación en las concentraciones hormonales por día no permitieron observar incrementos significativos en los niveles de progesterona y testosterona los días correspondientes a la ovulación (8 y 10), días en los que se esperaba encontrar los niveles mas altos de progesterona cuyo pico preovulatorio se presenta en forma normal 4 a 6 horas antes de la ovulación (Kappauf y Van Tienhoven; 1972). Igualmente, se esperaba encontrar un aumento en los niveles de testosterona, ya que estos presentan sus máximos incrementos 8 a 10 horas antes que el pico de P₄ en aves (Johnson y Van Tienhoven; 1980, Kappauf y Van Tienhoven; 1972).

El momento en que se pudieron apreciar folículos jerárquicos antes de la ovulación (día 2) correspondió a lo encontrado en la literatura para palomas, donde se especifica que los folículos en esta categoría tardan 5 a 7 días de desarrollo para poder ser ovulados (Cuthbert; 1945). Del mismo modo, el

número de folículos reclutados a esta categoría, que fue de solo 2 folículos grandes amarillos por ciclo, concuerda con lo encontrado en estudios previos (Cuthbert; 1945).

Aunque no hubo una correlación significativa entre los niveles de estradiol en suero y el número de FGB y FPA, se aprecia un incremento simultáneo de estradiol y dichos folículos, lo cual confirmaría previas observaciones de que los FGB poseen el 50% de la actividad aromatasa del ovario (Armstrong; 1984) y de que ambos grupos foliculares son necesarios para que haya una síntesis y secreción de estradiol (Robinson y Etches; 1986, Johnson; 1993). Por otro lado, se aunque no significativa, se encontró una correlación negativa de estradiol con progesterona, que confirma las observaciones previas de que el estradiol no interviene directamente en la ovulación y que ésta puede ocurrir aún en ausencia del pico preovulatorio de estradiol (Lague et al; 1975), que su acción dentro del proceso ovulatorio es mas como un sensibilizador a progesterona a nivel hipotálamo–hipofisiario (Wilson y Sharp; 1976), así como que el folículo preovulatorio es incapaz de producir estradiol (Porter *et al*; 1989).

Por otro lado, algo que también pudo contribuir a la gran variación en los niveles hormonales por día fue que el trabajo se desarrolló durante los meses de mayo y junio, los cuales corresponden a la época reproductiva de las palomas (Askew; 1997). Esto causó mayor variación en la respuesta al efecto macho por parte de las hembras, ya que al introducir a los machos algunas hembras tardaron menos de 10 días en manifestar el desarrollo folicular y la ovulación, dificultando establecer el momento preciso del desarrollo folicular para cada animal. Contrariamente, estudios previos realizados en el departamento de reproducción, mostraron que cuando se trabajaban los animales durante el invierno (meses de diciembre y enero) la respuesta de las hembras a la introducción del macho era muy homogénea y las palomas tardaban 10 días en presentar la postura del primer huevo (datos no publicados). Lo anterior pudo deberse a que durante la época reproductiva

siempre exista cierto grado de desarrollo folicular (Gutiérrez; 1999), del mismo modo que ocurre en mamíferos (Valdespino *et al*; 2007).

8. CONCLUSIONES

El presente estudio mostró que las concentraciones de progesterona y testosterona tienen una correlación positiva en palomas, tanto en suero como en heces. Además, se pudo establecer que emplear una muestra sencilla para determinar el desarrollo folicular y el momento de la ovulación en aves es un método poco eficiente, para estimar el desarrollo folicular y la ovulación.

REFERENCIAS

- ❖ **Armstrong DG.** (1984) Ovarian aromatase activity in the domestic fowl (*Gallus domesticus*), *Journal of Endocrinology*, **100** 81-86.
- ❖ **Armstrong DG.** (1985) Changes in aromatase activity in small ovarian follicles of the domestic fowl during growth and atresia, *Journal of Endocrinology*, **105** 297-301.
- ❖ **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.
- ❖ **Bahr JM, Calvo FO.** (1984) A correlation between adenylyl cyclase activity and responsiveness to gonadotrophins during follicular maturation in the domestic hen, In: Cunningham FJ, Lake PA, Hewitt D (eds), *Reproductive Biology of Poultry*. Harlow: British Poultry Science LTD; 75-87.
- ❖ **Bahr JM, Johnson AL.** (1984) Regulation of the follicular hierarchy and ovulation, *Journal Experimental Zoology*, **232** 495–500.
- ❖ **Barfield R.** (1971) Gonadotrophic hormone secretion in the female ring dove in response to visual and auditory stimulation by the male, *Journal of Endocrinology*, **49** 305-310.
- ❖ **Carre – Eusebe D, Oréal E.** (1997) The chick anti – Mullerian hormone gene. In: Perspectives in avian endocrinology. Eds S Harvey & RJ Etches, Ed. *Journal of Endocrinology Ltd*, Bristol. 15–26.
- ❖ **Chemineau P, Levy F, Thimonier J.** (1986). Effects of anosmia on LH secretion, ovulation and oestrus behaviour induced by males in the anovular Creole goat, *Animal Reproduction Science*, **10** 125–132.
- ❖ **Cuthbert N.** (1945) The ovarian cycle of the ring dove, *Journal of morphology*, **3** 351-377.
- ❖ **Del Hoyo J, Elliot A, y Sargatal J.** (1997) Handbook of the birds of the world, Sandgrouse to Cuckoos. Lynx Ediciones Barcelona, España. Vol.

- ❖ **Erickson C.** (1970) Induction of ovarian in female Ring doves by androgen treatment of castrated males, *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, **71** 210–215.
- ❖ **Etches RJ.** (1990) The ovulatory cycle in the hen, *Critical Reviews in Poultry Biology*, **2** 293-313.
- ❖ **Etches RJ.** (1993) Follicular growth and maturation in the domestic hen (*Gallus Domesticus*), *Journal Reproduction and Fertility*, **67** 351-358
- ❖ **Etches RJ.** (1996) Reproduction in Poultry, Edit. CAB INTERNATIONAL, 125–165.
- ❖ **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.** (1977) The plasma concentrations of testosterone and LH during the ovulatory cycle of the hen (*Gallus Domesticus*), *Acta Endocrinologica*, **84** 357-366.
- ❖ **Gilbert AB.** (1969) Innervation of the ovary of the domestic hen, *Experimental Physiology*, **54** 404-411
- ❖ **Gilbert AB.** (1981) The induction of atresia in the domestic fowl (*Gallus domesticus*) by ovine LH, *General and Comparative Endocrinology*, **44**, 344-349
- ❖ **Graham L H, Brown JL.** (1996) Cortisol metabolism in the domestic cat and Implications for non-invasive monitoring of adrenocortical function in endangered felids, *Zoo Biology*; **15** 71-82.
- ❖ **Gutiérrez G.** (1999) Hormonas y reproducción en aves: La influencia de factores ambientales y sociales, *Revista Latinoamericana de Psicología*, **31** 151-174
- ❖ **Hall PF.** (1984) Cellular organization for steroidogenesis, *International Review Cytology*, **Vol. 86** 53-92

- ❖ **Harvey S, Bedrak E, Chadwick A.** (1981) Serum concentrations of prolactin, luteinizing hormone, growth hormone, corticosterone, progesterone, testosterone and oestradiol in relation to broodiness in the domestic turkeys, *Journal of Endocrinology*, **89** 187-195
- ❖ **Hill R.** (1979) Fisiologia animal comparada, Edit. Reverté, 800 pag.
- ❖ **Huang E5-R, Kao KJ, Nalbandov AV.** (1979) Synthesis of sex steroids by cellular components of chicken follicles, *Biology of Reproduction*, **20** 454-461
- ❖ **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,
- ❖ **Imai K, Nalbandov AV.** (1978) Plasma and follicular steroid levels of laying hens after the administration of gonadotropins, *Biology of Reproduction*, **19** 779-84
- ❖ **Isola J, Korte JM.** (1987) Immunocytochemical localization of progesterone receptor in the chick ovary, *Endocrinology*, **3** 1034-1040
- ❖ **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 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, *General and comparative Endocrinology*, **58** 478–485,
- ❖ **Johnson AL, van Tienhoven A.** (1984) Plasma concentrations of six steroids and LH during the ovulatory cycle of the hen, *Biology of Reproduction*, **23** 386–393,
- ❖ **Johnson AL, van Tienhoven A.** (1996) Hypothalamo – hypophyseal sensitivity to hormones in the hen. Plasma concentrations of LH, progesterone, and testosterone in response to central injections of progesterone and R5020, *Biology of Reproduction*, **23** 910-917

- ❖ **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

- ❖ **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

- ❖ **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, 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.

- ❖ **Martínez F.** (1991) La Paloma mensajera. México: Boletín de la Federación Mexicana de Colombofilia A. C.

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

- ❖ **Pageaux JF, Laugier C.** (1983) Analysis of progesterone receptor in the quail oviduct. Correlation between plasmatic estradiol and cytoplasmatic progesterone receptor concentrations, *Journal of Steroid Biochemistry*, **18** 209-214

- ❖ **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,

- ❖ **Parkhurst CR, Mounthey GJ.** (1989) Poultry Meat and Egg Production, New York: Van Nostrand Reinhold, Chapter 3 31–87.
- ❖ **Porter TE, Hargis BM, Silsby JL, El Halawani ME.** (1989) Differential steroid production between theca internal and theca external cell: A three-cell model for follicular steroidogenesis in avian species, *Endocrinology*, **125** 109-115
- ❖ **Rangel PL, Lassala A, Gutiérrez CG.** (2005) Testosterone immunization blocks the ovulatory process in laying hens without affecting ovarian follicular development, *Animal Reproduction Science*, **86** 143-151.
- ❖ **Rangel L, Rodríguez A, Rojas S, Gutiérrez C.** (2006a) Testosterone stimulation of progesterone production by hen (*Gallus domesticus*) granulosa cells differs according to the degree of follicle maturation, *Biology of reproduction*, **77** 155-156
- ❖ **Rangel PL, Sharp PJ, Gutierrez CG.** (2006b) Testosterone antagonist (flutamide) blocks ovulation and preovulatory surges of progesterone, luteinizing hormone and oestradiol in laying hens, *Reproduction*, **131** 1109-1114.
- ❖ **Robinson FE, Etches RJ.** (1986) Ovarian steroidogenesis during follicular maturation in the domestic fowl (*Gallus domesticus*), *Biology of Reproduction*, **35** 1096–1105
- ❖ **Sasanami T, Mori M.** (1999) Effects of estradiol – 17 β and testosterone on progesterone production in the cultured granulosa cells of Japanese quail, *British Poultry Science*, **40** 536-540.
- ❖ **Scanes CG, Godden PM, Sharp PJ.** (1977) A 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, Dawson A, Lea RW.** (1998) Control of luteinizing hormone and prolactin secretion in birds, *Comparative Biochemistry and Physiology Part C*, **119** 275 – 282
- ❖ **Short RV.** (1960) Steroids presents in the follicular fluid of the mare, *Journal of Endocrinology*, **20** 147-156
- ❖ **Strauss III, Schuler LA, Rosenblum MF, Tanaka T.** (1981) Cholesterol metabolism by ovarian tissue, *Advances in Lipid Research*, **18** 99-157
- ❖ **Sturkie`s.** (2000) *Avian Physiology*, Edit Causey Whittow, Fifth edition, pag. 569–596
- ❖ **Tanaka K, Inoue T.** (1990). Role of steroid hormones and catecholamines in the process of ovulation in the domestic fowl. “*Endocrinology of bird: Molecular to Behavioral*” (M. Wada, S. Ishii and CG Scanes edits.), pag 59–68.
- ❖ **Tell LA, Lasley BL.** (1991) An Automated Assay for Fecal Estrogen Conjugates in the Determination of Sex in Avian Species, *Zoo Biology*, **10** 361–367.
- ❖ **Tilly JL, Kowalski KI, Johnson AL.** (1991) Stage of ovarian follicular development associated with the initiation of steroidogenic competence in avian granulose cells, *Biology of Reproduction*, **44** 305 – 314.
- ❖ **Valdespino C, Martínez MR, García FL, Martínez RL.** (2007) Evaluación de eventos reproductivos y estrés fisiológico en vertebrados silvestres a partir de sus excretas: Evolución de una metodología no invasiva, *Acta zoológica mexicana*, **23** (3) 151 – 180.

- ❖ **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.
- ❖ **Wilson SC, Cunningham FJ.** (1984) Endocrine control of the ovulation cycle. In *Reproductive Biology of Poultry* edit. Cambridge, pag. 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.** (1976) Effects of androgens, oestrogens and deoxycorticosterone acetate on plasma concentrations of luteinizing hormone in laying hens, *Journal of Endocrinology*, **69** 93-102
- ❖ **Yoshimura Y, Bahr JM.** (1991) Localization of progesterone receptors in pre- and postovulatory follicles the domestic hen, *Endocrinology*, **128** 323–330
- ❖ **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.