



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA
SALUD ANIMAL

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

“IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DEL SISTEMA
NEUROENDOCRINO DIFUSO EN EL OVARIO INMADURO DE
***Gallus gallus*”**.

TESIS QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:
PABLO GERARDO HOFMANN SALCEDO

TUTOR PRINCIPAL: DR GABRIEL GUTIÉRREZ OSPINA,
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM.

COMITÉ TUTOR: DRA. MARTA CATALINA ROMANO PARDO,
Centro de Investigación y Estudios Avanzados del IPN.
DR. CARLOS GUILLERMO GUTIÉRREZ AGUILAR,
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM.

MÉXICO, D.F. SEPTIEMBRE 2014.



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.

“There is a profound inhibitory effect on new ideas by people and ideas that ‘got there first,’ telling their story over and over while new observations struggle up from the bottom. The old line that human knowledge advances one funeral at a time seems to be so true!”

M. Gazzaniga. (2011) Ann N Y Acad Sci. 1224(1):1-8

Índice

Dedicatorias	5
Abstract	7
Resumen	9
Introducción	11
Planteamiento del Problema	26
Hipótesis	27
Objetivos	27
Material y métodos	28
Modelo Biológico	28
Marcadores Neuroendocrinos	30
Inmunofluorescencia	32
Microscopía electrónica de transmisión	33
Resultados	35
Discusión	48
Conclusión	53
Referencias	55
Agradecimientos	61
Publicación	63

Con profundo agradecimiento, dedico este trabajo a mi madre y a mi padre, porque sin su apoyo moral y económico la realización de este posgrado no hubiera sido posible. Dedico especialmente el producto final de este proceso a mi padre, quien ya no tuvo la oportunidad de ver concluida esta etapa de mi superación personal y académica.

Dedico también este trabajo a todos aquellos que con su apoyo técnico y que con su análisis crítico y consejos referentes al desarrollo de mi trabajo, participaron en una etapa importante de mi formación personal. Asimismo, agradezco a todos aquellos que con su ejemplo me han mostrado todo aquello que un científico y formador de recursos humanos jamás deberá ser o hacer.

Abstract.

The neuroendocrine system comprises a diversity of cellular populations possessing common characteristics, and differ from neurons by the lack of an axon and that they do not secrete the signaling molecules they produce at a presynaptic terminal. Several studies have been carried out on the presence of single or small groups of neuroendocrine cells within the internal lining of the gastrointestinal and respiratory tracts, as well as on their assigned sensory function associated to an endocrine regulatory response. The presence of cells corresponding to the neuroendocrine system has been reported in the urogenital tract of higher vertebrates, and there is evidence on the existence of neuron-like cells in the ovary. Nevertheless, a detailed characterization of the cellular population has not been made, and their origin has not been conclusively proven. The domestic fowl is the ideal biological model to resolve the controversy on the phenotype and origin of the ovarian neuroendocrine cells of vertebrates. The aim of the present work was the identification and characterization of the neuroendocrine cellular population in immature ovaries of *Gallus gallus* through immunolocalization and transmission electron microscopy techniques. These cells were observed to possess the characteristic proteins of secretory granules of the neuroendocrine system, as well as the enzymes of the catecholamine and indolamine biosynthesis pathways. By their phenotype and their distribution they could be considered part of the diffuse neuroendocrine system of the hen. The identified ovarian cells were observed from pre-hatching stages through the first weeks of post-hatching life. Their embryonic origin, their possible functions, transient or definitive, as well as the possibility that they may generate a cellular

population with a different phenotype in their final differentiated state in the mature ovary, are aspects still remaining to be elucidated.

Resumen

El sistema neuroendocrino está constituido por diversos tipos celulares que presentan características en común, pero difieren de las neuronas porque carecen de axón y no liberan las moléculas de señalización desde una terminal presináptica. Se han realizado estudios de la presencia de células neuroendocrinas aisladas o en grupos en el revestimiento interno del tracto gastrointestinal y del árbol respiratorio, y las funciones que se les atribuyen son principalmente sensoriales asociadas a una respuesta regulatoria endocrina. Se ha reportado la presencia de células del sistema neuroendocrino en el tracto urogenital de los vertebrados superiores y hay evidencia de la existencia de células con apariencia de neuronas en el ovario. Sin embargo, no se ha hecho una caracterización detallada, ni ha quedado fehacientemente probado el origen de esta población celular. El modelo ideal para poder resolver el problema del fenotipo y origen de las células neuroendocrinas del ovario de los vertebrados es la gallina doméstica. El presente trabajo se centró en la identificación y caracterización de la población celular neuroendocrina en ovarios inmaduros de *Gallus gallus*, mediante técnicas de inmunolocalización y microscopia electrónica de transmisión. Se observó que esta población celular posee las proteínas características de los gránulos secretorios del sistema neuroendocrino, así como las enzimas de las vías de biosíntesis de catecolaminas e indolaminas. Por su fenotipo y distribución se les puede considerar parte del sistema neuroendocrino difuso de la gallina. Las células identificadas en el ovario de la gallina fueron observadas desde etapas previas a la eclosión y durante las primeras semanas

de vida fuera del huevo. Su origen embrionario, sus posibles funciones, transitorias o definitivas, así como la posibilidad de que puedan dar origen a una población celular con un fenotipo distinto en estado de diferenciación definitiva en el ovario maduro, permanecen por dilucidarse.

Introducción

A lo largo de la evolución y con el advenimiento de la vida pluricelular, se hizo importante la comunicación intercelular para la regulación de los procesos del desarrollo y la división del trabajo, así como la modulación de las funciones fisiológicas de los distintos linajes celulares. Con esto, el organismo asegura su adecuación metabólica y su reproducción a las condiciones cambiantes del medio. Para lograr la regulación de dichas funciones, las células de los organismos pluricelulares se comunican por mecanismos de señalización que se realizan en sitios de contacto intercelular o mediante señales químicas liberadas sistémicamente al espacio intercelular, en el que pueden difundir a grandes distancias y tener un efecto sobre la fisiología de poblaciones celulares lejanas.

El sistema endocrino de los vertebrados es el conjunto de glándulas productoras de mensajeros químicos que se liberan al torrente circulatorio y cuyas funciones son la regulación del crecimiento, metabolismo, balance electrolítico, así como el desarrollo sexual y la función reproductiva. La actividad de estas glándulas está controlada tanto por el sistema nervioso central como por las hormonas producidas por otros tejidos glandulares.

Por otro lado, el sistema nervioso de los animales pluricelulares es el encargado de la captación, integración y procesamiento de la información procedente de los estímulos del medio interno y el medio circundante que resultan en respuestas adaptativas, fisiológicas o conductuales. Los sistemas nerviosos de los animales pluricelulares están constituidos por células altamente especializadas, llamadas neuronas, que en general transmiten la información a manera de relevo por

puntos de contacto entre ellas o con otros tipos celulares en distintas regiones del cuerpo. Sin embargo, existen neuronas que liberan mensajeros químicos al medio intercelular o al torrente circulatorio de manera endocrina como respuesta a una señal nerviosa.

El concepto de sistema neuroendocrino tradicionalmente manejado es la interacción anatómica, funcional y fisiológica entre el sistema nervioso central y las glándulas endocrinas periféricas de los vertebrados. Como base de este concepto, se encuentran los ejes de regulación generada por distintos grupos de neuronas en el hipotálamo, que liberan factores al torrente circulatorio (sistema porta-hipofisiario) desde sus terminales axonales en la eminencia media. Estos factores estimulan a distintas poblaciones celulares de la hipófisis y éstas a su vez producen las señales químicas que regulan la función de los órganos endocrinos periféricos. Una variación de este mecanismo de señalización es la innervación directa de las glándulas endocrinas periféricas por el sistema nervioso autónomo, que promueve la secreción de sustancias con efecto biológico que participan en la regulación de las funciones corporales. Un ejemplo de esta modalidad es la médula de las glándulas adrenales, en la que las células cromafines liberan adrenalina como respuesta a los estímulos nerviosos. Cabe hacer notar que el fenotipo de las células cromafines, que constituyen el tejido endocrino predominante de la médula adrenal, presenta rasgos en común con neuronas del sistema nervioso central así como con otros tejidos endocrinos y con algunas células aisladas, que no constituyen tejidos, pero se encuentran incorporadas en los epitelios de revestimiento de los tractos

digestivo, respiratorio y urogenital, así como en el estroma de las vísceras. Éstas últimas, han sido la motivación principal para la caracterización del fenotipo celular neuroendocrino en general, así como de las particularidades de cada una de las poblaciones de este linaje y su posible participación en la regulación de las funciones y el desarrollo del sistema dentro del cual se encuentran.

Así pues, la acepción del término 'neuroendocrino' no solamente se refiere a la interacción entre el sistema neural y el sistema endocrino, sino que también proporciona información acerca de las características fenotípicas en común de un linaje celular presente en prácticamente todos los sistemas corporales. El motivo de la presente revisión es entonces, hacer una narrativa histórica de la evolución del concepto del Sistema Neuroendocrino Difuso, una descripción del fenotipo celular y presentar evidencia de la existencia de células pertenecientes a este sistema en el ovario de los vertebrados.

Un sistema difuso

Durante la primera mitad del siglo XIX, se llegó a entender el concepto de la regulación de las funciones corporales mediante mecanismos de comunicación entre los distintos órganos del cuerpo y que el sistema nervioso en conjunto con el sistema endocrino participan en dicha regulación. Sin embargo, la naturaleza de las señales, los órganos que las producían, las células que constituyen al sistema endocrino y la relación que guardan con los componentes neurales del cuerpo, seguía siendo motivo de debate. Avocados al discernimiento de la naturaleza de las secreciones reguladoras y las características de los tejidos que

las producen, los estudios sobre la estructura del tejido pancreático por Paul Langerhans (1869), de la población de células cromafines en la superficie de las glándulas gástricas por Rudolf Heidenhain (1870) y de la presencia de una población de células con características similares en la mucosa del intestino por Kulchitsky (1897), sentaron las bases para el concepto de un sistema endocrino presente en el tracto digestivo de los vertebrados. Durante esa época, la noción dominante era la del control de las funciones corporales por el sistema nervioso, tal como lo había descrito Ivan Petrovich Pavlov (nervismo), incluidas las secreciones del tracto digestivo. No fue sino hasta 1902 con los trabajos de William Bayliss y Ernest Starling que se definió la función endocrina del tubo digestivo y su regulación humoral mediada por la secretina. En su trabajo destacan la importancia de las secreciones por los tejidos glandulares carentes de conductos y proporcionan evidencia de que el 'nervismo' no es el único mecanismo regulador de las funciones exocrinas del intestino, dado que la acidez en la luz intestinal estimula las secreciones pancreáticas aún cuando ambos han sido denervados.

En 1914, Pierre Masson sugiere que la población de células claras ('helle Zellen'), cromafines y argentafines por su afinidad a las sales de cromo y de plata respectivamente, presente de manera dispersa en la mucosa intestinal descrita por Ciaccio en 1906 (células 'enterocromafines'), podría ser considerada un órgano endocrino difuso. Ese mismo año y en colaboración con Antonin Gosset (1914), Masson propone que éste es el linaje celular que da origen a los tumores endocrinos intestinales. El término 'carcinoide' acuñado por Oberndorfer

en 1907, ha sido utilizado para distinguir a las neoplasias con características neuroendocrinas de los adenocarcinomas y aún cuando estos tumores han sido de gran interés clínico y patológico durante décadas, hoy en día su biología y clasificación precisa siguen siendo evasivas. En 1928 Pierre Masson es el primero en proponer que la población celular intestinal de la que se desarrollan estas tumoraciones, tiene un origen neural y que las sustancias que producen son las responsables del síndrome carcinoide.

Avocado al estudio de la estructura y de las funciones del páncreas, Frederick Feyrter (1938) observó la existencia de células claras similares a las de la mucosa intestinal en el epitelio de los conductos pancreáticos. Él concluyó entonces que el sistema endocrino humano no solo consiste de glándulas, sino que también está constituido por células endocrinas dispersas, presentes individualmente o en pequeños grupos, en los epitelios y mucosas de todos los órganos del cuerpo, por lo tanto, un sistema endocrino difuso. Al realizar la comparación entre estas poblaciones celulares y el tejido neuroendotelial que se encuentra en la zona de transición entre la corteza y la médula de las glándulas adrenales, propone la existencia de un sistema neuroendocrino difuso (SND) que se desarrolla por la migración del tejido nervioso a los distintos destinos definitivos en el cuerpo, mediada por señales quimiotácticas. Con esta propuesta novedosa, Feyrter integra las filosofías distintas, de un sistema hormonal o de un sistema neural para la regulación de las funciones corporales. Esta integración representa un cambio de paradigma, en el que la regulación de las funciones de los órganos se puede realizar adicionalmente por un sistema difuso, y no solo

por tejidos constituidos por la agrupación de células similares, como son el sistema nervioso y las glándulas que componen el sistema endocrino general.

El fenotipo neuroendocrino

Una vez establecido el concepto de un sistema difuso, con funciones endocrinas y paracrinas que de manera similar al efecto del sistema nervioso regula las funciones de los distintos sistemas corporales, pasaron varias décadas antes de que se hiciera un intento por analizar las características fenotípicas y funcionales que estas poblaciones celulares tienen en común.

Los primeros estudios encaminados a describir las características morfológicas y funcionales de las poblaciones de células neuroendocrinas (NE) fueron motivados por la presencia de tumoraciones, aparentemente benignas en el tracto digestivo que se denominaron carcinoides (Oberndorfer, 1907). Cuando Oberndorfer presentó la conclusión de su trabajo ante la Sociedad Alemana de Patología, en el que los tumores carcinoides representaban un tipo distinto de cáncer, encontró gran resistencia por parte de los renombrados patólogos de la época. Ellos consideraban que los tumores descritos por Oberndorfer eran malformaciones, adenomiomas o transformaciones tumorales de primordios heterotópicos pancreáticos. Sin embargo, conforme se fue incrementando la evidencia de la naturaleza neoplásica de éstas lesiones, el concepto fue gradualmente aceptado.

Mediante la realización de estudios comparativos entre las células tumorales descritas por Obendorfer y las reportadas por Kultschitzky en las criptas del intestino delgado, Huebschmann (1910) concluye que las células corresponden al mismo linaje que las encontradas por Heidenhain en las glándulas gástricas desde 1870. Entonces en 1914, utilizando técnicas de impregnación con sales de plata, en los estudios sobre las características fenotípicas de los carcinoides y de la población celular de la que posiblemente se originan, Pierre Masson las describe como células de naturaleza principalmente endocrina. Treinta años después de la propuesta de Friedrich Feyrter (1938) respecto a la existencia de un sistema difuso formado por células de linaje neuroendocrino, el interés de Anthony Pearse (1969) por encontrar los rasgos morfológicos y funcionales en común de las células hasta ese momento identificadas en distintos órganos y sistemas, desarrolla el concepto de APUD (del inglés amine precursor uptake and decarboxylation), por la capacidad de incorporar los precursores aminoacídicos, de sintetizar, acumular y secretar las aminas con efecto biológico en conjunto con la capacidad de producir hormonas peptídicas de bajo peso molecular. Esta agrupación hace referencia a las características citológicas y bioquímicas que comparten las neuronas con las células endocrinas dispersas por el organismo, así como las que constituyen los tejidos de los órganos endocrinos. Ejemplo de estas últimas son las que conforman la médula de las glándulas adrenales. Con la evidencia hasta el momento acumulada, respecto a los rasgos fenotípicos, funcionales y la producción de mensajeros químicos, la idea clásica de que las células del sistema nervioso podrían ser claramente

distinguidas de otros tipos celulares se tornó más difícil de sostener. De hecho, el concepto APUD propuesto por Pearse al final de la década de los 1960's echó abajo la idea de que la producción de monoaminas, como moléculas de señalización era una característica exclusiva de las neuronas. En ese mismo sentido, durante años se siguió intentando hacer una distinción clara entre células secretoras y neuronas utilizando las características morfológicas y funcionales consideradas clásicamente neuronales. Entre los rasgos fenotípicos considerados se incluyó a los neurofilamentos y a los cuerpos de Nissl, que a través de la microscopía electrónica se han descartado como exclusivamente neuronales, ya que los neurofilamentos y neurotúbulos están constituidos por los mismos elementos que los del citoesqueleto de muchos otros linajes celulares. Los mismos cuerpos de Nissl, presentes también en las células cromafines de la médula adrenal, así como en las células parafoliculares de la tiroides y en las células NE del sistema gastro-entero-pancreático, no son mas que cisternas y vesículas de retículo endoplásmico, que están presentes en prácticamente todos los linajes celulares del cuerpo (Fujita y Kobayashi, 1979). Se podría argüir que el potencial de acción generado a lo largo de la superficie de las neuronas es una característica netamente neuronal, pero se ha visto que las células de los islotes pancreáticos, aparentemente secretoras, pueden responder a estímulos del medio mediante la generación de potenciales de acción y liberación del contenido de sus gránulos secretorios (Dean y Matthews, 1970). Dado que a la fecha no se ha encontrado organelo o rasgo bioquímico único de neuronas y para contender con la controversia generada respecto a la distinción entre

neuronas y células secretoras endocrinas, en 1975 Fujita y colaboradores propusieron el concepto de “paraneurona” y lo sustentaron más detalladamente en 1976. Con este concepto, se considera a las células que poseen una capacidad de secreción de moléculas de señalización como respuesta a los estímulos que reciben del medio, un gradiente morfológico, con muchos fenotipos intermedios entre prácticamente neural y completamente secretorio (Figura 1). El caso de los pinealocitos (Korf et al., 1986; Brednow y Korf, 1998; Redecker 1999) y neuronas hipotalámicas (Sánchez et al., 2009; Figura 2), así como las células beta de los islotes pancreáticos (Dean y Matthews, 1970), son ejemplos que dan sustento a la propuesta. Como muchas otras ideas integradoras, el concepto de “paraneurona” ha sido difícilmente aceptado al seno de la comunidad científica y aún cuando han transcurrido casi cuarenta años de su propuesta y con la evidencia existente, sigue apareciendo de manera marginal en el tema.

Actualmente, dentro del concepto de fenotipo neuroendocrino, los rasgos fenotípicos y funcionales considerados en común en las células del linaje celular son la producción y secreción de aminas biogénicas (principalmente serotonina, dopamina, noradrenalina e histamina), para lo cual expresan las enzimas de las vías de síntesis cada una de estas moléculas de señalización, la presencia de gránulos secretorios de centro denso y la liberación regulada de péptidos con efecto biológico como los neuropéptidos, las cromograninas o secretograninas.

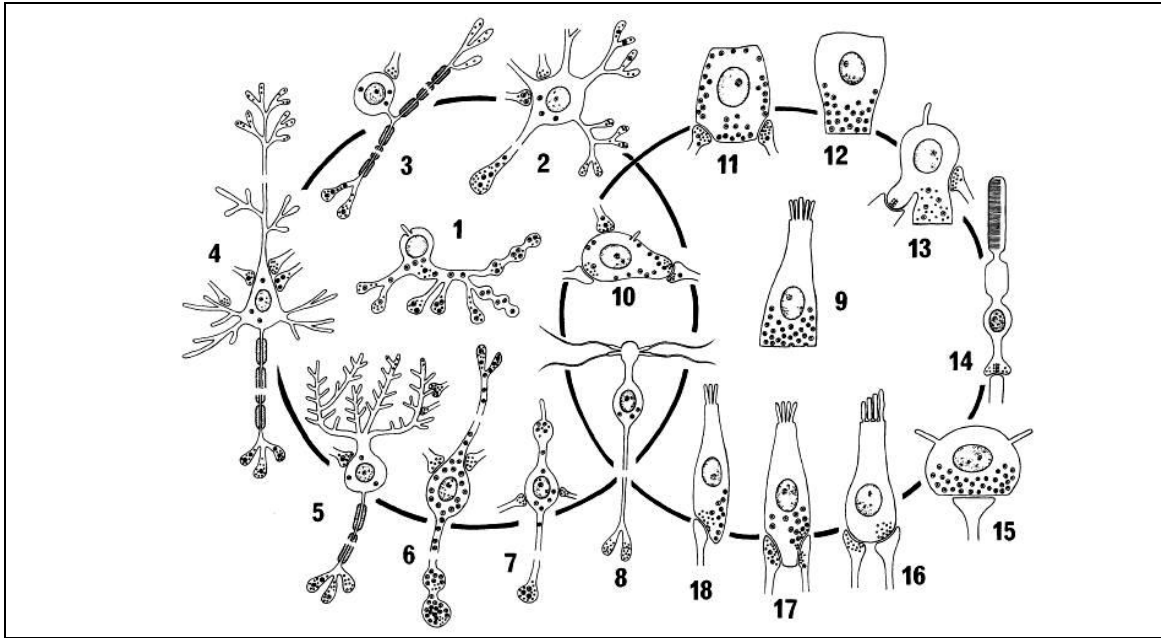


Figura 1. Ilustración de la gama de posibilidades morfológicas de los distintos tipos de células de fenotipo neural (izquierda) y nuroendocrino (derecha) y los rasgos en común (sobreposición de los círculos) en el modelo propuesto de paraneurona propuesto por Fujita en los 1970's. En la imagen se ilustran neurona entérica intramural que representa el prototipo de neurona "arquineurona" (1); neurona autonómica multipolar (2); neurona sensorial (3); neurona piramidal (4); célula de Purkinje (5); neurona "neurosecretoria" or "peptidérgica" (6); neurona en contacto con el líquido cerebro-espinal (7); célula olfatoria (8); célula endocrina intestinal (9), que representa el prototipo de paraneurona "arquiparaneurona"; célula glomo de cuerpo carotídeo (10); célula cromafín de médula adrenal (11); célula adenohipofisiaria, parafolicular o endocrina (12); pinealocito (13); célula fotorreceptora (14); célula de Merkel (15); célula ciliada del oído interno (16); célula neuroendocrina broncopulmonar (17); célula gustativa (18). Tomado de Fujita T. (1989).

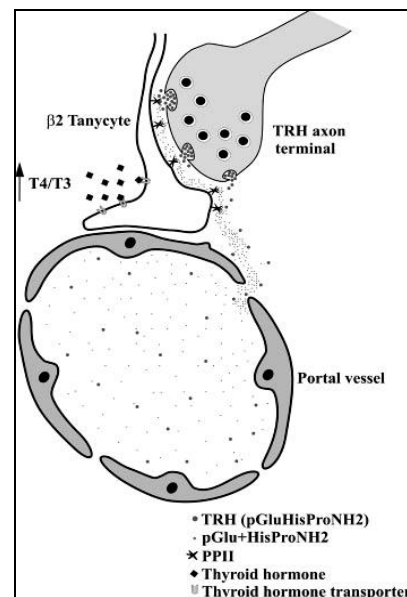


Figura 2. Modelo de la liberación de factores bioactivos desde la terminal axonal de una neurona hipotalámica perteneciente al sistema neuroendocrino. Tomado de Sánchez et al. (2009).

En los gránulos secretorios de las distintas poblaciones celulares están presentes las enzimas necesarias para el procesamiento de los precursores protéicos de los péptidos de secreción, como lo son las proproteína convertasas subtilisina/kexina PCSK1 y PCSK2 (del inglés proprotein convertase subtilisin/kexin types 1 y 2). Aunque algunas neuronas, tanto en el sistema nervioso central como en el periférico, presentan estos mismos rasgos fenotípicos y son consideradas parte del sistema neuroendocrino corporal, las células de fenotipo neuroendocrino clásicas difieren de las neuronas porque carecen de axón y no poseen estructuras especializadas, como las terminales presinápticas, mediante las cuales liberan los factores de señalización que producen (Pearse 1968 y 1969; Langley, 1994; Day y Slazet 2002). Un ejemplo clásico de células con este fenotipo son las cromafines de la médula adrenal (Figura 3). En resumen, las diferentes poblaciones celulares pertenecientes al

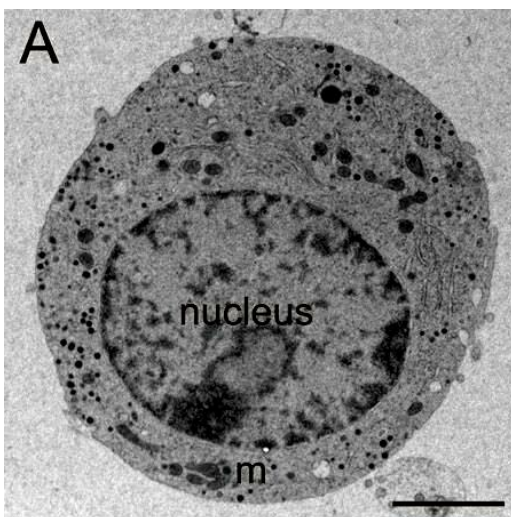


Figura 3. Imagen por microscopía electrónica de transmisión de una célula chromaffin de médula adrenal de ratón, aislada en cultivo, en la que se aprecian gránulos secretorios de centro denso, de tamaño variable, característicos de células con fenotipo neuroendocrino, distribuidos en el citoplasma. (Escala = 2 μ m). Tomado de Becherer et al. (2012).

sistema neuroendocrino, se encuentran tanto en el sistema nervioso central, en las glándulas endocrinas, constituyendo tejidos neuroendocrinos periféricos o incorporadas en el tejido de los órganos del cuerpo. Los mecanismos de señalización en que participan pueden modificar el estado fisiológico del tejido dentro del cual se encuentran (paracrino), o regular las funciones metabólicas de diferentes tejidos a distancia, mediante la dispersión de la señal por todo el cuerpo del organismo (endocrino) (Figura 4).

En los vertebrados superiores se ha prestado especial atención a células NE aisladas o en grupos presentes en el revestimiento interno del tracto gastrointestinal y del árbol respiratorio. Las funciones atribuidas a estas células son principalmente sensoriales asociadas a su subsecuente respuesta regulatoria, que ejercen de manera autocrina, paracrina, yuxtacrina o incluso endocrina (Langhans et al., 1997; Prinz et al., 2003; Pan et al., 2004; Adriaensen et al., 2006; Bertrand y Bertrand, 2010). Basados en estudios morfológicos y en su caracterización neuroquímica, se asume que durante el desarrollo, la población celular neuroendocrina modula el crecimiento y maduración funcional de los órganos en los que se encuentran presentes (Cutz, 1982; Evsyukova, 2006). En este sentido, se ha descrito la participación de este grupo de células en el desarrollo y maduración fisiológica del epitelio respiratorio (Pan et al., 2006), sin embargo, su participación en los procesos ontológicos de otros órganos y sistemas permanece inexplorada.

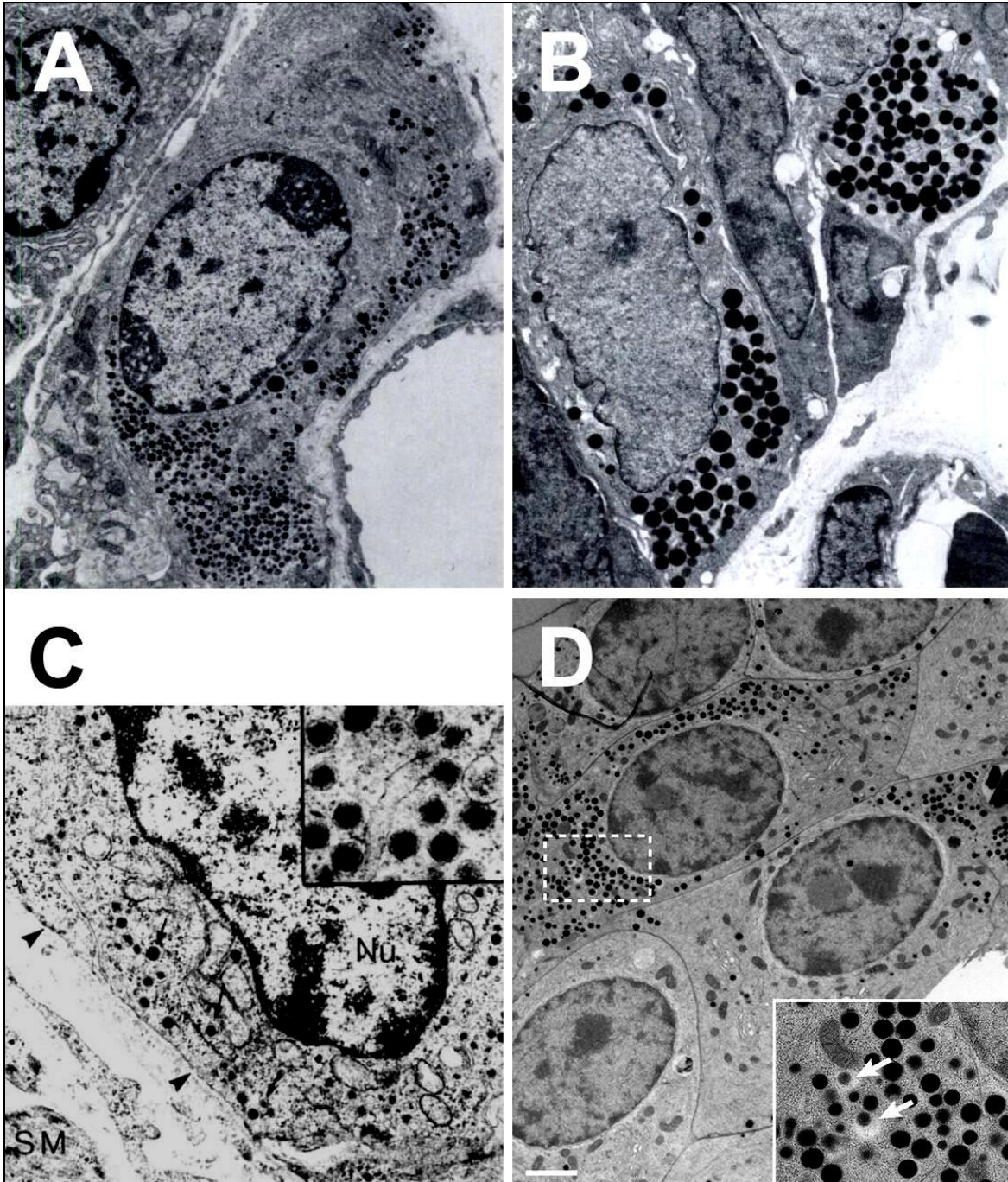


Figura 4. Ultraestructura general observada por microscopía electrónica de transmisión de diferentes tipos de células neuroendocrinas. Independientemente del tejido dentro del que se encuentran, en todas ellas se aprecian los gránulos secretorios de centro denso presentes en el citoplasma. Estos gránulos son de tamaño y abundancia variable, debido al grado de madurez del gránulo y el estado fisiológico de la célula. En esta figura se ilustran una célula parafolicular, productora de calcitonina de tiroides de erizo europeo (A, Pearse, 1969); células neuroendocrinas del sistema gastroenteropancreático (GEP) de ileon canino (B, Pearse, 1969); célula del sistema neuroendocrino broncopulmonar de infante humano (C, Cutz, 1982); células beta de los islotes pancreáticos de rata (D, Fava et al., 2012).

Existen reportes respecto a la existencia de células del SND en el tracto urogenital de los vertebrados superiores. Este linaje celular se ha podido identificar en el epitelio glandular de la próstata, en el epitelio de los conductos deferentes y el epidídimo, así como en regiones por debajo de la lamina basal de los epitelios antes mencionados (di Sant'Agnese et al., 1984; Hanyu et al., 1987; Davidoff et al., 1993 y 2005; Jiménez-Trejo et al., 2007).

Por su parte, en el ovario, existe evidencia de que células con apariencia de neuronas e inmunopositivas a algunos de los factores neurales o neuroendocrinos como la Tirosina Hidroxilasa (TH), la enolasa neuroespecífica (NSE) y el receptor a neurotrofinas de baja afinidad p75NTR, están presentes en células del estroma medular, así como en el tejido interfolicular de la corteza (Dees et al., 1995; D'Albora y Barcia, 1996; Anesetti et al., 2001; D'Albora et al., 2002). Existe la posibilidad de que las células referidas pertenezcan al componente ovárico del sistema neuroendocrino difuso, dado que las células de fenotipo NE poseen la capacidad de incorporar, procesar, almacenar y liberar aminas biogénicas y por lo tanto presentan inmunopositividad a las enzimas de las vías de síntesis correspondientes. Además de las enzimas de la biosíntesis de aminas con actividad biológica, las células NE poseen algunos otros marcadores que se encuentran presentes también en células de linaje neuronal (Le Douarin, 1988).

Aún cuando se ha identificado el origen del linaje celular neuroendocrino en el tracto gastrointestinal y el páncreas de pollo, además de haberse caracterizado a las distintas subpoblaciones (Rawdon y Andrew, 1999), no se ha hecho una

caracterización detallada, ni ha quedado fehacientemente probado el origen de la población NE ovárica de los vertebrados.

Planteamiento del Problema

El ovario contiene células que muestran marcadores para el linaje neuronal. Si bien se ha postulado que éstas son neuronas, la caracterización hasta ahora realizada es parcial por lo que ellas podrían pertenecer al linaje neuroendocrino.

Dadas las evidencias actuales de que las células con fenotipo neuroendocrino surgen a partir de prácticamente cualquiera de las hojas blastodérmicas del embrión, el estudio *in vivo* del origen, migración, colonización y diferenciación neuroendocrina de la cresta neural en los primordios gonadales, resuelven la cuestión del origen incierto de las células del sistema neuroendocrino en el ovario. Un modelo biológico ideal, representativo de vertebrados para hacer estudios de marcaje y trazado de la migración de las células precursoras de múltiples linajes celulares es el embrión de pollo, sin embargo no se ha reportado evidencia de la existencia de una población celular de estas características en el ovario de la gallina doméstica. Dada la carencia de información respecto a un linaje celular neuronal o neuroendocrino en el ovario de *Gallus gallus*, es imperativo sentar las bases para poder discernir su origen y dilucidar su ontogenia mediante la identificación de su existencia y la obtención de evidencia de su naturaleza y características fenotípicas.

Hipótesis

El estroma del ovario inmaduro de *Gallus gallus* contiene una población de células neuroendocrinas.

Objetivos

El presente trabajo se centró en identificar a las células de linaje neuroendocrino en el estroma del ovario inmaduro de la gallina domestica, describir su distribución y realizar una caracterización de la población celular mediante el análisis de su fenotipo a nivel ultraestructural y la inmunolocalización de factores característicos de los gránulos secretorios de células de este sistema, así como la detección de la presencia de las enzimas necesarias para la síntesis de monoaminas con efecto biológico.

Material y métodos

Modelo Biológico

Se utilizaron 10 ovarios izquierdos de pollitas para cada una de las edades entre los 10 y los 14 días posteclosión. Las pollitas se obtuvieron a partir de huevos fértiles de un proveedor comercial (Aves Libres de Patógenos Específicos, ALPES, Tehuacán, Puebla, México), que se incubaron a 37.5°C, con humidificación automática y movimiento continuo, durante 21 días hasta su eclosión. Las pollitas nacidas se mantuvieron a una temperatura constante de 24.0°C, con ciclos de luz - oscuridad de 12/12 horas, con acceso *ad libitum* a alimento (Purina, México) y agua hasta alcanzar la edad de estudio.

A las edades especificadas, los animales se sacrificaron con una inyección intraperitoneal de pentobarbital sódico (85.5 mg kg⁻¹) y posteriormente se decapitaron. El manejo y sacrificio de los animales se apegó a las normas establecidas por 'CARE 308.01 Avian Euthanasia' en el Centro para Recursos Animales y Educacion de la Universidad de Cornell, Nueva York, Estados Unidos (Guanzini, 2004; based on the AVMA [American Veterinary Medical Association] Guidelines on Euthanasia, 2007) y los protocolos fueron revisados y aprobados por el Comité para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM.

Los ovarios se disecaron incluyendo la glándula adrenal y se fijaron por inmersión toda la noche a 4°C en paraformaldehído (PFA) al 4% en solución amortiguadora de fosfatos (PB; 0.1M, pH 7.4). Las muestras de tejido fueron lavadas dos veces en PB antes de ser incubadas a 4°C en solución de sacarosa

al 30% en PB, para crioprotección. Los ovarios se incluyeron en NEG-Frozen Section Medium (Richard-Allan Scientific, U.S.A.) y fueron congelados sobre hielo seco. Se realizaron cortes transversales de los ovarios entre 30 y 50 μm de grosor, utilizando un microtomo criostático (Microm HM550, Alemania) a -20°C . Los cortes obtenidos se colectaron en una solución crioprotectora (etilenglicol 25%, glicerol 25% en PB) y se almacenaron a -20°C hasta su procesamiento para la inmunodetección de los marcadores neuroendocrinos seleccionados.

Para el estudio de la población celular neuroendocrina en ovarios de edades previas a la eclosión, se realizó la incubación del huevo fértil y el desarrollo se detuvo por enfriamiento a las edades seleccionadas entre los 11 y los 16 días de incubación (estadios HH37, HH38, HH39, HH40, HH41 y HH42; Hamburger y Hamilton, 1951). Se realizaron incubaciones de huevo fértil en tres ocasiones y se utilizaron 5 ovarios izquierdos para cada una de las edades en cada ocasión. El sexo de los animales se determinó con base en la asimetría gonadal presente en las hembras. Los ovarios izquierdos obtenidos se procesaron de la misma manera que para las edades posteriores a la eclosión. Una vez incluidos en medio NEG-Frozen Section Medium, se obtuvieron cortes de $20\mu\text{m}$ de grosor, en microtomo criostático a -20°C , mismos que fueron directamente montados en laminillas gelatinizadas. Inmediatamente después del montaje, se siguió el protocolo para la inmunodetección de las enzimas tasa limitante de las vías de síntesis de catecolaminas e indolaminas, de la misma manera en que se realizó para edades posteclosión.

Marcadores Neuroendocrinos

Los marcadores neuroendocrinos seleccionados para la identificación y caracterización de las células del sistema neuroendocrino difuso del ovario de la gallina doméstica fueron las enzimas tirosina hidroxilasa (TH), dopamina β -hidroxilasa (DBH), triptofano hidroxilasa (TPH) y la L-DOPA descarboxilasa (DDC). Por otro lado, la presencia de neurofilamento de cadena pesada (NF-H) se incluyó como indicador del fenotipo neuroendocrino y como evidencia de las características de los gránulos secretorios se identificó la presencia de cromogranina A (ChgA) y sinaptosina (SYP). Adicionalmente, la inmunolocalización del citocromo P450aromatasa (P450arom ó CYP19A1) se realizó para obtener información acerca de la ubicación de las células neuroendocrinas con relación a las células esteroideogénicas del ovario. Los anticuerpos dirigidos en contra de los marcadores seleccionados, los fabricantes y las diluciones utilizadas se resumen en el cuadro 1.

La inmunodetección de los marcadores se realizó mediante la visualización de la reacción de la peroxidasa de rábano con 3,3'-diaminobencidina (DAB, Vector Laboratories, Inc., U.S.A.) de acuerdo al protocolo del fabricante. Inicialmente, la inactivación de la actividad endógena de peroxidasas se hizo por incubación de la muestra de tejido en peróxido de hidrógeno (H_2O_2) 0.3% en PB suplementado con Triton X-100 (PBT; Sigma, USA) 0.3% a temperatura ambiente (TA) durante 30 min. Posteriormente, los cortes fueron lavados cuatro veces en PB durante 10 min a TA, seguidos por una incubación en BioSB Immuno Retriever (BioSB, Inc., USA) durante 30 min a 70°C para el desenmascaramiento de epítopes.

Después de tres lavados en PB y uno en PBT durante 10 min cada uno a TA, los cortes se incubaron con los distintos anticuerpos primarios a las diluciones referidas durante 40 h a 4°C, con agitación continua. Después de la incubación con el anticuerpo primario, los cortes se lavaron suavemente y se incubaron con el anticuerpo secundario correspondiente, levantado en burro y acoplado a biotina (1:500 en PBT; Chemicon, USA) durante 120 min a TA y agitación continua. Después de cuatro lavados en PB a TA durante 10 min cada uno, los cortes de ovario se incubaron con el complejo avidina-peroxidasa (Vectastain ABC Elite, Vector Laboratories, USA) durante 90 min a temperatura ambiente. Finalmente, y posterior a cuatro lavados de 10 min en PB a TA, se realizó el revelado con el protocolo de DAB (Vector Laboratories, USA) a TA. Los tiempos de revelado con DAB se determinaron para cada una de las inmunorreacciones con los anticuerpos primarios de acuerdo a la intensidad del marcaje. Una vez terminada la inmunodetección del marcador, los cortes de tejido fueron montados en laminillas gelatinizadas y se dejaron secar durante 2 horas a TA en una cámara de vacío.

Las muestras montadas se rehidrataron con solución salina (0.9%) y fueron contrateñidas con verde metilo (0.05% w/v; Sigma, USA) en solución amortiguadora de acetato de sodio (0.1M, pH 4.2) durante 2 min. Los cortes fueron lavados con agua desionizada para remover el exceso de colorante y se dejaron secar al aire durante 15 min. Finalmente, las muestras se cubrieron utilizando Cytoseal-60 mounting medium (Richard-Allan Scientific, Inc., USA). Las muestras se observaron por microscopía de campo claro con un

microscopio Nikon Eclipse 80i y las imágenes se capturaron con el programa NIS-ELEMENTS® F3.0 (Nikon, Japan).

Inmunofluorescencia

En una segunda fase del trabajo, se llevaron a cabo estudios de doble inmunofluorescencia con el propósito de caracterizar con mayor detalle la(s) población(es) de células neuroendocrinas identificadas. Esta fase se llevó a cabo siguiendo el mismo protocolo establecido para cada anticuerpo primario en la localización por inmunocitoquímica de uno solo de los marcadores, de manera secuencial. Se incorporó un paso de bloqueo de 30 min a TA con avidina carente de fluoróforo ('cold avidin'; Vector Laboratories, USA) previo a la incubación con el anticuerpo secundario. La inmunorreacción se evidenció con avidina conjugada con fluoresceína o rojo Texas (1:200, 60 min a TA; Vector Laboratories, USA). Una vez lavadas las muestras en PB, los cortes se contratiñeron con 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI, $1\mu\text{g mL}^{-1}$) durante 3 min a TA, se montaron en laminillas gelatinizadas, se cubrieron con un medio de montaje que retarda el decaimiento de la marca fluorescente (Dako, USA) para su observación y la captura de las imágenes. Las muestras procesadas por inmunofluorescencia se observaron en un microscopio Olympus BX51 DSU (Disc Scanning Unit; Olympus, USA) y las imágenes se capturaron utilizando el programa MBF BIOSCIENCE STEREO INVESTIGATOR® (MicroBrightField, Inc., USA).

Los controles negativos, para ambos procedimientos, se generaron omitiendo el anticuerpo primario.

Microscopía electrónica de transmisión

Los ovarios disecados se lavaron en solución salina 0.9% y se seccionaron transversalmente en fragmentos de aproximadamente 1.0 mm³. Posteriormente, las muestras fueron fijadas en paraformaldehído 4% y glutaraldehído 2.5% en solución amortiguadora de cacodilato de sodio (0.1M, pH 7.4) durante 3 h a 4°C. Después de tres lavados de 10 min en PB, las muestras fueron postfijadas en tetraóxido de osmio (Polysciences, Inc., USA) al 1.0% en PB durante 2 h a TA, seguido de dos lavados adicionales de 10 min en PB. La deshidratación se llevó a cabo en etanol 70, 95 y 100% y óxido de propileno 100% (dos veces en cada paso durante 10 min), seguida de una incubación de preinclusión, durante toda la noche a TA, en una mezcla 1:1 de medio de inclusión (EMBed-812, Electron Microscopy Sciences, USA, preparada de acuerdo al protocolo del fabricante) y óxido de propileno. La inclusión final se realizó por incubación en el medio EMBED-812 durante 24 h a 60°C. Se obtuvieron cortes semifinos de las muestras, que se montaron en laminillas y fueron teñidos con azul de toluidina. Una vez identificadas las regiones de interés, se realizaron cortes ultrafinos que fueron observados y fotografiados en un microscopio electrónico M-10 (Carl Zeiss NTS GmbH, Germany). Los cortes semifinos y ultrafinos se obtuvieron con un ultramicrotomo Reichert-Jung Ultracut E (USA).

Cuadro 1

Lista de anticuerpos utilizados para identificar, localizar y caracterizar a las células neuroendocrinas del ovario inmaduro de *Gallus gallus*.

MARCADOR	FUNCIÓN	Fuente de la IgG	DILUCIÓN	MARCA
Cromogranina A (ChgA)	Una pre-pro-proteína presente en gránulos secretorios de centro denso de células simpato-adrenales, cuyos productos de corte enzimático son pancreastatina, vasostatina, parastatina, cromostatina y β -granina, entre otros, principalmente involucrados en circuitos de regulación negativa.	Policlonal, cabra.	1:1000	Santa Cruz, Inc., U.S.A.
L-DOPA Descarboxilasa (DDC)	Involucrada en la descarboxilación de la L-3,4-dihidrofenilalanina (DOPA) en la producción de dopamina y la descarboxilación del L-5-hidroxitriptofano en la producción de serotonina. Participa en las vías de síntesis de neurotransmisores de las familias de catecolaminas e indolaminas.	Policlonal, cabra.	1:1000	Santa Cruz, Inc., U.S.A.
Dopamina β -hidroxilasa (DBH)	Cataliza la conversión de dopamina a noradrenalina dentro de la vía de síntesis de catecolaminas.	Monoclonal, ratón	1:4000	Chemicon, U.S.A.
		Policlonal, oveja	1:2000	Abcam, Plc., U.S.A.
Neurofilamento de cadena pesada (NF-H)	Presente en algunas células neuroendocrinas e identificada en las células de tipo neural en las gónadas de mamíferos.	Policlonal, conejo	1:4000	Chemicon, U.S.A.
P450aromatasa (Arom)	Cataliza la conversión de andrógenos a estrógenos. Su presencia proporciona información respecto a la relación entre las células ováricas neuroendocrinas y esteroidogénicas.	Policlonal, conejo	1:4000	Abcam, Plc., U.S.A.
Sinaptofisina (SYP)	Proteína asociada a la membrana de los gránulos neurosecretorios involucrada en la génesis y reciclaje de los de las vesículas presinápticas o secretorias.	Policlonal, oveja	1:4000	Abcam, Plc., U.S.A.
Triptofano Hidroxilasa (TPH)	Es la primera enzima y tasa limitante de la vía de síntesis de los neurotransmisores de la familia de las indolaminas, que participa con la conversión del L-triptofano a L-5-hidroxitriptofano.	Monoclonal, ratón	1:4000	Sigma, U.S.A.
Tirosina Hidroxilasa (TH)	Es la primera enzima y también la tasa limitante de la biosíntesis de los neurotransmisores de la familia de las catecolaminas; participa con la conversión de tirosina a 3,4-dihidrofenilalanina.	Policlonal, conejo	1:4000	Chemicon, U.S.A.
		Policlonal, oveja	1:8000	Chemicon, U.S.A.

Resultados

El estroma del ovario de la pollita entre los 12 y 14 días de edad posteclosión contiene una población de células neuroendocrinas (NE) inmunorreactivas (IR) para la sinaptofisina (SYP) y la cromogranina-A (ChgA), factores característicos de los gránulos secretorios de un gran número de células NE. La inmunolocalización del neurofilamento de cadena pesada (NF-H) mostró también una población celular IR de características y distribución similares a las identificadas con SYP y ChgA. A nivel ultraestructural, las células presentan gránulos secretorios, de centro denso. Esta población celular mostró también IR para las enzimas de las vías de síntesis de catecolaminas e indolaminas, específicamente, la tirosina hidroxilasa (TH), la L-DOPA descarboxilasa (DDC), la dopamina β -hidroxilasa (DBH) y la triptofano hidroxilasa (TPH; Figura 5). En todos los casos, las células observadas tuvieron un diámetro menor a 10 μm , se encontraron dispersas en el estroma ovárico aisladas o en pequeños conjuntos (Figura 6).

Para determinar si las células NE identificadas constituían una sola población o eran una población heterogénea, se realizaron análisis de colocalización de los marcadores por inmunofluorescencia. Éstos revelaron que en prácticamente todas las células NE ováricas la SYP, la ChgA y el NF-H se encuentran colocalizados (Figura 7).

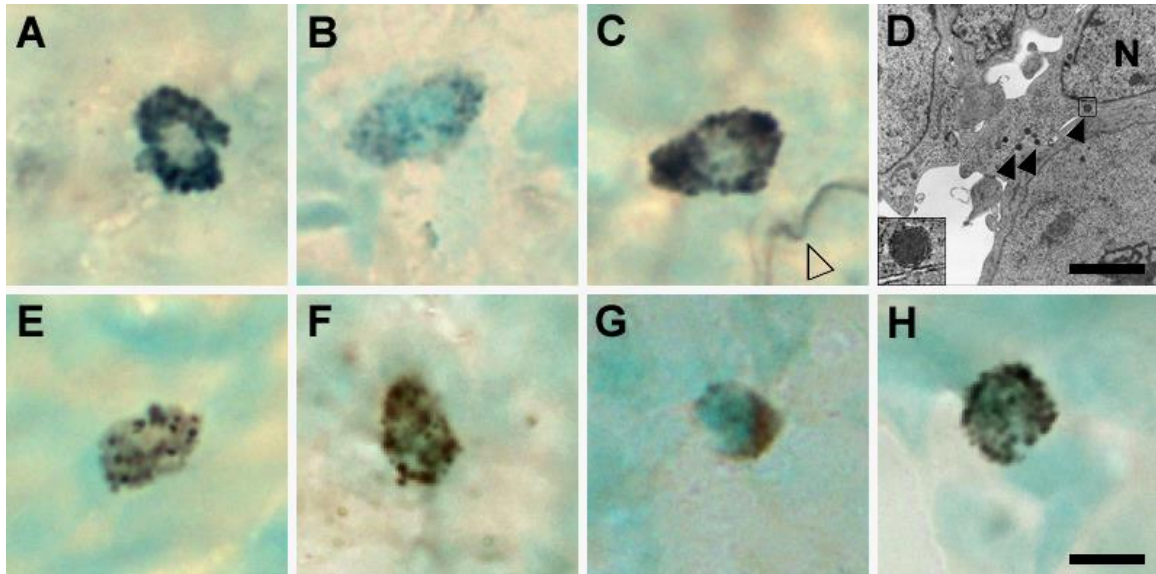
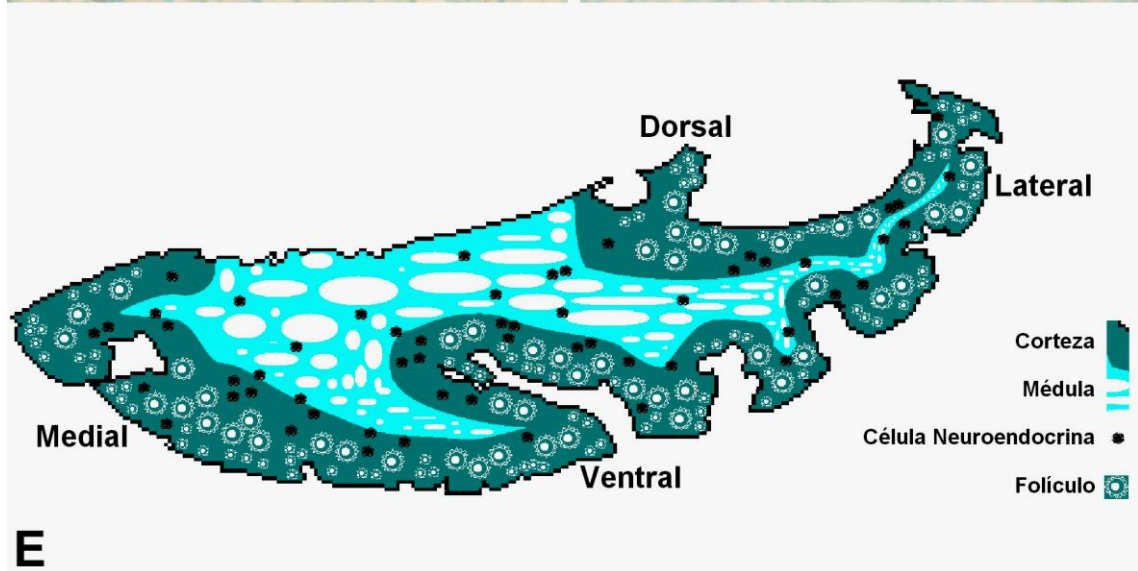
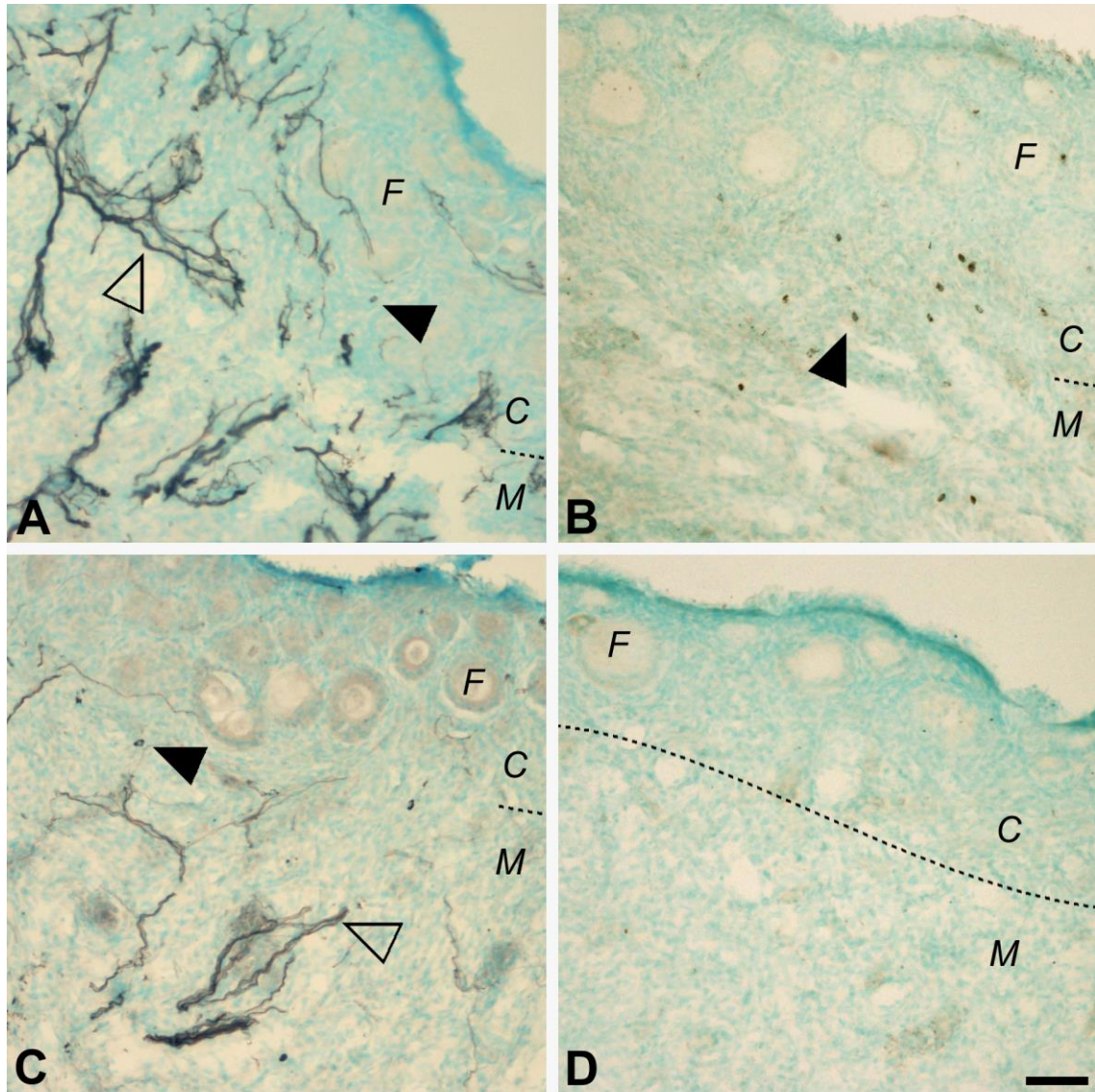


Figura 5. Las células identificadas en ovario de gallina de 12 días de edad porsteclosión, mostraron inmunoreactividad contra la sinaptofisina (A), la cromogranina-A (B), el neurofilamento de cadena pesada (C) y poseen gránulos secretorios de centro denso (flechas y recuadro en D; N, señala el núcleo de la célula. Escala = 1 μ m). También, fue posible observar fibras nerviosas inmunorreactivas para el neurofilamento de cadena pesada en el estroma ovárico (flecha abierta en C). Las células NE se mostraron inmunopositivas para las enzimas de las vías de síntesis de monoaminas, tirosina hidroxilasa, triptofano hidroxilasa, L-DOPA descarboxilasa y dopamina β -hidroxilasa (E-H, respectivamente). Escala = 10 μ m.

Figura 6. Se muestra la inmunorreactividad (IR) para los marcadores neuroendocrinos representativos en cortes transversales de 30 μm de grosor, de ovario inmaduro de gallina de 12 días de edad posteclosión. La población celular neuroendocrina identificada (flechas) mostró IR positiva para ambas enzimas tasa limitantes, tirosina hidroxilasa (A) y triptofano hidroxilasa (B), que incorporan los aminoácidos tirosina y triptofano en las vías de síntesis de catecolaminas e indolaminas respectivamente. Un marcaje robusto contra TH se observó en fibras nerviosas y haces de ellas (flechas abiertas) que inervan la médula ovárica y se continúan hasta la región cortical, alcanzando la zona perifolicular. Se observaron grupos de fibras nerviosas similares inmunorreactivas para el neurofilamento de cadena pesada (NF-H), aunque no tan abundantes o intensamente marcadas. La inmunorreactividad contra NF-H se hizo patente también en las células neuroendocrinas del ovario inmaduro de la gallina (C). En todos los casos, las células observadas se encontraron aisladas y dispersas en el estroma ovárico. Se incluye una imagen representativa del control de las inmunolocalizaciones de los marcadores neuroendocrinos, en la que el anticuerpo primario se excluyó de la reacción (D). La línea discontinua señala el límite aproximado entre la corteza (C), que contiene a los folículos (F) y la médula (M) ovárica. En esta etapa del desarrollo no existe una división clara entre ambas regiones. Escala = 50 μm . Representación esquemática de un corte transversal de ovario de una gallina de 14 días de edad posteclosión, en el que se muestra la distribución topográfica de las células neuroendocrinas (NE) en el estroma ovárico (E). Las células NE se observaron predominantemente en la zona perifolicular de la corteza y en regiones subcorticales de la médula en las edades estudiadas.



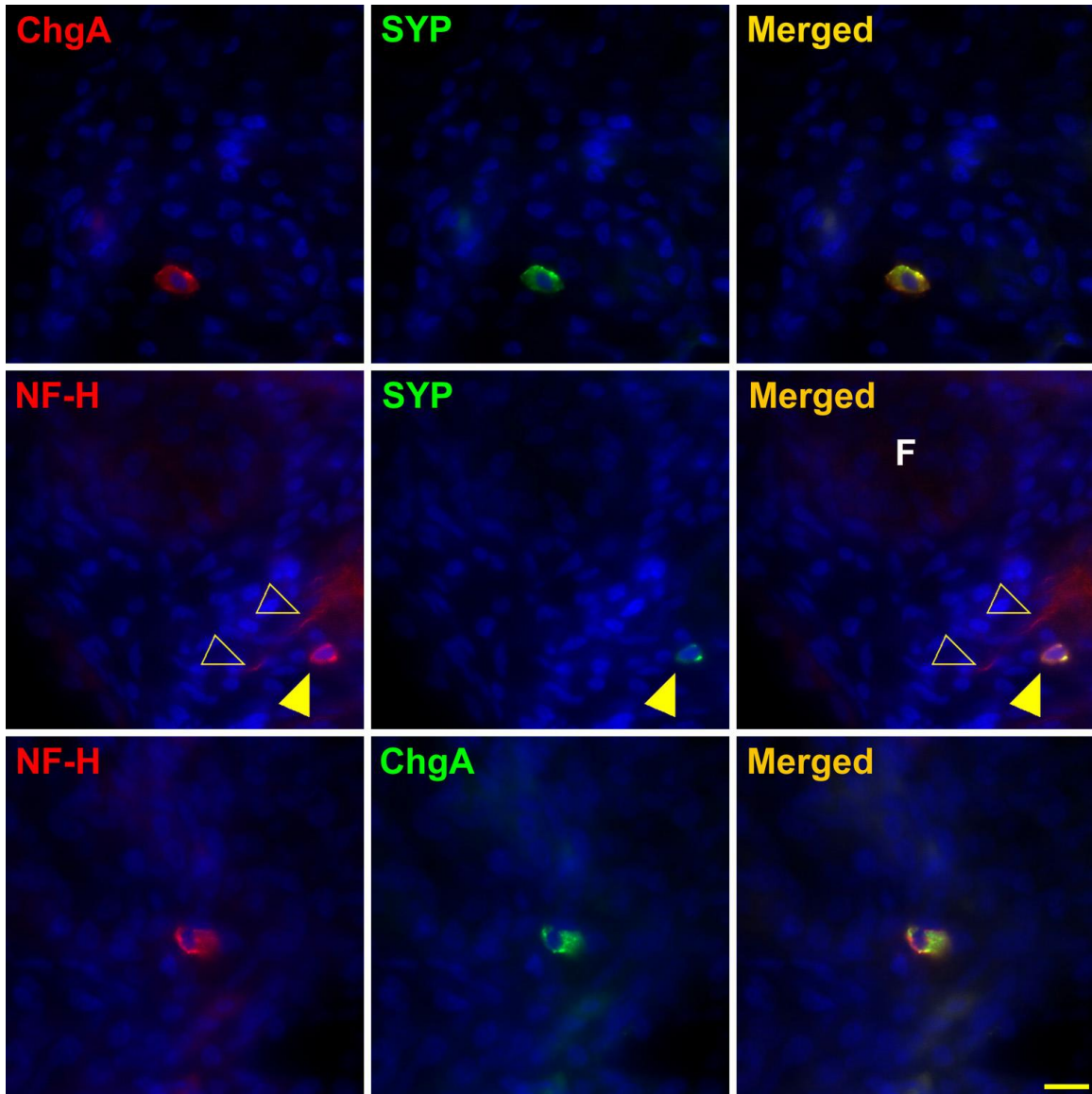


Figura 7. Estudio por inmunofluorescencia de la colocalización de la cromogranina-A (ChgA), la sinaptosina (SYP) y el neurofilamento de cadena pesada (NF-H) en células NE del ovario de gallina de 14 días de edad posteclosión. Algunas células NE (flechas amarillas) se observaron en cercanía de fibras inmunorreactivas para el NF-H (flechas abiertas) y cerca de folículos ováricos (F). Escala = 10 μ m.

De igual forma, se observó la colocación de las enzimas que participan en las vías de síntesis de catecolaminas e indolaminas. El estudio por inmunofluorescencia mostró que las células NE ováricas poseen los elementos necesarios para la síntesis de dopamina y noradrenalina (Figura 8), así como para la producción de serotonina (Figura 9). Un hallazgo interesante, fue el hecho de que las enzimas para ambas vías de síntesis de monoaminas estuvieron coexpresadas en la misma población celular (Figura 10). Estas enzimas a su vez, se encontraron colocadas con SYP y ChgA (Figuras 11 y 12, respectivamente).

Con el fin de establecer la relación espacial que guarda la población de células NE en la zona de transición corticomedular con las células esteroideogénicas del ovario inmaduro de la gallina, se hizo una doble inmunolocalización con fluorescencia de los marcadores neuroendocrinos y el citocromo P450aromatasa (CYP19A1). El inmunomarcaje contra el CYP19A1 hizo evidentes células productoras de estrógenos clásicas, de citoplasma abundante, que forman grupos o cordones en la región de transición corticomedular del ovario. Algunas células NE se vieron en la proximidad de los grupos de las células esteroideogénicas y también mostraron inmunorreactividad para el citocromo. Un análisis posterior mostró que las células esteroideogénicas también son inmunorreactivas para algunos de los marcadores neuroendocrinos, como la L-DOPA descarboxilasa, pero no para todos, como fue el caso de la triptofano hidroxilasa (Figura 13).

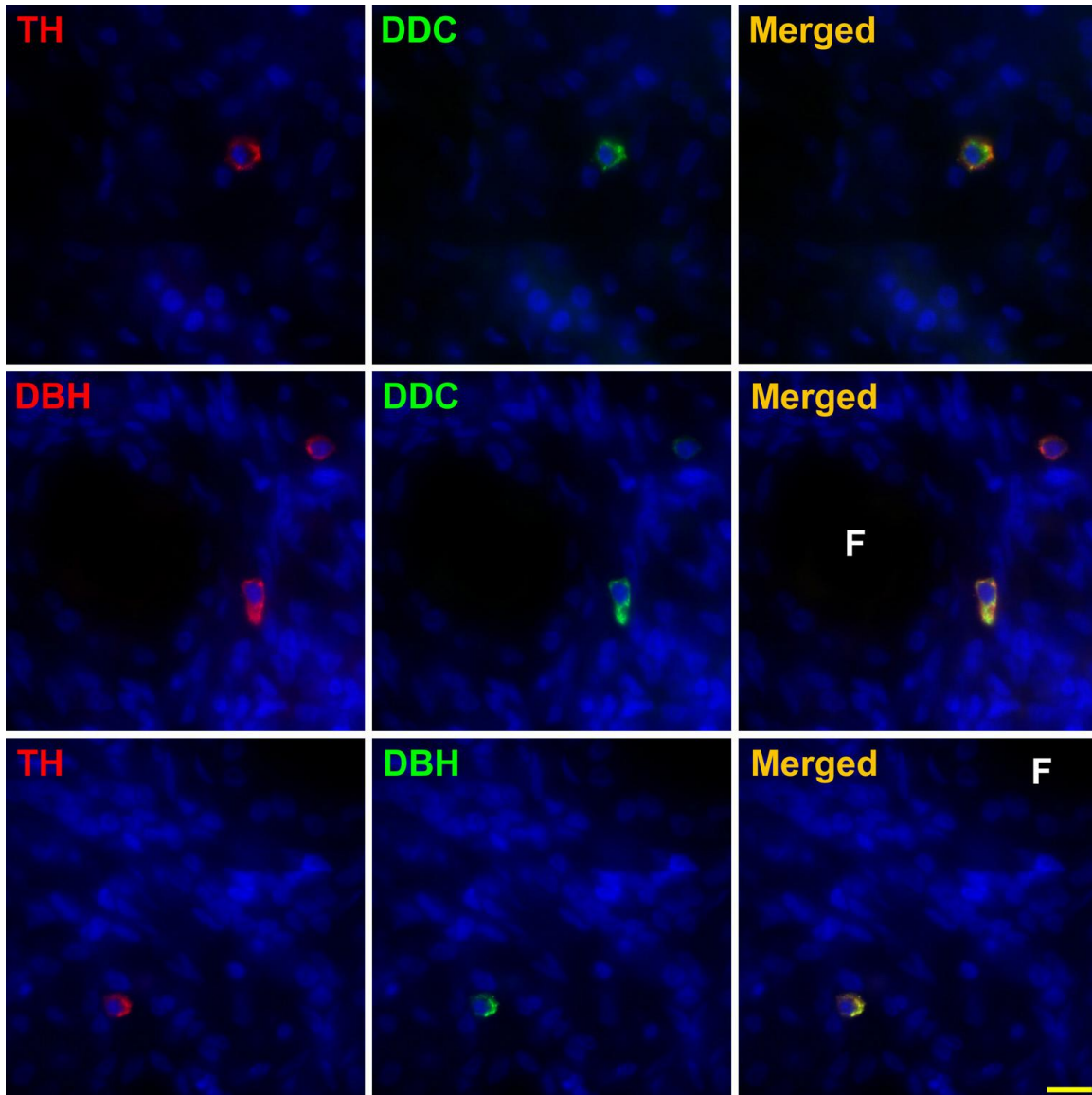


Figura 8. Se muestra la colocalización de las enzimas de la vía de síntesis de catecolaminas, tirosina hidroxilasa (TH), L-DOPA descarboxilasa (DDC) y dopamina β -hidroxilasa en las células NE del ovario de gallina de 14 días de edad. Algunas de estas células se encontraron en el espacio intersticial de la corteza cerca de los folículos (F). Escala = 10 μ m.

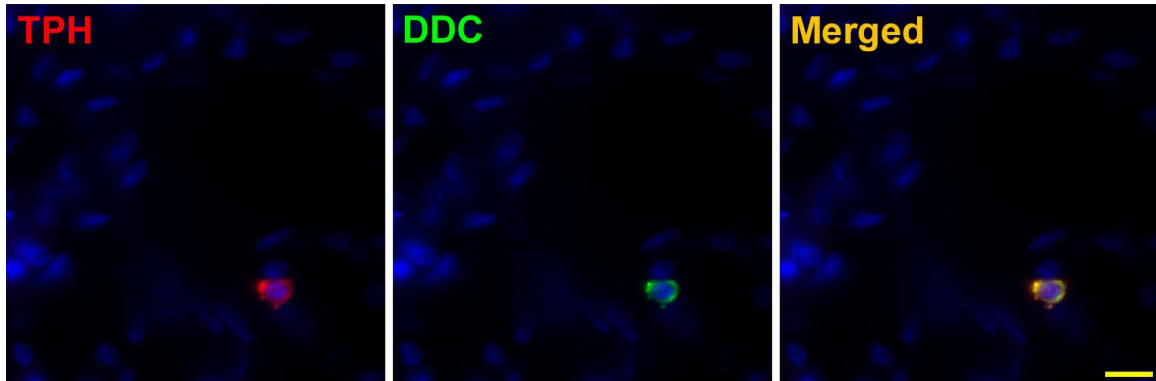


Figura 9. Estudio por inmunofluorescencia que muestra la colocalización de las enzimas involucradas en la síntesis de la serotonina, triptofano hidroxilasa (TPH) y DDC en células NE del ovario inmaduro a los 14 días de edad. Escala = 10 μ m.

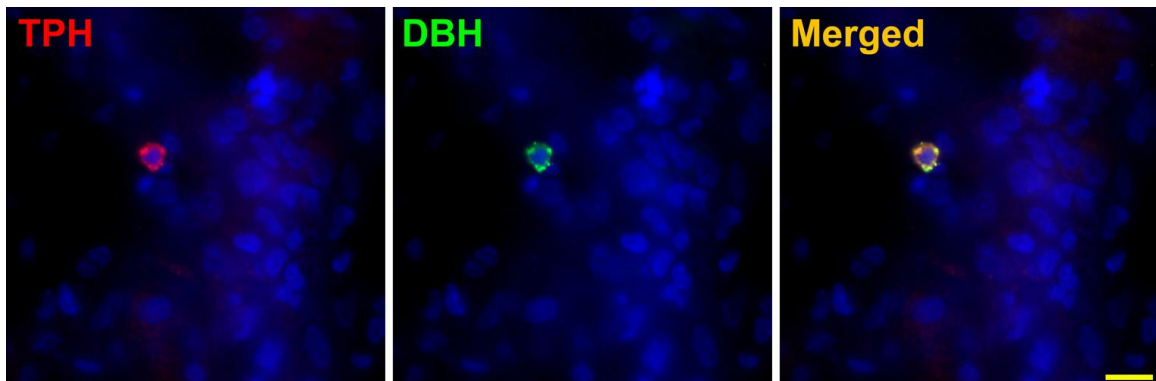


Figura 10. Estudio de la colocalización de las enzimas TPH y DBH que participan en la biosíntesis de indolaminas y catecolaminas respectivamente, en las células NE del ovario inmaduro (14 días posteclosión) de la gallina doméstica. Escala = 10 μ m.

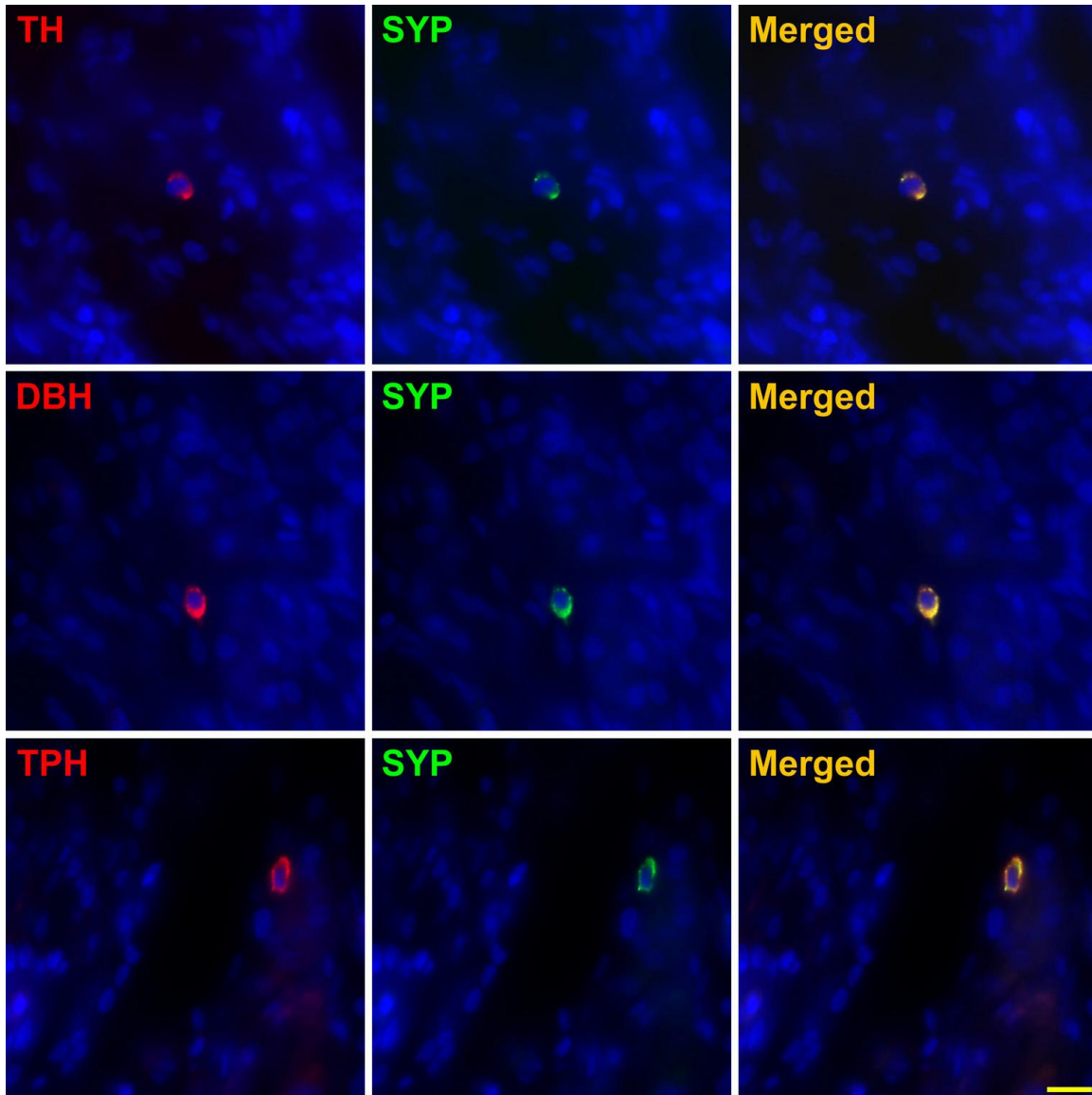


Figura 11. Inmunofluorescencia que muestra la colocalización de las enzimas involucradas en la biosíntesis de catecolaminas e indolaminas, TH, DBH y TPH con la SYP en la población de células NE del ovario de gallina a los 14 días posteclosión. Escala = 10 μ m.

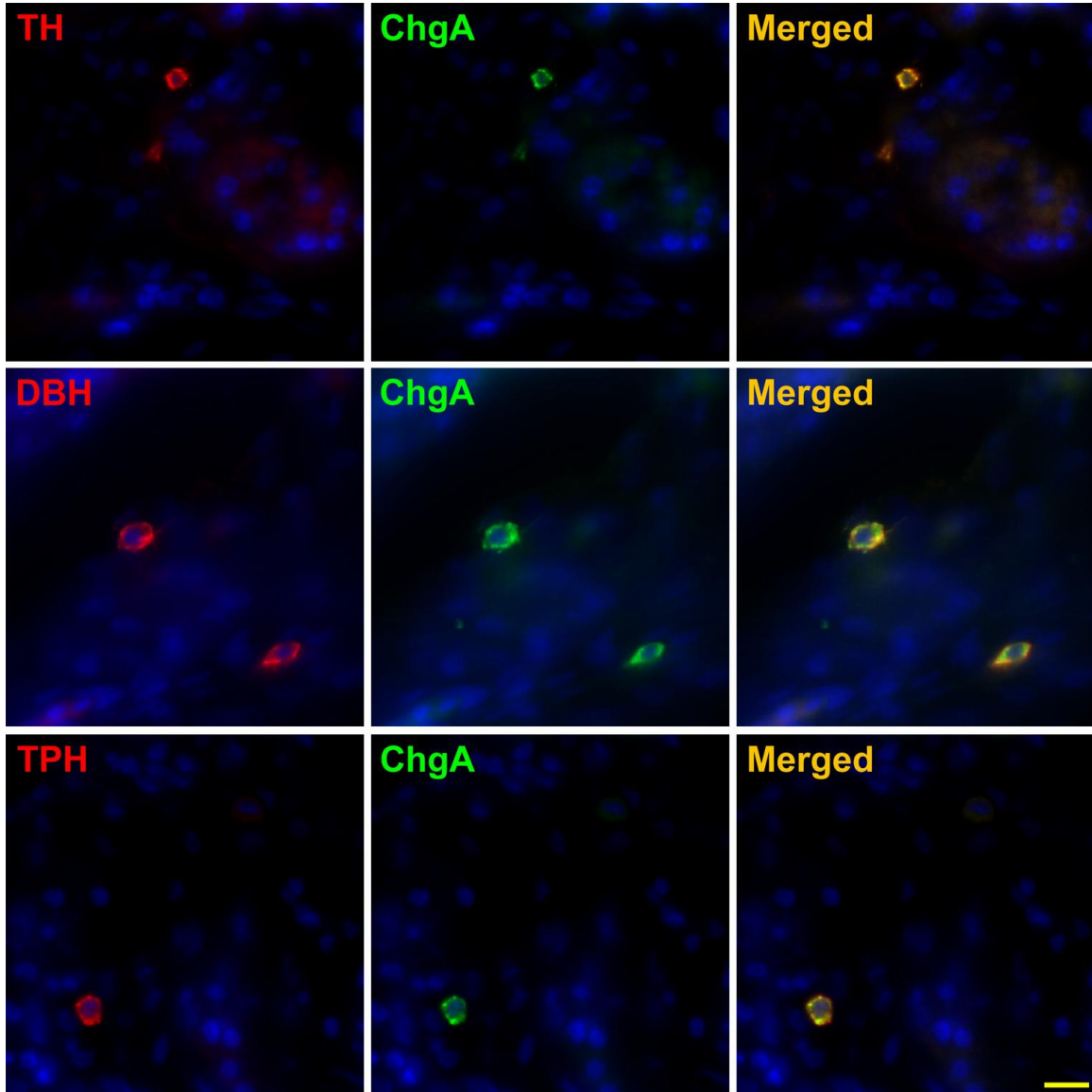


Figura 12. Colocalización por inmunofluorescencia de las enzimas que participan en la síntesis de catecolaminas e indolaminas (TH, DBH y TPH) con la ChgA en células NE del ovario de gallina a los 14 días de edad posteclosión. Escala = 10 μ m.

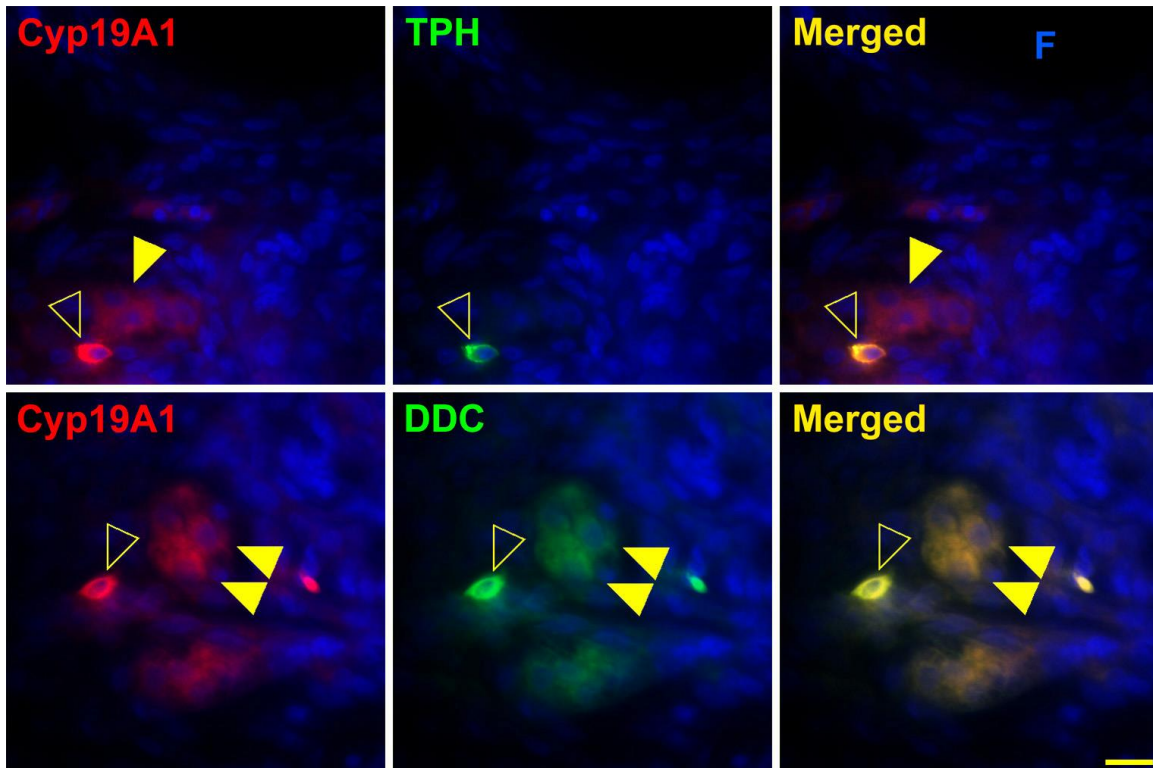


Figura 13. En la imagen se muestra la inmunorreactividad contra el citocromo P450aromatasa (CYP19A1) en células productoras de estrógenos clásicas (flechas abiertas) del ovario de la gallina doméstica a los 14 días de edad posteclosión. Algunas de las células NE ováricas se observaron en la cercanía de células esteroidogénicas en la región subcortical la médula ovárica (F = folículo). Inesperadamente, las enzimas de ambas vías de síntesis de monoaminas (se muestra TPH) se observaron colocalizadas con el CYP19A1 en la población celular NE del ovario. Otro hallazgo interesante, es que las células estrogénicas del estroma ovárico (flechas amarillas) presentaron inmunorreactividad para algunos de los marcadores neuroendocrinos (se muestra DDC). Escala = 10 μ m..

Finalmente, para poder determinar la edad del desarrollo *in ovo* en la que son inicialmente visibles las células representativas de la población celular del SND del ovario, se realizó la inmunolocalización de las enzimas tasa limitante de la biosíntesis de catecolaminas (TH, Figura 14) y de indolaminas (TPH, Figura 15) en los distintos estadios preeclosión (HH37 – HH42, correspondientes a edades de 11 hasta 16 días de incubación; Hamburger y Hamilton, 1951). Se observaron células inmunorreactivas a TH y TPH, de características similares a las

identificadas en etapas posteclosión, en ovarios de embrión de pollo. En el primero de los casos, la IR contra TH se hizo apreciable en las células del SND ovárico a partir de la etapa HH41 en todos los casos, que corresponde aproximadamente a 15 días de incubación (Figura 14), mientras que las células IR para la TPH fueron evidentes en etapas más tempranas pero consistentemente nunca antes del estadio HH39, que corresponde aproximadamente a 13 días de incubación (Figura 15).

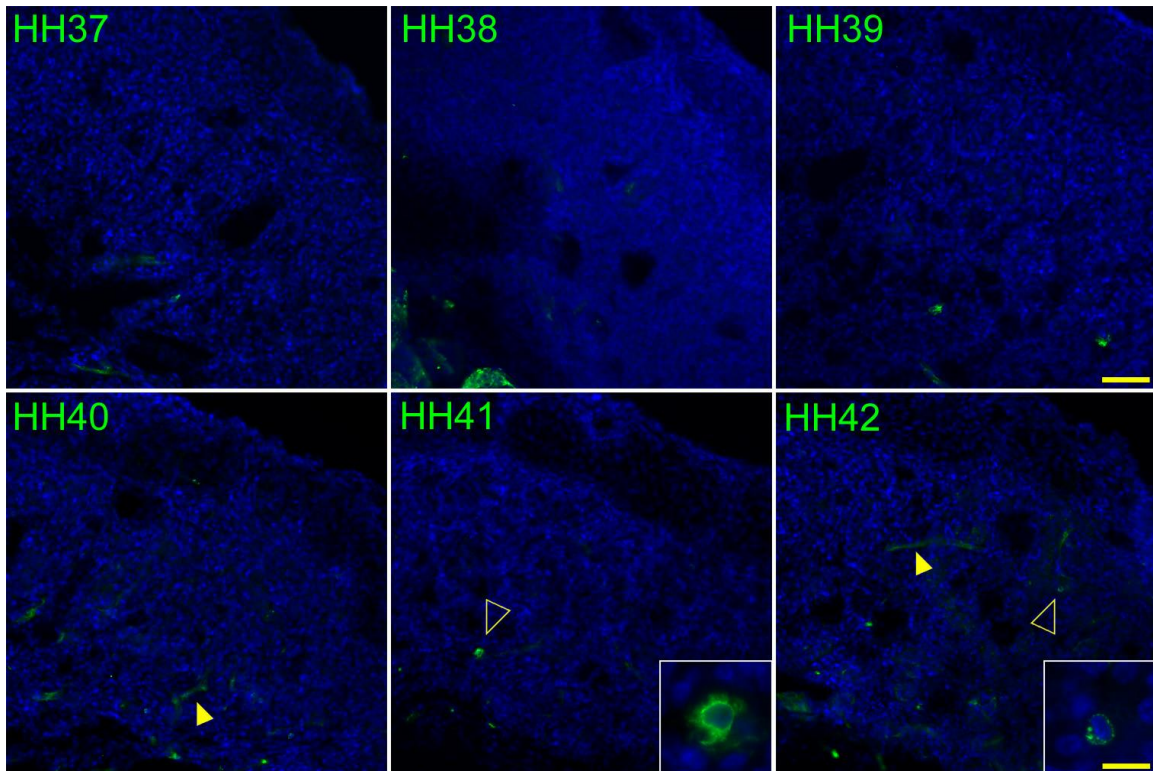


Figura 14. Inmunolocalización de TH (Tirosina Hidroxilasa) en corte transversal de ovario de embrión de pollo en estadios del desarrollo *in ovo* desde HH37 hasta HH42 (Escala = 50 μ m). Es posible apreciar a las células del SND ovárico inmunopositivas (flechas abiertas) a partir del estadio HH41 (~15 días de incubación). En los recuadros se muestra a las células señaladas con mayor resolución (Escala = 10 μ m). La inmunorreacción también mostró algunas fibras nerviosas inmunopositivas para la TH (flechas sólidas).

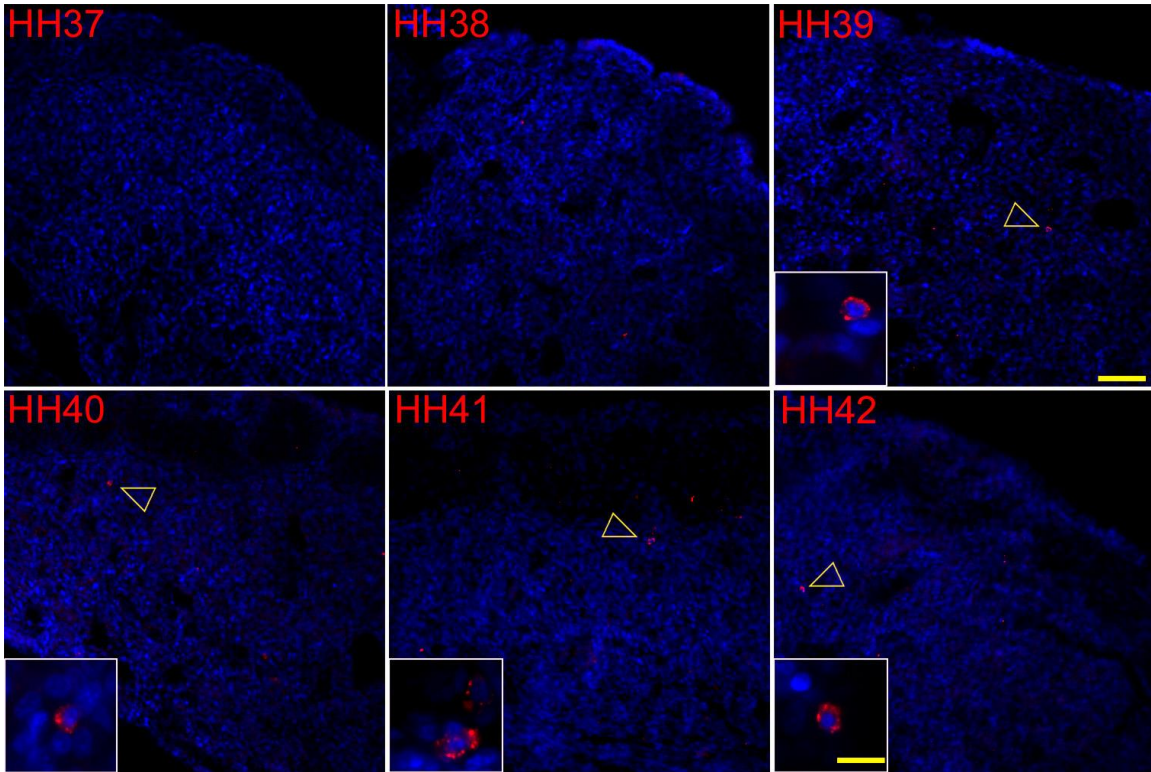


Figura 15. Inmunolocalización de TPH (Triptofano Hidroxilasa) en corte transversal de ovario de embrión de pollo en estadios del desarrollo *in ovo* desde HH37 hasta HH42 (Escala = 50 μ m). Es posible apreciar a las células del SND ovárico inmunopositivas (flechas abiertas) a partir del estadio HH39 (~13 días de incubación). En los recuadros se muestra a las células señaladas con mayor resolución (Escala = 10 μ m).

Discusión

Las células neuroendocrinas constituyen una población heterogénea que se encuentra presente en prácticamente todos los órganos del cuerpo de los vertebrados. Sin embargo, no ha quedado lo suficientemente claro si la población celular está representada en los ovarios. Aunque se ha reportado la existencia de células parecidas a neuronas o incluso neuronas ováricas en ovarios de mamíferos en distintas etapas ontogénicas, así como en el ovario inmaduro del avestruz (Dees et al. 1995; D'Albora y Barcia, 1996; Anesetti et al. 2001; D'Albora et al. 2002; Kimaro & Madekurozwa, 2006; Madekurozwa, 2008), la naturaleza de las células descritas no era concluyente, dado que la presencia de la tirosina hidroxilasa, neurofilamentos, enolasa neurona específica y el producto protéico del gen 9.5, entre otros, no son marcadores exclusivos de neuronas, sino que también se encuentran presentes en células de linaje neuroendocrino (Perez et al., 1990; Martin et al., 2000; Portela-Gomes et al., 2004).

Con este trabajo, se describe una población celular que fue positivamente marcada para la SYP, la ChgA y el NF-H, así como para las enzimas involucradas en la biosíntesis de catecolaminas e indolaminas, TH, TPH, DDC y DBH. Esta población celular, también mostró la presencia de gránulos citoplásmicos secretorios de contenido electrodensito y delimitados por una membrana. En conjunto, los rasgos observados en la población celular del ovario inmaduro de la gallina doméstica, son características del fenotipo neuroendocrino (Pearse, 1986; Flatmark, 2000; Toni, 2004) y sugieren que

pertenecen al sistema neuroendocrino difuso. De ahí que nuestras observaciones difieren de los trabajos hasta ahora reportados, en los que se menciona la existencia de células parecidas a neuronas en el ovario de aves (Kimaro y Madekurozwa, 2006; Madekurozwa, 2008). Nuestros hallazgos también sugieren la necesidad de reexaminar la idea de la existencia de las neuronas intrínsecas en ovarios de los mamíferos (Dees et al., 1995; D'Albora y Barcia, 1996; Mayerhofer et al., 1996; Anesetti et al., 2001; D'Albora et al. 2002), debido a que la caracterización fenotípica que sostiene dicha aseveración es incompleta.

En el presente estudio, se observó que las enzimas que participan en ambas vías de síntesis de monoaminas se encuentran colocalizadas en las células de fenotipo NE. Esto podría significar que las células NE del ovario inmaduro de la gallina doméstica poseen la capacidad de producir, y posiblemente liberar, los dos tipos de monoaminas. Se ha incrementado el cúmulo de evidencia que da soporte a la posibilidad de que algunas células puedan ser productoras y secretoras de ambos tipos de monoaminas (Pearse, 1986; Flatmark, 2000; Li et al. 2011). Sin embargo, es posible que las células NE del ovario inmaduro de la gallina doméstica posean este potencial dual porque no se han comprometido con su estado diferenciado terminal. Esta situación se ha documentado para neuronas colinérgicas y adrenérgicas periféricas de mamífero durante etapas tempranas en su desarrollo (von Bartheld y Rubel, 1989; Landis, 1990). Estudios ontológicos y comparativos de las células NE ováricas en cuestión podrían abordar estas posibilidades.

En un sentido ontológico, estudios preliminares mostraron inmunorreactividad para las enzimas tasa limitantes de la biosíntesis de catecloaminas e indolaminas en la población celular NE desde etapas del desarrollo previas a la eclosión (15 días de incubación, HH41, para la TH y desde los 13 días de incubación, HH39, para la TPH). Esto parece indicar que los rasgos fenotípicos de las células NE del ovario de la gallina aparecen paulatinamente hasta presentarse colocalizados en etapas posteriores a la eclosión.

La presencia de células de linaje neuroendocrino durante el desarrollo del ovario genera preguntas interesantes respecto a su función y a su origen embrionario. Es tentador formular la hipótesis de que los productos de sus secreciones participen en la regulación de la histogénesis ovárica de una manera directa, como se ha mostrado en el desarrollo del tracto respiratorio (Cutz, 1982; Pan et al., 2004 y 2006; Evsyukova, 2006). De hecho, se ha comprobado que las funciones de las monoaminas, como moléculas de señalización, están relacionadas con una gran variedad de procesos celulares y que la serotonina participa en la regulación del progreso del ciclo celular y el compromiso de diferenciación terminal de algunas poblaciones celulares durante el desarrollo (Turlejski, 1996; Dubé y Amireault, 2007; Čikoš et al., 2011). En el caso de aves domésticas maduras, se ha observado que la noradrenalina estimula las funciones reproductivas de las hembras por medio de la promoción de la expresión de receptores a las gonadotropinas hipofisiarias en las células foliculares (Ebeid et al., 2008), a diferencia de la dopamina o la serotonina que inhiben la ovulación (Sharp et al., 1989). Por lo anterior, es posible pensar que

las aminas biogénicas liberadas por la innervación y por el SND ovárico puedan participar de manera conjunta en etapas tempranas de la foliculogénesis.

La presencia de la población celular NE en el ovario inmaduro podría tener un efecto indirecto en el desarrollo mediante la modificación de la secreción de esteroides, ya que se ha observado que en etapas preeclósión el 17β -estradiol participa en la histogénesis ovárica mediante la modulación de la proliferación de distintos tipos celulares del ovario embrionario (Méndez-Herrera et al. 1993). Posiblemente, podrían también tener un efecto en el desarrollo del ovario por la regulación local del flujo sanguíneo en los distintos compartimientos funcionales del ovario en desarrollo (Mannelli et al., 1990).

Aún cuando fue posible visualizar esta población celular durante el desarrollo *in ovo*, la cuestión del origen sigue siendo materia de controversia, dado que el origen propuesto para las 'neuronas ováricas' (Dees et al. 2006) contrasta con la evidencia de que las células testiculares de Leydig, que poseen un fenotipo neuroendocrino (Davidoff et al., 1993, 2005), surgen a partir de la musculatura lisa y de los pericitos de la pared de los vasos locales (Davidoff et al. 2004).

Finalmente, un hallazgo interesante es que las células esteroidogénicas posean marca para algunas de las enzimas involucradas en la biosíntesis de monoaminas y que algunas células NE presenten marca para el citocromo P450aromatasa. Debido a que existe evidencia de que células con fenotipo neuroendocrino son precursoras de las esteroidogénicas del estroma testicular, sería interesante indagar si las células descritas en el presente trabajo dan origen a las esteroidogénicas del ovario. Estudios futuros que exploren la fuente

embrionaria, distante o local, que da origen a la población celular NE estudiada en el ovario de la gallina, así como estudios de la evolución y diferenciación de la misma, podrá resolver las incógnitas aquí expuestas.

Conclusión

Con el presente trabajo se pudo identificar una población celular de fenotipo neuroendocrino en el estroma del ovario inmaduro de la gallina doméstica. Esta población fue observada tanto en etapas previas a la eclosión, como durante las primeras semanas de vida fuera del huevo. Por su fenotipo y la distribución de sus elementos celulares, se les puede considerar el componente ovárico del sistema neuroendocrino difuso de la gallina. Su origen embrionario, sus posibles funciones, transitorias o definitivas, en los distintos estadios del desarrollo del ovario, así como la posibilidad de que puedan dar origen a una población celular con un fenotipo distinto en estado de diferenciación definitiva en el ovario maduro, permanecen por dilucidarse.

En un mundo utópico ...

... “Science operates by using evidence and reason. Doubt is prized, authority rejected. No finding is deemed ‘true’ – a notion that’s always provisional – unless it’s repeated and verified by others. We scientists are always asking ourselves, ‘How can I find out whether I’m wrong?’”

Jerry A. Coyne. “Science and religion aren’t friends” USA Today, October 11th 2010.

Referencias

1. Adriaensen D, Brouns I, Pintelon I, De Proost I, Timmermans JP. (2006) Evidence for a role of neuroepithelial bodies as complex airway sensors: comparison with smooth muscle-associated airway receptors. *J Appl Physiol.* 101(3):960-970.
2. Anesetti G, Lombide P, D'Albora H, Ojeda SR. (2001) Intrinsic neurons in the human ovary. *Cell Tissue Res.* 306(2):231-237.
3. AVMA Guidelines on Euthanasia (Formerly Report of the AVMA Panel on Euthanasia). June 2007. <http://www.avma.org/resources/euthanasia.pdf>, consultado: agosto, 2008.
4. Bayliss WM, Starling EH. (1902) The mechanism of pancreatic secretion. *J Physiol.* 28(5):325-353.
5. Becherer U, Medart MR, Schirra C, Krause E, Stevens D, Rettig J. (2012) Regulated exocytosis in chromaffin cells and cytotoxic T lymphocytes: how similar are they? *Cell Calcium.* 52(3-4):303-312.
6. Bertrand PP, Bertrand RL. (2010) Serotonin release and uptake in the gastrointestinal tract. *Auton Neurosci.* 153(1-2):47-57.
7. Brednow K, Korf HW. (1998) Morphological and immunocytochemical features of the pineal organ of C3H and C57BL mice at different stages of postnatal development. *Cell Tissue Res.* 292(3):521-530.
8. Ciaccio C. (1906) Sur une nouvelle espèce cellulaire dans les glandes de Lieberkuhn. *C R Séances Soc Biol Fil.* 58(T1):76-77.
9. Čikoš Š, Fabian D, Makarevich AV, Chrenek P, Koppel J. (2011) Biogenic monoamines in preimplantation development. *Hum Reprod.* 26(9):2296-305.
10. Cutz E. (1982) Neuroendocrine cells of the lung. An overview of morphologic characteristics and development. *Exp Lung Res.* 3(3-4):185-208.
11. D'Albora H, Anesetti G, Lombide P, Dees WL, Ojeda SR. (2002) Intrinsic neurons in the mammalian ovary. *Microsc Res Tech.* 59(6):484-489.
12. D'Albora H, Barcia JJ (1996) Intrinsic neuronal cell bodies in the rat ovary. *Neurosci Lett.* 205(1):65-67.
13. Davidoff MS, Middendorff R, Enikolopov G, Riethmacher D, Holstein AF, Müller D. (2004) Progenitor cells of the testosterone-producing Leydig cells revealed. *J Cell Biol.* 167(5):935-944.
14. Davidoff MS, Schulze W, Middendorff R, Holstein AF. (1993) The Leydig cell of the human testis--a new member of the diffuse neuroendocrine system. *Cell Tissue Res.* 271(3):429-439.

15. Davidoff MS, Ungefroren H, Middendorff R, Koeva Y, Bakalska M, Atanassova N, Holstein AF, Jezek D, Pusch W, Müller D. (2005) Catecholamine-synthesizing enzymes in the adult and prenatal human testis. *Histochem Cell Biol.* 124(3-4):313-323.
16. Day R, Salzet M. (2002) The neuroendocrine phenotype, cellular plasticity, and the search for genetic switches: redefining the diffuse neuroendocrine system. *Neuro Endocrinol Lett.* 23(5-6):447-451.
17. Dean PM, Matthews EK. (1970) Glucose-induced electrical activity in pancreatic islet cells. *J Physiol.* 210(2):255-264.
18. Dees WL, Hiney JK, McArthur NH, Johnson GA, Dissen GA, Ojeda SR. (2006) Origin and ontogeny of mammalian ovarian neurons. *Endocrinology.* 147(8):3789-3796.
19. Dees WL, Hiney JK, Schulte TD, Mayerhofer A, Danilchik M, Dissen GA, Ojeda SR. (1995) The primate ovary contains a population of catecholaminergic neuron-like cells expressing nerve growth factor receptors. *Endocrinology.* 136(12):5760-5768.
20. di Sant'Agnese PA, De Mesy Jensen KL. (1984) Endocrine-paracrine cells of the prostate and prostatic urethra: an ultrastructural study. *Hum Pathol.* 15(11):1034-1041.
21. Dubé F, Amireault P. (2007) Local serotonergic signaling in mammalian follicles, oocytes and early embryos. *Life Sci.* 81(25-26):1627-1637.
22. Ebeid TA, Eid YZ, El-Abd EA, El-Habbak MM. (2008) Effects of catecholamines on ovary morphology, blood concentrations of estradiol-17beta, progesterone, zinc, triglycerides and rate of ovulation in domestic hens. *Theriogenology.* 69(7):870-876.
23. Evsyukova (2006) Formation of diffuse neuroendocrine system in human ontogenesis. *J Evol Biochem Physiol.* 42(1):3-10.
24. Fava E, Dehghany J, Ouwendijk J, Müller A, Niederlein A, Verkade P, Meyer-Hermann M, Solimena M. (2012) Novel standards in the measurement of rat insulin granules combining electron microscopy, high-content image analysis and in silico modelling. *Diabetologia.* 55(4):1013-1023.
25. Feyrter F. (1938) Über diffuse endokrine epitheliale Organe. *J.A. Barth, Leipzig.*
26. Flatmark T (2000) Catecholamine biosynthesis and physiological regulation in neuroendocrine cells. *Acta Physiol Scand.* 168(1):1-17.
27. Fujita T. (1976) In: R.E. Coupland and T. Fujita (eds), Chromaffin, Enterochromaffin and Related Cells, *Elsevier, Amsterdam, Oxford and New York*, pp. 204-208.
28. Fujita T. (1989) Present status of paraneuron concept. *Arch Histol Cytol.* 52 Suppl:1-8.

29. Fujita T, Kobayashi S. (1975) Paraneuron – the new brothers of neuron (in Japanese) *Igaku No Ayumi*, 94:638-640.
30. Fujita T, Kobayashi S. (1979) Current views on the paraneurone concept. *TINS* 2(2):27-29.
31. Gosset A, Masson P. (1914) Tumeurs endocrines de l'appendice. *Presse Med* 25:237-240.
32. Guanzini L (2004) CARE 308.01 Avian Euthanasia. Cornell Center for Animal Resources & Education, Cornell University. www.research.cornell.edu/care/documents/SOPs/CARE308.pdf, consultado: enero, 2009.
33. Hamburger V, Hamilton HL. (1951) A series of normal stages in the development of the chick embryo. *J Morphol.* 88(1):49-92.
34. Hanyu S, Iwanaga T, Kano K, Fujita T. (1987) Distribution of serotonin-immunoreactive paraneurons in the lower urinary tract of dogs. *Am J Anat.* 180(4):349-356.
35. Heidenhain R. (1870) Untersuchungen über den Bau der Labdrüsen. *Arch Mikr Anat.* 6(1):368-406.
36. Huebschmann P. (1910) Sur le carcinome primitif de l'appendice vermiculaire. *Rev Med Suisse Romande.* 30:317-332.
37. Jiménez-Trejo F, Tapia-Rodríguez M, Queiroz DB, Padilla P, Avellar MC, Manzano PR, Manjarrez-Gutiérrez G, Gutiérrez-Ospina G. (2007) Serotonin concentration, synthesis, cell origin, and targets in the rat caput epididymis during sexual maturation and variations associated with adult mating status: morphological and biochemical studies. *J Androl.* 28(1):136-149.
38. Kimaro WH, Madekurozwa MC. (2006) Immunoreactivities to protein gene product 9.5, neurofilament protein and neuron specific enolase in the ovary of the sexually immature ostrich (*Struthio camelus*). *Exp Brain Res.* 173(2):291-297.
39. Korf HW, Oksche A, Ekström P, Gery I, Zigler JS Jr, Klein DC. (1986) Pinealocyte projections into the mammalian brain revealed with S-antigen antiserum. *Science.* 231(4739):735-737.
40. Kultschitzky N. (1897) Zur Frage über den Bau des Darmkanals. *Arch Mikr Anat.* 49(1):7-35.
41. Landis SC (1990) Target regulation of neurotransmitter phenotype. *Trends Neurosci.* 13(8):344-350.

42. Langerhans P. (1869) Beiträge zur Mikroskopischen Anatomie der Bauchspeicheldrüse: Inaugural-Dissertation, zur Erlangung der Doctorwürde in der Medicine und Chirurgie vorgelegt der Medicinischen Facultät der Friedrich-Wilhelms-Universität zu Berlin und öffentlich zu vertheidigen am 18. Februar 1869. *Königliche Friedrich-Wilhelms-Universität zu Berlin*. Medizinische Fakultät. Buchdruckerei von Gustav Lange, Berlin.
43. Langhans N, Rindi G, Chiu M, Rehfeld JF, Ardman B, Beinborn M, Kopin AS. (1997) Abnormal gastric histology and decreased acid production in cholecystokinin-B/gastrin receptor-deficient mice. *Gastroenterology*. 112(1):280-286.
44. Langley K. (1994) The neuroendocrine concept today. *Ann N Y Acad Sci*. 733:1-17.
45. Le Douarin NM. (1988) On the origin of pancreatic endocrine cells. *Cell*. 53(2):169-171.
46. Li Z, Chalazonitis A, Huang YY, Mann JJ, Margolis KG, Yang QM, Kim DO, Côté F, Mallet J, Gershon MD. (2011) Essential roles of enteric neuronal serotonin in gastrointestinal motility and the development/survival of enteric dopaminergic neurons. *J Neurosci*. 31(24):8998–9009.
47. Madekurozwa MC. (2008) An immunohistochemical study of ovarian innervation in the emu (*Dromaius novaehollandiae*). *Onderstepoort J Vet Res*. 75(1):59-65
48. Mannelli M, Pupilli C, Lanzillotti R, Ianni L, Serio M. (1990) Catecholamines and blood pressure regulation. *Horm Res*. 34(3-4):156-160.
49. Martín R, Fraile B, Peinado F, Arenas MI, Elices M, Alonso L, Paniagua R, Martín JJ, Santamaría L. (2000) Immunohistochemical localization of protein gene product 9.5, ubiquitin, and neuropeptide Y immunoreactivities in epithelial and neuroendocrine cells from normal and hyperplastic human prostate. *J Histochem Cytochem*. 48(8):1121-3110.
50. Masson P. (1914) Histologie: la glande endocrine de l'intestin chez l'homme. *CR Acad Sci*. 158:59–61.
51. Masson P. (1928) Carcinoids (argentaffin-cell tumors) and nerve hyperplasia of the appendicular mucosa. *Am J Path*. 4(3):181-212.
52. Mayerhofer A, Danilchik M, Pau KY, Lara HE, Russell LD, Ojeda SR. (1996) Testis of prepubertal rhesus monkeys receives a dual catecholaminergic input provided by the extrinsic innervation and an intragonadal source of catecholamines. *Biol Reprod*. 55(3):509-518.
53. Méndez-Herrera C, Hofmann P, Pedernera E. (1993) Effect of 17beta-estradiol on somatic and germ cell subpopulations in the ovary of the newly hatched chick. *Gen Comp Endocrinol*. 89(2):182-188.
54. Oberndorfer S. (1907) Karzinoide Tumoren des Dünndarms. *Frankf Z Pathol*. 1:426-432.

55. Pan J, Yeger H, Cutz E. (2004) Innervation of pulmonary neuroendocrine cells and neuroepithelial bodies in developing rabbit lung. *J Histochem Cytochem.* 52(3):379-389.
56. Pan J, Copland I, Post M, Yeger H, Cutz E. (2006) Mechanical stretch-induced serotonin release from pulmonary neuroendocrine cells: implications for lung development. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 290(1):L185-193.
57. Pearse AG. (1968) Common cytochemical and ultrastructural characteristics of cells producing polypeptide hormones (the APUD series) and their relevance to thyroid and ultimobranchial C cells and calcitonin. *Proc R Soc Lond B Biol Sci.* 170(18):71-80.
58. Pearse AG. (1969) The cytochemistry and ultrastructure of polypeptide hormone-producing cells of the APUD series and the embryologic, physiologic and pathologic implications of the concept. *J Histochem Cytochem.* 17(5):303-313.
59. Pearse AG (1986) The diffuse neuroendocrine system: peptides, amines, placodes and the APUD theory. *Prog Brain Res.* 68:25-31.
60. Perez MA, Saul SH, Trojanowski JQ (1990) Neurofilament and chromogranin expression in normal and neoplastic neuroendocrine cells of the human gastrointestinal tract and pancreas. *Cancer.* 65(65):1219-1227.
61. Portela-Gomes GM, Hacker GW, Weitgasser R (2004) Neuroendocrine cell markers for pancreatic islets and tumors. *Appl Immunohistochem Mol Morphol.* 12(3):183-192.
62. Prinz C, Zanner R, Gratzl M. (2003) Physiology of gastric enterochromaffin-like cells. *Annu Rev Physiol.* 65:371-382.
63. Rawdon BB, Andrew A. (1999) Gut endocrine cells in birds: an overview, with particular reference to the chemistry of gut peptides and the distribution, ontogeny, embryonic origin and differentiation of the endocrine cells. *Prog Histochem Cytochem.* 34(1):3-82.
64. Redecker P. (1999) Synaptic-like microvesicles in mammalian pinealocytes. *Int Rev Cytol.* 191:201-255.
65. Sánchez E, Vargas MA, Singru PS, Pascual I, Romero F, Fekete C, Charli JL, Lechan RM. (2009) Tanycyte pyroglutamyl peptidase II contributes to regulation of the hypothalamic-pituitary-thyroid axis through glial-axonal associations in the median eminence. *Endocrinology.* 150(5):2283-2291.
66. 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. *Gen Comp Endocrinol.* 76(2):205-213.
67. Toni R. (2004) The neuroendocrine system: organization and homeostatic role. *J Endocrinol Invest.* 27(6 Suppl):35-47.

68. Turlejski K. (1996) Evolutionary ancient roles of serotonin: long-lasting regulation of activity and development. *Acta Neurobiol Exp (Wars)*. 56(2):619-636.
69. von Bartheld CS, Rubel EW. (1989) Transient GABA immunoreactivity in cranial nerves of the chick embryo. *J Comp Neurol*. 286(4):456-471.

Agradecimientos

Expreso mi gratitud al Dr. Gabriel Gutiérrez Ospina porque con su ejemplo, dedicación y paciencia estuvo al tanto de mi desarrollo personal, académico y como científico, y sin cuyo apoyo este trabajo no hubiera sido posible.

Agradezco a Jesús Ramírez Santos, Patricia Bizarro Nevares, Leonora Olivos Cisneros y Danna Colín Castelán por el apoyo técnico durante la ejecución de la parte experimental del trabajo.

A todos aquellos que con su ejemplo de conducta, su apoyo moral y sus críticas enriquecieron el trabajo e hicieron patente mi confianza en lo que un científico debe ser.

Hago un especial reconocimiento al Programa de Doctorado en Ciencias de la Producción y de la Salud Animal, así como al personal que integra a su planta académico-administrativa por la ayuda proporcionada y la facilitación de los procesos administrativos.

Agradezco también a las instituciones que aportaron los recursos económicos con los que este trabajo se realizó:

Hacia las bases neuroendocrinológicas del control de la deposición espermática en la rata macho. Dirección General de Asuntos del Personal Académico, PAPIIT, UNAM IN215208-3. Diciembre, 2007-2010.

“Bases geofísicas y neurofisiológicas de la magnetorecepción en la tortuga marina *Chelonia agassizi* de la reserva Colola-Maruata, Michoacán México: Hacia un modelo interdisciplinario para el desarrollo del área de la Ecología de las Sensaciones”. Proyecto de Investigación Científica Básica, CONACYT 82879 2009-2012.

Caracterización del sustrato neurofisiológico que subyace a la magnetocepción en la tortuga marina *Chelonia agassizii*. Dirección General de Asuntos del Personal Académico, PAPIIT, UNAM IN203912-3. Diciembre, 2011-2014.

Neuroendocrine cells are present in the domestic fowl ovary

Pablo G. Hofmann,¹ Armida Báez Saldaña,¹ Teresa Fortoul Van Der Goes,² Margarita González del Pliego² and Gabriel Gutiérrez Ospina¹

¹Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, Distrito Federal, Mexico

²Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, Distrito Federal, Mexico

Abstract

Neuroendocrine cells are present in virtually all organs of the vertebrate body; however, it is yet uncertain whether they exist in the ovaries. Previous reports of ovarian neurons and neuron-like cells in mammals and birds might have resulted from misidentification. The aim of the present work was to determine the identity of neuron-like cells in immature ovaries of the domestic fowl. Cells immunoreactive to neurofilaments, synaptophysin, and chromogranin-A, with small, dense-core secretory granules, were consistently observed throughout the sub-cortical ovarian medulla and cortical interfollicular stroma. These cells also displayed immunoreactivity for tyrosine, tryptophan and dopamine β -hydroxylases, as well as to aromatic L-DOPA decarboxylase, implying their ability to synthesize both catecholamines and indolamines. Our results support the argument that the ovarian cells previously reported as neuron-like in birds, are neuroendocrine cells.

Key words: birds; catecholamines; chromogranin-A; neuroendocrine cell; serotonin; synaptophysin.

Introduction

The diffuse neuroendocrine system comprises scattered cells or groups of cells distributed in virtually all organs of vertebrates. Neuroendocrine (NE) cells are commonly interspersed within epithelia, sub-epithelial linings, and/or stromal compartments. Cells of this lineage share the ability to synthesize biogenic amines, produce and release neuropeptidic messengers, and display dense-core secretory granules, and neuronal and endocrine molecular markers (Pearse, 1968, 1986; Flatmark, 2000; Montuenga et al. 2003; Toni, 2004).

Neuroendocrine cells have been extensively characterized along the gastrointestinal and respiratory tracts of vertebrates, particularly mammals. More recent studies have reported their presence along the urogenital tract of higher vertebrates. This cellular phenotype has been identified in epithelia, submucosae and/or interstitial spaces of the urethra, prostate, *vas deferens*, epididymis and testis (di Sant'Agnes & De Mesy Jensen, 1984; Hanyu et al. 1987; Davidoff et al. 1993, 2005; Jiménez-Trejo et al. 2007). Sev-

eral reports have suggested the existence of neuron-like cells or intrinsic neurons in the ovarian interstitial space of some birds and mammals (Dees et al. 1995; D'Albora & Barcia, 1996; Mayerhofer et al. 1996; Anesetti et al. 2001; D'Albora et al. 2002; Kimaro & Madekurozwa, 2006; Madekurozwa, 2008). However, proteins such as neurofilaments, tyrosine hydroxylase and neuron specific enolase also exist in NE cells, giving rise to the possibility that the previously identified ovarian intrinsic neurons or neuron-like cells might instead possess a neuroendocrine phenotype. The purpose of the present work was therefore to determine whether the neuron-like cells in the ovary of the domestic fowl belong to this lineage.

Materials and methods

Animals

Left ovaries of White Leghorn post-hatching pullets between 10 and 14 days of age were used. Fertilized eggs from a commercial supplier (Aves Libres de Patógenos Específicos, ALPES, Tehuacán, Puebla, Mexico) were incubated at 37.5 °C in a humidified incubator with automatic turning for 21 days, until hatching. The chickens were then maintained at a constant temperature of 24 °C, under a 12 : 12 h light–dark cycle, with *ad libitum* access to food (Purina, Mexico) and tap water, until they reached the ages of 10–14 days. Animals were sacrificed using an intraperitoneal injection of sodium pentobarbital (a minimum of 85.8 mg kg⁻¹) followed by decapitation at the specified ages. Animal handling and sacrifice followed the guidelines of the 'CARE 308.01 Avian Euthanasia' at the Cornell Center for Animal Resources & Education, Cornell University

Correspondence

Pablo G. Hofmann and Gabriel Gutiérrez-Ospina, Departamento de Biología Celular y Fisiología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico D.F., Ciudad de México 04510. T: + 52 (55) 56229195; F: + 52 (55) 56229198; E: phofmann@servidor.unam.mx and gabo@biomedicas.unam.mx

Accepted for publication 26 September 2012

Article published online 22 October 2012

(Guanzini, 2004; based on the *AVMA Guidelines on Euthanasia, 2007*) and the protocols were reviewed and approved by the institutional bioethics committee at Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.

Tissue sampling and immunocytochemistry

Ovaries were dissected, including the adrenal gland, and fixed by immersion in a 4% paraformaldehyde (PFA) solution diluted in phosphate buffer (PB; 0.1 M, pH 7.4) overnight at 4 °C. For cryoprotection, tissue samples were then washed in PB twice before being incubated overnight at 4 °C in a 30% sucrose solution in PB. The ovaries were included in Neg-50 Frozen Section Medium (Richard-Allan Scientific, USA) and frozen on dry ice. Transverse coronal slices, 30 or 50 µm, were obtained using a cryostat microtome (Microm HM550, Germany) at -20 °C, collected in a cryoprotecting solution (25% ethylene glycol, 25% glycerol in PB), and stored at -20 °C until used.

To evaluate the presence of neuronal and/or neuroendocrine cells by immunocytochemistry, endogenous peroxidase activity was inactivated by exposing tissue sections to 0.3% hydrogen peroxide (H₂O₂) in PB supplemented with 0.3% Triton X-100 (PBT; Sigma, USA) at room temperature (RT) during 30 min. The tissue slices were then washed in PB four times for 10 min at RT, followed by the incubation in BioSB Immuno Retriever (BioSB, Inc., USA) for 30 min at 70 °C. Following three washes in PB and one in PBT for 10 min each at RT, slices were incubated with different primary

antibodies (Table 1) diluted in PBT for 40 h at 4 °C, under continuous gentle shaking. After this period and following a gentle wash, sections were incubated with the corresponding donkey-raised, biotin-conjugated secondary antibodies (1 : 500 in PBT; Chemicon, USA) for 120 min at RT, with continuous shaking. After four washes in PB for 10 min each at RT, samples were incubated with the avidin-peroxidase complex (Vectastain ABC Elite, Vector Laboratories, USA) for 90 min at room temperature. Finally, after four 10-min washes in PB at RT, peroxidase activity was developed with a DAB kit (Vector Laboratories, USA) at RT. DAB incubation times were determined for each primary antibody immunoreaction, according to their concentration and staining intensity. Slices were mounted on gelatinized glass slides and dried for 2 h at RT in a vacuum chamber. Mounted slices were re-hydrated with saline solution (0.9%) and counterstained with methyl green (0.05% w/v; Sigma, USA) in sodium acetate buffer (0.1 M, pH 4.2) for 2 min. The slides were thoroughly washed in deionized water to remove excess stain. Slides were air-dried for 15 min at room temperature, and covered using Cytoseal-60 mounting medium (Richard-Allan Scientific, Inc., USA) for observation and image recording. Samples were observed under bright field microscopy on a Nikon Eclipse 80i and images were recorded using the NIS-ELEMENTS[®] F3.0 software (Nikon, Japan).

Immunofluorescence

Co-localization of neuronal/neuroendocrine markers was recorded using double immunofluorescence labelling following the proto-

Table 1 List of neuroendocrine protein markers and antibodies utilized for the immuno-detection and characterization of NE cells in the developing *Gallus gallus* ovary.

Neuroendocrine Marker	Function	IgG Species	Dilution	Manufacturer
Chromogranin-A (CHGA)	A pre-pro-protein present in dense-core secretory granules of sympathoadrenal cells, that can be cleaved to form pancreastatin, vasostatin, parastatin, chromostatin and β-granin, among other peptides, involved in negative feedback loops	Goat, polyclonal	1 : 1000	Santa Cruz, Inc., USA
L-DOPA Decarboxylase (DDC)	Involved in the decarboxylation of L-3,4-dihydroxyphenylalanine (DOPA) to dopamine and L-5-hydroxytryptophan to serotonin. Participates in catecholamine and indolamine neurotransmitter biosynthesis pathways	Goat, polyclonal	1 : 1000	Santa Cruz, Inc., USA
Dopamine β-Hydroxylase (DBH)	Catalyzes the conversion of dopamine to noradrenaline within the catecholamine synthesis pathway	Mouse, monoclonal Sheep, polyclonal	1 : 4000 1 : 2000	Chemicon, USA Abcam, Plc., USA
Heavy-chain Neurofilament (NF-H)	Present in some neuroendocrine cells, reportedly identified in intrinsic neuron-like cells in mammalian gonads.	Rabbit, polyclonal	1 : 4000	Chemicon, USA
synaptophysin (SYP)	A neurosecretory-granule membrane-associated protein implicated in the pre-synaptic or secretory vesicle genesis and recycling	Sheep, polyclonal	1 : 4000	Abcam, Plc., USA
Tryptophan Hydroxylase (TPH)	First and rate-limiting enzyme of the indolamine neurotransmitter synthesis pathway, with the conversion of tryptophan to L-5-hydroxytryptophan	Mouse, monoclonal	1 : 4000	Sigma, USA
Tyrosine Hydroxylase (TH)	First and rate-limiting enzyme for catecholamine neurotransmitter synthesis, with the conversion of L-tyrosine to L-3,4-dihydroxyphenylalanine (DOPA)	Rabbit, polyclonal Sheep, polyclonal	1 : 4000 1 : 8000	Chemicon, USA

cols for each marker under the conditions described for single immunocytochemical procedures, sequentially. A 30-min blocking step with 'cold avidin' (RT; Vector Laboratories, USA) was added prior to the secondary antibody incubation. Immunoreactivity was visualized using fluorescein- or Texas Red-conjugated avidin (1 : 200, 60 min at RT; Vector Laboratories, USA). Once thoroughly washed in PB, slices were counter-stained with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI, $1 \mu\text{g mL}^{-1}$) for 30 s at RT, mounted on gelatinized glass slides and covered using DAKO fluorescence mounting medium (Dako, USA) for observation and image recording. Immunofluorescence samples were observed under a Disc Scanning Unit-coupled Olympus BX51 DSU (Olympus, USA) and images were recorded using the MBF BIOSCIENCE STEREO INVESTIGATOR[®] software (MicroBrightField, Inc., USA). In both immunocytochemistry and immunofluorescence, negative controls were processed simultaneously but the incubation with the primary antibodies was omitted (Supporting Information Fig. S1).

Transmission electron microscopy

Dissected ovaries were washed in 0.9% saline solution and sectioned transversely (1.0 mm width). Tissue samples were then fixed in 4% paraformaldehyde and 2.5% glutaraldehyde in sodium cacodylate buffer (0.1 M, pH 7.4) for 3 h at 4 °C. After three 10-min washes in PB, samples were post-fixed in 1.0% osmium tetroxide (Polysciences, Inc., USA) in PB for 2 h at RT, followed by two washes in PB for 10 min. Dehydration was carried out in 70, 95 and 100% ethanol and 100% propylene oxide (twice each step for 10 min) followed by a pre-embedding incubation in a 1 : 1 mixture of embedding medium (EMBed-812, Electron Microscopy Sciences, USA, prepared according to the manufacturer's guidelines) and propylene oxide, overnight at RT.

Embedding was done by incubating in EMBed-812 medium for 24 h at 60 °C. Semi-thin and ultra-thin sections were obtained in a Reichert-Jung Ultracut E ultra-microtome (USA). Semi-thin sections were mounted on a glass slide and stained with toluidine blue. Once the regions of interest were identified, ultra-thin sections were obtained and observed, and images were photographed using an M-10 electron microscope (Carl Zeiss NTS GmbH, Germany).

Results

Heavy-chain neurofilament (NF-H) and synaptophysin (SYP) immunoreactivity was observed in a population of small, single, isolated cells distributed throughout the cortical and medullar interstitial space of the immature fowl ovary. At the ultrastructural level, these cells displayed small to medium-sized dense-core secretory granules. These cells also showed positive immunoreactivity for chromogranin-A (ChgA), as well as the enzymes involved in monoamine biosynthesis, namely tyrosine hydroxylase (TH), L-DOPA decarboxylase (DDC), dopamine β -hydroxylase (DBH) and tryptophan hydroxylase (TPH). All these features are consistent with their NE lineage (Fig. 1).

To determine whether the identified NE cells constituted a single or a heterogeneous population, we conducted immunofluorescence analyses, which revealed that almost all cells displayed positive co-localization of ChgA, NF-H and SYP (Fig. 2). These cells also possessed the enzymes required for catecholamine and serotonin (5-HT) biosynthesis (Figs 3 and 4, respectively). Interestingly, both pathways

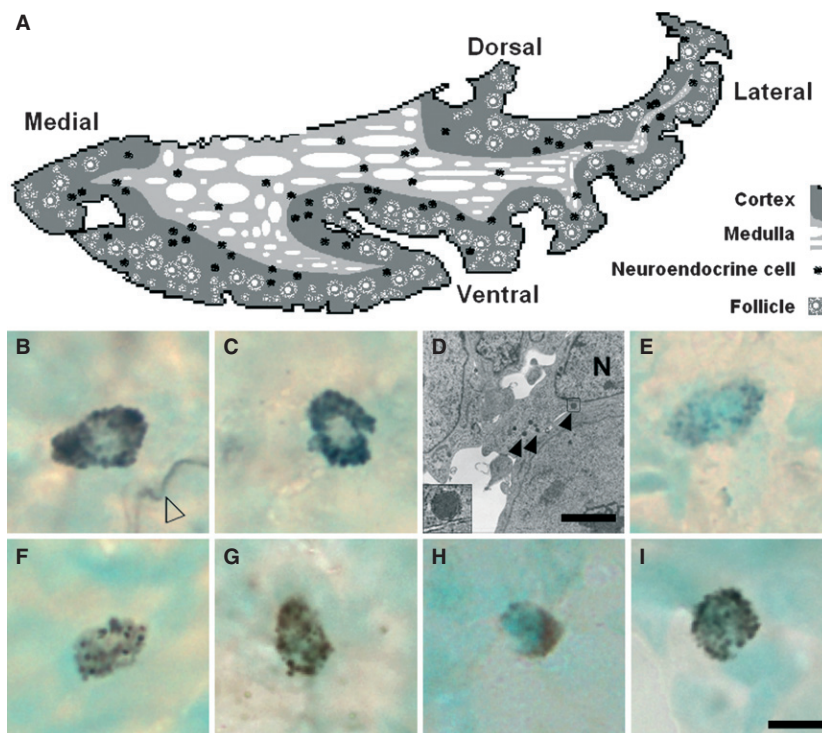


Fig. 1 Schematic representation of a cross section of a 14 day-old chick ovary that shows the topographical distribution of neuroendocrine (NE) cells throughout de hen's ovary (A). NE cells were predominantly found in perifollicular and subcortical regions at all ages studied. The identified NE cells showed immunoreactivity for the Heavy-chain Neurofilament (B), synaptophysin (C) and displayed dense-core secretory granules (arrowheads and inset in D; N, indicates cell nucleus, and Scale bar = 1 μm). It was also possible to observe Heavy-chain Neurofilament immunoreactive nerve fibres in the ovarian stroma (open arrowhead in B). The NE cells also showed positive immunostaining for Chromogranin-A (E), and also the monoamine synthesis pathway enzymes Tyrosine Hydroxylase, Tryptophan Hydroxylase, L-DOPA Decarboxylase, and Dopamine β -Hydroxylase (F-I, respectively). Scale Bar = 10 μm .

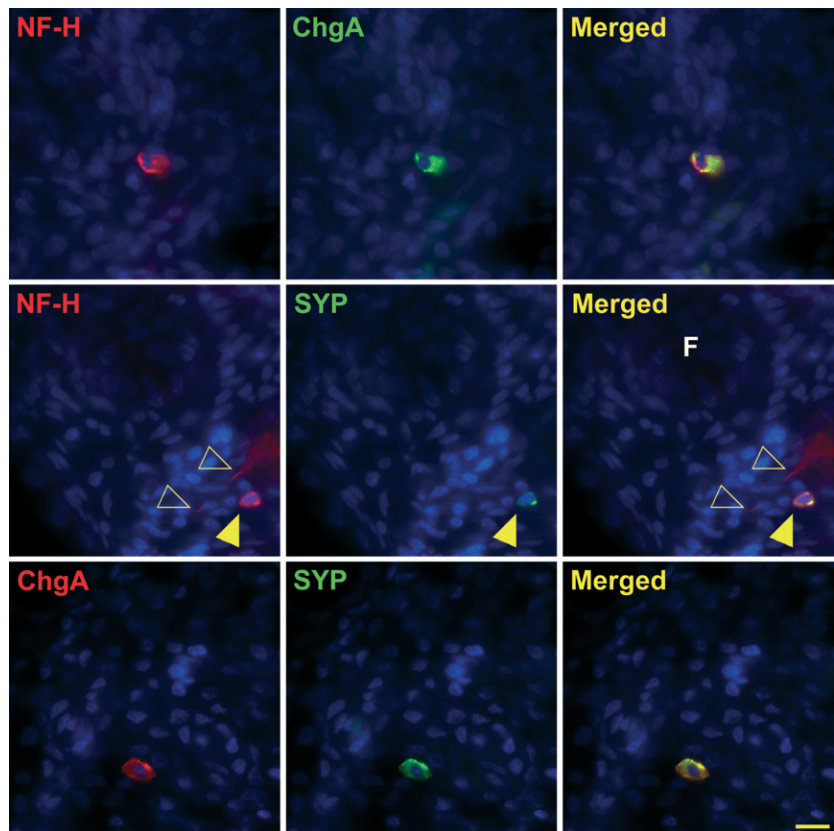


Fig. 2 Immunofluorescence studies documenting the co-localization of the Heavy-chain Neurofilament (NF-H), synaptophysin (SYP) and Chromogranin-A (ChgA) in the 14-day-old ovarian NE cells. Some neuroendocrine cells (yellow arrows) were observed near NF-H immunopositive nerve fibres (open arrows) in the vicinity of ovarian follicles (F). Scale bar = 10 μ m.

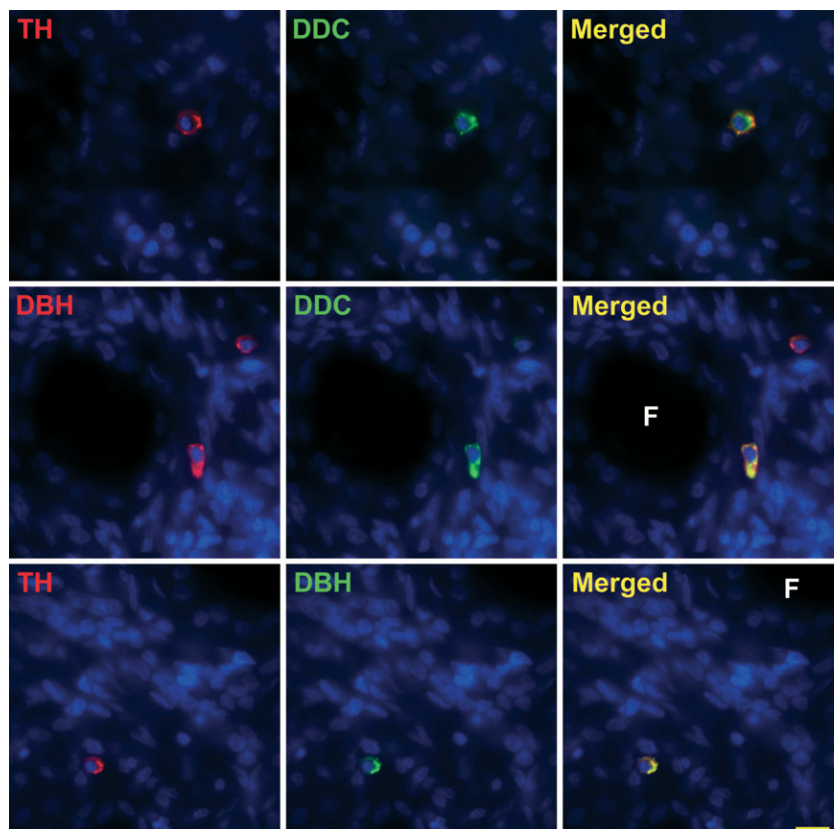


Fig. 3 Co-localization of the enzymes of the catecholamine synthesis pathway, Tyrosine Hydroxylase (TH), L-DOPA Decarboxylase (DDC), and Dopamine β -Hydroxylase (DBH) in the NE cells of the 14 day-old chick ovary. Some of these cells were found in the interstitial space of the cortex near the follicles (F). Scale bar = 10 μ m.

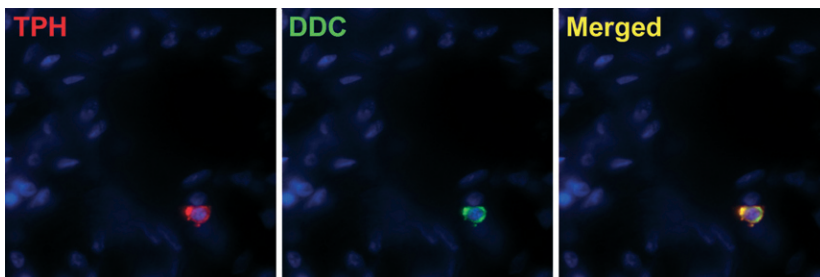


Fig. 4 Immunofluorescence co-localization of the enzymes involved in the serotonin synthesis pathway, Tryptophan Hydroxylase (TPH) and DDC, in the 14 day-old chick ovary NE cells. Scale bar = 10 μ m.

co-localized in the same cellular population (Fig. 5). Finally, the monoamine biosynthesis enzymes were co-expressed with SYP and ChgA (Figs 6 and 7, respectively).

Discussion

Neuroendocrine cells constitute a heterogeneous population distributed in most organs of the vertebrate body; however, it has been unclear whether these cells are found in the ovaries. Although the presence of neuron-like cells in the immature ostrich ovary was reported previously (Kimaro & Madekurozwa, 2006; Madekurozwa, 2008), the identity of these cells could not be conclusive, as neuron specific enolase and protein gene product 9.5 are not exclusively neuronal markers but may also be present in cells of neuroendocrine lineage (Perez et al. 1990; Martín et al. 2000; Portela-Gomes et al. 2004). Here, we describe ovarian interstitial cells that were positively labelled for NF-H, SYP, ChgA, TH, TPH, DDC and DBH, as well as displaying cytoplasmic dense-core secretory granules. Taken together, the cellular features observed in immature chick ovaries are common traits of the NE phenotype (Pearse, 1986; Flatmark, 2000; Toni, 2004), and suggest these ovarian cells belong to the NE lineage. Hence, our observations differ from previous reports claiming the existence of neuron-like cells in bird ovaries (Kimaro & Madekurozwa, 2006; Madekurozwa, 2008). Our findings also suggest the need to re-examine the idea of the existence of intrinsic neurons in mammalian ovaries (Dees et al. 1995; D'Albora & Barcia, 1996; Mayerhofer et al. 1996; Anesetti et al. 2001; D'Albora et al. 2002), given that the phenotypical characterization supporting such claims might also be incomplete.

In our study, all the enzymes involved in catecholamine and indolamine biosynthesis were co-localized within NE

cells. This could mean that NE cells of the domestic fowl ovary have the ability to produce, and possibly release, both monoamine groups. In support of this possibility, there is an increasing body of evidence that NE cells synthesize and release catecholamines and/or serotonin (Pearse, 1986; Flatmark, 2000; Li et al. 2011). However, it is also possible that the NE cells of the fowl immature ovary present this dual potential because they have not yet committed to a differentiated state, as has been shown for mammalian peripheral adrenergic and cholinergic neurons during early stages of development (von Bartheld & Rubel, 1989; Landis, 1990). Future ontological as well as comparative studies could address these possibilities.

The presence of NE cells in the immature fowl ovary raises interesting questions regarding their function and embryonic origin. It is tempting to hypothesize that their secretory products might regulate early ovarian histogenesis directly, as has been shown for the development of the respiratory tract (Cutz, 1982; Pan et al. 2004, 2006; Evsyukova, 2006), or indirectly, by modifying ovarian steroid secretion (Méndez-Herrera et al. 1993). In relation to their possible origin, all NE cells were originally considered to be derivatives of the neural crest, although it is now known that NE cells of different organ systems are not specified in the same germ layers of the embryo. Regarding the gonads, the proposed neural crest origin of 'ovarian neurons' (Dees et al. 2006) contrasts with evidence that testicular Leydig cells, displaying a neuroendocrine phenotype (Davidoff et al. 1993, 2005), arise from the local vascular smooth muscle cells and pericytes (Davidoff et al. 2004). Future studies should explore whether NE cells in the fowl ovary originate from local or distant embryonic tissues.

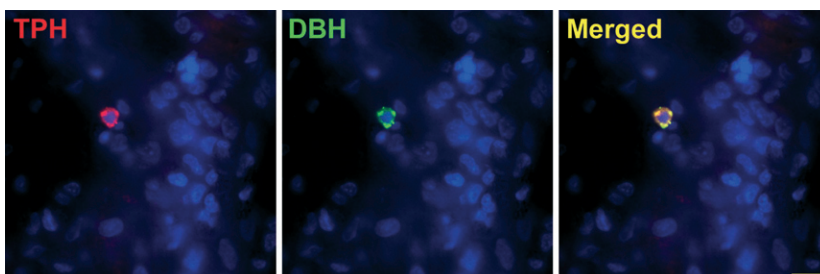


Fig. 5 Co-localization studies that document the presence of the enzymes TPH and DBH for both, indolamine and catecholamine biosynthesis pathways, in the NE cells of the 14 day-old ovary. Scale bar = 10 μ m.

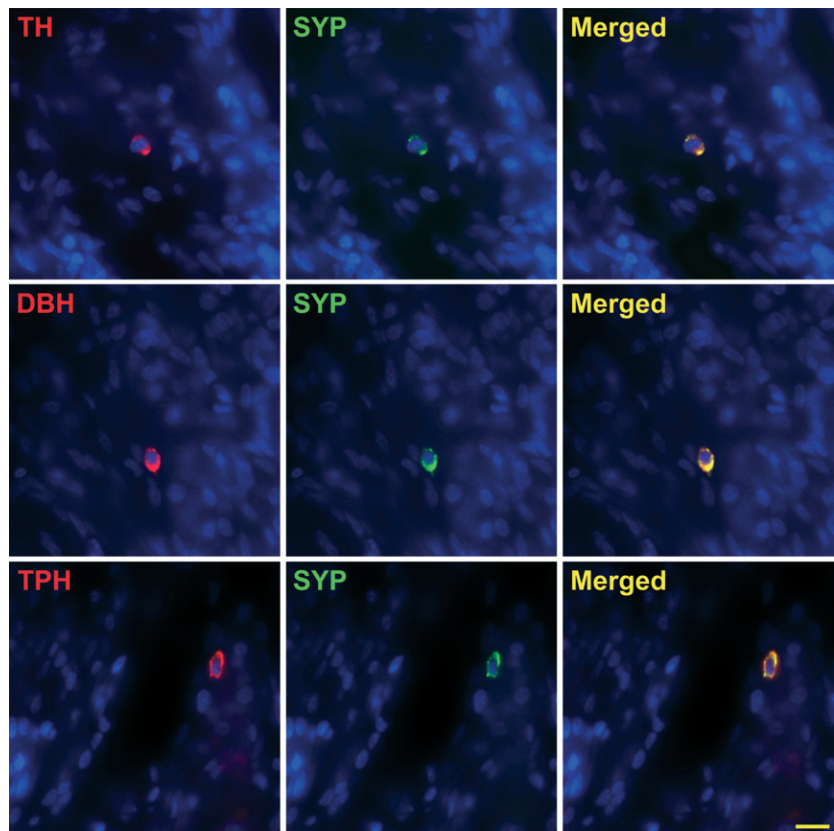


Fig. 6 Immunofluorescence showing the co-localization of SYP with the enzymes of the catecholamine and indolamine biosynthesis pathways, TH, DBH and TPH, in the NE cells of the 14 day-old chick ovary. Scale bar = 10 μ m.

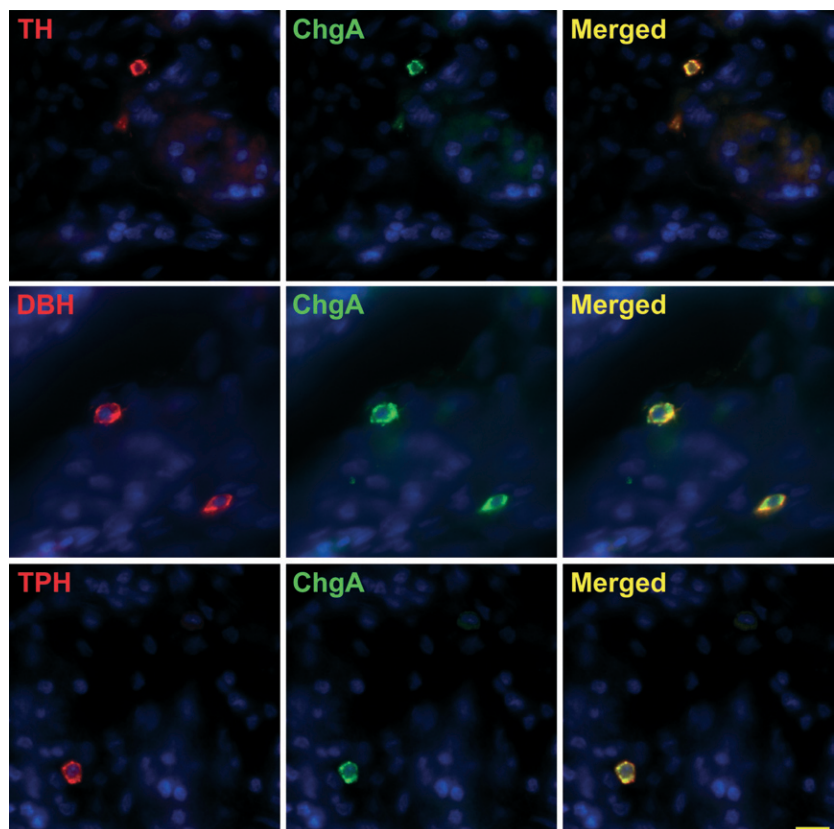


Fig. 7 Immunofluorescence co-localization studies of ChgA with the enzymes of the catecholamine and indolamine synthesis pathways, TH, DBH and TPH, within the ovarian NE cells of the 14 day-old chick. Scale bar = 10 μ m.

Acknowledgements

The authors thank María Verónica Gasca Ramírez and Patricia Bizarro Nevaes for their technical support. The authors also thank Tamil Kendall, Doctoral Candidate, University of British Columbia, for proofreading the present manuscript. This work was funded by the National Council of Science and Technology (Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, CONACyT), grant 82879, and the Program to Support Research and Technological Innovation of the National Autonomous University of Mexico (Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica –UNAM), grants IN203912-3 and IN215208.

Authors' contributions

Pablo G. Hofmann: Designed the study plan and carried out the tissue sampling, processing, and the immunodetection and co-localization studies of the selected neuroendocrine markers. Drafted and edited the manuscript.

Armida Báez-Saldaña: Participated in the study design, interpretation of the data and discussion of the results.

Teresa Fortoul-Van-Der-Goes: Carried out the observation and image recording with electron microscopy for the identification of the representative cells of neuroendocrine lineage at an ultrastructural level.

Margarita González-del-Pliego: Conducted preliminary observations of a cellular population immunoreactive for some neuropeptides in the immature chick ovary. These observations motivated the present study.

Gabriel Gutiérrez-Ospina: Evaluated and revised the study design and supervised the execution of the research. Instrumental in the revision and editing of the submitted manuscript.

References

- AVMA Guidelines on Euthanasia (Formerly Report of the AVMA Panel on Euthanasia). June 2007. <http://www.avma.org/resources/euthanasia.pdf>, accessed August, 2008.
- Anesetti G, Lombide P, D'Albora H, et al. (2001) Intrinsic neurons in the human ovary. *Cell Tissue Res* **306**, 231–237.
- von Bartheld CS, Rubel EW (1989) Transient GABA immunoreactivity in cranial nerves of the chick embryo. *J Comp Neurol* **286**, 456–471.
- Cutz E (1982) Neuroendocrine cells of the lung. An overview of morphologic characteristics and development. *Exp Lung Res* **3**, 185–208.
- D'Albora H, Barcia JJ (1996) Intrinsic neuronal cell bodies in the rat ovary. *Neurosci Lett* **205**, 65–67.
- D'Albora H, Anesetti G, Lombide P, et al. (2002) Intrinsic neurons in the mammalian ovary. *Microsc Res Tech* **59**, 484–489.
- Davidoff MS, Schulze W, Middendorff R, et al. (1993) The Leydig cell of the human testis—a new member of the diffuse neuroendocrine system. *Cell Tissue Res* **271**, 429–439.
- Davidoff MS, Middendorff R, Enikolopov G, et al. (2004) Progenitor cells of the testosterone-producing Leydig cells revealed. *J Cell Biol* **167**, 935–944.
- Davidoff MS, Ungefroren H, Middendorff R, et al. (2005) Catecholamine-synthesizing enzymes in the adult and prenatal human testis. *Histochem Cell Biol* **124**, 313–323.
- Dees WL, Hiney JK, Schultea TD, et al. (1995) The primate ovary contains a population of catecholaminergic neuron-like cells expressing nerve growth factor receptors. *Endocrinology* **136**, 5760–5768.
- Dees WL, Hiney JK, McArthur NH, et al. (2006) Origin and ontogeny of mammalian ovarian neurons. *Endocrinology* **147**, 3789–3796.
- Evsyukova II (2006) Formation of diffuse neuroendocrine system in human ontogenesis. *J Evol Biochem Physiol* **42**, 3–10.
- Flatmark T (2000) Catecholamine biosynthesis and physiological regulation in neuroendocrine cells. *Acta Physiol Scand* **168**, 1–17.
- Guanzini L (2004) CARE 308.01 Avian Euthanasia. Cornell Center for Animal Resources & Education, Cornell University. www.research.cornell.edu/care/documents/SOPs/CARE308.pdf, accessed January, 2009.
- Hanyu S, Iwanaga T, Kano K, et al. (1987) Distribution of serotonin-immunoreactive paraneurons in the lower urinary tract of dogs. *Am J Anat* **180**, 349–356.
- Jiménez-Trejo F, Tapia-Rodríguez M, Queiroz DB, et al. (2007) Serotonin concentration, synthesis, cell origin, and targets in the rat caput epididymis during sexual maturation and variations associated with adult mating status: morphological and biochemical studies. *J Androl* **28**, 136–149.
- Kimaro WH, Madekurozwa MC (2006) Immunoreactivities to protein gene product 9.5, neurofilament protein and neuron specific enolase in the ovary of the sexually immature ostrich (*Struthio camelus*). *Exp Brain Res* **173**, 291–297.
- Landis SC (1990) Target regulation of neurotransmitter phenotype. *Trends Neurosci* **13**, 344–350.
- Li Z, Chalazonitis A, Huang YY, et al. (2011) Essential roles of enteric neuronal serotonin in gastrointestinal motility and the development/survival of enteric dopaminergic neurons. *J Neurosci* **31**, 8998–9009.
- Madekurozwa MC (2008) An immunohistochemical study of ovarian innervation in the emu (*Dromaius novaehollandiae*). *Onderstepoort J Vet Res* **75**, 59–65.
- Martín R, Fraile B, Peinado F, et al. (2000) Immunohistochemical localization of protein gene product 9.5, ubiquitin, and neuropeptide Y immunoreactivities in epithelial and neuroendocrine cells from normal and hyperplastic human prostate. *J Histochem Cytochem* **48**, 1121–1130.
- Mayerhofer A, Danilchik M, Pau KY, et al. (1996) Testis of prepubertal rhesus monkeys receives a dual catecholaminergic input provided by the extrinsic innervation and an intragonadal source of catecholamines. *Biol Reprod* **55**, 509–518.
- Méndez-Herrera C, Hofmann P, Pedernera E (1993) Effect of 17 beta-estradiol on somatic and germ cell subpopulations in the ovary of the newly hatched chick. *Gen Comp Endocrinol* **89**, 182–188.
- Montuenga LM, Guembe L, Burrell MA, et al. (2003) The diffuse endocrine system: from embryogenesis to carcinogenesis. *Prog Histochem Cytochem* **38**, 155–272.
- Pan J, Yeager H, Cutz E (2004) Innervation of pulmonary neuroendocrine cells and neuroepithelial bodies in developing rabbit lung. *J Histochem Cytochem* **52**, 379–389.
- Pan J, Copland I, Post M, et al. (2006) Mechanical stretch-induced serotonin release from pulmonary neuroendocrine cells: implications for lung development. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **290**, L185–L193.

Pearse AG (1968) Common cytochemical and ultrastructural characteristics of cells producing polypeptide hormones (the APUD series) and their relevance to thyroid and ultimobranchial C cells and calcitonin. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* **170**, 71–80.

Pearse AG (1986) The diffuse neuroendocrine system: peptides, amines, placodes and the APUD theory. *Prog Brain Res* **68**, 25–31.

Perez MA, Saul SH, Trojanowski JQ (1990) Neurofilament and chromogranin expression in normal and neoplastic neuroendocrine cells of the human gastrointestinal tract and pancreas. *Cancer* **65**, 1219–1227.

Portela-Gomes GM, Hacker GW, Weitgasser R (2004) Neuroendocrine cell markers for pancreatic islets and tumors. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* **12**, 183–192.

di Sant'Agnes PA, De Mesy Jensen KL (1984) Endocrine-paracrine cells of the prostate and prostatic urethra: an ultrastructural study. *Hum Pathol* **15**, 1034–1041.

Toni R (2004) The neuroendocrine system: organization and homeostatic role. *J Endocrinol Invest* **27**, 35–47.

Supporting Information

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article:

Fig. S1. Immunoreactivity (IR) for representative neuroendocrine markers was observed in 30- μm -thick cross-sections of 12-day-old chick ovaries. The neuroendocrine cellular population identified (arrowheads) showed positive IR for both rate-limiting enzymes, tyrosine hydroxylase (TH) and tryptophan hydroxylase

(TPH), which incorporate the amino acids tyrosine and tryptophan into the catecholamine and indolamine synthesis pathways, respectively (A and B). A robust TH staining was observed in nerve bundles and fibres (open arrowheads) that innervate the ovarian medulla that extend into cortical regions, reaching the perifollicular space (A). A similar but not as abundant or intense population of IR nerve fibres and bundles was identified with the heavy-chain neurofilament (NF-H) antibody (C). Positive IR for NF-H, was also observed in the neuroendocrine cells of the immature chick ovary (C). In all cases, these cells were small (less than 10 μm in diameter) and were observed scattered throughout the ovary, as single cells or small groups of them, thus a diffuse system by their distribution. Though located in the deep medulla, and in the interfollicular stroma of the cortex, the neuroendocrine cells were more easily found in the ovarian cortex-medulla transition region of the ages studied. A representative image as a control of the immunolocalization of neuroendocrine markers is shown, where the primary antibody was absent from the reactions (D). The dotted line marks the approximate boundary between the ovarian cortex (C), containing the follicles (F) and the medulla (M), that at this stage of development no longer has a dividing basement membrane, nor is there a clear separation between the two. Scale bar = 50 μm .

As a service to our authors and readers, this journal provides supporting information supplied by the authors. Such materials are peer-reviewed and may be re-organized for online delivery, but are not copy-edited or typeset. Technical support issues arising from supporting information (other than missing files) should be addressed to the authors.