

85
24



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

"EFECTOS DE LAS HORMONAS GONADOTROPICAS
SOBRE EL OVARIO DE POLLOS RECIEN NACIDOS.
TRATADOS EN ETAPA EMBRIONARIA"

TESIS PROFESIONAL

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

B I O L O G O

P R E S E N T A :

HANNA / GUITTINS VALENTINO

MEXICO, D. F.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

1991



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 está 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.

I N D I C E

	Pags.
1) RESUMEN	1
2) INTRODUCCION	2
I HIPOTALAMO	2
a) Anatomía.	
b) Sistema neurosecretor.	
c) Factores hipotalámicos hipofisiotrópicos.	
d) Efectos de lesiones en el hipotálamo.	
II HIPOFISIS	7
a) Anatomía.	
b) Hormonas de la adenohipófisis.	
c) Hormonas gonadotrópicas.	
1) Química.	
2) Mecanismos de acción hormonal.	
3) Fisiología.	
4) Control de la secreción de gonadotropinas.	
III EJE HIPOTALAMO-HIPOFISIS-GONADA	19
a) Anatomía.	
b) Edad de establecimiento del eje hipotalamo-hipófisis-ovario.	
IV OVARIO	21
a) Anatomía.	
b) Esteroidogénesis.	
c) Mecanismo de acción hormonal.	
3) HIPOTESIS	31

4) OBJETIVO	32
5) MATERIALES Y METODOS	33
6) RESULTADOS	37
7) DISCUSION	44
8) CONCLUSIONES	50
9) BIBLIOGRAFIA	52

RESUMEN

Este trabajo tiene como propósito observar los efectos que causa la administración de gonadotropinas (FSH y LH) en el número de células de las subpoblaciones celulares y en el peso húmedo de los ovarios de pollos recién nacidos, tratados en etapa embrionaria. Las dosis de Pergonal (75 UI-LH, 75 UI-FSH, Serono de Mexico, S.A. de C.V.) usadas fueron de $1\mu\text{g}$ y $25\mu\text{g}$, inyectándose $100\mu\text{l}$ a los 13, 15 y 17 días de incubación sobre la membrana corioalantoidea. Después de la disgregación celular de los ovarios, se cuantificó el número de células por medio de un hemocitómetro. Otro grupo de ovarios fue usado para obtener el peso húmedo. Los resultados muestran lo siguiente:

- 1) Una tendencia hacia una disminución en el peso húmedo de los ovarios tratados con $1\mu\text{g}$ de Pergonal en relación a los controles y un peso húmedo similar en los ovarios tratados con $25\mu\text{g}$ de Pergonal en relación a los controles.
- 2) Un aumento en el número de células somáticas con y sin inclusiones de lípidos de los ovarios tratados con $25\mu\text{g}$ de Pergonal en relación a los controles; no se presenta diferencia en el número de células germinales.
- 3) Un aumento en la población celular total de los ovarios tratados con $25\mu\text{g}$ de Pergonal, dado principalmente por el aumento en el número de células somáticas.
- 4) Los ovarios tratados con $1\mu\text{g}$ de Pergonal no presentan diferencias significativas en el número de células somáticas con o sin inclusiones de lípidos, células germinales y total de células. Con base en estos resultados podemos concluir que el ovario del embrión de pollo responde a dosis de $25\mu\text{g}$ de Pergonal con un incremento en el número de células somáticas del ovario de pollos recién nacidos.

I N T R O D U C I O N

I HIPOTALAMO .

a) ANATOMIA.

El hipotálamo de las aves yace en la base del diencefalo debajo del talamo. Es relativamente una estructura pequeña que ocupa cerca del 3% del volumen total del cerebro y está separado dorsalmente del talamo por el surco hipotalámico. Rostral y caudalmente limita con el quiasma óptico, y ventralmente limita con la eminencia media y el infundíbulo (1).

En 1929, se identificaron diferentes grupos de células ganglionares en el hipotálamo anterior, a tales grupos se les reconocen como los núcleos paraventricular y supraóptico. Bargmann, demostró la neurosecreción de estos grupos celulares por medio de una técnica de cromohematoxilina (2). El hipotálamo está dividido en dos porciones por el tercer ventrículo, la región anterior formada por los núcleos celulares: pre-óptico, supra-óptico y paraventricular; y la región posterior o tuberal, formada por los núcleos celulares: medio posterior e infundibular (3).

Existen varias conexiones entre los núcleos celulares del hipotálamo y a su vez, entre éstos y otros órganos. Se han observado en las aves dos importantes nervios eferentes hipotalámicos: el tracto supraóptico-hipofisial y el tubero-hipofisial. El primero está formado por axones neurosecretorios del núcleo supraóptico y del núcleo paraventricular, una parte de las fibras del tracto supraóptico-hipofisial pasan al lóbulo neural y la otra a la eminencia media. El tracto tubero-hipofisial, está formado por fibras del núcleo infundibular y quizá también del núcleo ventromedial (4).

El hipotálamo está conectado por fibras nerviosas aferentes al tracto olfatorio, al tálamo y al cerebro anterior; recibe impulsos de varias partes del cuerpo vía ascendente de la médula oblonga y de la médula espinal. Las conexiones eferentes pasan del hipotálamo al tálamo anterior, al cerebro anterior, al núcleo autónomo del tallo cerebral y a la médula espinal. Además el hipotálamo tiene conexiones muy importantes con la hipófisis; se ha observado que en las aves, el hipotálamo juega una parte importante en la regulación de la temperatura corporal (5).

En cuanto a su relación con la hipófisis, tenemos que esta se divide en dos lóbulos: el lóbulo posterior o neurohipófisis, que está bajo control nervioso del hipotálamo a través de un paquete de fibras nerviosas del tracto supraóptico-hipofisial, el cual actúa como vía eferente para el hipotálamo, y el lóbulo anterior o adenohipófisis, que tiene un enlace vascular con el hipotálamo y con la neurohipófisis. Se conoce ahora, que el sistema neurosecretor del hipotálamo en las aves, tiene entre sus funciones, el control de la actividad de las gonadotropinas elaboradas por la adenohipófisis (3).

b) SISTEMA NEUROSECRETOR.

Las sustancias neurohormonales secretadas por las terminaciones nerviosas en la eminencia media hacia el sistema porta, provee el enlace entre el cerebro y los órganos endócrinos. Las hormonas hipofisiotrópicas son sintetizadas por neuronas peptidérgicas en el hipotálamo y son transportadas por corrientes axoplásmicas a las terminaciones nerviosas en la eminencia media que están en contacto con el endotelio de los plexos primarios de capilares donde son liberadas. Dichas neurohormonas son después distribuidas a la

hipófisis en particular, a la adenohipófisis por medio de la corriente sanguínea porta hipofisiaria (6).

c) FACTORES HIPOTALAMICOS-HIPOFISIOTROPICOS.

Debido a que se ha demostrado que la adenohipofisis secreta seis hormonas, es de suponer que el hipotálamo produce al menos seis neurohormonas (factores liberadores y factores inhibidores) capaces de regular la secreción de las seis hormonas producidas por la adenohipófisis. Las investigaciones llevadas a cabo en mamíferos y otros vertebrados, han demostrado la presencia de los factores liberadores o inhibidores para cada una de las hormonas de la adenohipófisis y se han reportado las siguientes neurohormonas hipofisiótropicas (9):

Factor liberador de la hormona luteinizante (LH-RH).

Factor liberador de la hormona foliculo estimulante (FSH-RH).

Factor inhibidor y liberador de la prolactina (PIF y PRF).

Factor liberador de la tirotrópina (TRF).

Factor liberador e inhibidor de la hormona del crecimiento (GRF y GIF).

Factor liberador e inhibidor de los melanocitos (MRF y MIF).

En las aves está aún la pregunta de si los dos tipos de gonadotropinas (LH y FSH) tienen su propio factor liberador o bien comparten un mismo factor liberador, ya que citológicamente hay dos tipos de células gonadotrópicas en la adenohipófisis. Hartree y Cunningham en 1969, efectuaron la purificación parcial de las hormonas de la hipófisis de pollo por cromatografía, y encontraron dos fracciones, una conteniendo FSH activa y la otra LH activa. Con base en esto, se propone que la

LH y la FSH deben tener su propio factor liberador (7), (10). Los estudios in vitro usando tejido de la hipófisis anterior, establecen que los extractos del hipotálamo de pollo contienen un factor liberador de la LH (1). Por otro lado, Jackson (1971) purificó el factor liberador de la LH de pollo por cromatografía en columna de Sephadex G25 y CM-Sephadex (8), (11). La comparación de la cromatografía de la LHRH de ave y de la LHRH de rata, indicó que ambos son similares, aunque tienen ciertas diferencias. En 1982, se aisló y caracterizó la LHRH de pollo, y mostró que tiene la siguiente estructura (12) :

(Pyro)-Gly-His-Try-Ser-Try-Gly-Leu-Pro-Gly-NH

d) EFECTOS DE LESIONES EN EL HIPOTALAMO.

En el pollo se ha observado que después de una síntesis de LHRH aumentan las concentraciones de LH en plasma. También se han observado cambios en la concentración de LH en plasma, durante el crecimiento y el desarrollo sexual; lo cual probablemente refleja la maduración tanto del hipotálamo como de la hipófisis, junto con cambios en la producción de esteroides gonadales. Parece ser que la mayoría de los factores actúan a nivel del sistema nervioso central para regular la liberación de LHRH de la eminencia media hacia la adenohipófisis y con ello, estimular la secreción de gonadotropinas (LH y FSH).

Durante la maduración sexual de la hembra, las lesiones de la región pre-óptica y del núcleo infundibular, bloquean la ovulación y provocan una marcada regresión del ovario y del oviducto. Sin embargo, las lesiones en la región supraóptica, también bloquean la ovulación, pero

el ovario y el oviducto no sufren regresión. Esto sugiere que la demanda de la región supraóptica puede bloquear la producción de la LH requerida para la ovulación, sin interferir con la liberación de la LH y de la FSH, necesarias para mantener el ovario y estimular la maduración folicular. Con esto, es posible establecer que la región pre-óptica y el núcleo infundibular, están involucrados en el crecimiento y mantenimiento de la gónada. Cuando éstas regiones se aíslan del resto del cerebro, el hipotálamo tuberal, no puede por sí sólo inducir el desarrollo de las gónadas. También parece ser, que el núcleo supraóptico, no está directamente involucrado en el mecanismo de control de la secreción de gonadotropinas y en el mantenimiento gonadal, sino que participa activamente en la producción de la LH requerida para la ovulación (13).

II HIPOFISIS .

a) ANATOMIA.

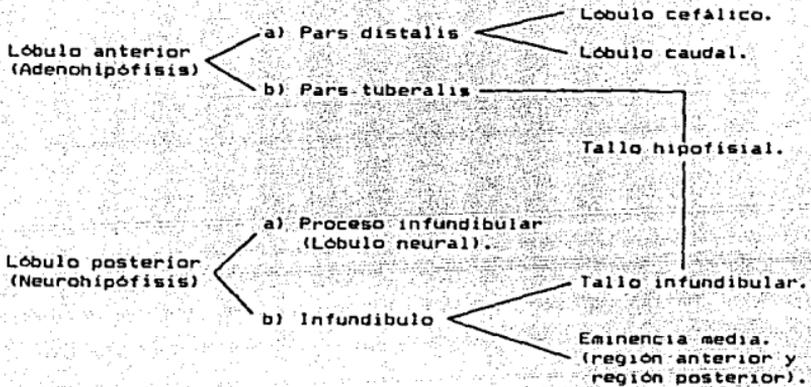
Los órganos endócrinos secretan sustancias que tienen efectos fisiológicos importantes sobre otros órganos. Estas glándulas descargan sus hormonas al torrente sanguíneo para ser transportadas hasta los órganos blanco donde causan su efecto fisiológico.

Las glándulas endócrinas en las aves son: la hipófisis, la tiroides, la paratiroides, las glándulas adrenales, el páncreas y las gónadas (testículo y ovario). Las primeras tres son estrictamente glándulas endócrinas, mientras que las tres últimas tienen ambas funciones, endócrina y exócrina.

La hipófisis se ha considerado como la glándula maestra, ya que elabora un gran número de hormonas que estimulan a otras glándulas para que secreten sus hormonas; de esta manera, las hormonas secretadas por la hipófisis son esenciales para la homeostasis y actúan en coordinación con otras glándulas endócrinas.

La hipófisis en las aves es un órgano pequeño y lobulado, situado en una depresión del hueso esfenoides llamada: silla turca, justamente posterior al quiasma óptico en el piso del diencefalo. Está compuesta por dos lóbulos: el lóbulo anterior (adenohipófisis) formado por dos zonas histológicamente diferentes, y el lóbulo posterior (neurohipófisis). En algunas aves no hay lóbulo o pars intermedia como en los mamíferos, y ambos lóbulos están separados por tejido conjuntivo (13).

DIVISIONES DE LA HIPOFISIS DE AVES



La adenohipófisis se origina a partir de la bolsa de Rathke, un divertículo que se extiende del estomodeo hacia el piso del diencefalo en la región del infundibulo; el lóbulo neural se desarrolla a partir de un crecimiento del infundibulo. En un estado temprano del desarrollo (6 días en el pollo), hay una subdivisión de los tejidos, la proliferación de estos da como resultado, diferentes zonas en la adenohipófisis del adulto: a) Los lóbulos aboral y oral, dan lugar respectivamente, a los lóbulos caudal y cefálico. b) La zona en contacto con el cerebro permanece como una capa sencilla de células y corresponde morfológicamente a la pars intermedia, luego estas células pierden su contacto con la pars nerviosa y se incluyen en la pars distalis (14).

Las primeras señales morfológicas de diferenciación celular aparecen en el lóbulo cefálico, donde las primeras células acidófilas son generalmente encontradas entre el décimo y onceavo día de desarrollo embrionario. En el lóbulo caudal, las primeras células aparecen entre los 15 días, o a los 18 y 19 días de desarrollo embrionario. La microscopía electrónica provee una mejor estimación de cuando comienza la actividad secretora de la glándula en el embrión, identificándose así, los primeros gránulos secretores en el lóbulo cefálico en el octavo día de desarrollo embrionario (15).

La adenohipofisis se divide en la pars distalis y en la pars tuberalis; en la primera, encontramos dos zonas histológicamente diferentes: el lóbulo cefálico y el lóbulo caudal. Sus células glandulares están arregladas en cordones o folículos, delimitados por una membrana basal. Entre las células se encuentra un importante plexo de capilares sanguíneos; cuya pared consiste de una capa sencilla de células endoteliales de tipo sinusoide. La mayoría de las células glandulares están en contacto directo con el espacio pericapilar y se clasifican en tres tipos: acidófilas, basófilas, y cromóforas. Amin y Gilbert, (1970) han concluido que en los individuos jóvenes, la actividad funcional de la hipófisis puede variar en relación al estado fisiológico del ave y esto a su vez, en relación a la actividad funcional de los diferentes tipos celulares, su efecto hormonal y su producción. A la edad de 10 semanas, se encontró que el número de células de cada tipo celular varía, lo cual está asociado con cambios en la actividad funcional de la hipófisis. Las células más afectadas son las de tipo I y las de tipo II, que son gonadotropas y que secretan FSH y LH, y las células luteotropas. Los cambios en estas

células se dan claramente en el inicio de la maduración sexual. Las células secretoras de FSH son las primeras en incrementar en número y actividad, lo cual está quizá relacionado con el incremento de la secreción de esteroides por el ovario que va de acuerdo con el incremento del peso del oviducto. Las células que secretan LH, son más notables al mismo tiempo que los folículos ováricos maduran antes de la ovulación (16).

La pars tuberalis consiste en un conjunto de células que cubren parte de la superficie ventral del diencefalo y por lo general se extienden hacia el lado caudal del tallo infundibular. La pars tuberalis está en comunicación con la pars distalis por un cordón de células que surgen de la región media de la eminencia media y pasan a la pars distalis.

La neurohipófisis se divide en el lóbulo neural y el infundíbulo, que a su vez, se divide en dos regiones: el tallo infundibular y la eminencia media. La apariencia de la neurohipófisis varía considerablemente de una especie a otra. Con base en estudios de microscopía electrónica realizados en pollos, se propuso que el lóbulo neural está formado por un tejido que consiste de terminaciones nerviosas del tracto neurosecretor supraóptico-hipofisial; estas terminaciones nerviosas contienen granulos con diámetros de 100 nm. a 200 nm., y están rodeadas de pituitocitos (19). El tallo infundibular puede ser considerado como una proyección tubular de la pared del diencefalo, el cual contiene al lóbulo neural. En el pollo el tallo infundibular es morfológicamente diferente de la eminencia media, esta última, está íntimamente relacionada con el plexo capilar primario del sistema porta-hipofisario y es posible distinguir en ella, tres capas celulares: la epéndimaria, la fibrosa y la glandular (1).

En un estudio detallado de los vasos sanguíneos de la hipófisis de pollo (Green, 1951); se encontró que las arterias superiores de la hipófisis proveen de sangre al plexo de capilares primarios en la eminencia media. Los vasos porta, colectan la afluencia de sangre de este plexo y la pasan hacia la pars distalis, en ésta, los vasos se ramifican en todas direcciones y desembocan en el interior de los senos venosos rodeando a la glándula (1), (18).

b) HORMONAS DE LA ADENOHIPOFISIS.

La adenohipófisis o lóbulo anterior de la hipófisis de las aves, elabora todas las hormonas producidas en la adenohipófisis de los mamíferos; estas son :

Dos hormonas proteínicas : la hormona del crecimiento o somatotropina (STH) y la prolactina.

Tres hormonas glucoproteicas : la tirotropina (TSH) y dos gonadotropinas, la hormona foliculo estimulante (FSH) y la hormona luteinizante (LH).

Dos hormonas polipeptídicas : la adenocorticotropina (ACTH) y la melanotropina (MSH).

Para determinar la presencia y la acción de las hormonas de la hipófisis, se usan por lo general las siguientes técnicas: 1) La administración de hormonas en un animal intacto. 2) La extracción de la hipófisis del animal (hipofisectomía), y 3) La sustitución o reemplazo de la misma. En cualquiera de los tres casos, se pueden observar efectos en varios órganos y un cambio en su fisiología (14).

c) HORMONAS GONADOTROPICAS.

El adecuado funcionamiento de los sistemas tanto en los mamíferos como en las aves u otro vertebrado, es dependiente de las hormonas de la

hipófisis, en este caso, nuestro interés son las hormonas gonadotrópicas, que son esenciales para el desarrollo, funcionamiento y mantenimiento de las gónadas. La adenohipófisis de las aves, así como la de los mamíferos, produce como se mencionó anteriormente, la FSH y la LH (hormonas glucoproteicas) y ambas están presentes en la hipófisis del embrión de pollo cerca del 18^{avo} día de desarrollo embrionario.

1) Química.

La estructura primaria de algunas hormonas glucoproteicas en mamíferos ha sido estudiada en detalle. Estas hormonas están compuestas por dos subunidades, designadas α y β , las cuales por sí solas, tienen una actividad biológica. La subunidad α de la hormona LH, FSH y TSH, tiene secuencias idénticas de aminoácidos; mientras que la subunidad β es la determinante en la actividad biológica con una secuencia diferente de aminoácidos para cada hormona. Cada subunidad contiene carbohidratos unidos en una o más porciones en la cadena de péptidos y hay evidencia de que las dos subunidades son sintetizadas independientemente en la hipófisis de los mamíferos (13).

En los laboratorios donde se han aislado la FSH y la LH, se ha observado que la LH de pollo tiene más prolina y menos glutamato, ácido aspártico e histidina que la FSH. Similarmente la cantidad de carbohidratos de ambas hormonas, ha sido determinada; el total de carbohidratos para la LH es de 13.7 g. por 100 g de glucoproteína (incluyendo 5.2 hexosa, 7.1 hexosamina y 1.4 g. 100 g⁻¹ ácido siálico) y de 7.1 g. para la FSH (incluyendo 3.1 hexosa, 3.2 hexosamina y 0.8 ácido siálico) (19).

Basandonos en analogias con los mamíferos y el pavo, la FSH y la LH de pollo tienen pesos moleculares de cerca de 28,300 daltons y están compuestas por dos glicoproteínas distintas: la subunidad α y la subunidad β (20).

2) Mecanismo de acción hormonal.

La célula debe reconocer cierta información y traducir sus señales en una respuesta, por lo que, proteínas específicas llamadas receptores, llevan a cabo tal función. Una célula blanco es definida como aquella que contiene una concentración o cantidad de receptores suficiente para dar una respuesta dentro del rango fisiológico de la concentración hormonal.

Las hormonas, según su mecanismo de acción han sido clasificadas en tres grupos :

1) Hormonas del tipo esteroide (unión a receptores intracelulares), como son: estrógenos, andrógenos, progesterona, glucocorticoides, mineralocorticoides y tiroxina.

2) Hormonas que activan la superficie celular (unión a receptores membranales).

Subgrupo A (tienen como segundo mensajero al AMPc) :

Hormona luteinizante (LH).
Hormona foliculo estimulante (FSH).
Corticotropina (ACTH).
Tirotropina (TSH).
Gonadotropina coriónica (hCG).
Hormona estimulante de los melanocitos (MSH).
Lipotropina (LPH).
Angiotensina II.
Hormona antidiurética (ADH).
Paratohormona (PTH).
Calcitonina.
Glucagón.
Catecolaminas β -adrenérgicas y α -adrenérgicas.
Somatostatina.
Hormona liberadora de la corticotropina (CRH).
Opíodes endógenos.

Subgrupo B (tienen como segundo mensajero al calcio y/o fosfatidilinositoles) :

Vasopresina, Hormona liberadora de la tirotrópina (TRH), Catecolaminas α -adrenérgicas, Hormona liberadora de las gonadotropinas (Gn-RH), Acetilcolina.

3) Hormonas que activan la superficie celular (su mensajero intracelular aún no ha sido identificado) :

Insulina, Hormona del crecimiento, Prolactina, Somatomamotropina coriónica, Oxitocina y Factores del crecimiento.

a) Mecanismo de acción de las hormonas que activan la superficie celular con unión a receptores membranales :

Los receptores para las hormonas de este grupo están en la superficie externa celular; son proteínas integrales de la membrana plasmática formadas por moléculas de mayor tamaño (PM entre 50 y 300,000) y complejidad que las hormonas. En el caso de las hormonas peptídicas, la ocupación del 1 al 5% de los sitios totales de unión, es suficiente para obtener una respuesta hormonal máxima; aunque debe señalarse que la concentración de los complejos Hormona-Receptor que determinan la magnitud de la señal, dependen de tres factores: la concentración de la hormona, la concentración del receptor y la afinidad de la interacción H-R. Los receptores se están sintetizando y degradando continuamente; la síntesis se inicia en los ribosomas asociados al retículo endoplásmico rugoso y el procesamiento de la proteína nativa se realiza posteriormente en el aparato de Golgi. El mecanismo de respuesta es mediado por la activación de la adenilato ciclasa, enzima membranal que cataliza la formación de ATP a AMPc. Los efectos del AMPc en células de organismos eucariotes, son mediados

fundamentalmente por la fosforilación o desfosforilación de proteínas, de tal manera que procesos tan diferentes entre sí como son: la esteroidogénesis, transporte de iones, metabolismo de carbohidratos y lípidos, crecimiento celular y replicación, pueden ser mediados por una proteína cinasa específica, una fosfatasa específica o por sustratos específicos para la fosforilación (21), (22), (23). La maduración folicular del ovario representa un ejemplo interesante de la interacción hormonal en la regulación de los receptores de superficie celular (21). Los receptores para la LH en las células granulosas incrementan durante la maduración, lo cual ha mostrado ser dependiente de la FSH. Sin embargo, la administración de FSH en ratas hipofisectomizadas, no muestra tal aumento a menos que estas también reciban estrógenos. Se ha observado también, que cuando se administran sólo estrógenos, el número de receptores a LH en las células granulosas disminuyen, por lo que la función de las hormonas esteroides sexuales y de la FSH se da de manera sinérgica (21).

3) Fisiología.

Los papeles de la LH y de la FSH en el pollo parecen ser casi idénticos a aquellos que se dan en los mamíferos. Estudios realizados en el pollo, indican que la FSH actúa en la estimulación de la espermatogénesis, en la función de las células de Sertoli (24) y en el crecimiento folicular del ovario. En contraste, la LH, induce la diferenciación de las células de Leydig (25), la producción de testosterona por parte del testículo (19) y provoca la ovulación.

Considerando la producción de progesterona, la mayor fuente de ésta, es la capa granulosa de los folículos preovulatorios (26). La síntesis de progesterona es incrementada tanto in vitro como in vivo, debido a

la presencia de la LH (27), (28). Las fracciones de LH de pollo también estimulan fuertemente la producción de progesterona. Los papeles de la LH y de la FSH en el control de la síntesis de testosterona y estrógenos está menos establecida. La testosterona es producida por la mayoría de los folículos ováricos (26), aunque las células de la granulosa y de la teca pueden sintetizar testosterona, parece que ésta es normalmente producida por las células de la teca, usando la progesterona derivada de las células de la granulosa. La maduración folicular no podrá ocurrir en ausencia de las gonadotropinas producidas por la hipófisis. Se ha sugerido que la FSH, además controla el depósito del vitelo; por otro lado, la LH, induce la ovulación del folículo maduro. Evidencia de ello viene de la alta incidencia de ovulación seguida de una administración de LH pero no de FSH (29); y del incremento en la concentración de LH en sangre, horas antes de la ovulación.

4) Control de la secreción de gonadotropinas.

Como ya se mencionó, las hormonas hipofisiotrópicas son sintetizadas por neuronas peptidérgicas de los núcleos preóptico, paraventricular, infundibular y supraóptico del hipotálamo, para después ser transportadas por corrientes axoplásmicas a terminaciones nerviosas en la eminencia media, donde son liberadas y puestas en contacto con el endotelio de los plexos primarios de capilares para ser transportadas a la adenohipofisis, donde ejercen su fuerza para la liberación de gonadotropinas y otras hormonas elaboradas por la pars distalis de la adenohipofisis y finalmente, éstas hormonas vía corriente sanguínea actúan sobre su órgano blanco, en este caso, las gónadas femeninas. Con base en esto, es de suponer que debe haber un mecanismo de

regulación en las tres partes para la secreción de hormonas hipofisiotrópicas, gonadotrópicas y esteroides gonadales. Por tanto, los mecanismos de retroalimentación juegan un papel fundamental en la regulación de la función del hipotálamo, de la hipófisis y del ovario, y por consiguiente, en el control de la reproducción. En el contexto del eje hipotálamo-hipófisis-gónada, han sido establecidos tres niveles de retroalimentación: La LHRH del hipotálamo quizá influya su propia secreción por un circuito ultracorto de regulación; después, las gonadotropinas de la hipófisis pueden entonces modificar la secreción de la LHRH a partir de la eminencia media, actuando sobre el hipotálamo por medio de un circuito corto de regulación, y por último, por medio de un circuito largo de regulación, las hormonas esteroides de la gónada en circulación, interactúan con el complejo hipotálamo-hipófisis; ejerciendo una retroalimentación tanto positiva como negativa sobre la secreción hormonal. La retroalimentación (-) de los esteroides gonadales es responsable de la regulación basal de las concentraciones de gonadotropinas, mientras que la retroalimentación (+), es responsable del disparo de gonadotropinas preovulatorias en la hembra (13). Los esteroides gonadales ejercen entonces una influencia estimulante sobre el mecanismo neural, gobernando las descargas cíclicas de LHRH. Hay evidencia en ratas (30), ovejas (31) y pollos (32), de que los esteroides gonadales, en particular los estrógenos, pueden realzar la respuesta de la hipófisis hacia la liberación de LHRH.

III EJE HIPOTALAMO - HIPOFISIS - GONADA .

a) ANATOMIA.

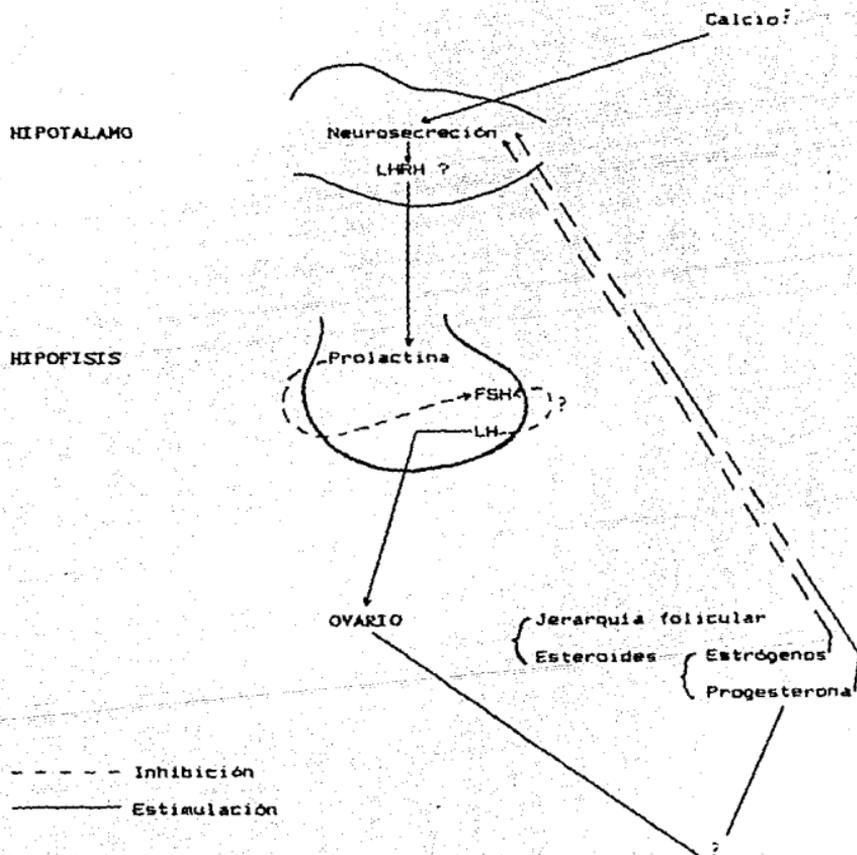
El sistema hipotálamo-hipófisis-ovario, integra, procesa y traduce información, resultando así, una propia secreción hormonal por parte de los tres órganos.

En los últimos años, la estructura y fisiología de este sistema ha recibido mucha atención, y conforme avanza el conocimiento se podrá entender mejor su funcionamiento. Las partes integrales de este sistema son células neurosecretoras localizadas en el hipotálamo (núcleos supraóptico, paraventricular e infundibular) y los axones de estas células, los cuales forman paquetes de fibras nerviosas (paquete nervioso supraóptico-hipofisial, paraventriculo-hipofisial y tubero-hipofisial). Estos tres paquetes mandan sus terminaciones nerviosas hacia el interior de la eminencia media en la neurohipófisis (1).

Las conexiones monoaminérgicas entre las siguientes zonas: núcleos tuberalis, hipotalámico posterior medio, paraventricular, supraóptico, preóptico, basal y la eminencia media; son una parte del mecanismo integrativo en el control hipotalámico de la adenohipófisis (33).

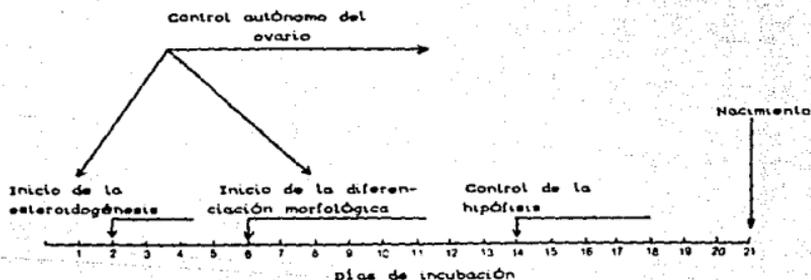
Los primeros granulos neurosecretores aparecen en el embrión de pollo entre los 12 y 14 días; estas células producen una secreción que migra via axón hacia la neurohipófisis, directamente a la eminencia media, para pasar por los capilares sanguíneos hacia la adenohipófisis (pars distalis) y estimular la liberación de gonadotropinas.

El siguiente esquema muestra las relaciones entre el eje Hipotálamo-Hipófisis-Gónada, involucradas en la actividad reproductora (1) :



b) EDAD DE ESTABLECIMIENTO DEL EJE HIPOTALAMO-HIPOFISIS-OVARIO.

En los estados tempranos del desarrollo embrionario gonadal, el control es llevado a cabo sin la intervención de la hipófisis, de manera que el ovario es capaz por sí solo de sintetizar las hormonas esteroideas necesarias para su desarrollo y mantenimiento. La regulación gonadal por parte de la hipófisis ocurre del 14^{avo} día en adelante y las células gonadotrópicas no aparecen en la hipófisis hasta cerca del 14^{avo} día de desarrollo. Se ha sugerido que durante los estadios tempranos de desarrollo gonadal, las hormonas esteroideas producidas por el ovario entre el 2^o y 6^o día de desarrollo embrionario, son importantes, ya que ejercen su control en el desarrollo del ovario. Después, la hipófisis es importante, ya que afecta claramente la embriogénesis del ovario, que no sería cumplida en su totalidad y mantenida, en caso de no establecerse este eje Hipotálamo-Hipófisis-Gónada, necesario en la hembra adulta. El siguiente esquema muestra el tiempo en que el ovario de pollo permanece autónomo y el momento en que la hipófisis ejerce su influencia sobre el ovario, estableciéndose el eje Hipotálamo-Hipófisis-Gónada (34), (36).



IV OVARIO .

a) ANATOMIA.

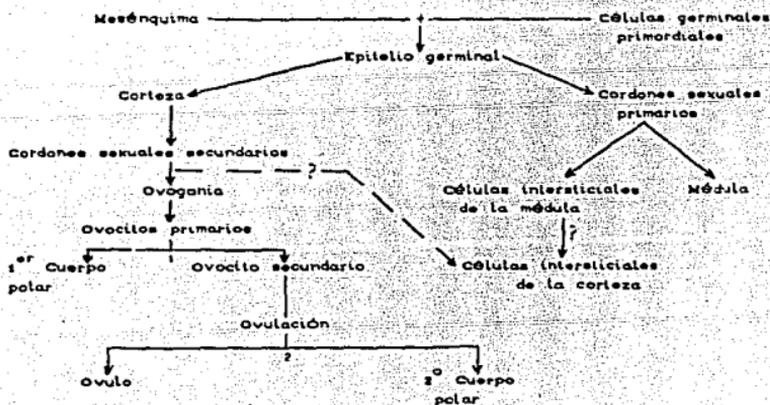
En las gallinas, aunque no en todas la aves, sólo el ovario y el oviducto izquierdo son funcionales; los órganos derechos son vestigiales. Se han reportado ovarios y oviductos derechos, pero éstos raramente son funcionales (34).

El ovario izquierdo esta situado en la cavidad del cuerpo, en posición ventral a la aorta y posterior a la vena cava, y en posición craneal al riñon. Está cerca de las glándulas adrenales y cubierto por una cápsula de tejido conjuntivo. Permanece unido a la pared del cuerpo por un pequeño ligamento mesovárico y a la vena cava por un tallo ovárico o hilus, compuesto de tejido conjuntivo, vasos sanguíneos, nervios y músculo liso (35).

El suplemento arterial del ovario es variable, usualmente surge de la arteria izquierda gonado-renal y en otras ocasiones, las arterias del ovario surgen directamente de la aorta. Dos venas drenan sangre del ovario, las venas craneales del ovario se juntan con la vena suprarenal izquierda para desembocar en el interior del lado izquierdo de la vena cava y la vena caudal del ovario desemboca directamente en el interior de la parte ventral de la vena cava, cerca del nivel de las venas iliacas externas (36).

El desarrollo del ovario comienza en el 3^{er} día de incubación, cuando las células germinales primordiales y las células mesenquimatosas son incorporadas al epitelio germinal. Durante el 6^o y 7^o día de

incubación, se forman los cordones sexuales primarios, que dan lugar a la médula y a las células intersticiales de la médula. Entre el 8^{avo} y 11^{avo} día, el epitelio germinal prolifera y forma la corteza y los cordones sexuales secundarios. Posteriormente, se forman las ovogonias que por multiplicación celular dan origen a los ovocitos primarios. La maduración nuclear del ovocito empieza en el folículo y se termina en el oviducto, y consta de dos divisiones sucesivas. La primera división es reduccional, da origen al ovocito secundario y al primer cuerpo polar, y ocurre dos horas antes de la ovulación (37). La segunda división de maduración es ecuacional y ocurre en el oviducto, subsecuentemente a la ovulación (Fig. 1).



- 1) 1^a División reduccional
 2) 2^a División ecuacional.

Fig. 1. Esquema del desarrollo del ovario hasta la producción del ovulo.

Durante el desarrollo del embrión, el ovario izquierdo es más grande que el derecho y la distribución asimétrica de las células germinales comienza en el 3^{er} día de incubación. El ovario está formado por una médula y una corteza, separadas por una capa de tejido conjuntivo llamada túnica albugínea (38), (Fig. 2).

La médula se forma a partir de los cordones sexuales primarios derivados del epitelio germinal, está constituida por tejido conjuntivo, nervios y músculo liso, y es quizá, la parte más vascularizada del ovario. La corteza rodea completamente a la médula, excepto en la zona de hilio, contiene a las ovogonias y a los ovocitos, y su superficie externa está formada por epitelio cuboidal (36).

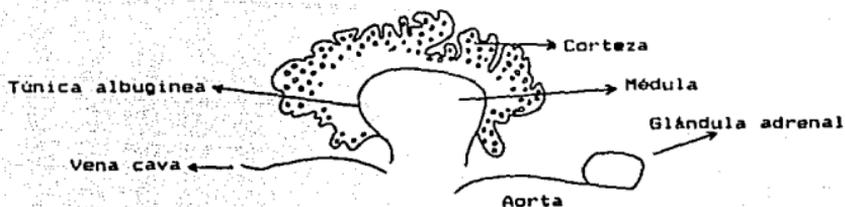


Fig. 2. Esquema del corte transversal del ovario.

b) ESTEROIDOGENESIS.

En la gónada femenina de las aves, se ha demostrado la presencia de cordones medulares bien delimitados por una lámina basal; estos cordones epiteliales hacia el 8^{avo} día de desarrollo embrionario, presentan ya una actividad esteroidogénica (39). Entre los cordones medulares, es posible reconocer la presencia de un sistema de conductos denominados lacunares, los cuales, están delineados por una delgada lámina basal (40).

Las estructuras epiteliales se encuentran distribuidas de manera irregular en la médula del ovario, de tal forma, que en la región medular cercana a la corteza, denominada médula subcortical, se localizan cordones de células esteroidogénicas relativamente pequeños, así como reducidos canales lacunares. En la médula profunda se encuentran cordones de células esteroidogénicas de mayor tamaño, que corresponden a las células intersticiales del ovario. Utilizando técnicas histoquímicas, se puso de manifiesto la presencia de colesterol y sus esteres en el tejido esteroidogénico de las aves; así mismo, la presencia de $\Delta-3\beta$ HSD, en los cordones medulares del embrión de pollo, refleja la adquisición de una actividad esteroidogénica en etapas tempranas (41).

La conversión del colesterol en las diferentes hormonas sexuales esteroideas secretadas por el ovario, es catalizada por un complejo sistema enzimático, localizado en diferentes organelos celulares. El ovario, tiene entonces, las enzimas necesarias para la síntesis de novo, es decir, a partir de acetato, formando colesterol (lípidos insaponificables del tipo esterol).

La activación de la colesterol esterasa, para proveer de colesterol a la mitocondria y su conversión posterior, requiere de la acción sinérgica de la LH y de la γ -MSH, a través de la formación de AMPc. El colesterol es convertido a delta-5-pregnenolona, al romperse su cadena lateral por la acción de la enzima 20,22-desmolasa en las mitocondrias; este proceso requiere de NADPH, O_2 y citocromo P-450. La delta-5-pregnenolona se convierte en progesterona mediante la acción de dos enzimas, la $3\text{-}\beta\text{-ol}$ -deshidrogenasa y la Δ -isomerasa, que se encuentran en el retículo endoplásmico liso; este proceso oxidativo necesita NAD como receptor del hidrógeno del hidroxilo de la posición 5 a la 4. En el ovario, la progesterona es utilizada como sustrato para la formación de andrógenos y estrógenos. La conversión de progesterona a las hormonas androgénicas, utiliza dos enzimas: la 17α -hidroxilasa y la 17,20-desmolasa, que rompe la cadena lateral de dos carbonos; esta reacción se da en el retículo endoplásmico, depende de NADPH y O_2 , y es catalizada por el citocromo P-450. La pregnenolona también forma andrógenos por la vía delta-5, produciendo la dehidroepiandrosterona. La androstendiona es el principal andrógeno sintetizado por el ovario, aunque se producen pequeñas cantidades de testosterona y dehidroepiandrosterona. A su vez, los andrógenos son los precursores en la formación de estrógenos; proceso llamado aromatización y que lleva a la elaboración de un compuesto fenólico de 18C a partir de un esteroide neutro de 19C; el proceso requiere de NADPH, O_2 , citocromo P-450 y un complejo de enzimas aromatasas, y se lleva a cabo en los microsomas. La aromatización de androstendiona produce estrona (E_1), y la de testosterona, estradiol (E_2); a su vez, la testosterona se interconvierte con la androstendiona y la

estróna con el estradiol, mediante la acción de la enzima 17β -oxidoreductasa (34), (42), (Fig.3).

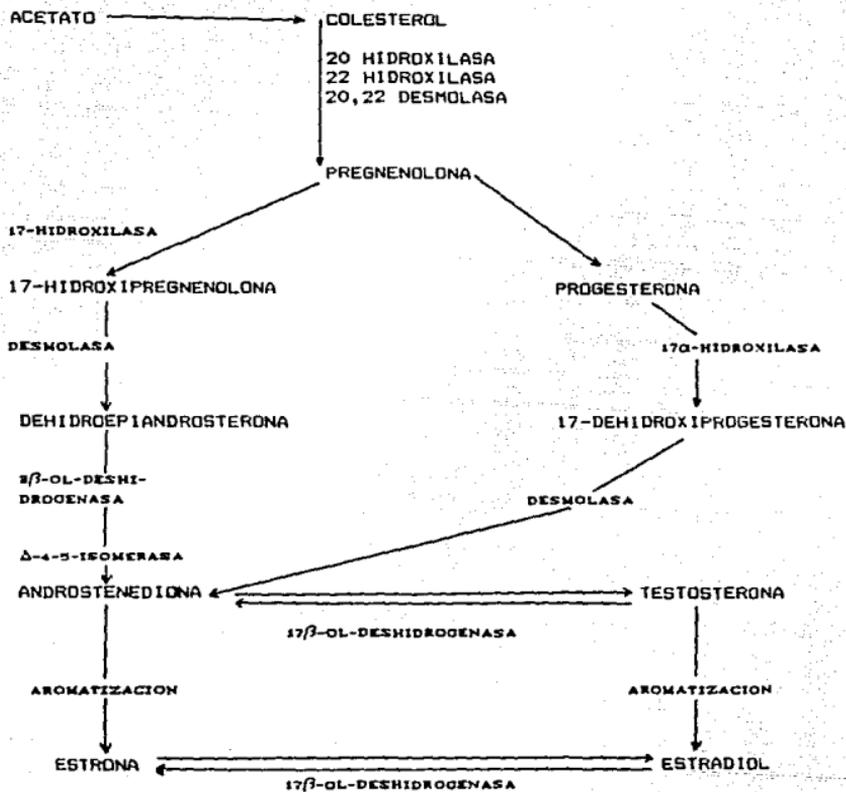


Fig. 3. Vías de la esteroidogénesis en el ovario.

Existe gran controversia acerca de la formación de los componentes esteroidogénicos; hay por lo menos tres teorías sobre el posible origen de las células intersticiales, o también llamadas "glándulas intersticiales" del ovario de las aves.

Una de estas teorías propone que las células intersticiales se forman como protrusión de las células granulosa de los folículos atresicos (39). Otra teoría sugiere que las células intersticiales se originan de cordones medulares primarios, organizados durante el desarrollo gonadal temprano. Por último, otros investigadores han puesto en evidencia el surgimiento de poblaciones esteroidogénicas a partir de células indiferenciadas del estroma ovárico (43).

A pesar de que existen estas evidencias, no se ha determinado el origen exacto de las poblaciones celulares que llevan a cabo la esteroidogénesis en el ovario. Sin embargo, se ha planteado que las células esteroidogénicas en etapas tempranas del desarrollo folicular, responden a la LH y a la hCG, segregando androstenediona y testosterona. Además se ha demostrado que estas poblaciones celulares presentan la ultraestructura característica de las células productoras de esteroides, con un abundante retículo endoplásmico liso, mitocondrias con crestas de tipo tubular y numerosas inclusiones lipídicas (44).

Los estrógenos (estradiol y estrona) han sido identificados en el ovario izquierdo de embriones de pollo de 10 a 13 días y en pollos recién nacidos. Las gónadas de embriones de pollo de 6 días sintetizan estrona y 17β -estradiol, mientras que los ovarios de 7 a 8 días producen estrona, 17β -estradiol, estriol, epiestriol, androstenediona y testosterona (45). Woods et al, en 1975 (46), demostraron por

técnicas de inmunofluorescencia, la presencia de testosterona en sangre de embriones de pollo de 5 días y determinaron por técnicas de radioinmunoensayo (RIA), su concentración en plasma en embriones de de 7 a 17 días de incubación.

La testosterona es el primer andrógeno producido por el ovario izquierdo en embriones de pollo de 15 días, sin embargo, a los 8 días son capaces de secretar testosterona, después de haber adicionado hCG al medio de incubación.

A partir del 6^o día de desarrollo, la diferenciación sexual morfológica de las gonadas se hace aparente; en este momento, la estrona esta presente en las células de los cordones primarios de la médula. Durante el 3^o al 12^{avo} día de desarrollo embrionario, la estrona es sintetizada por las células intersticiales de la médula y por los cordones medulares. Al 13^{avo} día, la estrona esta presente en las células de los cordones sexuales secundarios de la corteza y en las células intersticiales de la misma; estos cordones son el sitio principal para la síntesis de estrona. De 6^o al 12^{avo} día, las células intersticiales de la médula son los sitios para la síntesis de 17 β -estradiol; en el 13^{avo} día, la síntesis de esta hormona es iniciada en los cordones de la corteza. Las células intersticiales de la teca metabolizan progesterona para formar androstenediona y testosterona, las cuales a su vez, pueden aromatizarse y formar estrona y 17 β -estradiol respectivamente, como se puede observar en la Fig.3 .

Por último, podemos mencionar que la aparición de estrona y 17 β -estradiol en los cordones y en las células intersticiales de la corteza al 13^{avo} día de incubación es de particular interés, ya que se

ha demostrado que entre los 13 y 14 días de incubación, la adenohipófisis inicia la regulación hormonal de la esteroidogénesis de los cordones y de las células intersticiales de la corteza. Esto es un indicador de que en los días anteriores al 13^{avo} día, la síntesis de estrógenos y otros esteroides es autónoma, mientras que después de este tiempo, la síntesis de esteroides por los diferentes tipos celulares, está bajo el control de las gonadotropinas producidas por la adenohipófisis, que a su vez, son liberadas por medio de factores hipotalámicos (34), (47), (48), (49).

c) MECANISMO DE ACCION HORMONAL.

Las hormonas insolubles en agua (hormonas esteroides) necesitan de proteínas transportadoras, que pueden ser de dos tipos: proteínas de transporte general y proteínas de transporte específico, las cuales tienen sitios específicos de unión para las hormonas.

Las hormonas esteroides inician su mecanismo de acción a nivel celular por medio de interacciones con receptores intracelulares, localizados en el citoplasma y/o en el núcleo celular.

El primer paso es la internalización a la célula de la hormona libre, desprovista de su proteína transportadora; este proceso se realiza por difusión pasiva. Una vez que la hormona interacciona con su receptor, se forma un complejo H-R que es activado a través de una reacción dependiente de la temperatura y de la fuerza iónica, y que resulta en cambios conformacionales y de carga que le confieren una gran afinidad para interaccionar con sitios aceptores en la cromatina nuclear. Los cambios moleculares que se dan como resultado de la interacción del complejo HR-aceptor, incluyen la activación o inactivación de la transcripción génica específica, el procesamiento

específico de precursores de ARNm y la traducción a nivel ribosomal en proteínas específicas capaces de modificar las funciones celulares (21), (22), (23).

Varios estudios han demostrado que las hormonas del ovario influyen en la actividad reproductiva del organismo; estas son responsables de los caracteres sexuales secundarios y con frecuencia, tienen efectos marcados en el metabolismo y en el comportamiento (36), (50).

H I P O T E S I S

En base a los antecedentes anteriores, se conoce que el ovario de pollo recién nacido, responde al efecto de las hormonas gonadotropicas. Por lo que suponemos que en el ovario del embrión de pollo tratado con la combinación de LH/FSH, se provoquen cambios en el número de la población celular de algunas de las subpoblaciones esteroidogénicas del ovario.

O B J E T I V O

**ESTUDIAR EL EFECTO DE LAS HORMONAS GONADOTROPICAS EXOGENAS
A DIFERENTE CONCENTRACION SOBRE LAS SUBPOBLACIONES
CELULARES DEL OVARIO DE POLLOS RECIEN NACIDOS .**

M A T E R I A L E S
Y
M E T O D O S

MATERIALES Y METODOS .

Para la realización de este trabajo se utilizaron embriones de pollo de la raza White Leghorn, incubados a 37.8° C, en una incubadora de humedad constante y aire forzado.

Al décimo día de incubación, se realizó una ovoscopia para descartar aquellos huevos que no alcanzaron su desarrollo o que no fueron fértiles. A los viables se les marcó con lápiz la posición donde quedaba la cámara de aire y se dividieron en los siguientes grupos :

- 1) Grupo testigo (tratado con medio de Dulbecco).
- 2) Grupo experimental 1 (tratado con 1µg de Pergonal).
- 3) Grupo experimental 2 (tratado con 25µg de Pergonal).

Posteriormente, los huevos se limpiaron con alcohol al 70% y se les hizo una pequeña abertura de forma triangular de la siguiente manera : Con una aguja de disección se hizo un orificio en la cámara de aire y con la segueta se trazó sobre la cascara, arriba de la cámara de aire, un triángulo pequeño, de tal manera que al quitarlo quedó expuesta la membrana externa del huevo. Sobre la membrana externa del huevo se colocó una gota de suero fisiológico estéril y con unas pinzas pequeñas se le hizo una punción con mucho cuidado para no maltratar al embrión y su vascularización. Después, con un bulbo se hizo succión en el orificio de la cámara de aire para bajar la membrana corioalantoidea y poder quitar con las pinzas la membrana externa del huevo. La abertura triangular y el agujero de la cámara de aire fueron tapados con cinta adhesiva.

Los días 13, 15 y 17 de incubación, se aplicó la hormona sobre la membrana corioalantoidea. Las dosis utilizadas fueron: 1 μ g y 25 μ g de Pergonal (75 UI-LH, 75 UI-FSH, Serono de México, S.A. de C.V.); inyectándose 100 μ l cada día; mientras que el Grupo testigo, fue tratado con 100 μ l de Dulbeco (MEN).

Todo el material de cristalería y plástico fue esterilizado previamente, se usó agua ultrapura para la preparación de las dosis hormonales, trabajándose bajo condiciones estériles; para lo cual se usó una campana de flujo laminar, un mechero y filtros.

Los animales fueron sacrificados por decapitación dentro de las 24 horas después del nacimiento (21 días). Con una tijera se les hizo una incisión medioventral y con unas pinzas se retiraron las vísceras para dejar las gónadas expuestas. En base a las características morfológicas de las gónadas, se diferenció entre machos y hembras. Los machos se desecharon y a las hembras se les disecaron los ovarios izquierdos, los cuales fueron colocados en una caja de Petri con Solución salina libre de Ca⁺⁺ y Mg⁺⁺.

Unos ovarios se utilizaron para obtener el Peso húmedo, para lo cual se secaron con papel filtro y se introdujeron en cápsulas de plástico que se pesaron. Otros ovarios, fueron depositados cada uno por separado en un vial con 1.5 ml. de tripsina al 0.25 %, diluida en una solución salina libre de Ca⁺⁺ y Mg⁺⁺ y se incubaron durante 20 min. en un baño de agitación (90 ciclos/min.) a 37° C; la disgregación celular se terminó de hacer por completo con la ayuda de pipetas Pasteur siliconizadas. Para detener la acción enzimática de la tripsina, a cada vial se le agregó 3.0 ml. de inhibidor de tripsina al 0.25 %.

El control de la viabilidad de las células se realizó con la prueba de exclusión de colorante, Azul de Tripano, mostrando un 90 % de viabilidad después de la disgregación celular.

Una alícuota de esta suspensión ovarica se utilizó para cuantificar el número de células/ovario por medio de un hemocitómetro; las células se clasificaron según su morfología en :

- a) Células somáticas sin inclusiones de lípidos.
- b) Células somáticas con inclusiones de lípidos.
- c) Células germinales.

Los datos fueron sometidos a la prueba estadística de " T " de Student.

R E S U L T A D O S

RESULTADOS .

En los datos obtenidos en el Peso húmedo de los ovarios de pollos recién nacidos, se observa una tendencia hacia una disminución en el peso húmedo de los animales tratados con $1\mu\text{g}$ de Pergonal en relación a los controles, los cuales presentan un peso húmedo similar a los animales tratados con $25\mu\text{g}$ de Pergonal (Gráfica 1).

Los datos obtenidos de la cuantificación celular muestran lo siguiente:

1) Un aumento significativo en la cantidad de células somáticas sin inclusiones de lípidos y células somáticas con inclusiones de lípidos en los animales tratados con $25\mu\text{g}$ de Pergonal en relación a los controles (Gráfica 2).

2) Las células germinales de los animales tratados con $25\mu\text{g}$ de Pergonal en relación a los controles, no presentan una diferencia en el número de células (Gráfica 2).

3) Un aumento significativo en la población celular total de los animales tratados con $25\mu\text{g}$ de Pergonal en relación a los controles (Gráfica 2, Cuadro 1).

4) La cantidad de células somáticas con y sin inclusiones de lípidos, y células germinales de los ovarios tratados con $1\mu\text{g}$ de Pergonal en comparación con los del grupo control, no presentan diferencia significativa (Gráfica 3).

5) No se presentan diferencias significativas en el número total de células de los ovarios tratados con $1\mu\text{g}$ de Pergonal en relación a los controles (Gráfica 3, Cuadro 1).

CUADRO 1

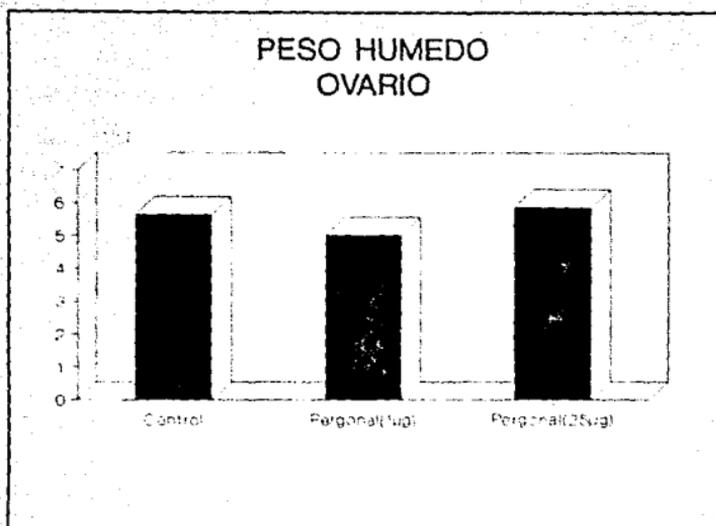
Conteo celular de las subpoblaciones celulares de los ovarios de pollos recién nacidos tratados con Pergonal en la etapa embrionaria.

<i>Tratamiento</i>	<i>N</i>	<i>Células s/Lípidos</i> (10 ⁶)	<i>Células c/Lípidos</i> (10 ⁵)	<i>Células germinales</i> (10 ⁵)	<i>Total de células</i> (10 ⁶)
Control	43	5.38 ± 0.2	4.22 ± 0.2	3.62 ± 0.3	6.13 ± 0.2
Pergonal 1µg	26	5.46 ± 0.3	4.22 ± 0.3	3.47 ± 0.4	6.19 ± 0.3
Pergonal 25µg	22	6.57 ± 0.3*	5.44 ± 0.3*	3.55 ± 0.3	7.45 ± 0.3*

Valores expresados como la media ± error estándar

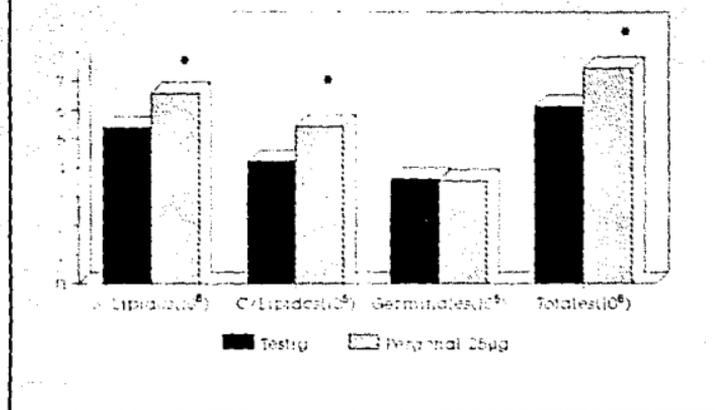
Nivel de significancia: * = p < 0.05

N = número de animales

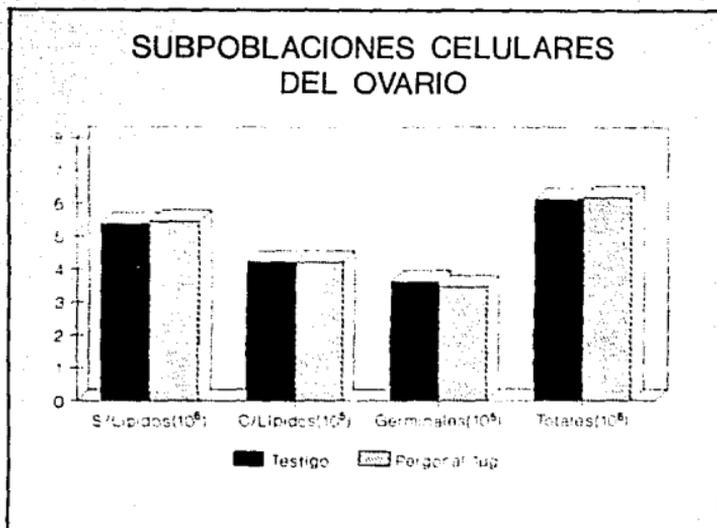


**GRAFICA 1. PESO HUMEDO DE LOS OVARIOS DE POLLOS
RECIEN NACIDOS TRATADOS CON PERGONAL.**

SUBPOBLACIONES CELULARES DEL OVARIO



GRAFICA 2. CONTEO CELULAR DE LAS SUBPOBLACIONES CELULARES DE LOS OVARIOS DE POLLOS RECIENTE NACIDOS TRATADOS CON 25 µg DE PERGONAL. NIVEL DE SIGNIFICANCIA: * = p < 0.05



GRAFICA 3. CONTEO CELULAR DE LAS SUBPOBLACIONES CELULARES DE LOS OVARIOS DE POLLOS RECIEN NACIDOS TRATADOS CON 1µg DE PERGONAL.

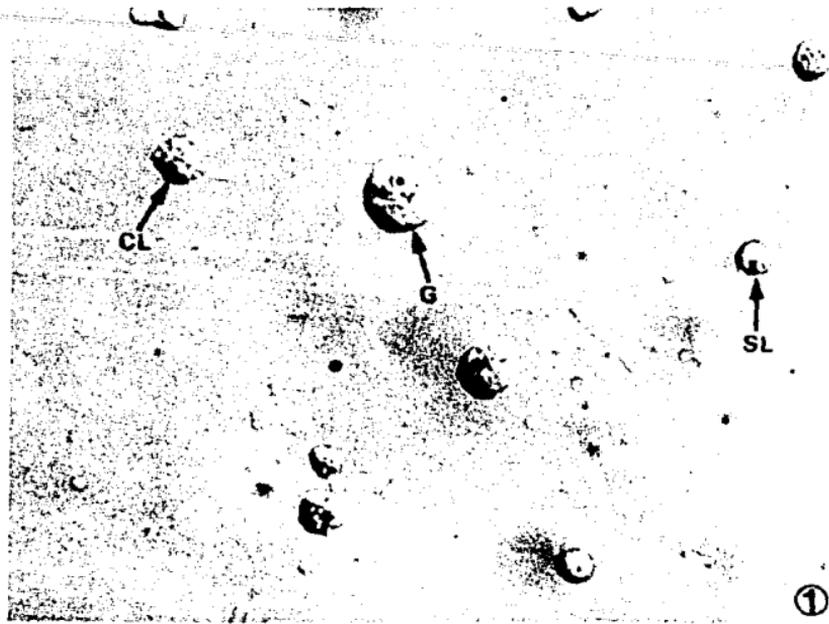


Fig.1. Fotomicrografía que muestra las tres subpoblaciones celulares del ovario después de la disgregación enzimática; observándose las células germinales (G) y las células somáticas, dentro de estas últimas tenemos a las células somáticas con inclusiones de lípidos (CL) y a las células somáticas sin inclusiones de lípidos (SL). Las células somáticas tienen un diámetro aproximado de $20\mu\text{m}$, son de forma irregular. Algunas de estas células presentan en su citoplasma inclusiones de lípidos, mientras que otras no. Las células germinales (G) son de forma regular, con un diámetro de $30\mu\text{m}$ o más y con un núcleo excéntrico.

D I S C U S S I O N

DISCUSION

Los resultados obtenidos en este trabajo, demuestran que el ovario de los embriones de pollo son capaces de responder a un tratamiento de gonadotropinas; dando como resultado un aumento en el número de células somáticas de los animales tratados con 25µg de Pergonal, a diferencia de los animales tratados con 1µg de Pergonal, que no presentan aumento en el número de células somáticas. Estos resultados pueden deberse a que la dosis de 25µg de Pergonal, es una dosis hiperfisiológica que produce un aumento en la esteroidogénesis de la gónada, principalmente en la producción de estrógenos.

En trabajos anteriores, se encontró que las gónadas de embriones de pollo de 20 días de incubación, responden al tratamiento de gonadotropinas (FSH y LH) con un aumento en el peso del testículo, en el diámetro de los cordones seminíferos, en el número de células de Sertoli, en el peso del ovario, en el volumen de la corteza y en el número de ovocitos; cuando son inyectados al 15^{avo} día de incubación (51) y al 8^{avo} día (52). Otra información (53) reveló que la FSH promueve el desarrollo testicular en embriones de pollo de 13 días, cuando éstos son inyectados a partir del 10^o día de incubación; causando un aumento en el diámetro de los cordones seminíferos y en el número de células germinales, lo cual es interesante, si se toma en cuenta que esta respuesta temprana (10 días de incubación) se da en la etapa en que la gónada es aun autónoma y por ello, la síntesis y secreción de hormonas esteroideas por el ovario es independiente de la regulación por parte de las gonadotropinas de la adenohipófisis (54). Con esto último, se llegó a suponer que los receptores a la FSH en los

testículos embrionarios, quizá inicien su desarrollo antes de que se establezca el Eje Hipotálamo-Adenohipófisis-Ovario (día 13.5 de desarrollo embrionario) y que la administración crónica de FSH activa en este periodo temprano, los receptores hormonales en el testículo (53).

Se ha observado en otros estudios, que la gonadotropina coriónica humana (hCG) administrada a los 13, 15 y 17 días (1.0 IU/embrión) del desarrollo embrionario, provoca en los ovarios de pollos recién nacidos, un aumento en el volumen de los cordones de células intersticiales, en el desarrollo del sistema lacunar y en los capilares sanguíneos; una disminución en el número de células germinales en el estroma de la médula del ovario y modificaciones en las células poco diferenciadas cercanas a las células intersticiales; éstas últimas presentan inclusiones de lípidos en su citoplasma, mismas que se hacen más evidentes después del tratamiento con hCG, por lo que se ha propuesto una posible transformación de estas células en células intersticiales maduras (55).

Estudios ultraestructurales sobre la médula del ovario de pollos recién nacidos tratados con hCG, muestran que las células esteroidogénicas se hacen más aparentes con un aumento en la cantidad de citoplasma y en el área mitocondrial; las células poco diferenciadas presentan señales de estimulación, lo que sugiere su transformación a células esteroidogénicas; y además se da un aumento en el número de mitocondrias y de retículo endoplásmico rugoso de las células epiteliales del sistema lacunar (56).

Otros experimentos muestran que para el día 7.5 de desarrollo embrionario, las gónadas tanto de hembras como de machos de embriones

de pollo, responden a la administración de hCG, elevando las concentraciones de estradiol (E₂) en plasma, respuesta que continúa en los días 8.5 y 9.5 de desarrollo embrionario (54). El cultivo de gonadas fragmentadas de embriones de pollo de 18 días en un medio sintético con hCG, contribuye a la esteroidogénesis de las células gonadales, lo cual ha permitido cuantificar por medio de estudios radioinmunológicos (57), (58), la producción de hormonas esteroides. En los ovarios la estimulación por hCG da como resultado un aumento en la producción de estradiol, mientras que los testículos, responden con un aumento en la producción de testosterona.

Por medio de técnicas radioinmunológicas (RIA), se conoce que las gonadotropinas inician su control sobre la síntesis y secreción de esteroides del ovario de pollo a partir del día 13.5, ya que los niveles de 17 β -estradiol permanecen constantes en el ovario izquierdo en los días 6.5 a los 12.5 de incubación, para luego aumentar marcadamente a partir del día 13.5 hasta el 18.5 (49). Este hecho refuerza la idea de que el Eje hipotálamo-adenohipófisis-ovario es funcionalmente maduro a partir del día 13.5 de embriogénesis.

Durante la embriogénesis y los primeros días del periodo postnatal, las gónadas son muy sensibles a la influencia de factores exógenos, en particular a las hormonas; por lo que con los estudios mencionados se ha sugerido que los receptores hormonales, pasan por un desarrollo de maduración, es decir, que estos comienzan su función con una baja capacidad de unión hormona-receptor en el estado embrionario y, alcanzan su madurez postnatalmente (semanas). Por otro lado, tenemos que la diferenciación sexual de la gónada comienza cerca del día 6.5 de embriogénesis y que el eje hipotálamo-adenohipófisis-ovario, es

funcional a partir del día 13.5 de incubación en adelante; esta maduración funcional del eje parece seguir tres pasos :

- a) Estado 1 : es el tiempo en que el ovario es autónomo y la síntesis y secreción de hormonas esteroides es funcionalmente independiente de la regulación hipotálamo-adenohipófisis (día 0 al 13).
- b) Estado 2 : se establece el eje adenohipófisis-ovario, en el cual el desarrollo de la gónada se hace dependiente de las gonadotropinas (día 13.5).
- c) Estado 3 : se establece el eje hipotálamo-adenohipófisis-ovario, que involucra una dependencia funcional de estos órganos, así como también, una interdependencia entre los componentes hipotalámicos y adenohipófisis-ovario (día 13.5), (54).

Con base en estas referencias en el presente trabajo las dosis de gonadotropinas (FSH y LH) administradas fueron a los 13, 15 y 17 días de incubación, momento en el que se tiene con toda seguridad a la gónada diferenciada en ovario o testículo, donde los receptores de la gónada son capaces de responder al estímulo exógeno de las gonadotropinas debido a su grado de madurez y donde el eje hipotálamo-adenohipófisis-ovario se ha establecido para ejercer su regulación gonadotrópica sobre el ovario e inducir la secreción de las hormonas esteroides, las cuales actúan a su vez sobre las gonadotropinas, dando como resultado una regulación exacta entre los tres órganos : hipotálamo, adenohipófisis y ovario.

El tiempo de incubación (10° día) en el que se hizo la abertura triangular es seleccionado con base en que en esta etapa de desarrollo el embrión no sufre tantos daños debido a su grado de desarrollo (tamaño) y de vascularización; y para el día 13 de incubación, la

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

mortalidad es mínima. Las gonadotropinas se colocan sobre la membrana corioalantoidea del embrión que está ampliamente vascularizada y por medio de ésta, las hormonas gonadotrópicas entran al embrión de pollo y provocan sus efectos sobre las gónadas.

El trabajo con embriones de pollo nos facilita la información obtenida en esta tesis en particular, debido a su fácil manipulación y bajo costo y a que se encuentran en un ambiente cerrado e independiente.

Por último, en el Departamento de Embriología de la Facultad de Medicina, se ha venido desarrollando una línea de investigación sobre los cambios producidos en las gónadas de embriones de pollo que son sometidos a gonadotropinas, con el objeto de conocer la fisiología reproductora del ave, y de corroborar, reforzar y ampliar la información contenida en trabajos de otros investigadores. De tal manera que el Pergonal (FSH/LH) es empleado en este trabajo para conocer los efectos que provoca en los ovarios de pollos recién nacidos y poder compararlos con los de otras investigaciones.

C O N C L U S I O N E S

CONCLUSIONES

Se puede concluir que las gonadotropinas producen cambios en el ovario del embrión de pollo, provocando un aumento celular en las subpoblaciones celulares de los ovarios de pollos recién nacidos tratados a los 13, 15 y 17 días, con la dosis de 25µg de Pergonal, mientras que en los ovarios tratados con la dosis de 1µg de Pergonal, este aumento celular no se presenta. El aumento es debido a una hiperplasia celular, donde la diferencia en el número total de células del grupo experimental tratado con 25µg de Pergonal, está dado básicamente por el aumento en el número de las células somáticas (células con inclusiones de lípidos y células sin inclusiones de lípidos), y no por el aumento en el número de células germinales, ya que éste no se presenta. Podemos suponer entonces que, las gonadotropinas actúan a nivel de receptores de las células somáticas, mismos que sufren una maduración antes del día 13.5 de desarrollo embrionario, momento en que se inicia el funcionamiento del eje hipotálamo-adenohipófisis-ovario.

B I B L I O G R A F I A

BIBLIOGRAFIA

- 1) Bell-Freeman. (1971)a. The pituitary gland. En: "Physiology and biochemistry of the domestic fowl". Vol 1. Academic Press. Nueva York. 427-453.
- 2) Bargmann, W., Hild, W., Ortman, R. y Schiebler, T. H. (1950). The morphology of the neurosecretory relationship between hypothalamus and neurohypophysis. Acta Anat. (Basel). 3, 264-280.
- 3) Sturkie, P. D. (1976)a. Physiology of nervous system of birds. En: "Avian physiology". Springer. Nueva York. 746-751.
- 4) Wingstrand, K. G. (1951). The structure and development of the avian pituitary. Gleerup, Lund.
- 5) Rogers, F. T. (1919). Regulation of body temperature in the pigeon and its relation to certain cerebral lesions. Am. J. Physiol. 49:271.
- 6) Harris, G. W. (1955). Neural control of pituitary gland. Physiological society monograph. No.3. Arnold, London.
- 7) Schally, A. V., Arimura, A., Kastin, A.J., Matsuo, H., Baba, Y., Redding, T.W., Nair, R.M.G., Debeljuk, L. y White, W.F. (1971). Purification of hypothalamic releasing hormones. Science. Nueva York. 173, 1036-1038.
- 8) Matsuo, H., Baba, Y., Nair, R.N.G., Arimura, A. y Schally, A.V. (1971). Structure of the LH and FSH-releasing hormone. The proposed amino acid sequence. Biochem. Biophys. Res. Comm. 43, 1334-1339.
- 9) Farner-King. (1973)b. Neuroendocrinology in birds. En: "Avian biology". Academic Press. Nueva York. 287-336.
- 10) Hartree, A.S. y Cunningham, F.L. (1969). Purification of chicken pituitary follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone. J. Endocrinology. 43, 606-616.
- 11) Jackson, G.L. (1971). Avian luteinizing hormone-releasing factor. Endocrinology. 89, 1454-1463.
- 12) King, J.A. y Millar, R.P. (1982). Program of the 64th. annual meeting of the endocrine society.
- 13) Bell-Freeman. (1984)b. The pituitary gland. En: "Physiology and biochemistry of the domestic fowl". Vol 5. Academic Press. Nueva York. 40-73.

- 14) Farner-King. (1973)a. The adenohypophysis. En: "Avian biology". Academic Press. Nueva York. 110-170.
- 15) Guedenet, J.C., Grignon, G. y Franco, N. (1970). Etude eritique de la mise en evidence des cellules a grains glycoprotidiques de l'adenohypophyse chez le poulet au cours de la vie embryonnaire et de la periode postnatale. Electron. Microsc. Prog. Int. Congr. 111,565.
- 16) Amin, S.O. y Gilbert, A.B. (1970). Innervation of the ovary of the domestic hen. Br. Poult. Sci. 11, 451-458.
- 17) Duncan, D. (1956). An electron microscope study of the neurohypophysis of a bird, Gallus domesticus. Anat. Rec. 125, 457-471.
- 18) Green, J.D. (1951). The comparative anatomy of the hypophysis with a special reference to its blood supply and innervation. Amer. J. Anat. 88, 225-311.
- 19) Licht, P., Papkoff, H., Farmer, S.W., Muller, C.H., Tsui, H.W. y Crews, D. (1977). Immunochemical studies on the pituitary gonadotropins. Recent. Prog. Horm. Res. 33, 169-243.
- 20) Burke, W.H., Licht, P., Papkoff, H. y Gallo, A.B. (1979). The chemistry of the gonadotropins. Gen. Comp. Endocr. 37, 501-520.
- 21) Harold, E.C. (1983). Mechanisms of hormone action. En: "Endocrinology". John Wiley and Sons. Nueva York. 1-18.
- 22) Malacara, J.M. (1990). Generalidades de endocrinologia. En: "Fundamentos de endocrinologia". Salvat. México. 1-17.
- 23) Flores, F.L. (1990). Mecanismos de acción hormonal. En: "Endocrinologia". Méndez-Cervantes. México. 1-32.
- 24) Ishii, S. y Yamamoto, K. (1976). Demonstration of the follicle stimulating hormone (FSH) activity in hypophyseal extracts of various vertebrates by the response of the Sertoli cells of the chick. Gen. Comp. Endocr. 29, 506-510.
- 25) Conell, C.J. (1972). En: "Physiology and biochemistry of the domestic fowl". (Bell-Freeman eds.). Vol. 5. Academic Press. Nueva York. 40-73.
- 26) Huang, E.S.R., Kao, K.J. y Nalbandov, A.V. (1979). Synthesis of sex steroids by cellular components of chicken follicles. Biol. Reprod. 20, 454-461.
- 27) Scanes, C.G. y Fagioli, J.H. (1980). Effects of mammalian and avian gonadotropins on in vitro progesterone production by avian ovarian granulosa cells. Gen. Comp. Endocr. 41, 1-17.
- 28) Hammond, R.W., Todd, T. y Hertelendy, F. (1980). Effects of mammalian gonadotropins on progesterone release and cyclic nucleotide production by isolated avian granulosa cells. Gen. Comp. Endocr. 41, 467-476.

- 29) Imai, K. (1973). En: "Physiology and biochemistry of the domestic fowl". (Bell-Freeman eds.). Vol. 5. Academic Press. Nueva York. 40-73.
- 30) Aiyer, M.S. y Fin, F.G. (1974). En: "Physiology and biochemistry of the domestic fowl". (Bell-Freeman eds.). Vol. 5. Academic Press. Nueva York. 40-73.
- 31) Reeves, R.R., Arimura, A. y Schally, A.V. (1971). Pituitary responsiveness to purified luteinizing hormone-releasing hormone (LH-RH) at various stages of the estrous cycle. Biol. Reprod. 4, 88-92.
- 32) Bonney, R.C. y Cunningham, F.J. (1977). A role for AMPc as mediator of the action of LH-RH on chicken anterior pituitary cells. Morph. Cell. Endocr. 7, 233-254.
- 33) Sharp, P.J. y Follet, B.K. (1970). En: "Aspects of neuroendocrinology". (W. Bargman and B. Scharrer, eds.). Springer. Berlin. 95-103.
- 34) Bell-Freeman. (1971)d. The endocrine ovary in reproduction. En: "Physiology and biochemistry of the domestic fowl". Vol.3. Academic Press. Nueva York. 1449-1464.
- 35) Gilbert, A.B. (1969). An observation bearing on the ovarian-oviduct relationship in the domestic hen. Q. Jl. Exp. Physiol. 54, 404-411.
- 36) Bell-Freeman. (1971)c. The ovary. En: "Physiology and biochemistry of the domestic fowl". Vol.3. Academic Press. Nueva York. 1163-1202.
- 37) Romanoff, A.L. (1960). "The avian embryo". Mc. Millan. Nueva York.
- 38) Bradley, O.C. (1960). "Structure of the fowl". 4 th. Ed. Revised by T. Grahame Oliver and Boyd; Edinburgh.
- 39) Jordanov, J., Angelova, P., Boyadzieva-Michailova, A. y Bakalska, M. (1978). Ultrastructure of developing interstitial cells in chick embryonic gonad in relation to their genesis and steroidogenic function. Z. Mikrosk. Anat. Forsch. 92, 449-464.
- 40) Callebeaut, M. (1979). The avian ovary is an open organ. Anat. Embryol. 158, 103-119.
- 41) Scheib, D. y Haffen, K. (1969). Apparition et localisation des hydroxystéroïde déshydrogénases dans les gonades de l'embryon et du poussin de la caille: étude histoenzymologique et comparaisons avec le poulet. Gen. Comp. Endocrinol. 12, 566-597.
- 42) Flores, F.L. (1990). Ovario. En: "Endocrinología". Méndez-Cervantes. México. 359-381.

- 43) Stahl, A. y Carlon, N. (1973). Morphogenese des cordons sexuels et signification de la gonade chez l'embryon de poulet. Acta Anat. (Basel). 85, 248-274.
- 44) Pedernera, E., Gomez, V., Velázquez, P., Juárez-Dropeza, M.A. y González del Pliego, M. (1988). Identification of steroidogenic cell subpopulations in the ovary of the newly hatched chicken. Gen. Comp. Endocrinol. 71, 153-162.
- 45) Guichard, A., Cedard, L. y Haffen, K. (1973). Aspect comparatif de la synthèse de stéroïdes sexuels du développement. Gen. Comp. Endocrinol. 20, 16-28.
- 46) Woods, J.E., Simpson, R.M. y More, P.L. (1975). Plasma testosterone levels in the chick embryo. Gen. Comp. Endocrinol. 27, 543-547.
- 47) Guichard, A., Cedard, L., Mignot, T.M., Scheib, D. y Haffen, K. (1971). Radioimmunoassay of steroids produced by cultures chick embryonic gonads: differences according to age, sex and side. Gen. Comp. Endocrinol. 32, 255-265.
- 48) Woods, J.E. y Erton, L.H. (1978). The synthesis of estrogens in the gonads of the chick embryo. Gen. Comp. Endocrinol. 36, 360-370.
- 49) Bell-Freeman. (1984)e. Steroid hormone production by the ovary. En: "Physiology and biochemistry of the domestic fowl". Vol.3. Academic Press. Nueva York. 323-341.
- 50) Sturkie, P.D. (1976)b. Gonadal hormones. En: "Avian physiology". Springer. Nueva York. 568-585.
- 51) Csaba, G., Shahin, M.A. y Dobozy, D. (1980). The overlapping effect of gonadotropins and TSH on embryonic chicken gonads. Arch. Anat. Hist. Embr. Norm. et Exp. 63, 31-38.
- 52) Shahin, M.A., Csaba, G. y Dobozy, D. (1981). Effects of mammalian hypophyseal hormones: gonadotropins, thyrotropins and adrenocorticotropin, on the embryonic development of 8-days chick embryo gonads. Arch. Anat. Hist. Embr. Norm. et Exp. 64, 111-117.
- 53) Shahin, M.A., Dobozy, D. y Csaba, G. (1985). The overlapping effect of TSH and FSH on the embryonic chicken gonads at the mid incubation period. Z. Mikrosk. Anat. Forsch. Leipzig. 1, S. 169-175.
- 54) Woods, J.E., Mennella, J.A. y Thommes, R.C. (1981). The hypothalamic-adenohypophyseal-gonadal axes in the developing chick embryo. Gen. Comp. Endocrinol. 45, 66-73.
- 55) González-Moran, G., González del Pliego, M. y Pedernera, E. (1985). Morphological changes in the ovary of newly hatched chickens treated with chorionic gonadotropin during embryonic development. Gen. Comp. Endocrinol. 59, 162-167.

56) González del Pliego, M., González-Morán, G. y Pedernera, E. (1988). Ultrastructure of the ovarian medulla in the newly hatched chick treated with human chorionic gonadotropin. *Cell Tissue Res.* 253, 665-670.

57) Guichard, A., Haffen, K., Cédard, L., Mignot, T.M. y Scheib, D. (1979). Effects of hCG and of season on in vitro steroidogenesis by 18-day chick embryo gonads. *Ann. Biol. Anim. Bioch. Biophys.* 19 (4B), 1317-1325.

58) Teng, T.C., Teng, C., Bousfield, G.R., Liu, W. y Ward, D.N. (1982). Differential response of growing and regressing chicken ovaries to gonadotropic hormones. *Gen. Comp. Endocrinol.* 48, 325-332.