



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

EFFECTO DE LA PROGESTERONA EN EL DESARROLLO
DEL OVARIO DE EMBRIONES DE POLLO

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I O L O G O

P R E S E N T A :

ANA HILDA FIGUEROA GUTIERREZ

México, D. F.

1992

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



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.

INDICE

RESUMEN.....	1
INTRODUCCION.....	2
OBJETIVO.....	13
HIPOTESIS.....	14
MATERIAL Y METODOS.....	15
RESULTADOS.....	19
DISCUSION.....	32
CONCLUSIONES.....	36
BIBLIOGRAFIA.....	37
APENDICE.....	41

RESUMEN

La progesterona suele ser administrada en dosis altas cuando se presenta peligro de aborto en el humano. En el ovario fetal puede ser utilizada como intermediario en la síntesis de diversas hormonas esteroides. Algunos autores le atribuyen a esta hormona un efecto antiestrogénico y también se le asigna una acción masculinizante en los embriones femeninos. El objetivo de este trabajo fue estudiar el efecto de la progesterona sobre la diferenciación celular del ovario en el embrión de pollo.

Se aplicó una dosis única de progesterona de 800 ng/embrión en la cámara de aire, a los 2, 3, 4, 5 y 9 días de desarrollo embrionario. Los embriones fueron sacrificados a los 17 días de incubación. Se diseccionó en las hembras el ovario izquierdo y se sometió a disgregación celular con tripsina. Se realizó el conteo de las células ováricas clasificadas en tres tipos: somáticas sin inclusiones de lípidos, somáticas con inclusiones de lípidos y germinales.

En los embriones tratados el día 2 de incubación no se observó diferencia en el número de células con respecto a los testigos. En los ovarios de los embriones inyectados a los días 3 y 4 se dio un incremento celular, comparándolos con los testigos. El mayor efecto se obtuvo en los tratados a los 5 días de desarrollo, especialmente en las células somáticas sin inclusiones de lípidos. El tratamiento al día 9 mostró un incremento menor en la cantidad celular. El análisis de varianza indicó una diferencia significativa con $P < 0.05$ al comparar el número de células somáticas sin inclusiones de lípidos, entre los grupos tratados y los testigos, analizando los datos en forma global. Se presentó una mayor proporción de machos en el lote inyectado al día 5 de incubación, que no mostró significancia mediante una prueba de χ^2 cuadrada.

Concluimos que en este trabajo la progesterona no mostró efecto antiestrogénico pues no inhibió la proliferación celular ovárica inducida por estrógenos; más bien tuvo una acción análoga con estas hormonas. Los datos indican que el efecto sobre la proliferación celular se fue haciendo mayor con respecto al tiempo de incubación en que se aplicó la inyección, entre los días 2 y 5, siendo este último el de mayor efecto del tratamiento. La progesterona pudo haber sido metabolizada a estrógenos en las células del ovario, siendo estas hormonas las que ejercieron su efecto. De los tres tipos celulares las células sin inclusiones de lípidos mostraron más sensibilidad al tratamiento.

INTRODUCCION

DESARROLLO EMBRIONARIO DE LAS GONADAS

Las gónadas son los órganos reproductores en los cuales se lleva a cabo la formación de los gametos. El ovario produce los óvulos en la hembra y el testículo espermatozoides en el macho, y además secretan hormonas sexuales.

Durante las primeras etapas del desarrollo embrionario la formación de las gónadas es muy semejante en ambos sexos. En los vertebrados se desarrollan a partir del mesodermo como un engrosamiento del epitelio celómico, constituyendo las crestas genitales. Posteriormente el peritoneo se constriñe quedando la futura gónada suspendida de éste. Están estrechamente relacionadas topográficamente con el esbozo del mesonefros, siendo ambos completamente independientes en las primeras fases del desarrollo (Ruíz, 1988). El epitelio de las crestas genitales está constituido por dos tipos celulares: el primero lo forman las células germinales primordiales (CGP) que darán origen a las futuras células sexuales, siendo éstas grandes, con núcleos prominentes y vesiculares, el citoplasma tiene propiedades particulares de tinción debido a su gran contenido de fosfatasa alcalina (Dollander, 1986); el segundo, es el más abundante, son de origen mesodérmico y se diferenciarán en las células somáticas de la gónada adulta: las células de Sertoli en los testículos y células foliculares en los ovarios; se ha sugerido un origen mesonefrico para éstas, aunque también se propone que las células del epitelio celómico

intervienen en su formación (Balinsky, 1978).

Witschi (1967) propuso que el origen de las células germinales primordiales en humanos y en aves es endodérmico, a partir del saco vitelino o bien de las células del tronco primitivo.

En mamíferos en general las CGP se identifican en la porción caudal de la línea primitiva, mesodermo de la alantoides y endodermo del saco vitelino. En el humano se ha sugerido como único origen de estas células al endodermo de la alantoides (Kofman-Alfaro et al, 1982). Estas células migran desde la alantoides a través del mesodermo del intestino posterior pasando por el mesenterio dorsal hasta las crestas genitales. Al parecer las células somáticas que se encuentran en la zona de la futura cresta genital, emiten señales específicas (agentes quimiotácticos) que atraen y retienen a las células germinales primordiales (Ruíz-Durá, 1988). En los mamíferos el desplazamiento se hace por emisión de pseudópodos (movimientos tipo amiboideo), y por los movimientos propios de las células intestinales durante la morfogénesis, mientras que en las aves el desplazamiento de las CGP es por medio de la circulación sistémica (Ruíz-Durá, 1988). Las CGP aumentan cuantitativamente por mitosis durante su migración desde la alantoides hasta la cresta genital. En el humano la formación de las crestas genitales se inicia alrededor del día 32 de desarrollo embrionario.

DIFERENCIACION DE LAS GONADAS

La diferenciación gonadal a testículo se inicia en etapas tempranas del desarrollo, (día 40 de gestación en el humano). El epitelio interno de la cresta genital que contiene a las CGP, forma cordones sexuales que invaden la región medular de la cresta; este epitelio germinativo se multiplica activamente al tiempo que el mesénquima rodea a los cordones sexuales junto con numerosos vasos sanguíneos que provienen de la región mesonéfrica. La región cortical se hace fibrosa y origina la túnica albugínea que rodea por completo a la gónada. Después, los cordones sexuales se fragmentan formando cordones seminíferos que contienen a las espermatogonias. Entre los cordones sexuales se forma el tejido intersticial constituido por células de Leydig, secretoras de testosterona. Se establecen conexiones entre los túbulos mesonéfricos y las gónadas formándose la rete testis.

La diferenciación del ovario es más tardía que la del testículo y su crecimiento más lento, su volumen aumenta básicamente por proliferación de las células germinales primordiales y del epitelio calóxico. El ovario está constituido por las CGP rodeadas de células somáticas y estroma que se diferenciará en tejido conectivo, vasos sanguíneos y tejido intersticial esteroideogénico (futuras células de la teca interna y de la glándula intersticial). En la cresta genital se van a organizar los cordones sexuales que se encuentran conectados al epitelio superficial; en el caso de las hembras los cordones sexuales son de gran importancia en el proceso de la foliculogénesis. La formación de estos cordones es

aproximadamente el día 35 de gestación en humano. Las CGP inician luego la profase de la primera división meiótica, en el humano, alrededor de la semana 18 de desarrollo embrionario. Durante la diferenciación ovárica los folículos se forman a partir de la fragmentación de los cordones epiteliales; cada ovocito queda finalmente rodeado por una capa de células epiteliales y delimitado por una lámina basal, a éstos se les llama folículos primordiales. En la etapa adulta, cuando ya se han formado las tecas interna y externa alrededor de la lámina basal de las células foliculares, se les conoce como folículos secundarios y terciarios.

El folículo es la unidad funcional del ovario adulto en los vertebrados. Cada folículo proporciona al ovocito el soporte y los nutrientes necesarios para alcanzar su madurez hasta el momento de la fecundación. Las células somáticas del folículo (células de la capa granulosa) contribuyen de manera importante en este proceso pues su función principal es proveerlo de los requerimientos nutritivos necesarios para su crecimiento; para ello, estas células están provistas de prolongaciones canaliculares para la transferencia de sustancias nutritivas. Es probable que también les proporcionen el estímulo que inicia su crecimiento (Gore-Langton, 1988); además controlan la maduración del núcleo y citoplasma del ovocito seleccionado para la ovulación, este proceso se lleva a cabo mediante cambios en el microambiente del folículo, ocasionados por las sustancias que secretan al fluido folicular que baña al ovocito. La granulosa tiene un

papel fagocitario después de la expulsión del óvulo o si éste se hace atrésico, eliminando el vitelo, coágulos sanguíneos y otras sustancias de desecho. Puede desarrollar también funciones de glándula endocrina (Hoar, 1978). Las células de la granulosa son la fuente principal de secreción de 17 β -estradiol (Martín et al, 1986).

El estroma del ovario que rodea la capa granulosa se organiza en capas de tejido conectivo formando la teca, cuya región interna se transforma en una capa glandular y vascular que sintetiza hormonas esteroideas (Hoar, 1978). Las células tecales son la fuente principal de 17 α -hidroxiprogesterona, y de androstenediona, el principal andrógeno producido por el ovario (Martín et al, 1986).

En mamíferos, después de la ovulación hay una proliferación de las células de la granulosa y de la teca interna que van a constituir el cuerpo lúteo, que segrega fundamentalmente progesterona.

En las aves sólo el ovario izquierdo se desarrolla por completo al entrar las CGP a la cresta genital izquierda; la gónada derecha permanece en estado indiferenciado conteniendo cordones sexuales primarios. Las CGP de la gónada derecha degeneran.

BIOQUIMICA DE LAS HORMONAS OVARICAS

El colesterol es el precursor de todas las hormonas esteroideas. El ciclopentanoperhidrofenantreno constituye la estructura común de todas las hormonas esteroideas; consta de 17

carbonos que se encuentran formando cuatro anillos a los que se les designa de la A a la D. Pueden contener carbonos adicionales que se encuentran unidos a las posiciones 10 y 13 o bien constituir una cadena lateral a partir del carbono 17 (C17). Las hormonas esteroides difieren de sus precursores y metabolitos en el número y ubicación de las dobles ligaduras y en su estereoquímica. El estereoisomerismo de las moléculas está dado por los carbonos asimétricos. Los metilos angulares que se unen a los carbonos 19 y 18 (C19 y C18) en las posiciones 10 y 13 respectivamente se utilizan como punto de referencia pues se proyectan hacia el frente del plano; en este caso se dice que están orientados en beta (β), mientras que si se localizan por detrás del plano se dice que se orientan en alfa (α). En el carbono 5 (C5) se localiza un átomo de hidrógeno que, si se orienta en β , la molécula tiene una conformación cis (como sucede en todas las hormonas esteroides naturales), y en caso de que se oriente en α , la molécula tendrá una conformación trans.

Los esteroides se clasifican en base a su función biológica principalmente en tres grupos: progestinas con 21 átomos de carbono, andrógenos con 19 carbonos y estrógenos con 18 carbonos. Los estrógenos se forman por aromatización de los andrógenos. Dentro de estas hormonas las más importantes son estrona y 17 β -estradiol; este último es el más activo de los esteroides producidos en el ovario, su función principal es inducir la receptividad sexual (estro) en hembras de mamíferos además de otras funciones importantes en la fisiología reproductiva (Gore-Langton, 1988).

En el ovario también se producen andrógenos, en la teca interna, principalmente androstenediona y testosterona que son precursores en la biosíntesis de estrógenos (estrona y 17 β -estradiol).

Dentro de las progestinas la pregnenolona es la hormona más importante producida en el folículo. Es un precursor de todas las hormonas esteroides. La progesterona es la más abundante de las progestinas, es producida como un intermediario biosintético por el folículo en todos los estados de desarrollo y como un producto final en los periodos periovulatorio y postovulatorio (Gore-Langton, 1988). Por ser un intermediario en la biosíntesis de los corticosteroides adrenales, de la testosterona y del 17 β -estradiol, está presente en el córtex adrenal, la placenta y el ovario así como en el cuerpo lúteo (glándula transitoria de secreción) (Bhagavan, 1974).

FUNCIONES DE LA PROGESTERONA

Tracto Reproductivo

Las principales células blanco de la progesterona son las del revestimiento mucoso del tracto genital, pero es necesario que estas células previamente se hayan expuesto a estradiol, el cual induce la formación de receptores a progesterona, para que ésta pueda ejercer sus efectos (Niswender et al, 1988).

Los estrógenos actúan sobre el epitelio del oviducto induciendo la ciliogénesis y promoviendo el crecimiento y proliferación de las células. Las células ciliadas después de la ovulación parecen dirigir al óvulo en su descenso hacia la

ampolla. Bajo la influencia de estrógeno el cérvix secreta un mucus rico en glucoproteínas alineadas en filamentos, que facilitan el paso del esperma a través del canal cervical. La consistencia del mucus cervical cambia y se vuelve altamente viscoso por la acción de la progesterona (Niswender et al, 1988).

Tanto estrógenos como progesterona regulan las contracciones del oviducto que intervienen en el transporte del óvulo al útero. Estas contracciones sólo ocurren cuando el útero está apto para recibir al óvulo.

La progesterona induce en el epitelio del oviducto la secreción de un fluido que mantiene el desarrollo del óvulo a una edad muy temprana. También parece inducir la regresión del epitelio vaginal, caracterizado por un desprendimiento del endometrio.

Dentro de las funciones más significativas de la progesterona está preparar al útero para la preñez; en muchas especies también actúa sobre las células del miometrio bloqueando las contracciones organizadas. Durante los ciclos no fértiles el endometrio sufre deterioro al bajar los niveles de progesterona en sangre, a medida que el cuerpo lúteo cesa su función; este cambio se observa más claramente en primates, en los que el revestimiento del útero se desprende y resulta en menstruación (Niswender et al, 1988).

Glándula Mamaria

Las glándulas mamarias presentan receptores para progesterona pero se sabe poco acerca de su papel en el crecimiento de éstas

(lactogénesis). Sin embargo se ha demostrado que la progesterona junto con las hormonas de la pituitaria anterior actúan promoviendo el desarrollo lóbulosalveolar de las glándulas mamarias, que previamente han sido expuestas a estrógeno; cuando hay una secreción sostenida de progesterona, como sucede durante la preñez, hay un desarrollo considerable del sistema lóbulosalveolar mientras que en ausencia de esa secreción parece no haber efectos de esa hormona sobre la glándula mamaria (Niswender et al, 1988).

Hipotálamo y Glándula Pituitaria Anterior

Parece haber una influencia directa de la progesterona en el pulso generador de hormona liberadora de gonadotropina (GnRH) en el hipotálamo. La secreción de hormona foliculo estimulante se altera poco con la progesterona. En primates, el cuerpo lúteo también secreta estradiol y las concentraciones basales de esta gonadotropina permanecen suprimidas durante la fase lútea y no se incrementan hasta después de la involución del cuerpo lúteo (Niswender et al, 1988).

Un efecto importante de la progesterona en el sistema nervioso central es inducir la receptividad sexual de la hembra en muchas especies de mamíferos y aves; provoca una respuesta a ciertos estímulos ambientales que se refleja en su actitud positiva hacia el apareamiento.

Antagonismo a Estrógenos

Los niveles sanguíneos de estrógenos fluctúan de acuerdo al

estado del ciclo reproductivo de la hembra y van acompañados de cambios en el porcentaje de unión estrógeno-receptor, que se reflejan en el efecto fisiológico que tienen estas hormonas. Además del estrógeno mismo, otras hormonas alteran su acción a nivel celular y modifican las funciones dirigidas por éste (Clark and Markaverich, 1988).

Los progestágenos y aún los mismos estrógenos (en dosis altas) han sido descritos como antiestrógenos; algunos muestran efecto débil y otros fuerte cuando se aplican localmente al tejido sensible (Goodman, 1986).

Está ampliamente demostrado que la progesterona reduce la capacidad del estrógeno de inducir crecimiento uterino, anula la cornificación y produce descamación del epitelio vaginal, por lo que se considera que tiene efecto antiestrogénico (Drill, 1978).

La disminución del efecto del estrógeno causado por la progesterona (antagonismo) a nivel celular en el útero, se da al competir ambas hormonas por el receptor citoplásmico a estrógeno, por eso, podría considerarse que no se trata de un efecto antagónico, sino de una modificación en el mecanismo de acción del estrógeno (Clark and Markaverich, 1988). Por efecto de la progesterona se observa un decremento en el número de complejos estrógeno-receptor tanto citoplásmicos como nucleares, por lo que disminuye la sensibilidad del útero al estradiol. Esto está relacionado con cambios en la morfología del epitelio del lúmen uterino (Clark and Markaverich, 1988). También inhibe la estimulación causada por estrógenos de los sitios de unión del complejo estrógeno-receptor en el núcleo.

Los efectos inhibitorios de esta hormona parecen estar mediados por el receptor a estradiol, pues la acción de éste es necesaria para observar el efecto inhibitorio de la progesterona.

Masculinización

Por los efectos de la progesterona en el mantenimiento del embarazo, se han usado progestágenos para contrarrestar la amenaza de aborto. Aunque los efectos secundarios de la administración de progestágenos en la madre son mínimos, esto no se aplica al feto (Goodman, 1986). Los agentes progestacionales administrados al principio del embarazo inducen anomalías congénitas (Mayers et al, 1980). En el feto por ejemplo, la administración de cantidades excesivas de progesterona produce en la hembra atrofia suprarrenal, atrofia de mamas e hipertrofia del clitoris, además de crecimiento excesivo de pelo y voz grave (Salter, 1953). También pueden causar malformaciones genitales en fetos masculinos (Goodman, 1986).

OBJETIVO

La progesterona es una hormona indispensable para el mantenimiento y el desarrollo del embrión durante su gestación; es común la administración de esta hormona durante el embarazo en caso de presentarse peligro de aborto, aumentando así su concentración; pero al estar presente en dosis elevadas, pueden haber efectos de esta hormona sobre el desarrollo del producto, por lo tanto, el objetivo principal de este trabajo es estudiar el efecto de la progesterona sobre la proliferación celular del ovario en el embrión de pollo.

HIPOTESIS

Durante el desarrollo embrionario los estrógenos estimulan la proliferación celular en la gónada; sin embargo, algunos autores han propuesto que la progesterona tiene un efecto antiestrogénico (Goodman, 1986; Drill, 1978). Por lo tanto, si se suministra progesterona exógena durante el desarrollo embrionario del pollo, en la etapa de proliferación celular de la gónada, entonces, ésta ejercerá un efecto antiestrogénico interfiriendo así en el desarrollo de la gónada, alterando la proliferación celular.

MATERIAL Y METODOS

Para este trabajo se tomó como modelo el embrión de pollo por ser un sistema cerrado en el que no intervienen los esteroides maternos durante el desarrollo embrionario, como ocurre en el caso de los mamíferos.

Se utilizaron huevos fértiles de pollo de la raza White Leghorn Babcock 300, procedentes de la granja de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia; se mantuvieron en una incubadora con circulación forzada de aire y humedad controlada a 37.8°C con 80 % de humedad relativa, en grupos de 120, distribuidos en lotes de 30 huevos cada uno.

Se probaron dos diferentes tratamientos con progesterona: por inmersión y por inyección, en condiciones estériles. El primero de ellos consistió en sumergir los huevos al día cero de desarrollo embrionario en solución de progesterona (Sigma Chemical Co.) a una concentración de 80 mg/ml en etanol/agua al 50 % V/V; los huevos se sumergieron por unos cuantos segundos y se dejaron secar antes de iniciar su incubación.

El otro tratamiento utilizado consistió en inyectar a los embriones en la cámara de aire. Para ello se hizo en ésta un orificio con la ayuda de una aguja de disección y se les inyectó con 100 μ l de una solución de progesterona con 800 ng/ml en etanol al 10 %. Después el orificio se selló con cinta adhesiva. Una vez así, se colocaron de manera vertical en charolas para continuar su incubación.

La inyección de progesterona en la cámara de aire se aplicó

como dosis única a embriones de 2, 3, 4 ó 5 días de incubación (etapa de diferenciación ovárica en el pollo) o de 9 días de desarrollo embrionario (etapa de proliferación de ovogonias).

Para el lote testigo, se inyectaron en la cámara de aire 100 ul de etanol al 10 %.

Durante la incubación se hizo ovoscopia para eliminar los huevos abortados y registrar la mortalidad.

OBTENCION DE GONADAS

Al día 17 de incubación se obtuvo el peso de los huevos y de los embriones para analizar más adelante una posible correlación entre estos parámetros; sólo se disecó el ovario izquierdo de las hembras que tuvieron un peso corporal igual o mayor de 14 gramos. Los embriones fueron sacrificados por decapitación; se disecaron para observación de las gónadas, se determinó el sexo con la ayuda de microscopio estereoscópico. Se eliminaron los embriones de menor peso así como los que presentaron malformaciones.

Los ovarios obtenidos por disección cuidadosa se colocaron en solución salina balanceada (SSB) libre de Ca^{2+} y Mg^{2+} (ver apéndice) separados por grupos experimentales. Los ovarios se trabajaron en pools de 3 ó 4 cada uno, distribuidos de forma homogénea en tamaño, para realizar el conteo celular.

DISGREGACION CELULAR

Los ovarios fueron colocados en frascos pequeños con tripsina (Grand Island Biological Co.) al 0.25 % en SSB libre

de Ca^{2+} y Mg^{2+} (ver apéndice) utilizando 1 ml de esta solución por ovario. Los viales se colocaron en baño de incubación con agitación de 30 ciclos/minuto a 37°C durante 15 a 20 minutos. Luego se disociaron las células mecánicamente con la ayuda de pipetas Pasteur siliconizadas y flameadas. Una vez disgregadas las células se agregaron 2 ml por ovario de inhibidor de tripsina (Grand Island Biological Co.) al 0.25 %, disuelto en medio Dulbecco + Albúmina 0.1 % (Grand Island Biological Co.). Los volúmenes fueron llevados todos a 4 ml por ovario con el medio de cultivo para ajustar las diluciones.

CONTEO CELULAR

El conteo celular se hizo por el método de dobles ciegos. Se resuspendieron las células con pipeta Pasteur inmediatamente antes de cargar la cámara cuentaglóbulos con una muestra de la suspensión celular. Se dejó reposar por unos minutos y se contó el número total de las células en microscopio Fotónico a 40X de aumento. Estas se clasificaron de acuerdo a su tipo en:

- Células somáticas con inclusiones de lípidos, son células de menos de 25 μm de diámetro con más de 5 gotas de lípidos en su citoplasma.
- Células somáticas sin inclusiones de lípidos, son células de menos de 20 μm de diámetro.
- Células germinales, son ovocitos primarios, de forma ovalada, con núcleo excéntrico y presentan el cuerpo de Balbiani en posición yuxtannuclear; se reconocen fácilmente por ser las de mayor tamaño.

ANALISIS ESTADISTICO

Los resultados se evaluarán por medio de análisis de varianza (ANOVA) y por la prueba "t" de Student. También se aplicarán pruebas de χ^2 cuadrada y de regresión lineal.

RESULTADOS

En anteriores trabajos se han registrado los pesos del huevo y del pollo recién nacido, estableciéndose una relación entre ambos parámetros; por tal motivo en este trabajo se tomaron los pesos del huevo y del embrión a los 17 días de incubación. Aplicando un análisis de regresión lineal a nuestros datos, no se encontró ninguna relación entre los dos parámetros (gráfica I). La regresión lineal tampoco tuvo significado analizando los resultados separados por sexo (controles o experimentales).

En la misma gráfica se observa un agrupamiento de datos aproximadamente a partir de los 14 gramos de peso del embrión, por lo que se estableció, a nuestro criterio, que se utilizarían para el estudio a los embriones hembra que tuvieran un peso corporal de 14 gramos o más, descartando también aquellos que presentarían malformaciones físicas externas.

Se esperaba una proporción similar para ambos sexos en los diferentes días de tratamiento; observando la incidencia para cada sexo en la tabla I, se observa que se presentaron proporciones similares en los diferentes lotes experimentales, excepto en el inyectado al día 5 de incubación, en donde se dio un mayor número de machos que de hembras. Analizamos estos datos mediante una prueba de χ^2 cuadrada para ver si el sesgo hacia los machos se debió al azar o a la acción del tratamiento. Esta prueba no indicó diferencias significativas entre las proporciones de sexo para los distintos días de tratamiento.

Para comparar la incidencia de malformaciones entre ambos

grupos, se realizó una prueba de Xi cuadrada, (tabla II) que indicó que no se presentó mayor proporción de alteraciones morfológicas externas debidas al tratamiento.

Por haberse inyectado a los grupos testigo en un lapso intermedio entre los grupos experimentales, no obtuvimos datos de inyección a los grupos testigo los días 2 y 5 de desarrollo.

Los resultados del conteo celular en los grupos testigo y los tratados por inyección se muestran en la tabla III. Los embriones tratados con hormona el día 2 de desarrollo, tuvieron una cantidad de células muy similar a lo observado en los embriones de los grupos testigo promediados; con la inyección al día 3, hubo un aumento ligero con respecto a los anteriores, lo mismo que en los lotes tratados al día 4 de incubación. Los datos muestran un mayor número celular en los ovarios de los embriones inyectados con progesterona el día 5 de desarrollo. De acuerdo con los datos obtenidos, la proliferación celular aumenta de forma progresiva con respecto al tiempo de incubación en que se aplica la inyección (gráfica II). Para el tratamiento a los lotes el día 9 de desarrollo, los resultados mostraron un aumento menor en el número de células respecto de los lotes testigo.

Se observaron incrementos en los tres tipos celulares cuantificados (células somáticas con lípidos, somáticas sin lípidos y germinales), en los distintos días de tratamiento, siendo más claro en las células sin inclusiones de lípidos (gráficas III, IV y V).

Se practicó un análisis de varianza (tabla IV) para comparar

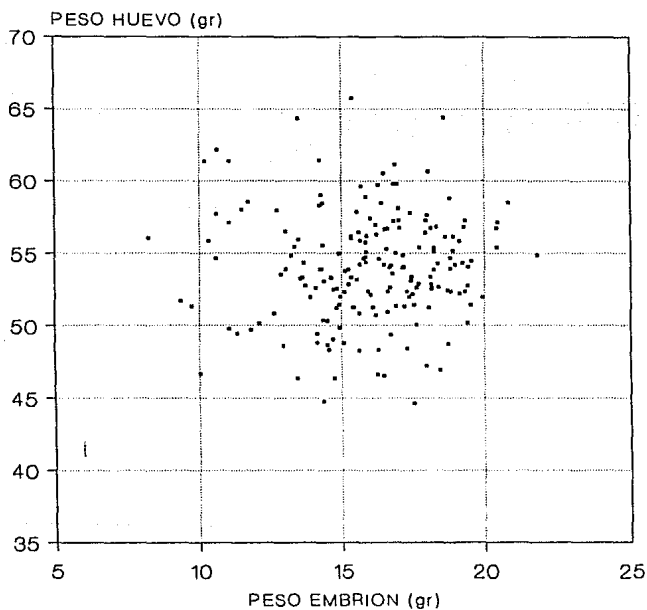
la cantidad de células somáticas sin inclusiones de lípidos entre los grupos tratados y los testigos, en este caso se obtuvo diferencia significativa ($P < 0.05$).

Con este análisis no se encontraron diferencias en cuanto al número de células con relación al día de tratamiento, incluyendo todos los datos experimentales. Realizando un segundo análisis de varianza que involucró a los grupos experimentales con un mayor número de datos (días 3, 4 y 9), se reafirma esta diferencia significativa entre los lotes tratados con respecto a los testigos (tabla V).

No se practicaron análisis de varianza con los otros dos tipos celulares (somáticas con inclusiones de lípidos y germinales) porque el incremento celular fue menor, comparándolos con las células sin inclusiones de lípidos.

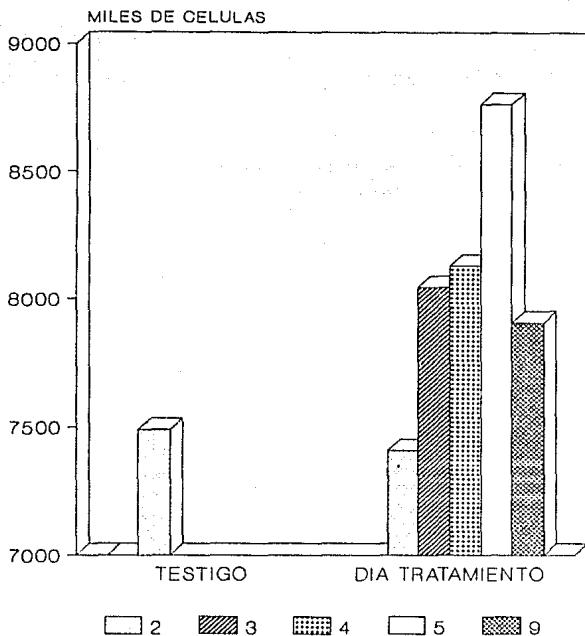
Se aplicaron pruebas de "t" de Student contrastando cada uno de los grupos experimentales con los grupos testigo, no obteniéndose en ningún caso diferencia significativa. También se realizaron pruebas de "t" para comparar entre sí las distintas edades de tratamiento; se encontró un valor para "t" de 2.0309 contrastando los grupos experimentales tratados los días 2 y 5, que aunque no arrojó diferencia significativa, se acerca mucho al valor establecido, indicando una tendencia al aumento en la celularidad hacia el quinto día de desarrollo.

Relación de peso entre huevo y embrión



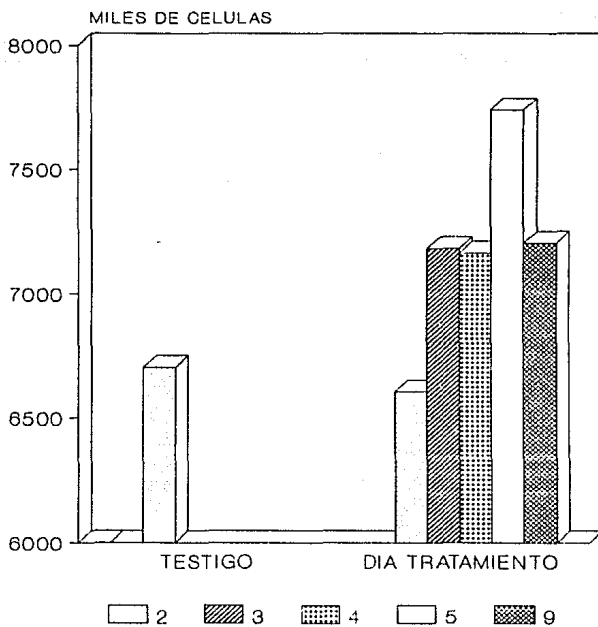
GRAFICA I. No hay correlación lineal
entre las variables. $R=0.027$
 $R^2=0.0007$

Células totales



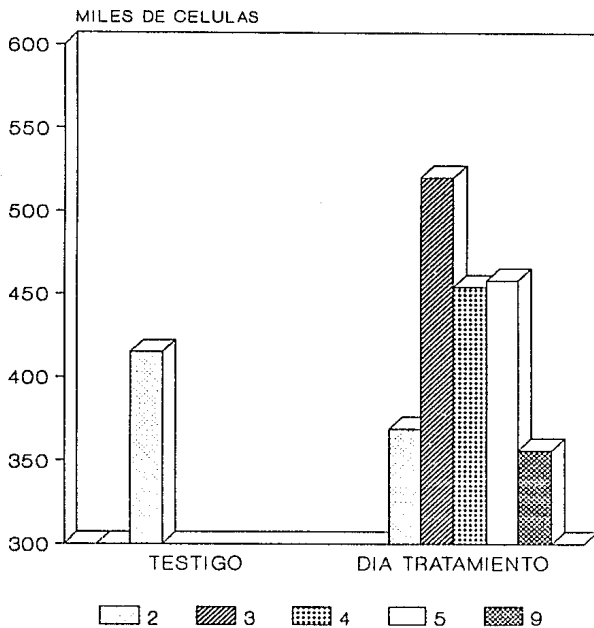
Gráfica II.

Células somáticas Sin inclusiones de lípidos



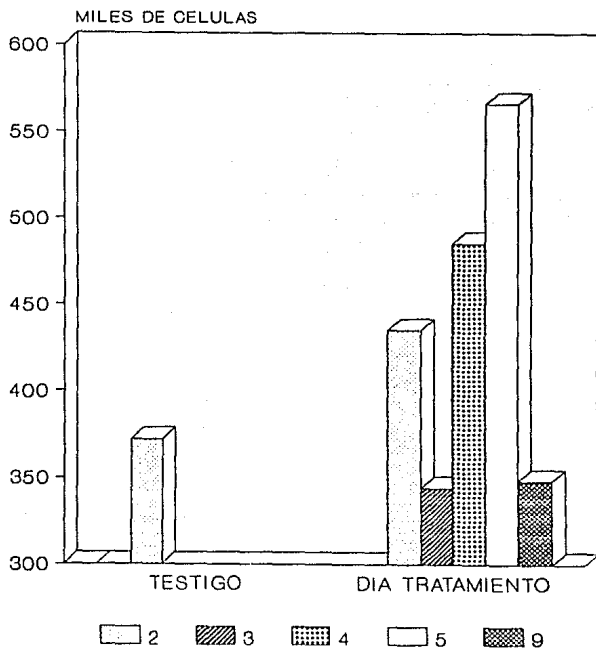
Gráfica III.

Células somáticas Con inclusiones de lípidos



Gráfica IV.

Células germinales



Gráfica V.

PRUEBA DE χ^2 PARA PROPORCION
DE SEXOS

FRECUENCIAS OBSERVADAS			
	MACHOS	HEMBRAS	TOTAL
TESTIGO	108	111	219
DIA 2	43	44	87
DIA 3	53	56	109
DIA 4	55	59	114
DIA 5	44	30	74
DIA 9	27	25	52
INM	31	28	59

NIVEL DE SIGNIFICANCIA 0.05

GRADOS DE LIBERTAD 6

χ^2 CALCULADA 3.0686

χ^2 DE TABLAS 12.592

TABLA I. NO HAY DIFERENCIAS EN LA PROPORCION
DE SEXOS CON RESPECTO AL DIA DE
TRATAMIENTO.

PRUEBA DE χ^2 PARA PROPORCION DE MALFORMACIONES

FRECUENCIAS OBSERVADAS			
	MALFOR.	NO MALF.	TOTAL
TESTIGO	17	202	219
DIA 2	7	80	87
DIA 3	9	100	109
DIA 4	13	101	114
DIA 5	5	69	74
DIA 9	5	47	52
INM	3	56	59

NIVEL DE SIGNIFICANCIA 0.05
 GRADOS DE LIBERTAD 6
 χ^2 CALCULADA 2.6941
 χ^2 DE TABLAS 12.592

TABLA II. NO HAY DIFERENCIAS EN LA PROPORCION DE MALFORMACIONES.

TABLA III. DATOS DEL CONTEO CELULAR

TRATAMIENTO	DIA	TIPO CELULAR	MEDIA \pm DS	N
TESTIGO	3	SIN LIPIDOS	6518.9 \pm 1106.0	9
	3	CON LIPIDOS	478.3 \pm 99.2	9
	3	GERMINALES	370.0 \pm 143.1	9
	3	TOTALES	7367.2 \pm 1125.1	9
	4	SIN LIPIDOS	6745.8 \pm 1045.6	6
	4	CON LIPIDOS	358.3 \pm 117.6	6
	4	GERMINALES	405.0 \pm 148.5	6
	4	TOTALES	7509.2 \pm 1193.7	6
	9	SIN LIPIDOS	6902.9 \pm 639.9	7
	9	CON LIPIDOS	382.9 \pm 79.6	7
	9	GERMINALES	345.7 \pm 90.5	7
	9	TOTALES	7631.4 \pm 733.4	7
PROGESTERONA INYECCION	2	SIN LIPIDOS	6603.3 \pm 1045.7	9
	2	CON LIPIDOS	369.4 \pm 74.6	9
	2	GERMINALES	435.0 \pm 144.4	9
	2	TOTALES	7407.8 \pm 1130.9	9
	3	SIN LIPIDOS	7183.6 \pm 1491.6	11
	3	CON LIPIDOS	520.0 \pm 154.6	11
	3	GERMINALES	343.6 \pm 136.1	11
	3	TOTALES	8047.3 \pm 1624.8	11
	4	SIN LIPIDOS	7164.1 \pm 1452.7	11
	4	CON LIPIDOS	454.5 \pm 138.3	11
	4	GERMINALES	484.5 \pm 153.4	11
	4	TOTALES	8130.5 \pm 1593.6	11
	5	SIN LIPIDOS	7740.0 \pm 979.1	5
	5	CON LIPIDOS	458.0 \pm 154.7	5
	5	GERMINALES	566.0 \pm 130.2	5
	5	TOTALES	8764.0 \pm 1212.6	5
	9	SIN LIPIDOS	7204.0 \pm 562.2	5
	9	CON LIPIDOS	356.0 \pm 126.7	5
	9	GERMINALES	348.0 \pm 125.0	5
	9	TOTALES	7908.0 \pm 739.9	5

DS Desviación estándar

N Número de pools de ovarios

CELULAS SOMATICAS SIN INCLUSIONES DE LIPIDOS

FUENTE	SUMA CUADRADOS	GL	CUADRADOS MEDIOS	VALOR F	PROBABILIDAD UNA COLA
CON HORMONA	6826377	1	6826380	6.77	0.0113
DIA TRATAM	3139528	4	784882	0.78	0.5426
INTERACCION	4369248	4	1092310	1.08	0.3711
ERROR	70535778	70	1007650		

TABLA IV. ANALISIS DE VARIANZA DE DOS VIAS, DATOS COMPLETOS. SE OBSERVAN DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS ENTRE LOS GRUPOS TRATADOS Y LOS TESTIGO.

CELULAS SOMATICAS SIN INCLUSIONES DE LIPIDOS

FUENTE	SUMA CUADRADOS	GL	CUADRADOS MEDIOS	VALOR F	PROBABILIDAD UNA COLA
CON HORMONA	5575351	1	5575350	4.21	0.0463
DIA TRATAM	15488	2	7744	0.01	0.9942
INTERACCION	1628209	2	814104	0.62	0.5452
ERROR	55565081	42	1322980		

TABLA V. ANALISIS DE VARIANZA DE DOS VIAS, DIAS 3, 4 Y 9. SE DIERON DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS ENTRE LOS GRUPOS TRATADOS Y LOS TESTIGO.

TABLA VI. PESO (gr)

		HEMBRAS	MACHOS
		EMBRION	EMBRION
CONTROL	MEDIA	15.01	15.64
	DESVIACION	2.72	1.66
	NO. DATOS	32	23
	R		
TRATADOS	MEDIA	16.39	16.02
	DESVIACION	2.45	2.60
	NO. DATOS	60	68
	R		

EL TRATAMIENTO CON PROGESTERONA NO AFECTO EL PESO TOTAL DEL HUEVO NI EL PESO CORPORAL DEL EMBRION.

DISCUSION

El análisis de regresión lineal entre el peso del huevo y el embrión sugiere que el peso corporal no está en relación con el peso del huevo en los embriones de 17 días de incubación, de tal manera que esto no puede utilizarse para establecer un criterio de selección de embriones.

Basándonos en esa gráfica de correlación fue como se estableció un límite inferior de peso (14 gramos) de los embriones que se tomaron para el estudio de las poblaciones celulares del ovario; esto se realiza para descartar los embriones que estuvieran retrasados en su desarrollo. Hay que señalar que el tratamiento no afectó el peso corporal de la totalidad de los embriones estudiados (tabla VI).

La proporción de sexos en los distintos días de tratamiento mostró un ligero sesgo hacia los machos, principalmente en el grupo tratado el día 5 de incubación; pero como se demostró a través de una prueba de χ^2 cuadrada, no hay diferencia significativa. Sería interesante analizar más detalladamente la proporción de sexos aplicando el tratamiento por inyección, al día 5 de desarrollo embrionario, para explorar si la tendencia a un mayor número de machos registrada en el presente trabajo, puede deberse a un efecto masculinizante de la progesterona, como lo describieron otros autores (Goodman, 1986; Salter, 1953).

No hay diferencias en las proporciones de embriones malformados para ambos sexos comparándolos con una prueba de χ^2

cuadrada, lo que está indicando que la dosis elegida no afectó el desarrollo embrionario. Algunos autores describen una mayor incidencia de malformaciones, pero utilizan dosis mayores de progesterona (Salter, 1953; Mayers et al, 1980).

Se probaron dos vías de administración con el fin de determinar cuál de ellos, inmersión o inyección, era más confiable para estudiar el efecto de la progesterona. Los embriones tratados por inmersión no mostraron claramente el efecto de la hormona, mientras que en los tratados por inyección se observó mejor la diferencia. Por esta razón se eliminó el método de inmersión y se prosiguió con el de inyección.

El conteo celular se realiza a los 17 días de incubación porque es el momento en que la ovogénesis ha llegado al máximo de su desarrollo y todavía no se inicia la atresia de células germinales que ocurre en la mayoría de los vertebrados (Hughes, 1963).

Con base en otros trabajos experimentales que se llevan a cabo en nuestro laboratorio administrando estrógenos, se eligió la dosis de 800 ng de progesterona por ser la dosis doble a la equivalente con la cual se obtiene efecto máximo con el 17 β -estradiol.

Se inyectó a los embriones con 800 ng de progesterona los días 2, 3, 4 y 5 de desarrollo embrionario porque en esta etapa se lleva a cabo la diferenciación ovárica en el pollo (entre los días 3 y 4) y el día 9 porque se inicia la etapa de proliferación de las ovogonias en el ovario ya formado.

Los inyectados el día 2 de desarrollo no mostraron efecto del tratamiento pues la cantidad de células es similar a la de los lotes testigo. La diferencia en número se fue haciendo mayor al ir avanzando el desarrollo. En los ovarios de los lotes tratados los días 3 y 4 se observó más claramente el incremento celular, comparándolos con el lote testigo. Pero el mayor efecto se obtuvo en los embriones de 5 días de incubación, y se reflejó en la cantidad de células ováricas, lo que sugiere que durante la etapa de diferenciación de la gónada el futuro ovario es sensible a las hormonas esteroides y el efecto de las mismas persiste durante un período prolongado (12 a 14 días).

Aunque se obtuvo diferencia significativa estadística mediante el análisis de varianza, las pruebas de "t" no dieron un resultado similar. El que la comparación entre los grupos tratados los días 2 y 5 se acerca a la diferencia significativa, sugiere que tal vez aumentando el tamaño de muestra se podría esclarecer la tendencia al aumento en la celularidad. También sería interesante analizar el efecto de la progesterona entre los días 5 y 9 de incubación para hacer un seguimiento continuo del efecto de esta hormona.

Se ha demostrado que la proliferación cortical del ovario es dependiente de estrógeno (Scheib, 1983); pero si se tiene en cuenta que la progesterona es considerada como un antiestrógeno (Goodman, 1986), nosotros esperaríamos que esta hormona inhibiera la proliferación celular, sin embargo éste no fue lo observado. El presente trabajo demuestra que la progesterona en nuestras

condiciones experimentales no está ejerciendo una acción antiestrogénica; al contrario, parecería que la hormona está actuando de manera similar a los estrógenos. Una explicación alternativa sería que, al ser la progesterona un intermediario biosintético para hormonas esteroides, la misma pudo haber sido metabolizada por el ovario a otros compuestos, entre los que se podrían encontrar la testosterona y el 17 β -estradiol (Bhagavan, 1974; Gore-Langton, 1988). Es posible que el efecto de esos metabolitos, principalmente el 17 β -estradiol, sea el que se reflejó, promoviendo el incremento de células ováricas y no la progesterona como tal.

CONCLUSIONES

La progesterona no mostró efecto inhibitorio en el desarrollo embrionario del ovario; su acción promovió la proliferación de las células ováricas.

De los tres tipos celulares que conforman el ovario, las células somáticas sin inclusiones de lípidos fueron las más sensibles al tratamiento, aumentando en cantidad.

La comparación entre los grupos tratados y los testigo fue estadísticamente significativa, siendo mayor el efecto del tratamiento aplicado a los 5 días de desarrollo embrionario.

La progesterona no ejerció una acción clara sobre la proporción de sexos y no aumentó la incidencia de malformaciones congénitas.

BIBLIOGRAFIA

1. Balinsky, B. I. y Fabian, B. C. Introducción a la Embriología. 5ª ed. Ediciones Omega. Barcelona. 1983. pp 486-495.
2. Bhagavan, N. V. Biochemistry. 2nd. ed. J. B. Lippincott Co. USA. 1978. pp 1240-1241.
3. Brodie, A. M. Biosynthesis, Metabolism and Secretion of Ovarian Steroid Hormones. In: Serra, G. B. (ed) Comprehensive Endocrinology. Raven Press. New York. 1983. pp 1-17.
4. Carlson, B. M. Embriología Básica de Patten. 5ª ed. Ed. Interamericana-Mc Graw-Hill. México. 1990. pp 69-82.
5. Clark, J. H. and Markaverich, B. M. Actions of Ovarian Steroid Hormones. In: Knobil, E. and Neill, J. et al (ed) The Physiology of Reproduction. Vol. I. Raven Press. New York. 1988. pp 710.
6. Dollander, A. y Fenart, R. Elementos de Embriología. Embriología General. Ed. Limusa. México. 1986. pp 77-83.
7. Drill. Farmacología Médica. 2ª edic. Ed. La Prensa Médica Mexicana. México, D. F. 1978. pp 1383-1387.
8. George, F. W. and Wilson, J. D. Sex Determination and Differentiation. In: Knobil, E. and Neill, J. et al (ed) The Physiology of Reproduction. Raven Press. New York. 1988. pp 3-26.
9. Goldman. B. D. and Zarrow, M. X. The Physiology of Progesterins. In Geiger S. R. (ed) Handbook of Physiology. Section 7: Endocrinology. Vol II, Part I, Chapter 24.

- American Physiological Society. Washington. 1973. pp 547-572.
10. Goodman y Gilman, A. Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica. 7ª edic. Ed. Panamericana. México, D. F. 1986. pp 1350-1356.
 11. Gore-Langton R. E. and Armstrong, D. T. Follicular Steroidogenesis and its Control. In: Knobil E. et al (ed) The Physiology of Reproduction. Vol. I. Raven Press. N. Y. 1988. pp 332-338, 350-364.
 12. Granner, D. et al. Bioquímica de Harper. 10ª ed. Ed. El Manual Moderno. México. 1986. pp 506-513, 585-586.
 13. Hoar, W. S. Fisiología General y Comparada. Ed. Omega. Barcelona. 1978. pp 729-735, 754-763.
 14. Hsueh, A. J., Peck, E. J. and Clark, J. H. Control of Uterine Estrogen Receptor Levels by Progesterone. *Endocrinology*. 98:438-444. (1975).
 15. Jost, Alfred. Initial Stages of Gonadal Development. *Archiv. Anat. micr. Morph. expér.* 74:39-41. (1985).
 16. Leavitt, W. W. et al. Biology of Progesterone Receptors. en: Receptor and Hormone Action. Vol. II. Academic Press. N. Y. 1978. pp 157-159.
 17. Lehninger, Albert L. Principios de Bioquímica. Ed. Omega. Barcelona. 1984. pp 744-745, 723.
 18. Lobue, Joseph, and Gordon, Albert. Humoral Control of growth and differentiation. Vol. I. Academic Press. 1973. pp 313-314.
 19. Mayers, F. H., Jawetz, E., Goldfien, A. Manual de

- Farmacología Clínica. 4ª edic. Ed. El Manual Moderno. México. 1980. pp 453.
20. Moore, K. L. Embriología Clínica. 3ª edic. Ed. Interamericana. México, D. F. 1985. pp 166.
 21. Morrison, T. et al. Fisiología Humana. CECSA. México. 1970. pp 416-422.
 22. Niswender, G. D. and Nett, T. M. The Corpus Luteum and its Control. en: The Physiology of Reproduction. Vol. I. Raven Press. N. Y. 1988. pp 489-491.
 23. O'Malley, B. W. and Strott, C. A. The Mechanism of Action of Progesterone. In: (ed) Handbook of Physiology. Section 7: Endocrinology. Vol II, Part I, Chapter 26. American Physiological Society. Washington, D. C. 1973. pp 591-602.
 24. Patten, Bradley M. Human Embriology. 3th edition. Ed. McGraw-Hill Book Company. U.S.A. 1968.
 25. Robson, J. M. Recent Advances in Sex and Reproductive Physiology. 3th edition J & A Churchill Ltd. 1949.
 26. Ruiz Durá, M. F. Fundamentos de Embriología y Fisiología de la Reproducción. Recopilación de Textos Básicos. UNAM. México. 1988. pp 25-43, 64-91.
 27. Sadler, T. W. Langman. Embriología Médica. 5ª edic. Ed. Médica Panamericana. Buenos Aires. 1986. pp 20-34.
 28. Salter, William T. Tratado de Farmacología Aplicada. Aplicación de los Principios Farmacológicos a la Práctica Médica. Tomo I. Ed. Interamericana. México. 1953.

29. Scheib, Denise. Effects and role of estrogens in avian gonadal differentiation. *Cell Differentiation (Suppl)*. 23:87-92. (1983).
30. Selcer, K. W. and Leavitt, W. W. Progesterone Down-Regulation of Nuclear Estrogen Receptor: A Fundamental Mechanism in Birds and Mammals. *Gen. Comp. Endocrinol*. 72:443-452. (1988).

APENDICE

SOLUCIONES EMPLEADAS:

Dulbeco+Albúmina

1.34 g Dulbecco's Modified Eagle Medium (Grand Island Biological Co., New York, U.S.A. No. Cat. 430-2100).

0.10 g Albumin Bovine (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo., U.S.A. No. Cat. A-7888).

Se disuelven en agua destilada, se ajusta el pH a 7.5 con Bicarbonato de Sodio al 5% (coloración rojiza, espuma rosada), y se afora a 100 ml.

Solución salina balanceada libre de Ca⁺ y Mg⁺

NaCl.....8.0 g (J. T. Baker S. A. de C. V., México. No. Cat. 3624).

KH₂PO₄.....0.2 g (J. T. Baker S. A. de C. V., México. No. Cat. 3246).

KCl.....0.2 g (Química Dinámica, S. A. de C. V., Monterrey, N. L., México. No. Cat. P4900).

Na₂HPO₄.....1.15 g (J. T. Baker S. A., México. No. Cat. 3828).

H₂O destilada...1000 ml

Disolver en el agua y ajustar el pH con Rojo Fenol, coloración rojiza.

Tripsina

Tripsin (Grand Island Biological Co., New York, U.S.A. No. Cat. 840-7072IL).

Al 0.25%, disuelta en solución salina balanceada libre de Ca^{2+} y Mg^{2+} .

Inhibidor de Tripsina

Tripsin Inhibitor (Grand Island Biological Co., New York, U.S.A. No. Cat. 840-7075II).

Al 0.25%, disuelto en solución Dulbeco+Albúmina.