

106  
2ej



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

ANALISIS HISTOLGICO Y MORFOMETRICO DE  
OVARIO DE POLLO RECIEN NACIDO TRATADO CON  
HORMONA FOLICULO ESTIMULANTE.

**T E S I S**  
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:  
**B I O L O G O**  
P R E S E N T A :  
**CAROLINA MANCILLA MENDEZ**

ASESOR: DRA. MA. GENOVEVA GONZALEZ MORAN



MEXICO, D. F.

1983

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional  
Autónoma de México



## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis 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	
DESARROLLO GONADAL Y OVARIO EMBRIONARIO	3
OVARIO MADURO	8
CONTROL HORMONAL DE LA ACTIVIDAD REPRODUCTIVA EN AVES	11
BIOQUIMICA DE LA HORMONA FOLICULO ESTIMULANTE	16
ANTECEDENTES	22
HIPOTESIS Y OBJETIVOS	30
MATERIAL Y METODO	31
RESULTADOS	35
DISCUSION	47
CONCLUSIONES	51
BIBLIOGRAFIA	52

## RESUMEN

En la actualidad existen pocos reportes concernientes a las funciones de la hormona foliculo estimulante circulante en el ovario embrionario de las aves debido a su baja probabilidad de obtenerla; de los escasos trabajos que se han realizado con hormona luteinizante,  $17\beta$ -estradiol ó progesterona algunos se han efectuado en ovario adulto y muy pocos en embriones.

El presente trabajo describe los cambios morfológicos y morfométricos producidos en el ovario de pollo recién nacido tratado durante el desarrollo embrionario con FSH. Se pretende observar si existe una respuesta en el ovario de pollo con un estímulo previo con FSH, a través del análisis histológico y morfométrico de los componentes de la médula subcortical del ovario de pollo recién nacido.

Se utilizaron huevos fértiles y se incubaron a  $37^{\circ}$  C con un porcentaje de humedad y suficiente ventilación, se trataron con hormona foliculo estimulante en concentraciones de  $1\mu\text{g}$  y  $40\mu\text{g}$  mientras que al lote control sólo se le inyectó medio de Dulbecco que fué el medio de dilución de la hormona. Al rededor de las 24 horas de eclosionados, se sacrificaron, se disecaron los ovarios y se hicieron cortes en ultramicrotomo a  $0.8\mu\text{m}$  los cuales se tificaron con azul de toluidina.

La prueba "T" de Student aplicada mostró que las diferencias eran significativas en cada parámetro de comparación.

Al final del análisis, se observa que existe un mayor estímulo en el área correspondiente a los vasos en los ovarios tratados con 1µg de FSH, mientras que los tratados con 40µg lo presentan a nivel de cordones de células intersticiales y núcleos de éstas.

## INTRODUCCION

### DESARROLLO GONADAL Y OVARIO EMBRIONARIO.

Desde el primer día de incubación, en el desarrollo embrionario de pollo, se ha observado un tipo celular importante, éste es el de las células germinales primordiales las cuales se reconocen independientemente del grado de desarrollo del embrión (Ginsberg, y Eyal-Giladi, 1987). Dubois (1967a y b) sugiere que estas células se originan en el endodermo y pared vitelina para el estado de blástula, empezando a moverse hacia adelante por movimientos morfogénéticos del endofilo (endoblasto vitelino) (Dubois, 1969; Dubois y Croisille, 1970; Jones, 1978). También se sugiere que para el tiempo de la oviposición, las células germinales primordiales están localizadas en una banda transversal, al eje embrionario, desplazándose escasamente, hacia la zona urogenital del embrión (Hardisty, 1978; Jones, 1978). Estas células se agrupan al final de este día en la zona denominada disco germinativo (Crawford, 1990). Este disco germinativo o primordio gonadal se encuentra localizado en el mesodermo esplácnico dorsal, a ambos lados del mesenterio dorsal, donde aparece el epitelio celómico más denso.

El desplazamiento de las células germinales primordiales es alrededor de las 33hrs. desde el epitelio celómico hasta la

región de las futuras gónadas. Es posible observar células germinales primordiales intraembrionarias antes del establecimiento de la circulación, lo que ocurre alrededor de las 33hrs. de incubación (Schwartz y Domm, 1972; Jones, 1978) lo que indica que el movimiento por vía sanguínea es secundario al que se realiza por el endoblasto vitelino (endofilo) hacia áreas anteriores del blastodermo (Rogulska, 1969; Dubois y Croisille, 1970; Hardisty, 1978; Houillon, 1978; Jones, 1978; Crawford, 1990).

Hacia las 48hrs. de incubación las células germinales primordiales empiezan a llegar al mesenterio dorsal y crestas genitales y la fase de transporte vascular termina virtualmente a las 90-120hrs. de incubación (Hardisty, 1978; Jones, 1978).

Posteriormente, estas células escapan de los vasos sanguíneos y migran hacia la zona de las futuras gónadas mediante movimientos ameboides (Houillon, 1978).

Esta migración es favorecida por la influencia de sustancias quimiotácticas originadas por el epitelio peritoneal de la cresta gonadal (Houillon, 1978; Crawford, 1990).

En el 3er. día de incubación, la gónada consta de un epitelio germinal o corteza, que se origina en el epitelio celómico y una médula originada del blastema mesonéfrico (van Tienhoven, 1959; Cole y Cupps 1989).

Hasta el 4o. día de incubación, la distribución de las células germinales primordiales es uniforme en el epitelio de ambas gónadas, sin embargo, después de este tiempo, esta distribución empieza a ser claramente asimétrica, hay por lo tanto, una mayor colonización en la gónada izquierda que en la derecha, además de que existe una migración activa desde la gónada derecha a la izquierda en ambos sexos (van Limborgh, 1968 a y b; Gilbert, 1969, 1971b; Jones, 1978; Crawford, 1990).

Para el 6o. día de incubación, aparecen pequeños brotes o extensiones del epitelio germinal que hacia el 7o. día entrarán a división mitótica y formarán los cordones sexuales primarios o cordones medulares que proliferan en dirección de la médula gonadal, se forma la corteza y los cordones sexuales primarios; una capa de tejido conectivo se forma originando la primera túnica albugínea (Crawford, 1990).

Subsecuentemente el desarrollo gonadal es variable según el sexo genético del embrión que en el caso de ovario en aves es atribuido a la presencia del antígeno H-W según expresión de una reacción serológica (Wachtel, 1983; Crawford, 1990).

Durante el 8o. día de incubación las células germinales primordiales son bipotenciales, capaces de originar, por diferenciación, células sexuales masculinas o femeninas (Crawford, 1990). Hay proliferación secundaria del epitelio gonadal que provee de células germinales primordiales a la corteza, estas células empiezan con una activa división mitótica que se prolonga

hasta el nacimiento formando las ovogonias. Estas son células grandes y redondas, más pequeñas que las células germinales primordiales pero más grandes que las células somáticas (Hughes, 1963; Jones, 1978; Tokarz, 1978; Crawford, 1990).

Se propone que las células intersticiales de la gónada están involucradas en el desarrollo del ovario mediante la producción de esteroides hasta antes del día 13 (Fugo, 1940; Vogel, 1957) esto se demuestra con la hipofisectomía de embriones mayores de 13 días de incubación en los cuales se observa inhibición gonadal, pero, si esto se realiza antes del día 13, la hipofisectomía no previene la diferenciación hacia ovarios o testículos, (Fugo, 1940; Gilbert, 1971b) lo que sugiere que las hormonas esteroides son producidas por el ovario entre los días 2 y 6 de incubación y juegan un papel importante en el desarrollo ovárico. Después, la pituitaria se encarga de la embriogénesis ovárica (Gilbert, 1971b).

Hay también tejido estromático que es la segunda túnica albugínea que se forma para el día 14 de incubación y que aísla los cordones sexuales corticales de lo demás, formando ahora zonas separadas que son el epitelio gonadal o corteza y la médula del ovario. Posteriormente, la túnica albugínea inicialmente formada entra en regresión (van Tienhoven, 1959; Crawford, 1990). Se ha formado, entonces, el ovario inmaduro que es amarillento, plano y de forma irregular (Gilbert, 1971b).

La zona medular contiene tejido conectivo, nervioso y músculo liso (Gilbert, 1969) mientras que la corteza contiene a las ovogonias y ovocitos. Esta rodea a la médula completamente, excepto por el hilio y está cubierta por epitelio cuboidal (Bradley, 1960).

Según algunos estudios realizados por Gasc (1978), en los que marcan radioactivamente al ADN y a las proteínas de gónadas de pollo, encontró que el ovario izquierdo en el 11o. día de incubación, tiene un contenido de proteínas 4.7 veces más alto que el ovario derecho, lo que indica que presenta un mayor grado de diferenciación. Algo similar ocurre con el contenido de ADN, lo que indica que el ovario izquierdo presenta, para este mismo periodo de incubación, un mayor grado de diferenciación y proliferación celular.

El incremento de ovocitos es de 28,000 en el día 9 a 680,000 en el día 17 y, subsecuentemente, decrece a 480,000 para el día de la eclosión (Benoit, 1950; Johnson, 1986; Sturkie, 1986). Esta diferencia en contenido de ADN y proteínas se debe también a que para el día 10 de incubación, empieza la regresión, tanto del ovario, como del oviducto derecho y ya para la eclosión, estos órganos son poco perceptibles (Gasc, 1978).

#### OVARIO MADURO.

Hasta el día 3 después de la eclosión, la gónada incrementa en tamaño pero su peso es relativamente constante (Nalbandov, y James, 1949; Gilbert, 1971b) y para el día 40. o 50. las células prefoliculares se observan cercanas a los ovocitos (D'Hollander, 1904; Hughes, 1963; Greenfield, 1966; Callebaut, 1968).

Estas células prefoliculares se derivan del epitelio celómico, se infiltran hacia la corteza y rompen la clara demarcación que existía entre el tejido medular y la corteza y se acercan a los ovocitos que se encuentran en estado diplóteno de la profase meiótica (Prochazkova y Konarek, 1970; Hodges, 1974; Tokarz, 1978; Gilbert, 1979; Crawford, 1990).

Como las células prefoliculares son planas, se extienden a lo largo de la superficie del ovocito y se superponen con sus adyacentes (Greenfield, 1966). Como resultado de esta superposición, las células parecen estar en epitelio estratificado, sin embargo, se trata de un epitelio cúbico pseudoestratificado (Benoit, 1950; Greenfield, 1966; Gilbert, 1971b; Gorbik y Gabareva, 1975; Tokarz, 1978; Balinsky, 1982).

Aproximadamente a las 18 o 20 semanas de edad del pollo, el ovario maduro es sexualmente activo y forma los folículos que comúnmente son de 6 distintos tamaños de entre 2 y 4 cm.

de diámetro, acompañados por un gran número de pequeños folículos de 2 y 10mm de diámetro y otros más pequeños y numerosos que son los folículos blancos (Johnson, 1986).

La pared del epitelio y la capa conjuntiva que limitan a cada folículo se alarga al aumentar el volumen de vitelo y se une al ovario por un tallo folicular en cuya parte distal el epitelio se adelgaza y no presenta capa conjuntiva o es mínima, esta zona es el estigma, mediante el cual, cada folículo se exterioriza de la corteza ovárica y se une a ella. Cada folículo es altamente vascularizado, excepto en esta zona ya que también es el punto de ruptura entre el folículo y el ovario durante la ovulación (De Alba, 1985; Johnson, 1986).

El crecimiento folicular en aves incluye tanto la maduración de la ovogonia, como la producción de un gran volumen de vitelo. Este volumen de vitelo domina al volumen del citoplasma activo del ovocito, el cual se ve desplazado por ésta, ocupando sólo una pequeña porción de la esfera total (De Alba, 1985). El crecimiento del ovocito, tiene lugar de seis a catorce días antes de la ovulación y durante este tiempo el volumen aumenta 200 veces (Balinsky, 1982).

La maduración de las ovogonias empieza con el inicio de la división meiótica y se transforman en ovocitos. La primera división de este proceso ocurre unas horas antes de la ovulación y por lo tanto, la expulsión del primer cuerpo polar; la segunda división, ocurre en el oviducto después de la ovulación (De Alba, 1985).

A continuación se analizará la regulación de la actividad reproductiva en las aves a través de la formación del eje hipotálamo-hipófisis-gónada.

## CONTROL HORMONAL DE LA ACTIVIDAD REPRODUCTIVA EN AVES.

La actividad reproductiva está controlada por algunos núcleos neurales del cerebro en respuesta a la información neural recibida por estímulos externos. Estos estímulos externos son recibidos por diferentes estructuras y posteriormente pasan al hipotálamo que es la base del diencefalo, situado detrás del quiasma óptico, por encima de la hipófisis o glándula pituitaria. Es también considerado como el centro de coordinación del sistema endocrino (Sturkie, 1967; Lenhinger, 1972; Harvey, et al., 1987; Ruiz, 1988).

La hipófisis, está situada en la silla turca, depresión en forma de silla de montar, del hueso esfenoides en la base del diencefalo (Sturkie, 1967).

Esta glándula consta de dos partes principales, el lóbulo anterior o adenohipófisis, de origen endodérmico y el lóbulo posterior o neurohipófisis, de origen ectodérmico. En las aves, no existe el lóbulo intermedio presente en mamíferos, sin embargo, estas dos zonas se encuentran separadas por una capa de tejido conjuntivo (Sturkie, 1967; Chester-Jones, et al., 1987).

La neurohipófisis está dividida en lóbulo neural distal, tallo neural y eminencia media, estas dos últimas regiones forman el infundíbulo. La eminencia media contiene un sistema de vasos portales por donde la sangre llega a la hipófisis para transportar hormonas y nutrientes. La morfogénesis de estos vasos

aparentemente se lleva a cabo durante los días 6o. a 7o. de incubación (Thommes y Russo, 1959; Pearson, 1972; Chester-Jones, et al., 1987). El inicio de esta organización se ha observado en los días 7.5 a 8 de incubación en los que se aprecian terminales nerviosas de neuronas hipotalámicas extendiéndose (Mikami et al., 1973; Daikoku et al., 1974) y para el día 9 incrementan en número y penetran en la capa externa de la eminencia media (Daikoku et al., 1974; Woods, et al., 1981). Dentro de la adenohipófisis, los vasos sanguíneos contactan capilares esenciales para el transporte de las hormonas secretadas como son la folículo estimulante (FSH), la luteinizante (LH), la Adrenocorticotropina (ACTH), Tirotropina (TSH) y otras, siendo las dos primeras gonadotropinas, ya que actúan sobre las gónadas (Chester-Jones, et al., 1987).

Una vez percibido el estímulo externo, el hipotálamo, segrega factores liberadores que llegan a la hipófisis, que al ser estimulada segrega hormonas a la sangre, que son transportadas a glándulas endocrinas las cuales son estimuladas para segregar sus hormonas específicas, también transportadas por la sangre hasta los receptores hormonales (Lenhinger, 1972).

El hipotálamo y la hipófisis forman parte del eje hipotálamo-hipófisis-gónada, los cuales en estados tempranos de desarrollo embrionario son autónomos en crecimiento, diferenciación y actividad y sólo después hay integración de ellos (Willier, 1955; Woods, 1987).

Se sabe que el hipotálamo es autónomo en estado inicial de desarrollo al sintetizar factores liberadores (Mikami, et al., 1973; Daikoku, et al., 1974; Woods, et al., 1985). Así como la hipófisis es capaz de sintetizar hormonas gonadotrópicas antes de su comunicación vascular con el hipotálamo. Esto ha sido demostrado mediante la técnica de inmunocitoquímica en la pituitaria alrededor del día 4 de incubación donde se encontró tanto LH como FSH (LH, Gasc y Sar, 1981; Woods et al., 1985) (FSH, Woods, et al., 1985; Woods, 1987) antes de la formación del plexo porta vascular definitivo entre el hipotálamo y la hipófisis que inicia en el día 12 de incubación (Thommes y Russo, 1959; Doskocil, 1970; Daikoku, et al., 1974; Stritesky y Rychter, 1977; Woods, 1987).

Fugo (1940) y Vogel (1956, 1957), realizaron experimentos de hipofisectomía, y observaron que el eje hipotálamo-hipófisis-gónada es funcional desde el día 13 de desarrollo. Esto lo deducen al observar en los embriones hipofisectomizados, desarrollo normal de las gónadas hasta el día 13, pero después, las gónadas no incrementan peso, talla, grado de diferenciación histológica (Fugo, 1940) ni contenido de colesterol (Vogel, 1956, 1957), siendo esto último importante debido a que el colesterol es el precursor esencial para la síntesis de hormonas sexuales producidas por las gónadas (Woods, et al., 1981; Woods, 1987).

Lo anterior es reforzado por trabajos realizados por Woods y Weeks (1969), en los que al hacer transplantes de adenohipófisis, detectaron que la regulación de la esteroidogénesis gonadal por la adenohipófisis empieza el día 13 en machos y el día 14 en en hembras. Esto se obtuvo al observar mediante la técnica de radioinmunoensayo de plasma, un incremento en el contenido de 17- $\beta$  estradiol que había permanecido constante durante los días 6.5 a 12.5 y cuyo incremento se observa en días los 13.5 como reflejo de la regulación gonadotrópica de la esteroidogénesis ovárica en este tiempo (Woods, et al., 1981; Woods, 1987).

Una vez establecido el eje hipotálamo-hipófisis-gónada para el día 13-13.5 en machos y 14 en hembras, se observa que, sólo si existen estímulos externos se producen factores liberadores de gonadotropinas en las neuronas hipotalámicas, las que entran en circulación porta hipofiseal y regulan la síntesis y liberación de las gonadotropinas de la hipófisis, la FSH y la LH, las cuales estimulan el crecimiento gonadal y la esteroidogénesis (Woods, et al., 1981; Woods, 1987).

La actividad de las neuronas secretoras hipotalámicas muestran ser sensibles al efecto *feed back* de esteroides gonadales en relación a los factores liberadores; es decir, cuando los esteroides gonadales se acumulan en tejido hipotalámico, hay disminución en la producción de factores liberadores y por tanto de hormonas gonadales (Sturkie, 1967; Harvey, et al., 1987).

Hasta ahora sólo se ha mencionado la FSH, como hormona producida por la adenohipófisis, pero es necesario conocer la manera en que actúa sobre la célula blanco. Para ello se describirá su bioquímica.

## BIOQUIMICA DE LA HORMONA FOLICULO ESTIMULANTE.

La FSH es una glicoproteína sintetizada por los gonadotropos de la hipófisis anterior. Consta de dos cadenas similares, una polipeptídica y una glicosilada (la cadena  $\alpha$  y la  $\beta$ ) que se encuentran unidas covalentemente (Clifton, 1989; Patton, et al., 1989).

Las dos subunidades son sintetizadas independientemente y contienen aproximadamente 100 aminoácidos cada una. La subunidad  $\beta$  identifica al tejido blanco apropiado mientras que la subunidad  $\alpha$  es importante para unirse al receptor el cual activa a la enzima adenilato ciclasa de la membrana de la célula blanco (Steiner, y Cameron, 1989; Patton, et al., 1989).

Los primeros reportes del aislamiento de la FSH de pollo, fueron hechas por Hartree y Cunningham (1969). Después fue aislada por varios investigadores como Follett et al, 1972; Scanes y Follett, 1972; Furuya e Ishii, 1974; Godden y Scanes, 1975; Licht et al, 1977; Sakai e Ishii, 1980 y Talbot et al, 1988.

En 1980, Sakai e Ishii, mediante estudios con radioinmunoensayo (RIA) obtuvieron resultados que les permiten proponer que la FSH de pollo está formada por aminoácidos y carbohidratos. La molécula contiene 17 aminoácidos claves para su funcionamiento (Lys, His, Arg, Asp, Thr, Ser, Glu, Pro, Gly, Ala, Cys, Val, Met, Ile, Leu, Tyr, Phe) siendo esta parte de la molécula rica en ácido aspártico y ácido glutámico y con poco contenido de cisteína

y metionina. Este reporte es similar al realizado por Godden y Scanes (1975) quienes también analizaron la composición de la FSH de pollo. El alto contenido de ácido aspártico y glutámico y el bajo contenido de metionina son características también en mamíferos, lo que permite tener un valor de confiabilidad, ya que son similares. Sin embargo el contenido de cisteína en la molécula de FSH es de un tercio y una cuarta parte de lo reportado en pavo y mamífero respectivamente (Sakai e Ishii, 1980).

El peso molecular de la FSH de pollo es estimado en 37,000 por Sakai e Ishii (1980) y en 38,000 por Krishnan, et al (1992) encontrándose ambos valores dentro del rango obtenido para mamíferos con valores de 31,000 a 47,900 usando métodos de aislamiento similares (Hashimoto, et al., 1965, 1966; Reichert, et al., 1968; Braselton y McShan, 1970; Sakai e Ishii, 1980).

La FSH de pollo es una proteína ácida que consiste de múltiples componentes, siendo probablemente cuatro (Sakai e Ishii, 1980) dentro de los cuales el pI (punto isoelectrico) más alto (4.5) coincide con el determinado con FSH ovina (Juitisz, et al, 1965) (Cahill, et al, 1968; Sherwood, et al, 1970). Sin embargo en estudios realizados con cFSH en 1992 por Krishnan, et al, reportan un único componente con un pI de 4.65, que también coincide con el de ovino. Esto sugiere que el producto obtenido en la purificación, realizada por éste último, fue mejor que la realizada por Sakai e Ishii (1980).

En los gonadotropos del lóbulo anterior de la hipófisis de pollo se produce la FSH, esta hormona al igual que la LH están en el embrión de pollo desde el día 18 de desarrollo (Moszkowski, 1949); sin embargo, experimentos de Woods, et al., (1981), Woods, (1987); Sturkie, (1967); Fugo, (1940) y Vogel, (1956) demuestran que la formación del eje hipotálamo-hipófisis-gónada se realiza durante los días 13.5 y 14 en machos y hembras respectivamente y que, al haber estímulos externos que provoquen la síntesis de factores liberadores, se regula la síntesis y liberación de gonadotropinas como la FSH.

En gallinas adultas, donde se han formado los folículos en el ovario, las células de la granulosa de los folículos maduros adquieren receptores para la FSH mientras que en machos, son las células de Sertoli las que adquieren estos receptores. Se propone que esto es debido a que ambos tipos celulares tienen el mismo origen embrionario (Dorrington y Armstrong, 1979).

La hormona por sí sola es considerada como primer mensajero cuando es mandada desde la hipófisis hasta el ovario por vía sanguínea, y llega a los receptores localizados en la superficie de las células de la granulosa. Esta acción genera un segundo mensajero, el AMP cíclico, el cual lleva la señal endocrina desde la membrana celular a otro compartimento celular. El AMPc es generado por la adenilato ciclasa, un complejo enzimático unido por dentro a la membrana celular (Cook, 1989; Patton, et al., 1989; Steiner y Cameron, 1989).

El sistema receptor-efector para la generación del AMPc, consiste de tres proteínas embebidas en la membrana celular, estas proteínas son: la receptora, la proteína G y la adenilato ciclasa. La FSH llega por vía sanguínea desde la hipófisis anterior hasta el folículo donde se encuentran las células de la granulosa que contienen a las proteínas receptoras que atraviesan la membrana plasmática. Esta proteína receptora cambia de conformación exponiendo el sitio de unión para la proteína Gs. La proteína Gs es llamada así por su vínculo con la guanosin difosfato y guanosin trifosfato (GDP y GTP). La proteína Gs está conformada por una subunidad  $\beta$ , una  $\gamma$  y una  $\alpha$ , siendo ésta última la subunidad reguladora (Alberts, et al., 1989; Baltimore, et al., 1990).

La proteína Gs es inactivada en su estado libre cuando lleva unida a la subunidad  $\alpha$  una molécula de guanosin difosfato (GDP), la cual es removida cuando la Gs se une a un receptor hormonal ocupado. Una molécula de guanosin trifosfato (GTP) reemplaza al GDP y activa a la proteína Gs para unirse a la adenilato ciclasa. Este reemplazo se efectúa porque la subunidad  $\alpha$  se disocia del complejo Gs exponiendo un sitio de unión en la subunidad  $\alpha$  para la adenilato ciclasa y producir algunas moléculas de AMPc-. La subunidad  $\alpha$  hidroliza el GTP y separa dos grupos fosfatos del ATP y se une al oxígeno libre del grupo fosfato restante uniéndose al carbono 3 del anillo de la ribosa del AMP para formar el ciclo.

Cuando ésto se lleva a cabo la subunidad  $\alpha$  regresa a su conformación original, causando la disociación de la adenilato ciclasa y se reasocia con el complejo  $\beta$ - $\gamma$ . Una vez que hay esta reasociación, hay liberación de un grupo fosfato del GTP quedando unido ahora un GDP en la proteína Gs. Todo este proceso continúa mientras la Gs no sea inactivada por sí sola por desfosforilación de la molécula de GTP y se desacople de la subunidad catalítica. Mientras una molécula de GTP esté unida a la Gs, la subunidad catalítica produce AMPc. El AMPc es un compuesto estable que puede encontrarse en las células indefinidamente si no fuera por la AMP fosfodiesterasa cíclica (PDE), una enzima que desacopla el fosfato 3' del 3',5'-AMP para producir 5'-AMP. La fosfodiesterasa requiere la presencia de  $Mg^{2+}$  intracelular y es activada en algunos casos por  $Ca^{2+}$  intracelular en rango micromolar (Alberts, et al., 1989; Baltimore, et al., 1990). Algunas proteínas G pueden activarse con el receptor por cambios en la concentración de  $Ca^{2+}$  en el citosol, pero el  $Ca^{2+}$  es mucho menos usado como un mensajero intracelular que el AMPc (Alberts, et al., 1989).

Se mencionó anteriormente que las células blanco para la FSH en gallinas adultas son las células de la granulosa presentes en los folículos, mientras que para la LH son tanto las células de la granulosa como las células de la teca, teniendo un procedimiento de recepción y activación en la producción de AMPc, similar a la primera (Patton, et al., 1989; Steiner y Cameron, 1989).

La FSH incrementa la actividad de enzimas responsables de la producción de progesterona una vez que las células tecaes produjeron androstenediona, la cual cruza la lámina basal del folículo y entra a las células de la granulosa y es convertida en estrógenos por las enzimas aromatasas que se encuentran en mitocondrias y retículo endoplasmático en un proceso que involucra interconexiones con varias vías enzimáticas (Patton, et al., 1989; Steiner y Cameron, 1989).

Para continuar, será necesario revisar los trabajos realizados anteriormente, que de alguna manera se relacionan con el tema y poder así tener una base para el presente trabajo.

#### ANTECEDENTES.

Existen pocos reportes concernientes a las funciones de la FSH circulante en aves, debido principalmente a la baja probabilidad de obtenerla pura.

Un estudio que analizó niveles de FSH en sangre de pollos, muestra un incremento de la hormona aproximadamente 14-15 hrs. antes de la ovulación (Scanes, et al., 1977; Bahr, y Johnson, 1991). Con ésto se asume que la FSH está involucrada en la selección y crecimiento folicular en el pollo, debido a la presencia de receptores y respuesta a FSH en el sistema adenilato ciclasa en el ovario (Calvo y Bahr, 1983; Ritzhaupt y Bahr, 1987; Bahr, y Johnson, 1991).

Sin embargo, el papel de la FSH en eventos preovulatorios y en la ovulación, necesitan ser estudiados con mayor detenimiento.

Se sabe que las células de la granulosa de pequeños folículos (F5-F3) (Según Nakamura, et al., 1979) preovulatorios son inicialmente células blanco a FSH como se ha visto en estudios *in vitro* e *in vivo* (Bahr y Johnson, 1991).

Las células de la granulosa de pequeños folículos preovulatorios (F5-F3) (Idem, 1979) con un número grande de receptores a FSH, muestran una mayor respuesta a FSH en el sistema adenilato-ciclasa y producen más progesterona en respuesta a la hormona que las células de la granulosa de los folículos preovulatorios m s grandes (F2-F1) (Hammond, et al., 1981a, b; Calvo y Bahr,

1983; Johnson, 1986; Ritzhaupt y Bahr, 1987; Bahr, y Johnson, 1991).

En contraste, las células de la granulosa de folículos preovulatorios más grandes son inicialmente regulados por LH (Calvo, et al., 1981; Hammond, et al., 1981).

Se han realizado trabajos en gallinas adultas y viejas han definido la baja producción de huevos con la edad tratándolos con FSH; ésto ha aportado datos como el decremento en el número de folículos atrésicos e incremento en el de folículos pequeños con vitelo amarillo, así como el número de folículos que empiezan el desarrollo folicular (Palmer y Bahr, 1988; Bahr y Johnson, 1991) demostrándose que la disminución de la postura se debe a la carencia de gonadotropinas; y a que el índice de folículos que entra en desarrollo, decrementa con la edad, ésto se debe a un cambio en la estimulación del ovario debido a que cambia el número de receptores a FSH presentes en las células de la granulosa (Palmer, 1989). Algunos trabajos de células en cultivo, sugieren que algunos factores de la teca regulan la producción de progesterona que realiza la granulosa (Lee y Bahr, 1989). Estudios posteriores demostraron que los andrógenos y el 17 $\beta$ -estradiol, esteroides producidos por la teca, suprimen la producción de progesterona por la granulosa, debido específicamente a un decremento en la actividad de enzimas que convierten el colesterol a pregnenolona y de pregnenolona a progesterona (Lee y Bahr, 1990). Sin embargo, el decremento

gradual en andrógenos y  $17\beta$ -estradiol por la teca durante la maduración del folículo preovulatorio puede ser necesaria para que la granulosa secrete progesterona en mayor cantidad, lo cual puede ser necesario para que surja la LH y con ello la ovulación, ya que el folículo que se aproxima a este evento incrementa la sensibilidad a LH (Scanes, et al., 1978; Johnson y van Tienhoven, 1984).

Existe un mayor número de trabajos realizados con LH en ovario embrionario y adulto, como el realizado por Teng y Teng en 1977, con ovarios de embriones de pollo a diferentes estadios de desarrollo, en los que observan la producción de estradiol y testosterona mediante la estimulación de gonadotropinas humanas y radioinmunoensayo en el medio de cultivo. Ellas observaron que el ovario derecho es dos veces más eficiente en la producción de testosterona que el izquierdo, y que en ambas gónadas, hay respuesta a la estimulación en todos los estadios de desarrollo, con un incremento en la producción de AMPc; sin embargo en el derecho fue 80% más alta que en el izquierdo, proponiendo entonces, que la capacidad del primero para secretar hormonas esteroides, no es afectada por la regresión. También afirmaron que responde a la hCG con un porcentaje más alto en la producción de testosterona que el izquierdo. En este último, la producción de estrógenos es de manera progresiva, de acuerdo a la edad del embrión. Sin embargo la capacidad del ovario embrionario

para responder tempranamente a la hCG, indica que ya existe el mecanismo para recibir gonadotropinas.

Experimentos posteriores de estas autoras (Idem, 1979) con embriones de pollo *in vitro*, en los que separaron los componentes celulares del ovario en germinales, fibroblásticos y epiteliales y los cultivaron por separado para observar la respuesta a la hCG a través de la secreción de esteroides, mostraron que las células epiteliales de ambos ovarios de embriones de 12 días, producen aproximadamente la misma cantidad de E<sub>2</sub> y T. Sin embargo, con incremento en la edad, fue disminuyendo a la mitad la síntesis de hormonas esteroides y la respuesta a la estimulación con hCG en el ovario derecho, respecto al ovario izquierdo. Esto puede deberse al decremento en la secreción de toda la población celular por estar en regresión.

Usando LH equina y ovina y FSH equina y ovina *in vitro* en ovarios de embrión de pollo, Teng y Teng (1982) observaron que hay máxima estimulación con LHc de ambos ovarios, incrementando la producción de 17 $\beta$ -estradiol y testosterona. Las LHc y LHo, fueron más activas que las FSH, pero el grado de estimulación en la producción de 17 $\beta$ -estradiol fue sólo escasamente más alta para ambas LH que para las FSHs. Basándose en trabajos en que la LH de aves y mamíferos estimulan la producción de progesterona en células de la granulosa *in vitro* (Huang, et al,

1979; Scanes y Fagioli, 1980) y en sus resultados, proponen que los receptores en ovario de pollo son más sensibles a LH que a FSH.

Weniger y Chouraqui (1988) mantuvieron *in vitro* células de gónadas femeninas de 7 a 18 días de desarrollo, en presencia y ausencia de LH bovina, determinaron por la técnica de radioinmunoensayo la cantidad de estradiol en el medio de cultivo. Sus resultados demuestran que la LH estimula la secreción de estradiol en todos los estados de desarrollo ovárico estudiados. Sin embargo, este coeficiente de estimulación es más alto para los estados más jóvenes y con un tratamiento de LH en concentración de 10ng/ml. La estimulación a la síntesis de estradiol por LH en estados jóvenes les sugirió que el número de receptores por célula secretora de estradiol, disminuye con la edad. Por otro lado, se ha observado que en estado normal de desarrollo, hay una aparente ausencia de la acción de la LH para tiempos de igual desarrollo, pero esto sólo se aclarará con la caracterización de los receptores a LH. Por otro lado, Woods, et al., (1989) realizaron trabajos en los cuales mediante la técnica de inmunocitoquímica, cuantificaron la LH gonadal en embriones intactos y en embriones hipofisectomizados, para dilucidar el mecanismo involucrado en la iniciación de la regulación de LH gonadal y la síntesis y secreción de T y E<sub>2</sub>. Los resultados muestran la presencia de

LH en el plasma de embriones de pollo masculinos y femeninos desde el día 10.5, el primer día examinado, hasta el día 18.5. También indican que el origen de LH en plasma es de la pituitaria, ya que embriones de ambos sexos hipofisectomizados son estadísticamente menores a los niveles que muestran los embriones intactos y con trasplante de hipófisis se elevan los niveles de LH en plasma a niveles similares a los de los controles.

Observaciones en las células intersticiales muestran cambios de forma de estelada a oval, lo que indica que las células intersticiales de forma estelada, no responden a la LH en el inicio del desarrollo y subsecuentemente estas células se diferencian bajo la influencia de elevados niveles de LH plasmática, cambiando a forma oval, lo que provoca un incremento en número y por lo tanto un aumento en la capacidad de síntesis de hormonas esteroides. Esto sugiere un mecanismo por el cual la hipófisis vía LH, inicia la regulación de la síntesis de T y E<sub>2</sub> gonadal y la secreción por las gónadas de embrión de pollo.

Nakamura, et al., (1991) realizaron trabajos *in vivo* para observar la actividad de análogos de LHRH en polluelos de 60 días de edad, basándose en la capacidad para incrementar la concentración de LH circulante. Esto lo hicieron con inyecciones intravenosas a diferentes concentraciones, induciendo incrementos significativos de LH en el plasma. Observaron máxima respuesta a los 2 min. después de la inyección, y que la LHRHs de aves tiene una actividad biológica más alta que la de mamíferos en pollos.

Otros investigadores (González-Morán, et al., 1985 y González del Pliego, et al., 1988) han realizado estudios en los cuales inyectaron hCG en embriones de pollo, al nacimiento diseccionaron el ovario izquierdo e hicieron observaciones morfológicas en él, encontrando que el volumen de los cordones de células intersticiales aumenta en los ovarios de los animales tratados, presentando gotas de lípidos más prominentes en el citoplasma; simultáneamente, observaron un incremento en el contenido de proteínas.

Hay también, un aumento en los canales vasculares de la médula externa de los ovarios tratados, lo que se interpreta como una reacción acoplada a la estimulación glandular. Con microscopía electrónica han observado que la respuesta es a nivel de un incremento en el área del citoplasma y área de mitocondrias en las células esteroidogénicas. También en las células poco diferenciadas hay signos de estimulación, lo que sugiere que hay una transformación de las células de los cordones intersticiales en esteroidogénicas. En las células epiteliales del sistema lacunar, hay estímulo en organelos citoplasmáticos. Estas evidencias sugieren que células indiferenciadas persisten en la médula ovárica hasta el nacimiento y pueden transformarse a células esteroidogénicas bajo estimulación gonadotrópica.

Los pocos estudios concernientes a la función de la FSH, tratan en forma somera la función que tiene en adultos sobre todo a nivel folicular, ya que actúa sobre las células de la granulosa y la función como hormona estimuladora en la producción de hormonas ováricas como el  $17\beta$ -estradiol y andrógenos; también los hay que tratan su química y bioquímica, sin embargo, no existen investigaciones relacionadas con su acción en ovario embrionario sobre todo *in vivo* ya que hay reportes de su acción en células ováricas embrionarias pero en medio de cultivo.

De ahí que surge la necesidad de realizar un trabajo que proporcione datos acerca de la acción de la FSH sobre células de ovario embrionario *in vivo*.

Para ello es necesario plantear una hipótesis de trabajo y comprobarla a través de los objetivos trazados.

#### HIPOTESIS.

El ovario de pollo recién nacido responden al estímulo con FSH inyectada durante el desarrollo embrionario.

#### OBJETIVOS.

- Observar qué zonas del ovario responden a la hormona folículo estimulante (FSH).
- Hacer estudios morfométricos de las zonas del ovario que respondieron a la FSH, así como sus cambios histológicos.

## MATERIAL Y METODO

Se obtuvieron huevos fértiles (800) de pollos White Leghorn en una granja de la Ciudad de México. Fueron incubados en el laboratorio a 37°C en una incubadora con humedad y ventilación constantes hasta la eclosión. En el día 10 de incubación, mediante ovoscopia, se observó el grado de desarrollo.

Los que se encontraron en buenas condiciones de desarrollo se limpiaron con un algodón humedecido en alcohol 70° y se colocaron con el eje mayor del huevo de manera horizontal en las cajas de cartón. Posteriormente se perforaron los huevos con una aguja de disección por la parte roma, en la cámara de aire, haciendo un orificio con una segueta aproximadamente a 1.5 cm. de ella de manera que no se perforara ninguna membrana, sólo el cascarón. Se colocó suero fisiológico sobre esas membranas (Solución de NaCl 0.9%) y con unas pinzas de punta roma muy fina, se procedió a hacer un pequeño orificio en la membrana externa. Con un bulbo se succionó a través del orificio de la cámara de aire para que se separara y bajara la membrana corioalantoidea junto con el embrión y evitar derrame sanguíneo y la muerte del embrión.

Posteriormente, se retiró la membrana externa con ayuda de unas pinzas para que quedara libre el orificio el cual se tapó con cinta adhesiva, lo mismo que el orificio de la cámara de aire. Los huevos se colocaron nuevamente en la incubadora y se esperó al 13o. día de incubación.

Los embriones se trataron con 100µl de FSH (fertinorm, Serono, 75 U.I.) en concentraciones de 1µg y 40µg diluida en medio de Dulbecco (Dibco) que fue también el medio con el cual se trataron los controles. Esta cantidad se aplicó a los 13, 15 y 17 días de incubación, sobre la membrana corioalantoidea.

Una vez terminado el desarrollo, dentro de las 24hrs. después de la eclosión, los pollos se sacrificados por decapitación, y se diseccionaron los ovarios, los cuales se fijaron en una solución de glutaraldehído:paraformaldehído (gluta:para) (MERCK) [6:3] diluido en buffer de Collidina (MERCK) con sacarosa pH 7.2, 0.05M. Los ovarios se seccionaron a la mitad y éstas se lavaron con buffer de Collidina sin sacarosa por cinco veces durante 15 minutos cada vez, para posteriormente deshidratar con acetona gradual (30°, 50°, 60°, 70°, 80°, 90°, 100°). Una vez realizado ésto, se procedió a preincluir los órganos durante 24hrs. en una mezcla de componente A + catalizador de un Kit de JB4 (Poliscience, Inc.). Pasado el tiempo de preinclusión, se procedió a incluirlos en cápsulas Been a temperatura ambiente y sin oxígeno en una mezcla de Componente A + Catalizador + Componente B, en una proporción de 1:25 (Sol. A + Cat.:Comp. B).

Obtenidos los órganos incluidos, se procedió a hacer cortes de 0.8µm en un ultramicrotomo (American Optical), los cuales se tificaron con azul de toluidina y se montaron para hacer

observaciones al microscopio de luz (A.O. Scientific Instrument. One-Hundred).

En el microscopio de luz se hicieron observaciones histológicas para comparar los ovarios de los animales a los que se aplicaron las diferentes concentraciones de la hormona y anotar, si había, las diferencias observadas en la médula ovárica.

Se realizó un estudio morfométrico en ovarios de los tres lotes, mediante una cámara lúcida (American Optical) puesta en un microscopio de luz, con la cual se hicieron tres dibujos de los cortes observados a 100x sobre un cuadro en papel de  $13946.1\mu\text{m}^2$  teniendo en total una área por individuo de  $41838.3\mu\text{m}^2$  marcando en diferentes tonos los vasos sanguíneos, los cordones de lípidos y los ovocitos presentes en la médula subcortical. A partir de ello, se hizo el conteo de área que ocuparon cada uno de los componentes mediante el método de conteo de puntos que ocupan sobre una laminilla con distancia de cada punto de 0.5cm. Posteriormente se obtuvo la proporción total de las áreas de cada componente con respecto al área total del cuadro (1680 puntos) para obtener la relación de volumen/volumen.

Obtenidos estos resultados, se procedió a aplicar la prueba "t" de Student para saber si los diferentes tratamientos presentaban diferencias significativas según los parámetros de comparación (cordones de lípidos, vasos y células no diferenciadas).

Para saber si los cordones presentes en la médula subcortical eran de lípidos, se procedió a aplicar la prueba con colorante Rojo "O" de aceite en cortes en congelación hechos con criostato (American Optical), de ovarios fijados en formol al 10%.

Se tomaron fotomicrografías de los cortes, en un fotomicroscopio Zeiss III con un rollo blanco y negro de asa 50.

## RESULTADOS.

En la médula subcortical de los ovarios, se aprecian diferencias evidentes entre los distintos tratamientos. En los ovarios control es posible observar que los vasos del sistema lacunar no invaden esta zona, mientras que los sanguíneos sí están presentes. (Fig. 3a). Las células endoteliales de los vasos de la médula subcortical se encuentran aplanadas. Es posible apreciar también que los cordones de las células intersticiales, no son abundantes, por lo que es fácil delimitarlos dentro de la gran cantidad de tejido intersticial ovárico presente a pesar de su forma irregular y tamaño variable (Fig. 3a). Las células productoras de lípidos de los cordones intersticiales, presentan inclusiones pequeñas y uno o dos nucleolos (Fig. 3a).

Dentro del tejido intersticial fué baja la probabilidad de encontrar células aisladas produciendo inclusiones lipídicas, por lo regular sólo están en los cordones.

En los ovarios tratados con  $1\mu\text{g}$ . de hormona FSH es posible notar que los vasos de la médula subcortical son más grandes que en los no tratados, por ésto es difícil diferenciar de manera precisa entre los pertenecientes al sistema lacunar y los sanguíneos (Fig. 3b).

Estos vasos presentan células endoteliales claramente más grandes debido al estímulo, no se encuentran aplanadas (Fig. 3b).

Cercanos a estos vasos es posible observar tanto células germinales como intersticiales, que ambos parecen encontrarse en proceso degenerativo.

Por encontrarse más vasos en esta zona subcortical, existe menos tejido intersticial que en los controles, sin embargo, los cordones intersticiales se delimitan fácilmente y parecen ser más grandes (Fig. 3b).

Los núcleos de las células productoras de lípidos de estos cordones, presentan más de dos nucléolos (4-6) y las células indiferenciadas intersticiales presentan un número semejante de ellos. Es posible observar, en el tejido intersticial, algunas células aisladas produciendo inclusiones lipídicas (Fig. 3b).

Finalmente, en los ovarios tratados con 40µg. de FSH, es posible observar que los vasos casi no invaden la médula subcortical, es decir, se observan muy pocos y no presentan las células endoteliales grandes (Fig. 3c).

Los cordones de células intersticiales se presentan abundantemente y son difícilmente delimitados porque se continúan unos con otros hasta formar uno muy grande de forma irregular (Fig. 3c). De esta manera, el tejido intersticial observado es mucho menor que los ovarios controles y los tratados con 1µg de hormona. Las células de estos cordones presentan inclusiones lipídicas más grandes en comparación a los otros tratamientos y sus núcleos presentan más de dos nucléolos (3-5), además, las células

indiferenciadas del intersticio parecen presentar un número mayor de nucléolos que las anteriormente mencionadas (5-7) (Fig. 3c). Hay también, un número mayor de células aisladas con inclusiones lipídicas (Fig. 3c).

En la Fig. 4 es posible observar un aumento de las áreas fuertemente teñidas con rojo "o" en el ovario tratado con 40  $\mu$ g de FSH (Fig. 4b), lo que indica una mayor área de zonas con lípidos en comparación a los controles (Fig. 4a).

Al hacer la morfometría, se encontró que la mayor modificación observada en los ovarios tratados con 1  $\mu$ g de FSH, fué que presentan mayor área vascular, respecto a los controles; lo que representa una diferencia considerable. Existe también un aumento menos significativo, aunque no menos importante, en el área ocupada por los cordones de células intersticiales, lo mismo que en el área que ocupa el intersticio (Tabla 1) (Fig. 1).

Cabe mencionar que en estos ovarios hay un aumento significativo en el número de ovocitos presentes cerca a los vasos, en comparación a los otros tratamientos. Presentan también, un aumento en el número de núcleos presentes en los cordones intersticiales (Fig. 2).

Por otro lado, las modificaciones más relevantes en los ovarios tratados con 40  $\mu$ g de FSH, son el aumento en el área de los cordones de células intersticiales y la disminución en el área de intersticio (Fig. 1). Aunado a ésto, es posible observar que hay

un aumento también en el número de núcleos de los cordones de células intersticiales y un incremento poco significativo en el área ocupada por los vasos (Tabla 1). Existe además, una disminución poco relevante en el número de ovocitos presentes en los vasos y tejido intersticial (Tabla 1).

Tabla I.

	Cordones (v/v)	Vasos (v/v)	Intersticio (v/v)	Ovocitos (No.)	Núcleos/1328 $\mu\text{m}^2$ (No.)
Control (n=7)	13.28:0.68	9.55:1.17	76.30:1.11	1.28:0.92	13.00:2.80
1 $\mu\text{g}$ (n=7)	21.20:1.93 **	24.90:1.96 ***	53.98:1.60 ***	6.14:1.61 **	20.75:4.21 **
40 $\mu\text{g}$ (n=7)	72.40:4.60 ***	5.02:1.40 *	22.49:3.58 ***	0.81:0.33 n.s.	70.87:2.17 ***

Resultados morfológicos del efecto de la FSH en 41838.3  $\mu\text{m}^2$  de la médula subcortical ovarica de pollo recién nacido, aplicada durante etapa embrionaria. Los valores son expresados con la media error estandar. P=0.05 (\*); P=0.005 (\*\*); P=0.001 (\*\*\*); n.s.=no significativo.

(v/v)

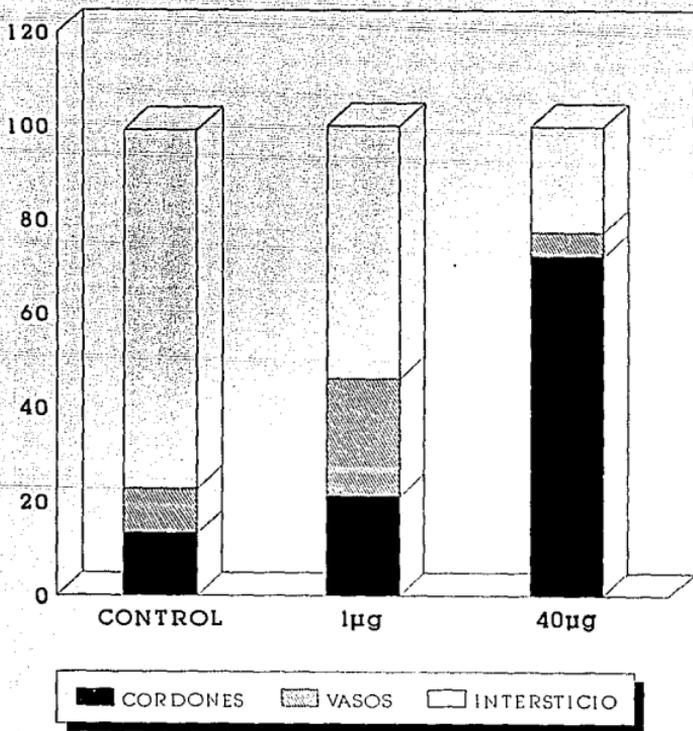
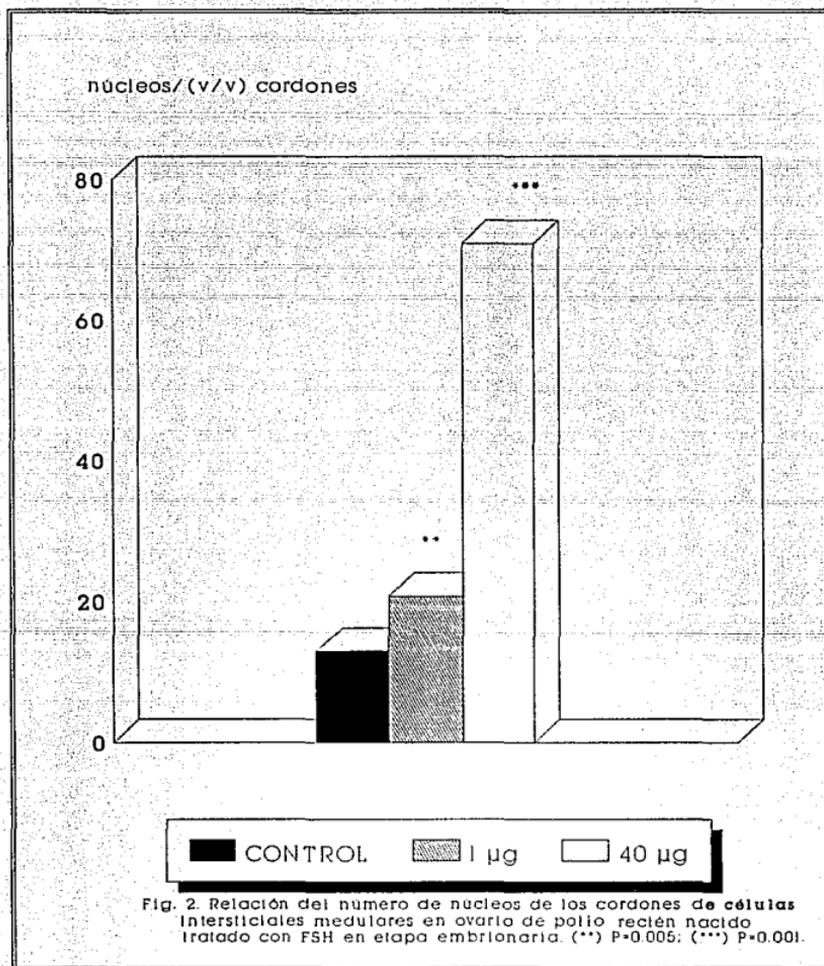
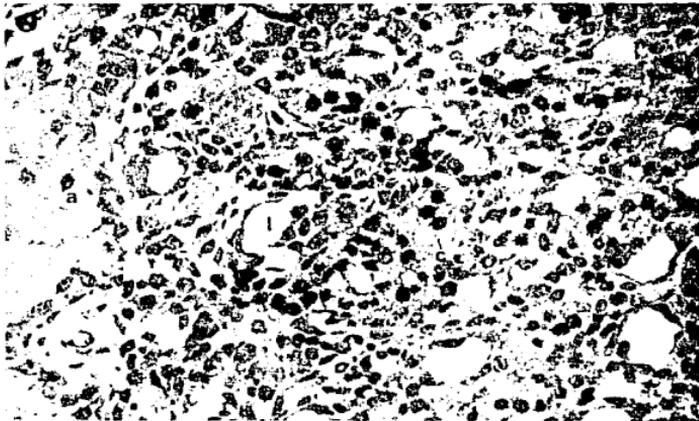


Fig. 1. Comparación del volumen de los componentes de la médula subcortical de ovario de pollo recién nacido, tratado con FSH en etapa embrionaria.





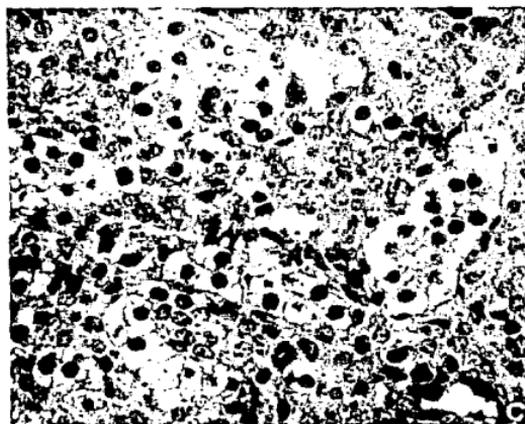
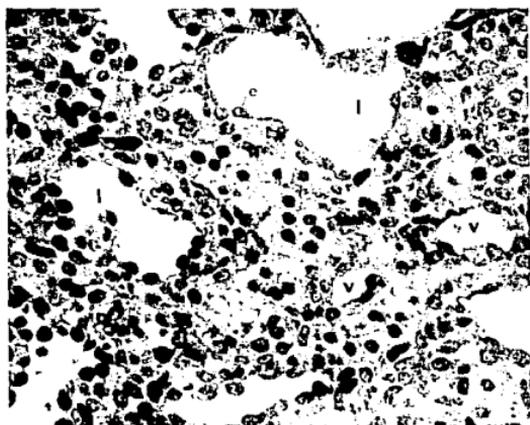
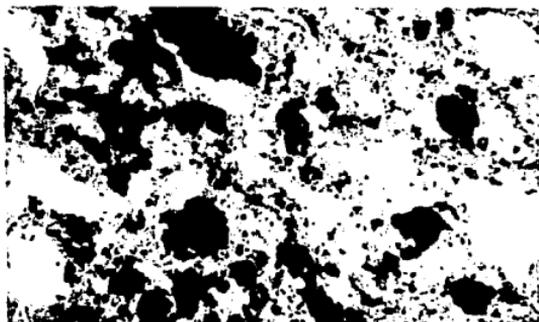


Fig. 3. Histología de la médula subcortical del ovario izquierdo de pollo recién nacido.

A) Ovario Control. Se observa corteza (a), vasos sanguíneos con células endoteliales planas (v), canales del sistema lacunar fácilmente diferenciables de vasos sanguíneos (l) y cordones de células intersticiales con inclusiones lipídicas (c). 500x

B) Ovario tratado con 1µg. de FSH. En la médula hay un incremento de los cordones de las células intersticiales (c) y gran desarrollo de los vasos sanguíneos (v) y del sistema lacunar (l). Las células endoteliales se ven estimuladas (e). 500x

C) Ovario tratado con 40µg. de FSH. En la médula hay un incremento mayor al de 1µg. en los cordones de células intersticiales (c). Hay pocos vasos sanguíneos (v). 500x



**Fig. 4. Prueba de Rojo "o" de aceite en ovario de pollo recién nacido control y tratado con 40  $\mu$ g. de FSH.**

**A)Ovario Control. Se observan vasos sanguíneos. Zonas con mayor tinción representan las regiones donde se encuentran los lípidos.**

**B)Ovario tratado con 40 $\mu$ g. de FSH. Hay pocos vasos y se aprecia mayor cantidad de zonas con tinción que reconoce las áreas con lípidos. 320x.**

## DISCUSION

Este trabajo se realizó con embriones de pollo debido principalmente a la facilidad su manejo; es decir, es más fácil conseguir el huevo fértil para poder incubarlo y manipularlo en laboratorio, no se necesita de la madre para la incubación y desarrollo del embrión, el tiempo de desarrollo embrionario es corto (21 días), características que los hacen ventajosos en comparación a cualquier mamífero.

Se trabajó con FSH porque se ha observado que el ovario de pollo responde a la estimulación con gonadotropinas durante el desarrollo embrionario. Esto ha sido demostrado por varios autores con trabajos in vitro (Cedard, et al., 1968; Teng y Teng, 1977, 1979, 1982; Woods, et al., 1981) y se ha comprobado con trabajos realizados in vivo (González-Morán, et al., 1985; González del Pliego, et al., 1988). Además porque existen muy pocos trabajos realizados con esta hormona específicamente en estado embrionario de pollo in vivo.

Las dosis utilizadas son el resultado de una curva dosis-respuesta, siendo dosis fisiológicas.

La hormona se aplicó los días 13, 15 y 17 porque se han realizado trabajos en los cuales al aplicar gonadotropinas antes del día 13 de desarrollo no hay respuesta en el ovario en cuanto a la producción de testosterona, lo que indica que el desarrollo del ovario está libre de la influencia de las hormonas

hipofisiarias (Fugo, 1940; Teng y Teng, 1977). Con ésto se indica que las gonadotropinas ejercen su influencia sobre el ovario alrededor del día 13 de incubación en que se forma el eje hipotálamo-hipófisis-ovario (Woods y Weeks, 1969). Así se asegura que la hormona estimula el crecimiento gonadal y la esteroidogénesis en el ovario (Woods, et al., 1981; Woods, 1987) o por lo menos ocurre alguna respuesta.

La acción de la hormona se observó específicamente en la médula subcortical ovárica ya que existen varios trabajos en los que se reporta la acción de gonadotropinas sobre los componentes de ésta (González-Morán, 1985; González del Pliego, et al., 1988) y su efecto sobre la producción de esteroides (Cedard, et al., 1968; Akram y Weniger, 1974; Teng y Teng, 1977, 1979, 1982; Guichard, et al., 1979; Woods, et al., 1981) que, mediante otros trabajos se sabe, se realiza en los cordones medulares ováricos (Narbaitz, et al., 1963; Narbaitz y Kolodny, 1964; Narbaitz y Adler, 1966; Woods y Domm, 1966; Narbaitz y Robertis, 1968; Scheib y Haffen, 1969; González-Morán, et al., 1985; González del Pliego, et al., 1988).

Después del tratamiento con FSH es posible observar que existe un aumento en el volumen de los cordones de células intersticiales medulares conforme aumenta la concentración de la hormona, ésto sugiere inicialmente que estas células del ovario de pollo tienen receptores a gonadotropinas en etapas tempranas. En trabajos realizados con LH (González-Morán, et al., 1985; González del

Pliego, et al., 1988) es posible observar un aumento en estos cordones de células intersticiales. Esto indica que las células de estos cordones responden al estímulo por ambas gonadotropinas aunque no se sabe si al mismo nivel o en la misma cantidad. Para aclarar esto es necesario realizar técnicas de inmunohistoquímica para saber qué tipo de receptores y en qué cantidad se encuentran en estas estas células a esta edad.

El estímulo en las células poco diferenciadas del intersticio en torno a los cordones de células con inclusiones lipídicas, indica probablemente, que estas células también son estimuladas por la hormona ya que se observan células aisladas en el intersticio que presentan la formación de pequeñas gotas de lípidos en su citoplasma, siendo tal vez la explicación del aumento en el volumen de los cordones de células intersticiales después del tratamiento con la hormona (principalmente con 40  $\mu$ g). Aunado a esto, el aumento en el número de núcleos en una área determinada indica posiblemente que este volumen se debe a una diferenciación de las células intersticiales indiferenciadas hacia células formadoras de inclusiones lipídicas y no a que las células de los cordones intersticiales se dividieran, ya que es muy difícil que una célula diferenciada se divida.

Es necesario hacer notar que en las células intersticiales no diferenciadas, se observa un mayor número de nucléolos en los ovarios tratados, número que es mayor conforme aumenta la

concentración hormonal. Esto puede indicar que la hormona actúa en este tipo celular ya que este aumento en el número de nucléolos indica que las células están produciendo ARN ribosomal para empezar a sintetizar proteínas que conlleven a una diferenciación, posiblemente hacia células con inclusiones lipídicas o bien, sintetizadoras de esteroides. Para verificar ésto es necesario realizar posteriormente estudios a nivel de inmunocitoquímica y radioinmunoensayo en cada población celular ovárica para saber cuál es la que realmente está siendo estimulada con la FSH.

Estudios previos con LH y FSH con ovarios de embriones de pollo *in vitro*, no muestran cambios significativos en los cordones de células medulares (Grassi-Milano y Pitini, 1978), la diferencia con los trabajos *in vivo* pueden deberse a las distintas condiciones experimentales.

El sistema lacunar presenta un desarrollo importante en los ovarios tratados con 1  $\mu$ g de FSH. Esto pudiera interpretarse como la existencia de una estimulación con la hormona a nivel glandular (Callebaut, 1979).

Las células endoteliales de estos canales vasculares se ven más grandes lo que indica que han sido estimuladas pero será necesario realizar estudios posteriores principalmente de microscopía electrónica para ver en qué consiste realmente esta estimulación.

#### CONCLUSIONES.

Se concluye finalmente que la médula subcortical del ovario de pollo recién nacido, sí presenta estimulación durante el tratamiento prenatal con FSH tanto en el volumen de los cordones de células intersticiales como en el desarrollo del sistema lacunar y, posiblemente, en las células intersticiales indiferenciadas.

## BIBLIOGRAFIA

-Akram, H. y Weniger, J. P. 1974. L'hypophyse est sans influence sur la synthèse d'oestrogènes chez l'embryon de Poulet. C. R. Acad. Sci. Ser. D 278:2669-2670.

-Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. y Watson, J. D. 1989. Molecular Biology of The Cell. 2nd. Edition. Garland Publishing, Inc. New York/London. p.p.694-705.

-Assenmacher, I. 1958. Recherches sur le controle hypothalamique de la fonction gonadotrope préhypophysaire chez le canard. Arch. Anat. Microscop. Morphol. Exp. 47:447.

-Bahr, J. M y Johnson, P. A. 1991. Reproduction in Poultry in "Reproduction in Domestic Animals". Cupps, P. T. ed. 4th. edition. Academic Press. Inc. New York. Chapter 17.

-Balinsky, B. J. 1982. Introducción a la Embriología. B., J. Balinsky, B. C. Fabian. 5ed. Barcelona. Omega. 727 p.

-Baltimore, D., Lodish, H., y Darnel, J. 1990. Molecular Cell Biology. 2nd. Edition. Scientifics American Books. Eds. Freeman and Company, New York.

- Benoit, J. 1950. Organes Uro-genitaux in "Traite de Zoologie". Vol. 15. (P. P. Grase ed.) Paris:Mason.
- Bradley, O. C. 1960. Structure of the Powl. 4th. ed. Revised by T. Grahame, Oliver and Boyd, Edinburgh.
- Braselton W. E. Jr., y McShan, W. H. 1970. Purification and properties of follicle-stimulating and luteinizing hormones from horse pituitary glands. Arch. Biochem. Biophys. 139:45-58.
- Cahill, C. L., Shetlar, M. R., Payne, R. W., Endecott, B., y Li, Y.-T. 1968. Isolation and characterization of ovine follicle stimulating hormone. Biochim. Biophys. Acta. 154:40-52.
- Callebaut, M. 1968. [<sup>3</sup>H] Uridine incorporation during previtellogenesis and early vitellogenesis in the oocytes of the chick (*Gallus gallus*). J. Embryol. Exp. Morphol. 20:169-174.
- Callebaut, M. 1979. The avian ovary is an open organ. Anat. Embryol. 158:103-119.
- Calvo, F. O., Wang, S.-C. y Bahr, J. M. 1981. LH-stimulable adenylyl cyclase activity during the ovulatory cycle in granulosa cells of the three largest follicle and the postovulatory follicle of the domestic hen (*Gallus domesticus*). Biol. Reprod. 25:805.

-Calvo, F. O. y Bahr, J. M. 1983. Adenylyl Cyclase system of the small preovulatory Follicles of the Domestic Hen: Responsiveness to Follicle-stimulating Hormone and Luteinizing Hormone. Biol. Reprod. 29;547-542.

-Cedard, L., Haffen, K., y Guichard, A. 1968. Influence de l'hormone gonadotrope chorionique sur la production d'oestrogènes à partir d'acetate de Na et de déhydroépiandrosterone radioactifs par les gonades embryonnaires de Poulet, cultivés in vitro. C. R. Acad. Sci. Ser. D 267:118-120.

-Clifton, D. K. 1989. The Anterior Pituitary in "Textbook of Physiology". Chapter 63. Patton, Fuchs, Hille Eds. Vol. 2. 21st. Edition. W. B. Saunders company. p.p. 1202-1214.

-Cole, H. H. y Cupps. P. T. 1959. Reproduction in Domestic Animals II. Academic Press. New York.

-Cook, D. L. 1989. The Cellular Biology of the Endocrine System: An overview. In "Textbook of Physiology". Chapter 59. Patton, Fuchs, Hille eds. Vol. 2. 21st. Edition. W. B. Saunders Company. p.p. 1139-1159.

-Crawford, R. D. 1990. Poultry Breeding and Genetics. Canada. Elsevier.

-Chester-Jones, Ingleton, P. M. y Phillips, J. G. 1987. The Structure and function of the hypothalamus and pituitary gland In "Fundamentals of Comparative Vertebrate Endocrinology". I. Chester-Jones, P. M. Ingleton, J. G. Phillips eds. p.p. 281-361.

-Daikoku, S., C. Ikeuchi, y H. Nakagawa. 1974. Development of the hypothalamohypophyseal unit in the chick. Gen. Comp. Endocrinol. 23:256-275.

-De Alba, J. 1985. Reproducción Animal. La Prensa Médica Mexicana, S. A. México, D. F. p.p. 501-522.

-D'Hollander, F. 1904. Recherches sur l'oogenèse et sur la structure et la signification du noyau vitellin de Balbiani chez les oiseaux. Arch. Anat. Microsc. 7:117-180.

-Dokocil, M. 1970. Development of the chick hypophysis. Acta Univ. Carol. [Med.] (Praha), 40:1-131.

-Dubois, R. 1967a. Localisation et migration des cellules germinales du blastoderme non-incubée de poulet d'après les résultats de cultures in vitro. Arch. Anat. Microsc. Morphol. Exp. 56:245-254.

-Dubois, R. 1967b. Sur l'origine et l'amoeboidisme des cellules germinales primordiales de l'embryon de poulet en culture in vitro et leur localisation dans le germe non incubée. C. R. Acad. Sci. Paris. 265:497-500.

-Dubois, R. 1969. Le mécanisme d'entrée des cellules germinales primordiales dans le réseau vasculaire chez l'embryon de Poulet. J. Embryol. Exp. Morphol. 21:255-270.

-Dubois, R., y Croiselle, Y. 1970. Germ cell line and sexual differentiation in birds. Phil. Trans. R. Soc. London ser. B. 259:73-89.

-Follett, B. K., Scanes, C. G., y Cunningham, F. J. 1972. A radioimmunoassay for avian luteinizing hormone. J. Endocrinol. 52:359-378.

-Fugo, N. W. 1940. Effects of hypophysectomy in the chick embryo. J. Exp. Zool. 85:271-297.

-Furuya, T. y Ishii, S. 1974. Separation of chicken adenyhypophysial gonadotropins. Endocrinol. Japon. 21:329-334.

-Gasc, J. M. 1978. Growth and sexual differentiation in the gonads of chick and duck embryos. J. Embryol. Exp. Morph. Vol. 44. p.p. 1-13.

-Gasc, J. M. y Sar, M. 1981. Appearance of LH-immunoreactive cells in the Rathke's pouch of the chicken embryo. Differentiation 20:77-80.

-Ginsberg, M. y H. Eyal-Giladi. 1987. Primordial germ. cells of the young chick blastoderm originate from the central zone of the area pellucida irrespective of the embryo forming process. Development. 101:209-219.

-Gilbert, A. B. 1969. Innervation of the ovary of the domestic hen. Q. J. Exp. Physiol. 54:404.

-Gilbert, A. B. 1971a. The Endocrine Ovary in Reproduction in "Physiology and Biochemistry of the Domestic Fowl", vol. 3. D. J. Bell and B. M. Freeman eds. Academic Press, London p.p. 1149-1468.

-Gilbert, A. B. 1971b. The Ovary in "Physvology and Biochemistry of the Domestic Fowl". F. J. Bell and B. M. Freeman eds. Academic Press, London/New York. p.p. 1163-1208.

-Gilbert, A. B. 1979. Female genital organs in "Form and Function in Birds". Vol. 1. King. A. S. and J. McLelland eds. Academic Press., London/New York. Chapter 5.

-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.

-González-Morán, 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.

-Godden, P. M. M. y Scanes, C. G., 1975. Studies on the purification and properties of avian gonadotropins. Gen. Comp. Endocrinol. 27:538-542.

-Gorbik, T. A., y Gabareva, N. S. 1975. Morphological alterations of the follicular epithelium in oogenesis of the Pekin duck (*Anas boschas domestica*) and other birds. Arch. Anat. Histol. Embriol. 68:16-24.

-Grassi-Milano, E., y Pitini, A. M. 1978. Effets morphologiques des hormones hypophysaires gonadotropes sur le développement de testicules et d'ovaries d'embryons de poulet en culture organotypique. Arch. Anat. Microsc. Morphol. Exp. 67:145-156.

-Greenfield, M. L. 1966. The oocyte of the domestic chicken shortly after hatching, study by electron microscopy. J. Embryol. Exp. Morphol. 15:297-316.

-Guichard, A., Haffen, K., Cedard, L., Mignot, Th-M., y Scheib, D. 1979. Effects of hCG and of season on in vitro steroidogenesis by 18-day chick embryo gonads. Ann. Biol. Anim. Biochim. Biophys. 19:1317-1325.

-Hammond, R. W., Koelkebeck, K. W., Scanes, C. G., Biellier, HJ. V., y Hertelendy, F. 1981. Plasma Prostaglandin, LH, and Progesterone levels during the Ovulation Cycle of the Turkey (Meteagres gallopavo). Gen. Comp. Endocrinol. 44:400-403.

-Hammond, R. W., W. H. Burke, y F. Hertelendy. 1981b. Influence of follicular maturation on progesterone release in chicken granulosa cells in response to turkey and ovine gonadotropins. Biol. Reprod., 24; 1048.

-Hardisty, M. W. 1978. Primordial germ cells and the Vertebrate germ line in "The Vertebrate Ovary". Jones, R. E. ed. Plenum Press. New York /London. p.p. 1-37.

-Hartree-Stockell, A. y Cunningham, F. J. 1969. Purification of chicken pituitary follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone. J. Endocrinol. 43:609-619.

-Harvey, S., C. G. Scanes y J. G. Phillips. 1987. Avian reproduction in "Fundamentals of comparative vertebrate endocrinology". I. Chester-Jones, p. M. Ingleton, J. G. Phillips Eds. p.p. 125-185.

-Hashimoto, C., McShan, W. H. y Meyer, R. K. 1965. Preparation of follicle-stimulating hormone from sheep pituitary glands. Biochim. Biophys. Acta. 21:120-125.

-Hashimoto, C., McShan, W. H. y Meyer, R. K. 1966. Purification and characterization of follicle-stimulating hormone from sheep pituitary glands. Biochemistry. 5:3419-33425.

-Hodges, R. D. 1974. The Histology of the Fowl. Academic Press. London/New York.

-Houillon, Ch. 1978. Sexualidad. Barcelona. Omega. p.p.201.

-Huang, E. S., Kao, K. J. y Nalbandov, A. V. 1979. Synthesis of sex steroids by cellular components of chicken follicles. Biol. Reprod. 20:454-461.

-Hughes, G. C. 1963. The population of germ cells in the developing female chick. I. Embriol. Exp. Morphol. 11:513-536.

-Johnson, A. L. 1986. Reproduction in the female in "Avian Physiology". Sturkie, P. D. ed. rth. edition. Springer-Verlag. New York. Chapter 18.

-Johnson, A. L. y van Tienhoven. 1984. Effects of aminoglutethimide on luteinizing hormone and steroid secretion and ovulation in the hen *Gallus domesticus*. Endocrinology, 114:2276.

-Jones, R. E. 1978. The Vertebrate Ovary. Comparative Biology and Evolution. Plenum press. New York and London. p.p. 853.

-Juitisz, M., Hermier, C., Colonge, A. y Courier, R. 1965. Purification et propriétés physicochimiques et biologiques de l'hormone folliclostimulante de mouton. Ann. Endocrinol. Paris. 26:670-682.

-Krishnan, K. A., Proudman, J. A. y Bahr, J. M. 1992. Purification and characterization of chicken follicle-stimulating hormone. Comp. Biochem. Physiol. 102B 67-75.

-Lee, H. T. y Bahr, J. M. 1989. Inhibitory sites of androgens and estradiol in progesterone biosynthesis in granulosa cells of the domestic hen. Endocrinology. 125:760-765.

-Lee, H. T. y Bahr, J. M. 1990. Inhibition of the activities of P450 cholesterol side-chain cleavage and  $3\beta$ -hydroxysteroid dehidrogenase and the amount of P450 cholesterol side-chain cleavage by testosterone and estradiol- $17\beta$  in hen granulosa cells. Endocrinology. 126:779-786.

-Lehninger, A. L. 1972. Biología. Las bases moleculares de la estructura y función celular. Prats. Barcelona. Omega. 887 p.

-Licht, P., Papkoff, H., Farmer, S. W., Muller, C. H., Tsui, H. W. y Crew, D. 1977. Evolution in gonadotropin structure and function. Rec. Progr. Horm. Res. 33:169-248.

-Mikami, S., T. Hashikawa, y D. S. Farner. 1973. Cytodifferentiation of the adenohypophysis of the domestic fowl. Z. Zellforsch. Mikrosk. Anat., 138:299-314.

-Moszkowski, A. 1949. Pouvoir corticotrope et gonadotrope de l'hypophyse de l'embryon de poulet. Comp. Rend. Soc. Biol. 143:1332.

-Nakamura, T., Nagata, T., Tanabe, Yuichi, Yanaiharà, N. y Hasegawa, Y. 1991. Comparison of *in vivo* biological activities of luteinizing hormone releasing hormone (LHRH) analogues in 60-day-old cockerels. Gen. Comp. Endocrinol. 83:290-296.

-Malvandov, A. V. y M. F. James. 1949. The blood-vascular system of the chicken ovary. Am. J. Anat. 85:347.

-Narbaitz, R. y Sabatini, M. J. 1963. Histochemical demonstration of cholesterol in differentiating chick gonads. Z. Zellforsch. 59:1-5.

-Narbaitz, R., y Kolodny, L. 1964.  $\Delta^5$ - $3\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase in differentiating chick gonads. Z. Zellforsch. 63:612-617.

-Narbaitz, R., y Adler, R. 1966. Submicroscopical aspects in chick gonad differentiation. J. Embryol. Exp. Morph. 16:41-47.

-Narbaitz, R. y De Robertis, E. M. 1968. Postnatal evolution of steroidogenic cells in the chick ovary. Histochemie. 15:187-193.

-Palmer, S. A. y Bahr, J. M. 1988. Biol. Reprod. 38 (suppl. 1), 184.

-Palmer, S. S. 1989. Follicle stimulating hormone and steroidogenesis in ovarian granulosa cells during aging in the domestic hen. Ph. D. disseration. University of Illinois, Urbana.

-Patton, H. D., Fuchs, A. F., Hille, B., Scher, A. M. y Steiner, R. 1989. "Textbook of Physiology". Vol. 2. 21st. Edition. W. B. Saunders Company. 1596 p.

-Pearson, R. 1972. The Avian Biology. Academic Press. London/New York. p.p. 414-424.

-Prochazkova, E. y Konarek, V. 1970. Growth of the zona vasculosa and zona parenchymatosa in postnatal development in the ovary in the chicken. Acta. Vet. Brno. 39:3-10.

-Reichert, L. E. Jr., Kathan, R. H. y Ryan, R. J. 1968. Studies on the composition and properties of immunochemical grade human pituitary follicle stimulating hormone (FSH): Comparison with luteinizing hormone (LH). Endocrinology. 82:109-114.

-Ritzhaupt, L. K. y Bahr, J. M. 1987. A decrease in FSH receptors of granulosa cells during follicular maturation in the domestic hen. J. Endocrinol. 115:303-310.

-Rogulska, T. 1969. Primordial germ cells in normal and transected duck blastoderms. J. Embryol. Exp. Morphol. 20:247-260.

-Ruíz D. Ma. Fernanda. 1988. Fundamentos de Embriología y Fisiología de la Reproducción. Recopilación de Textos básicos. U.N.A.M. Facultad de Ciencias. Depto. Biol. 375 p.

- Sakai, H. e Ishii, S. 1980. Isolation and characterization of chicken follicle-stimulating hormone. Gen. Comp. Endocrinol. 42:1-8.
- Scanes, C. G. y Follett, B. K. 1972. Fractionation and assay of chicken pituitary hormones. Brit. Poult. Sci. 13,603-610.
- Scanes, C. G., Godden, P. M. M. y Sharp, P. J. 1977. An homologous radioimmunoassay for chicken follicle-stimulating hormone: observations on the ovulatory cycle. Endocrinology 73:473.
- Scanes, C. G., Chadwich, A., Sharp, P. J. y Bolton, N. J. 1978. Diurnal variation in plasma luteinising hormone levels in the domestic fowl (*Gallus domesticus*). Gen. Comp. Endocrinol. 34:45-49.
- 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. Endocrinol. 41:1-7.
- Scheib, D. y Haffen, K. 1969. Apparition et localisation des hydroxystéroïde déshydrogénases ( $\Delta^5-3\beta$  et  $17\beta$ ) dans les gonades de l'embryon et dy poussin de la caille (*Coturnix coturnix japonica*). Etude histoenzymologique et comparaisons avec le poulet (*Gallus gallus domesticus*). Gen. Comp. Endocrinol. 12:586-597.

-Schwartz, W. J. y Domm, L. V. 1972. A study on division of primordial germ cells in the early chick embryo. Am. J. Anat. 135:51-70.

-Sherwood, O. D. Grimek, H. J. y McShan, W. H. 1970. Purification and properties of follicle-stimulating hormone from sheep pituitary glands. J. Biol. Chem. 245:2328-2336.

-Steiner, R. A. y Cameron, J. L. 1989. Endocrine Control of Reproduction in "Textbook of Physiology". Chapter 68. Patton, Fuchs, Hille. eds. vol.2. 21st. edition. W. B. Saunders Company. p.p. 1289-1342.

-Stritesky, J. y Z. Rychter. 1977. Contribution to the problem of the vascularization of the hypophysis cerebri in the chick embryo. Proc. XIXth Morphol. Cong. Folia Morphol., XXV:324-328.

-Sturkie, P. D. 1967. Fisiología Aviar. Acribia. p.p. 425-450.

-Sturkie, P. D. 1986. Avian Physiology. 4th. edition. Springer-Verlag. New York. p.p. 403-431.

-Talbot, R. T., Shasrp, P. J., Harvey, S., Williams, J. B., Dunn, I. C., Sterling, R. J. y Bahr, J. M. 1988. Comparison of the fractionation and assay of domestic duck and fowl pituitary gonadotropins. Br. Poult. Sci. 29:81-92.

-Teng, C. T. y Teng, C. S. 1977. Studies on sex organ development: The hormonal Regulation of Steroidogenesis and Adenosine 3':5'-Cyclic Monophosphate in Embryonic-Chick Ovary. Biochem J. 162:123-134.

-Teng, C. T., y Teng, C. S. 1979. Studies on sex Organ development: Separation and culture of steroid-producing cells from growing and regressing embryonic ovaries. Endocrinology. 104:1337-1343.

-Teng, C. T., Teng, C. S., Bousfield, G. R., Liu, W. K. y Ward, D. N. 1982. Differential Response of Growing and Regressing Chicken Ovaries to Gonadotropic Hormones. Gen. Comp. Endocrinol. 48:325-332.

-Thommes, R. C. y Russo, R. P. 1959. Vasculogenesis in the adenohipophysis of the developing chick embryo. Growth. 23:205-219.

-Tokarz, R. R. 1978. Oogonial proliferation, oogenesis, and folliculogenesis in nonmammalian vertebrates in "The Vertebrate ovary". Plenum Press. London/ New York.

-van Limborgh, J. 1968a. Number and distribution of the primary germ cells in the early post-somite stages ducks embryos. Arch. Morphol. Neerl.-Scand. 7:117-144.

-van Limborgh, J. 1968b. Le premier indice de la différenciation sexuelle des gonades chez l'embryon de poulet. Arch. Anat. Microsc. Morphol. Exp. 57:79-90.

-van Tienhoven, A. 1959. Reproduction in the Domestic Fowl: Physiology of the Female in "Reproduction in Domestic Animals" II. Cole, H. H. y Cupps, P. T. Academic Press. New York.

-Vogel; N. W. 1956. Pituitary-Gonad. Relationship in the Chick embryo, PhD. Dissertation. Indiana University.

-Vogel, N. W. 1957. Free tissue cholesterol and growth in chick embryos hypophysectomized by "decapitation". Anat. Rec. 127:382.

-Wachtel, S. S. 1983. H-Y antigen and the biology of sex determination. Grune and Stratton, New York.

-Weniger, J. P. y Chouraqui, J. 1988. Action de LH sur la sécrétion d'oestradiol par l'ovaire embryonnaire de Poulet en culture in vitro. Reprod. Nutr. Dévelop., 28(6A), 1473-1477.

-Willier, B. H. 1955. Ontogeny of endocrine correlation in "Analysis of Development". B. H. Willier, P. A. Weiss, and V. Hamburger, eds. W. B. Saunders, Philadelphia, Section X., p.p. 574-619.

-Woods, J. E. y Domm, L. V. 1966. A histochemical identification of the androgen-producing cells in the gonads of the domestic fowl and albino rat. Gen. Comp. Endocrinol. 7:559-570.

-Woods, J. E. y Weeks, R. L. 1969. Ontogenesis of the pituitary-gonadal axis in the chick embryo. Gen. Comp. Endocrinol. 13:242-254.

-Woods, J. E., Mennella, J. A. y Thommes, R. C. 1981. The hypothalamic-adenohypophyseal-gonadal axes in the developing chick embryo. I. LH sensitivity. Gen. Comp. Endocrinol. 45:66-73.

-Woods, J. E., Hopkins, W. L., Caliendo, J., Sorrentino, M. J., Martens, J. B. y Thommes, R. C. 1985. Ontogenesis pars distalis of the chick embryo. In: Current Trends in Comparative Endocrinology. B. Lofts and W. K. Holmes, eds. Hong Kong University Press, Hong Kong, p.p. 131-134.

-Woods, J. E. 1987. Maturation of the hypothalamo-adenohypophyseal-gonadal (HAG) axis in the chick embryo. J. Exp. Zool. Suppl. 1:265-271.

ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA

-Woods, J. E., Scanes, C. G., Seeley, M., Cozzi, P., Oneise, F.,  
y Thommes, R. C. 1989. Plasma LH and gonadal LH-binding cells in  
normal and surgically decapitated chick embryos. Gen. Comp.  
Endocrinol. 74:1-13.