

24
201



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

EFFECTO DE LA HORMONA GONADOTROPINA
CORIONICA HUMANA, SOBRE LAS DISTINTAS
SUBPOBLACIONES CELULARES DEL OVARIO
PREFOLICULAR DE *Gallus domesticus*.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

B I O L O G A

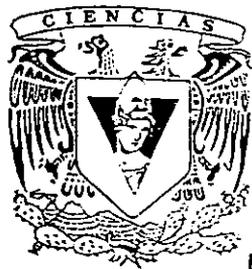
P R E S E N T A:

SAGRARIO GUILLERMINA CALDERON BALDERAS

DIRECTORA DE TESIS: DRA. MA. GENOVEVA GONZALEZ MORAN

MEXICO, D. F.

1998



264383

TESIS CON
FALTA DE ORIGEN

FACULTAD DE CIENCIAS
SECCION ESCOLAR



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

M. en C. Virginia Abrín Baule
Jefe de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo de Tesis: Efecto de la hormona Gona-
dotropina Coriónica Humana, sobre las distintas subpoblaciones celula
res del ovario prefolicular de Gallus domesticus.
realizado por Sagrario Guillermina Calderón Balderas.

con número de cuenta 9031065-0 , pasante de la carrera de Biología.

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis Propietario	Dra. María Genoveva González Morán.
Propietario	Dra. Marcela Esperanza Aguilar Morales.
Propietario	Dra. Elvira Estrada Flores.
Suplente	M. en IBB. Sagrario Guillermina Calderón Balderas.
Suplente	Biol. Teresa Sosa Rodríguez.

Edna M. Suárez Díaz
Marcela Esperanza Aguilar Morales
Elvira Estrada Flores
Sagrario Guillermina Calderón Balderas
Teresa Sosa Rodríguez

Edna M. Suárez Díaz
Consejo Departamental de Biología
Dra. Edna María Suárez Díaz.

DEPARTAMENTO
DE BIOLOGÍA

A MIS PADRES

QUE ME HAN APOYADO TODOS LOS DÍAS DE MI VIDA Y QUE CON SU AMOR
HE ALCANZADO TODAS MIS METAS.

A MIS HERMANAS

QUE CON SU CARIÑO Y AYUDA LOGRÉ CONCLUIR ESTA ETAPA DE MI
VIDA.

A MI DIRECTORA DE TESIS

QUE ME APOYÓ AMABLEMENTE EN TODO MI TRABAJO.

Y A TÍ HUMBERTO

QUE CON TU APOYO Y ESPECIALMENTE CON TU AMOR, VEO CULMINADO
UN GRAN ESFUERZO.

ÍNDICE

	Pag.
RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	3
1. EL OVARIO DE LAS AVES	3
1.1. Localización Anatómica	3
1.2. Estructura	5
1.3. Fisiología	6
1.4. Gametogénesis	9
2. DESARROLLO EMBRIONARIO DEL POLLO	11
3. CONTROL HORMONAL REPRODUCTIVO	18
4. HORMONA LUTEINIZANTE	23
4.1. Estructura	23
4.2. Sitio de Producción	24
4.3. Acción Biológica	25
4.4. Hormona Gonadotropina Coriónica Humana	26
ANTECEDENTES	28
OBJETIVO	34
MATERIALES Y MÉTODOS	35
RESULTADOS	39
DISCUSIÓN	52
CONCLUSIÓN	56
APÉNDICE	57
REFERENCIAS	59

RESUMEN

Existen pocos reportes relacionados con las funciones de la hormona gonadotropina coriónica en el ovario de pollo embrionario, en contraste con los que se refieren a ovario adulto. Sin embargo existen trabajos relacionados con las funciones de la hormona folículo estimulante y hormonas esteroides, que apoyan la línea de investigación que se sigue en este trabajo.

En el presente trabajo se estudiaron las modificaciones en el número y/o tamaño celular de las distintas subpoblaciones celulares ováricas, después del tratamiento in vivo con hCG, durante el desarrollo embrionario.

Se utilizaron huevos fértiles de pollo, de la raza White Leghorn, y se incubaron a 38° C, con humedad y ventilación constantes. Se aplicaron tres dosis de hCG, en los días 13, 15 y 17 del desarrollo embrionario. Dentro de las 24 horas después de la eclosión, los animales se sacrificaron por decapitación, se disecó el ovario izquierdo, se incluyó el material en epón 812 y se realizaron cortes de 1 μ m de grosor, los cuales se tiñeron con azul de toluidina, para posteriormente realizarse las medidas morfométricas.

La prueba de "t" de Student, que se aplicó a los resultados obtenidos mostraron que no hubo diferencias significativas en el número de las células

germinales, pregranulosas, indiferenciadas e intersticiales, encontrándose que solamente las células intersticiales aumentaron de tamaño por el tratamiento con hCG, siendo un incremento similar al de los cordones de células intersticiales.

Podemos concluir que la hCG no presentó efecto proliferativo sobre ninguna de las poblaciones del ovario prefolicular, pero sí un efecto de hipertrofia en las células intersticiales de la médula ovárica.

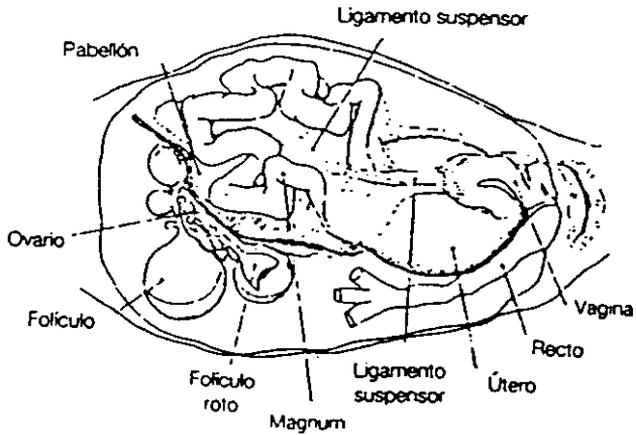
INTRODUCCIÓN.

1. EL OVARIO DE LAS AVES.

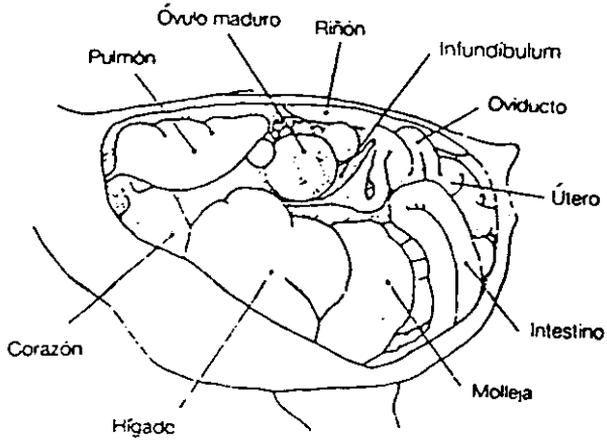
1.1. Localización Anatómica.

En la gallina, el ovario está situado en la parte superior izquierda de la cavidad abdominal, debajo de la arteria aorta y de la vena cava posterior. Se apoya sobre el riñón y el pulmón izquierdos, y por la parte inferior, sobre el saco aéreo abdominal izquierdo (Sturkie, P. 1965; Gilbert, A. 1971; Lofts, B. y Murton, R. 1973; Ede, D. 1975; Alamargot, J. 1982). La glándula suprarrenal izquierda está estrechamente enlazada al ovario y todo el conjunto descrito se halla suspendido de la pared dorsal del peritoneo gracias a un pliegue del mismo, que contiene fibras musculares lisas, vasos sanguíneos y nervios (Sturkie, P. 1965; Gilbert, A. 1971). Durante el desarrollo embrionario se forman un ovario y un oviducto derechos, pero usualmente degeneran y sólo persisten unos rudimentos cuando nace el polluelo (Sturkie, P. 1965).

El riego arterial del ovario, en la mayoría de los casos, procede de la arteria renal anterior. Existen dos venas ováricas que desembocan en la vena cava superior (Sturkie, P. 1965; Lofts, B. y Murton, R. 1973; Ede, D. 1975). La inervación está muy desarrollada, especialmente en dirección a los folículos (Gilbert, A. 1971).



a) Vista Ventral (según Gilbert)



b) Vista Lateral (según Taylor)

Figura 1.
Ubicación del aparato reproductor de la hembra en la cavidad abdominal.

1.2. Estructura.

Al no ser posible en el ovario adulto, la distinción entre médula y corteza, se mencionan normalmente como masas celulares, una de las cuales contiene los ovocitos (zona parenquimatosa) y la otra, fundamentalmente tejido muscular y vasos sanguíneos (zona vascular) (Lofts, B. y Murton, R. 1973; Ede, D. 1975).

El ovario adulto muestra el aspecto de un racimo de uvas, debido a la presencia de siete a diez folículos portadores , cada uno de ellos, de una yema que se halla en fase de crecimiento acelerado (Ede, D.1975; Alamargot, J. 1982). Junto a ellos se encuentran muchos pequeños folículos (más de 1000, perceptibles por el ojo humano) y también uno o dos folículos vacíos (estadio postovulatorio) que degeneran rápidamente (Ede, D. 1975).

En la estructura de estos folículos en estado maduro, y desde el interior hasta el exterior, se distinguen: una capa perivitelina acelular, segregada por la granulosa; una capa monocelular la granulosa; una capa llamada basal; dos tecas una interna y otra externa que contienen células intersticiales; una capa de tejido conjuntivo (salvo en la zona del estigma, lugar donde se producirá la rotura folicular, y un epitelio superficial) (Gilbert, A. 1971; Alamargot, J.1982; De Alba, J.1985).

Cada folículo está unido al ovario por un pedículo por donde penetran de dos a cuatro arterias que se extienden por la teca externa, dividiéndose en conductos más pequeños (arteriolas) los cuales, a través de la teca interna, llegan a formar una densa red capilar alrededor de la capa basal. La red capilar es poco densa en la región del estigma o línea de dehiscencia folicular, esta estructura permite en principio, que la ovulación no produzca una hemorragia (Gilbert, A. 1971; Johnson, A. 1986; Sauveur, B. 1992).

En lo que al sistema venoso se refiere, está presente a varios niveles, el más profundo de los cuales se sitúa en la teca interna (Sauveur, B. 1992). Las fibras nerviosas siguen un trayecto parecido al de las arteriolas.

1.3. Fisiología.

El ovario también es el lugar donde, bajo el control de la hipófisis, tiene lugar la síntesis de las hormonas esteroideas y el de la ovogénesis. La hipófisis anterior es absolutamente indispensable para el desarrollo y el mantenimiento de la actividad ovárica. Existen, tanto en las aves como en los mamíferos, tres hormonas gonadotrópicas hipofisarias, (Alamargot, J. 1982; Sauveur, B. 1992):

a) La FSH (Hormona Folículo Estimulante) cuya misión esencial es la de regular el desarrollo de los folículos del ovario y la actividad secretora de éste.

b) La LH (Hormona Luteinizante) también responsable del desarrollo del ovario, de la secreción ovárica de hormonas esteroideas y, sobre todo, de la ovulación, formando primeramente un pico preovulatorio junto con la FSH, para después aumentar y producir el fenómeno de la ovulación.

c) La prolactina que interviene en la conducta de incubación y en ciertos procesos metabólicos.

El ovario de las aves, bajo el control de las hormonas gonadotrópicas, segrega los tres principales tipos de esteroideas sexuales: estrógenos, andrógenos y progesterona. Esta secreción es cíclica por una parte, de acuerdo con el desarrollo de la ovulación, pero también tiene lugar de forma continua, aunque a un nivel más bajo.

Los estrógenos son sintetizados, probablemente, por las células intersticiales de las tecas foliculares. Su síntesis comienza en el animal joven y aumenta de forma notable dos o tres semanas antes de la madurez sexual, para disminuir, de nuevo, en dos a cuatro días si la gallina deja de poner. Los estrógenos son indispensables para:

-El crecimiento del oviducto

-La síntesis en el hígado, de las proteínas y de los lípidos de la yema.

- El transporte sanguíneo de las lipoproteínas y del calcio, así como de su depósito en el folículo.
- La síntesis de las proteínas de la clara en el mágnium.
- La formación del hueso medular y el aumento de la retención fosfo-cálcica al inicio del periodo de puesta.
- El comportamiento de ovoposición.
- Aparición de los caracteres sexuales secundarios y separación de los huesos pelvianos.

Los andrógenos, pueden tener un doble origen (células intersticiales del estroma del ovario y de la teca). Actúan estimulando el crecimiento de la cresta y de todos los caracteres sexuales secundarios. En sinergia con los estrógenos, estimulan también el desarrollo del oviducto y del hueso medular.

La progesterona proviene, en su mayor parte, de la granulosa del folículo preovulatorio. La progesterona tiene numerosas funciones, como son:

Controla las actividades celulares implicadas en el crecimiento del oviducto (siendo en éste caso agonista de estrógenos y andrógenos) y en la síntesis de ciertas proteínas del albumen; en este último caso, actúa habitualmente en sinergia con los estrógenos (Sauveur, B. 1992). Controla también los ritmos de ovulación y de ovoposición o puesta actuando sobre la liberación de LH-RH (factor de liberación de la hormona Luteinizante) por parte del hipotálamo, sobre las

contracciones del útero previas a la ovoposición y sobre la conducta de puesta (Sharp, P. 1980; Sauveur, B. 1992).

Durante la madurez sexual el contenido de hormonas gonadotrópicas se incrementa, aún más que después de la maduración folicular. La maduración sexual se manifiesta con el incremento en la actividad de la hipófisis. Amin y Gilbert (1970) observaron que el incremento en la producción de esteroides en el ovario, es medida por el crecimiento del oviducto y por la actividad de las células gonadotrópicas de la hipófisis que secretan principalmente hormona foliculo estimulante. Cuando se inicia el desarrollo folicular, la actividad de la hipófisis se incrementa, pero en menor grado que durante la madurez sexual, relacionando a las hormonas foliculo estimulante y luteinizante, con lo que estas dos hormonas estan involucradas en la maduración folicular (Gilbert, A. 1971). También se observó que el fotoperiodo influye en la liberación y en la concentración de hormona luteinizante, cuando gallinas de día corto fueron transferidas a condiciones de día largo, Éstas aumentaron su concentración de hormona luteinizante en el plasma sanguíneo (Sharp, P. 1980).

1.4. Gametogénesis.

Hacia el octavo día de la vida embrionaria, se inicia la ovogénesis, con la transformación de las células germinales primordiales en ovogonias. Estas ovogonias sufren repetidas divisiones mitóticas, dando lugar a los denominados

ovocitos primarios, que son células diploides en situación de profase meiótica. En el momento de la eclosión, el núcleo del mencionado ovocito se encuentra precisamente en fase de paquítena para evolucionar posterior y lentamente hacia la fase de diploténa en la que permanece meses o incluso años. Únicamente unas 24 horas antes de que se produzca la ovulación es cuando, en el interior del folículo listo para ovular, tiene lugar un proceso de división reduccional, dando lugar a un ovocito haploide, denominado ovocito secundario y a la expulsión del primer corpúsculo o glóbulo polar. En el caso de las aves, al ser la hembra heterogamética, después de la ovulación y la fecundación, es cuando queda determinado el sexo del futuro embrión. La segunda división de maduración tiene lugar, en el infundíbulo (Sauveur, B. 1992).

La actividad sexual de las gallinas comienza alrededor de las 18 a 20 semanas de edad, en esta etapa el ovario incrementa su peso en un intervalo de 0.4g a 2.0g, pero posteriormente el incremento es mucho más rápido, siendo éste de 40 a 60g, a consecuencia de cuatro a seis folículos en desarrollo, de alrededor de 40 mm de diámetro (Gilbert, A. 1971). La maduración folicular es secuencial en las aves, es decir, cada día por el número y desarrollo de los folículos presentes en el ovario (Wells, J. y Gilbert, A. 1984).

2. DESARROLLO EMBRIONARIO DEL POLLO.

La velocidad del desarrollo embrionario varía en función de factores tales como: el origen genético del huevo, el proceso de conservación previo, la temperatura de incubación, la edad de la madre, etc. Estas diferencias son especialmente apreciables durante los primeros días del desarrollo, mitigándose después.

En el caso de la gallina, las primeras segmentaciones celulares se producen en el interior del oviducto, durante la formación del huevo. La fusión de los pronúcleos masculino y femenino se produce aproximadamente tres horas después de haber tenido lugar la ovulación. Una hora después, mientras el huevo está en el istmo, tiene lugar la primera división celular, seguida de otras dos divisiones antes de que el huevo penetre en el útero en el estadio de 8 células (Sauveur, B. 1992).

En el estadio de 32 células, las divisiones son verticales; después se producen paralelamente a la superficie. Es entonces cuando aparece una cavidad subgerminal que da lugar a la aparición, en la superficie del blastodermo, de dos zonas concéntricas, perceptibles a simple vista: la zona translúcida, situada en el centro y la zona opaca, ubicada en la periferia (Rugh, R 1977; Sauveur, B. 1992)

A partir de este momento (6-8 horas antes de la ovoposición) la orientación y el eje de simetría del futuro embrión quedan definitivamente fijados siguiendo el enrollamiento de las chalazas durante la formación de la cáscara. Poco antes de la ovoposición, después de la aparición en el blastocele de una capa celular intermedia, que define dos cavidades superpuestas, se alcanza el estadio de blástula secundaria. Es entonces cuando tiene lugar la puesta del huevo y el desarrollo embrionario permanece bloqueado en la situación descrita mientras la temperatura es inferior a 21-22°C.

Cuando el huevo fecundado se coloca en la incubadora, la reanudación de su desarrollo se traduce al cabo de 5-6 horas, en un ensanchamiento de la región posterior del área translúcida, y en un ligero alargamiento del blastodermo. Transcurridas 16 horas, la región ensanchada se hace visible en toda su extensión y forma la línea primitiva. A las 18 horas de incubación, la línea primitiva alcanza su máxima longitud y se prolonga con un ensanchamiento, denominado prolongamiento cefálico, esbozo de la espina dorsal y eje del futuro embrión; con este evento concluye la gastrulación, en el cual el embrión ya posee sus tres láminas esenciales (ecto, meso y endoblasto) (Rugh, R. 1977; Sauveur, B. 1992).

Transcurridas 20 horas de incubación, la línea primitiva empieza a desaparecer. En el extremo opuesto, la parte proximal continúa diferenciándose con la aparición del repliegue cefálico, que corresponde a la placa neural. Dos o tres horas más tarde, una parte del mesoblasto empieza a dividirse en pares de segmentos o somitas, de las que derivará la mayor parte del esqueleto y el aparato muscular (Sauveur, B. 1992).

Desde el primer día de incubación, en el desarrollo embrionario del pollo, las células germinales primordiales migran desde su sitio de determinación inicial, reconociéndose independientemente del grado de desarrollo del embrión (Ginsberg, M y Eyal-Giladi, H. 1987; Crawford, R. 1990), hasta la región urogenital donde se formarán las gónadas (Hardisty, M. 1978; Jones, R. 1978), por medio de dos tipos de movimientos: pasivo y activo. El primero tiene lugar por una translocación de las células germinales primordiales, localizadas en el endodermo y el mesénquima vecino del saco vitelino y de la alantoides. Desde estas formaciones extraembrionarias, las células germinales primordiales pasan al interior del embrión, junto con el endodermo y el mesénquima que formarán al intestino primitivo grueso y al primordio del mesenterio intestinal. A partir de esta ubicación, se inicia la migración "activa" de las células germinales primordiales, valiéndose de su propia capacidad de locomoción para desplazarse entre las células somáticas estáticas o que se mueven en direcciones diferentes, por medio de sustancias quimiotácticas (Houillon, Ch. 1978; Crawford, R. 1990; Merchant, H. 1991). Posteriormente, las células germinales primordiales alcanzan la región de la cresta germinal, donde son rodeadas por células mesenquimáticas y mesoteliales

con las que se asocian estrechamente, formando el primordio gonadal (Merchant, H. 1991).

El primordio gonadal se desarrolla en la zona ventral del mesonefros. Esta formación se establece como una condensación de mesénquima, formando los túbulos mesonéfricos, probablemente inducida por el conducto mesonéfrico (Shumway, W. 1989; Crawford, R. 1990).

En el primordio gonadal se lleva a cabo una diferenciación tisular que antecede a la diferenciación sexual de éste órgano. Las células somáticas del primordio gonadal son de origen mesodérmico (Crawford, R. 1990). Inicialmente son de tres tipos: mesenquimáticas (laxamente distribuidas), mesoteliales (del epitelio celómico) y endoteliales (provenientes de los vasos que invaden la zona). Las células mesenquimáticas y las mesoteliales, inician una actividad proliferativa al llegar las células germinales primordiales, formando un agregado compacto que se denomina "blastema gonadal". Posteriormente, se inicia el depósito de una delgada lámina basal entre las células del primordio gonadal, que gradualmente lleva a la formación de los "cordones sexuales" de tipo epitelial (Houillon, Ch. 1978). Se establece así la gónada indiferenciada con un componente epitelial, entre cuyas células somáticas quedan "atrapadas las células germinales primordiales". En el componente estromático se incluye a los primeros vasos sanguíneos que riegan al primordio gonadal, a las células precursoras del tejido conjuntivo de la gónada y de las células intersticiales esteroideogénicas. (Merchant, H. 1991).

A partir de las 40 horas de iniciada la incubación, la parte anterior del sistema nervioso está formada y diferenciada en tres vesículas cerebrales. La extremidad posterior de la médula aún está abierta sobre la línea primitiva, que se retrae cada vez más. Durante el mismo periodo, aparece el corazón, mientras que los vasos sanguíneos llegan a alcanzar la zona extra-embriónica; la primera cavidad que se forma es el esbozo de lo que será el futuro intestino delgado.

A partir del tercer día de incubación, los acontecimientos embrionarios se hacen cada vez más numerosos, observándose los cambios morfológicos en el embrión (Sauveur, B. 1992).

Hasta el tercer día de la vida embrionaria (desarrollo de las crestas genitales) las células germinales primordiales y las células mesenquimatosas se incorporan al epitelio germinal (Cole, H. y Cupps, P. 1959; Van Tienhoven, A. 1959; Gilbert, A. 1971; Sauveur, B. 1992), acumulándose de forma simétrica a derecha e izquierda del embrión. A medida que el embrión se va desarrollando, el incremento de dichas células es de dos a cinco veces más rápido en la parte izquierda que en la derecha (Huettner, A. 1958; Gilbert, A. 1969; Jones, R. 1978; Crawford, R. 1990; Merchant, H. 1991; Sauveur, B. 1992). Normalmente, en el momento de la eclosión, el ovario derecho no es más que un resto de tejido medular ubicado encima de la vena cava caudal (Sauveur, B. 1992).

El primer indicio del desarrollo sexual se observa al cuarto día de desarrollo embrionario. Para este tiempo se observa una pequeña protuberancia del epitelio peritoneal, localizada entre el mesonefros y el mesenterio dorsal, rodeada de siete somitas inmediatamente después de las arterias onfalomesentéricas. Esta protuberancia del epitelio peritoneal, se denomina cresta germinal y está cubierta por el epitelio germinal y contiene células mesenquimatosas y células germinales primordiales.

Al quinto día de incubación las células germinales primordiales, están destinadas a formar las células sexuales definitivas. Poco tiempo después el ovario inicia su diferenciación, a nivel de células germinales primordiales, las cuales crecen y cambian a ovogonias (Huettner, A. 1958).

Para el octavo día de incubación, el epitelio gonadal del ovario izquierdo comienza a engrosarse y las células germinales primordiales inician las divisiones meióticas, formando las ovogonias (Hughes, G. 1963; Gilbert, A. 1971; Jones, R. 1978; Tokarz, R. 1978; Crawford, R. 1990). El tejido medular subyacente del ovario se distingue por dos capas de células, una capa superficial densa y otra capa reticular profunda que se encuentra más al interior. Las ovogonias se encuentran a lo largo de las células epiteliales, una vez separadas del epitelio se unen para formar los cordones sexuales secundarios. El tejido conjuntivo del estroma, la segunda túnica albugínea ovárica, inicia su formación el día 14, en este momento los cordones sexuales secundarios se

aislan del epitelio gonadal y de la médula ovárica; poco tiempo después el epitelio gonadal y la túnica albugínea primaria degeneran (Crawford, R. 1990), el tejido conjuntivo del estroma es sustituido por vasos sanguíneos y por muchos pequeños y grandes agregados de células (Huettner, A. 1958).

En el ovario en desarrollo se distinguen claramente dos zonas, una médula y una corteza, separadas por una densa capa de tejido conjuntivo, llamada túnica albugínea. La médula está formada de cordones sexuales primarios, derivados del epitelio germinal, tejido conjuntivo, nervios, músculo liso y principalmente vasos sanguíneos. La corteza contiene a las ovogonias y a los ovocitos (Gilbert, A. 1971; Crawford, R. 1990). En la médula ovárica se observa un tipo de células, que probablemente estén relacionadas con el metabolismo de las hormonas esteroideas, llamadas células intersticiales. Antes del día trece de desarrollo el control del desarrollo gonadal es extrahipofiseal (Fugo, N. 1940; Vogel, N. 1957). Realizando una hipofisectomía, se observa que la inhibición gonadal sólo ocurre del día trece de desarrollo en adelante y las células gonadotrópicas no aparecen en la hipófisis, sino hasta el día catorce de desarrollo, con estos experimentos se demuestra que antes del día trece de desarrollo el eje hipotálamo- hipófisis-gónada aún no se comunica, sugiriéndose que durante este tiempo las hormonas esteroideas son producidas por el ovario, entre el segundo y sexto día de incubación, influyendo en el desarrollo de él mismo (Gilbert, A. 1971).

Con la influencia de la hipófisis, se observa una multiplicación rápida de ovogonias, hasta la eclosión. En la eclosión se observa una madurez sexual, en relación al tamaño y peso del ovario, incrementándose entre 10 y 15 mm de largo, 10 mm de ancho y 3 o 4 mm de alto; durante este periodo el peso se mantiene relativamente constante observándose en un intervalo de 0.3 a 0.5g (Gilbert, A. 1971).

Alvarez-Fernández y colaboradores en 1995, caracterizaron *in vitro* fracciones celulares aisladas del ovario de pollo recién nacido, por medio de un gradiente de metrizamide, mostrando que las células esteroideogénicas metabolizan progesterona en andrógenos y las células medulares indiferenciadas aromatzan andrógenos en estrógenos.

3. CONTROL HORMONAL REPRODUCTIVO.

Las funciones reproductoras se encuentran bajo el control de la regulación neuroendócrina, es decir, están controladas por la correlación funcional fisiológica de los sistemas nervioso y endócrino. Este control está ejercido por sistemas reguladores internos, genéticamente fijados, que bajo el influjo, casi siempre, de circunstancias temporales son responsables del transcurso típico (individual y de especie) de los fenómenos de la reproducción.

Con la influencia de la hipófisis, se observa una multiplicación rápida de ovogonias, hasta la eclosión. En la eclosión se observa una madurez sexual, en relación al tamaño y peso del ovario, incrementándose entre 10 y 15 mm de largo, 10 mm de ancho y 3 o 4 mm de alto; durante este periodo el peso se mantiene relativamente constante observándose en un intervalo de 0.3 a 0.5g (Gilbert, A. 1971).

Alvarez-Fernández y colaboradores en 1995, caracterizaron *in vitro* fracciones celulares aisladas del ovario de pollo recién nacido, por medio de un gradiente de metrizamide, mostrando que las células esteroideogénicas metabolizan progesterona en andrógenos y las células medulares indiferenciadas aromatizan andrógenos en estrógenos.

3. CONTROL HORMONAL REPRODUCTIVO.

Las funciones reproductoras se encuentran bajo el control de la regulación neuroendócrina, es decir, están controladas por la correlación funcional fisiológica de los sistemas nervioso y endócrino. Este control está ejercido por sistemas reguladores internos, genéticamente fijados, que bajo el influjo, casi siempre, de circunstancias temporales son responsables del transcurso típico (individual y de especie) de los fenómenos de la reproducción.

La función sexual está determinada, en gran parte, por la actividad de la hormona gonadotrópica de la hipófisis. La hipófisis está sometida a control por medio de factores liberadores del hipotálamo, el cual, a su vez, depende del influjo de gobierno de determinadas regiones del encéfalo que reciben informaciones sensoriales del organismo y del ambiente, las procesan y las transmiten (Smidt, D. y Ellendorff, F. 1972; Harvey, S. et al. 1987; Ruíz, D. 1988).

El hipotálamo es la zona más ventral del diencefalo y queda situado por encima de la hipófisis. En el hipotálamo se encuentran núcleos formados por grupos de neuronas, situados en las regiones supraóptica, tuberal y de los cuerpos mamilares.

El hipotálamo está considerado como un órgano final de integración de las informaciones del encéfalo y sus misiones son múltiples. Constituye un centro regulador del hambre, sed y temperatura. Produce neurosecreciones y, con ayuda de "factores liberadores" o "inhibidores" controla la secreción de las hormonas adenohipofisarias, entre las que se encuentran las hormonas gonadotrópicas (Smidt, D. y Ellendorff, F. 1972; Cunningham, J. 1992).

La hipófisis es un órgano endócrino principal, ya que elabora un número de hormonas que estimulan a otras glándulas para que segreguen hormonas. La hipófisis está situada en la silla turca, una concavidad del hueso esfenoides, y envuelta por una extensión de la dura madre (Sturkie, P. 1965; Austin, C. y Short, R. 1982; McDonald, L. y Pineda, M. 1991; Cunningham, J. 1992), compacta y bien

vascularizada que forma una cubierta hacia la parte dorsal, atravesada solamente por el pedúnculo hipofisario y los vasos sanguíneos, inmediatamente por detrás del quiasma óptico (Smidt, D. y Ellendorff, F.1972; Cunningham, J.1992; Hardy, R. 1992).

La glándula hipófisis se subdivide anatómicamente en adenohipófisis y neurohipófisis, ambas regiones son de origen ectodérmico, pero provienen de primordios diferentes; la neurohipófisis se origina del infundíbulo del cerebro y permanece sujeta al hipotálamo por el tallo neural, en contraste, la adenohipófisis se origina del techo de la boca en forma de una evaginación comúnmente llamada saco de Rathke o ducto craneofaríngeo (Sturkie, P.1965; Austin, C. y Short, R.1982; Chester-Jones, R. et al. 1987; McDonald, L. y Pineda, M.1991; Cunningham, J.1992).En las aves no existe un lóbulo intermedio como en los mamíferos, pero la adenohipófisis y la neurohipófisis están separadas por una capa de tejido conjuntivo (Sturkie, P.1965).

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 (Thommes, R. y Russo, R. 1959; Pearson, R. 1972).En la adenohipófisis los vasos sanguíneos contactan capilares esenciales para el transporte de las hormonas secretadas, como la hormona foliculo estimulante (FSH), la luteinizante (LH), la adrenocorticotropina (ACTH), la

tirotropina (TSH) y otras, siendo las dos primeras gonadotropinas, ya que actúan sobre las gónadas (Sturkie, P. 1965; Austin, C. y Short, R. 1982).

El hipotálamo y la hipófisis forman parte del eje hipotálamo-hipófisis-gónada, los cuales en estadios tempranos de desarrollo embrionario son autónomos en crecimiento, diferenciación y actividad (Willer, B. 1955; Woods, J. 1987). Se sabe que el hipotálamo es autónomo en estado inicial de desarrollo al sintetizar hormonas liberadoras (Mikami, S. et al. 1973; Daikoku, S. et al. 1974; Woods, J. 1985). Así como la hipófisis es capaz de sintetizar hormonas gonadotrópicas antes de su comunicación vascular con el hipotálamo. Esto se demostró por medio de la técnica de inmunocitoquímica en la hipófisis, alrededor del día 4 de incubación, donde se encontró tanto LH (Gasc y Sar, 1981; Woods, J. et al. 1985) como FSH (Woods, J. 1985; Woods, J. 1987) antes de la formación del plexo porta vascular entre el hipotálamo y la hipófisis, que inicia el día 12 de desarrollo (Thommes, R. y Russo, R. 1959; Daskocil, M. 1970; Daikoku, S. et al. 1974; Stritesky, J. y Rychter, Z. 1977; Woods, J. 1987).

Fugo (1940) y Vogel (1956) realizaron experimentos con embriones de pollo hipofisectomizados, y observaron que el eje hipotálamo-hipófisis-gónada es funcional desde el día 13 de desarrollo, observando en los embriones hipofisectomizados un desarrollo normal de las gónadas hasta el día 13, pero después, las gónadas no incrementan su peso, talla, grado de diferenciación histológica, ni contenido de colesterol (Woods, J. 1969; Woods, J. 1987).

Woods y Weeks (1969) realizaron transplantes de adenohipófisis, en los que encontraron que la regulación de la esteroidogénesis gonadal por la adenohipófisis empieza el día 13 en machos y el día 14 en hembras. Esto se observó al realizar la técnica de radioinmunoensayo de plasma, encontrando un aumento en el contenido de $17\text{-}\beta$ estradiol, que había permanecido constante durante los días 6.5 a 12.5, y cuyo incremento se observa en el día 13.5 como consecuencia de la regulación gonadotrópica de la esteroidogénesis ovárica en este tiempo (Woods, J. y Weeks, R. 1969; Woods, J. 1987).

Una vez establecido el eje hipotálamo-hipófisis-gónada (día 13-13.5 en machos y día 14 en hembras), se observa que se producen hormonas liberadoras de gonadotropinas en las neuronas del hipotálamo, sólo si existen estímulos externos. Las hormonas liberadoras de gonadotropinas entran en circulación porta-hipofisial, regulando la síntesis y la liberación de las gonadotropinas de la hipófisis, la LH y la FSH, las cuales estimulan el crecimiento gonadal y la esteroidogénesis (Woods, J. 1987).

Los cambios en el ovario se producen por la secreción de hormonas gonadotrópicas, provocando cambios en las células efectoras a estas hormonas. Usando métodos bioquímicos, Teng y Teng (1979), han detectado un incremento en la producción de esteroides por las células intersticiales, del ovario de pollo embrionario, en presencia de hormona gonadotropina coriónica, en el medio de cultivo. Sin embargo, se sabe que la localización de células efectoras a

LH cambia durante el desarrollo del embrión. En el periodo de 5.5-13 días de desarrollo, se observa que las células que responden a esta hormona son las células intersticiales medulares, en el día 13.5 los niveles de LH en el plasma son elevados, realizando una reacción inicial de las células intersticiales corticales y de los cordones de células corticales, provocando la síntesis inicial de estrona y estradiol por estas células (Woods, J. et al., 1989).

La estimulación, durante el desarrollo embrionario del pollo, con gonadotropina coriónica humana, produce un incremento en el volumen de los cordones de células esteroideogénicas, un aumento en el desarrollo del sistema lacunar y de los vasos sanguíneos, localizados en la médula ovárica (González-Morán, G. et al., 1985).

4. HORMONA LUTEINIZANTE.

4.1. Estructura.

La hormona luteinizante (LH) es una glicoproteína dimérica con peso molecular de 28 a 30 kDa, dependiendo de la especie. El contenido de carbohidratos y, en particular el contenido de ácido siálico (1.4%) son esenciales para su acción biológica. La subunidad α es común para la LH, FSH y para la TSH (Austin, C. y Short, R. 1982; Wallach, D. 1987; Hardy, R. 1992), la subunidad α está formada por 92 aminoácidos y la subunidad β por 115 aminoácidos (Darnell, J. et al. 1991; Hardy, R. 1992; Cooke, D. et al. 1996).

LH cambia durante el desarrollo del embrión. En el periodo de 5.5-13 días de desarrollo, se observa que las células que responden a esta hormona son las células intersticiales medulares, en el día 13.5 los niveles de LH en el plasma son elevados, realizando una reacción inicial de las células intersticiales corticales y de los cordones de células corticales, provocando la síntesis inicial de estrona y estradiol por estas células (Woods, J. et al., 1989).

La estimulación, durante el desarrollo embrionario del pollo, con gonadotropina coriónica humana, produce un incremento en el volumen de los cordones de células esteroideogénicas, un aumento en el desarrollo del sistema lacunar y de los vasos sanguíneos, localizados en la médula ovárica (González-Morán, G. et al., 1985).

4. HORMONA LUTEINIZANTE.

4.1. Estructura.

La hormona luteinizante (LH) es una glicoproteína dimérica con peso molecular de 28 a 30 kDa, dependiendo de la especie. El contenido de carbohidratos y, en particular el contenido de ácido siálico (1.4%) son esenciales para su acción biológica. La subunidad α es común para la LH, FSH y para la TSH (Austin, C. y Short, R. 1982; Wallach, D. 1987; Hardy, R. 1992), la subunidad α está formada por 92 aminoácidos y la subunidad β por 115 aminoácidos (Darnell, J. et al. 1991; Hardy, R. 1992; Cooke, D. et al. 1996).

La LH es hidrosoluble. En forma considerablemente pura y en reacción próxima a la neutralidad, es más estable que la FSH. La actividad a temperaturas elevadas depende del pH y de la sequedad del preparado, siendo inactiva, por ejemplo, a 100° C y pH 7.4 al cabo de seis minutos. En urea, la LH es menos estable que la FSH. La LH no resulta inactivada, en contraste con la FSH, por las neuroaminidasas, en tanto que la tripsina, la quimotripsina o las carboxilasas reducen la actividad de la LH, y la oxidación con peryodato o con agua oxigenada, destruye su actividad biológica (Smidt, D. y Ellendorff, F. 1972).

4.2. Sitio de producción.

Las gonadotropinas se producen en el lóbulo anterior de la hipófisis (Austin, C. y Short, R. 1982; Wallach, D. 1987; Hardy, R. 1992) y su síntesis y secreción están controladas por hormonas de liberación, que se transportan desde el hipotálamo, por el sistema porta hipotalámico-hipofisiario. La LH y la FSH son secretadas por las células basófilas de la hipófisis (Austin, C. y Short, R. 1982; Hardy, R. 1992).

4.3. Acción Biológica.

La LH estimula la síntesis de esteroides en todos los tipos de células del ovario. Su acción principal es estimular la conversión del colesterol en pregnenolona. La LH también induce un aumento en la circulación del ovario, este efecto hiperhémico es igual al que producen otras hormonas trópicas en sus "órganos blanco" específicos.

Además, la LH induce la ovulación de los folículos previamente preparados por la FSH (Wallach, D. 1987). La acción ovulatoria de la LH es diferente de su acción esteroidogénica y se controla de una manera muy distinta.

El aumento de la liberación de la LH por la hipófisis, responsable de la ovulación, es producido por una retroalimentación positiva del estradiol sobre el hipotálamo, que causa una descarga de la hormona de liberación de la LH. En el macho, la LH estimula un aumento en la síntesis y en la secreción de la testosterona en las células intersticiales o de Leydig del testículo (Austin, C. y Short, R. 1982).

Después de que se producen en sus respectivas glándulas endócrinas, a menudo las hormonas proteínicas se almacenan por un tiempo dentro de la glándula hasta que se requiere su liberación; entonces pasan a la circulación por los capilares eferentes venosos que drenan la glándula. La captación de una

hormona del torrente sanguíneo y su conservación en un tejido puede limitarse a órganos que contienen receptores específicos para dicha hormona (Austin, C. y Short, R. 1982). La hormona luteinizante tiene receptores específicos en sus células blanco del ovario, en el caso de las hembras, este receptor fue caracterizado en ovario de pollo, obteniéndose la secuencia de aminoácidos de dicho receptor, por medio de un ADN complementario (Johnson, A. et al. 1996).

El mecanismo de acción de la Hormona Luteinizante, se efectúa por medio del aumento en la concentración intracelular del nucleótido monofosfato de adenosina cíclico (AMP 3'-5' cíclico). Cuando la hormona se une a sus receptores específicos, en la membrana, se aumenta la concentración de la enzima adenilato ciclasa, catalizando la conversión del trifosfato de adenosina (ATP) en muchas moléculas de AMP 3'-5' cíclico. El AMP 3'-5' cíclico actúa como "segundo mensajero", propagando el efecto de la hormona a toda la célula. La acción de la hormona puede incluir la producción de un "tercer mensajero"; por ejemplo: la LH puede aumentar la producción de progesterona en el ovario, la cual a su vez influye en la función de otras células (Austin, C. y Short, R. 1982).

4.4. Hormona gonadotropina coriónica humana

La gonadotropina coriónica humana (hCG) es producida por la placenta durante el primer trimestre del embarazo, observándose niveles altos de esta hormona en la orina. Las propiedades biológicas e inmunológicas de la hCG son

similares a las que presenta la hormona luteinizante.

La hCG es una glucoproteína con un peso molecular de 38,000, con un 30% de carbohidratos componentes en cada molécula. Cada molécula está formada por una subunidad α con un peso molecular de 14,700, aproximadamente 10,000 partes de proteínas y 4,700 de carbohidratos, y una subunidad β con un peso molecular de 23,000, con 16,000 partes de proteínas y 7,000 de carbohidratos. La acción biológica de la hCG es similar a la efectuada por la LH, estimulando la síntesis de esteroides en todos los tipos de células del ovario. Su acción principal es estimular la conversión del colesterol en pregnenolona. Además, la hCG induce la ovulación de los folículos previamente preparados por la FSH (Bahl, O. 1977).

ANTECEDENTES.

Existen pocas investigaciones que se refieren a las funciones de la gonadotropina coriónica o de la hormona luteinizante en el ovario de pollo embrionario, a diferencia de las realizadas con el animal adulto.

La acción de las hormonas gonadotrópicas se efectúa por la unión a sus receptores específicos en la membrana de las células blanco. Los receptores hormonales tienen una maduración durante el desarrollo embrionario, bajando la capacidad de unión en el embrión y llegando a su total maduración unas semanas después de nacer (Mills, N. y Means, A. 1972; Blázquez, E. et al. 1976). A este respecto, los receptores de gonadotropinas continúan madurando antes de que se genere el eje pituitario gonadal (día 13.5 de desarrollo) (Woods, J. et al. 1977). La administración hormonal exógena activa los receptores hormonales en las gónadas, incrementando la capacidad de desarrollo gonadal y el grado de preparación para recibir las gonadotropinas hipofisarias endógenas en el día 13.5 de incubación. Esto sugiere la posibilidad de que a esta temprana edad, la hormona por sí misma, induzca la formación de receptores hormonales (Shahin, M. et al. 1981).

Se sabe que la hormona luteinizante (LH), en las aves, aumenta durante el día, alrededor de 6 a 8 horas antes de la ovulación (Wells, J. y Gilbert, A. 1984), determinándose que la LH actúa para finalizar el crecimiento folicular y producir la ovulación. La actividad biológica de la LH se comprobó al purificarse tres isoformas

de LH de pollo y al observarse que estas isoformas también tenían la capacidad de estimular a las células de la granulosa, para que secretaran progesterona, al igual que la forma original de LH (Krishnan, K. et al. 1994).

Algunos trabajos con células en cultivo sugieren que las gónadas embrionarias forman colesterol si se les estimula con Gonadotropina Coriónica humana (hCG) (Haffen, K. et al. 1969). La enzima colesterol esterasa o 20-20 colesterol hidroxilasa estimula la producción de colesterol, incrementándose la producción de pregnenolona endógena, que a su vez da lugar a la progesterona (Guichard, A. et al. 1979). La progesterona es necesaria para que se produzca LH, y con ella la ovulación, ya que el folículo que se aproxima a este evento, incrementa la sensibilidad a LH (Scanes, C. et al. 1978).

Utilizando LH y hormona foliculo estimulante (FSH), ambas equina y ovina, en ovarios de embrión de pollo *in vitro*, Teng y colaboradores (1982) observaron que hubo máxima estimulación con LH de pollo, tanto en el ovario izquierdo como en el derecho, incrementándose la producción de 17β -estradiol y testosterona. Las LH equina y ovina, fueron más activas que las FSH, pero el grado de estimulación en la producción de 17β -estradiol fue mínimo para ambas LH que para las FSH. Algunas investigaciones demuestran que la LH de aves y de mamíferos, estimulan la producción *in vitro* de progesterona en células de la granulosa, proponiendo que los receptores en el ovario de pollo, son más sensibles a LH que a FSH (Huang, E. et al. 1979; Scanes, C. y Faglioli, J. 1980)

Weniger y Chouraqui (1988) mantuvieron *in vitro* células de ovarios de pollo embrionario, de 7 a 18 días de desarrollo, en presencia y ausencia de LH bovina, determinando por medio de la técnica de radioinmunoensayo, la cantidad de estradiol en el medio de cultivo. Sus resultados demostraron que la LH estimuló la secreción de estradiol en todos los estados de desarrollo estudiados. Sin embargo, el grado de estimulación fue más alto para los estados más jóvenes y con un tratamiento de LH en concentración de 10 ng/ml, concluyendo que el número de receptores por célula secretora de estradiol disminuyó con la edad.

Por otro lado, Woods y colaboradores (1989), realizaron trabajos en los cuales, por medio de la técnica de inmunocitoquímica, cuantificaron la LH gonadal en embriones intactos y en embriones hipofisectomizados, para observar cuál es el mecanismo relacionado con la iniciación de la regulación de LH gonadal y la síntesis y secreción de testosterona y estrógenos. Sus resultados mostraron la presencia de LH en el plasma de embriones de pollo, tanto en machos como en hembras, desde el día 10.5 hasta el día 18.5, concluyendo que el origen de la LH en el plasma es de la pituitaria, ya que los embriones de ambos sexos, hipofisectomizados, tuvieron un nivel más bajo de LH en el plasma, que los embriones intactos, y al realizar un trasplante de hipófisis, los niveles de LH en plasma, se elevaron a niveles similares de los embriones controles. También observaron que las células intersticiales de la médula ovárica mostraron cambios en su forma, lo que indicó que estas células se diferencian bajo la influencia de

elevados niveles de LH plasmática, cambiando de una forma irregular a una forma ovalada, lo que se observó como un incremento en número, y por lo tanto en la capacidad de síntesis de hormonas esteroideas, sugiriéndose un mecanismo, por el cual la LH inicia la regulación de la síntesis de testosterona y estrógenos.

El trabajo realizado por Grassi-Milano, E. y Pitini, A. en 1978, demostró que los ovarios de embriones de pollo, de 18 días, cultivados con gonadotropinas presentaron una corteza más desarrollada y con muchos ovocitos, en comparación con los controles se encontró que la membrana basal estaba ausente y las células somáticas corticales fueron pocas y no estaban agrupadas en cordones.

En la médula subcortical compacta, se observaron cordones macizos con numerosos gonocitos, separados por las células intersticiales, y los sistemas lacunares se encontraron muy desarrollados (Grassi-Milano, E. y Pitini, A. 1978; Shahin, M. et al. 1982). Sin embargo, los ovarios tratados con LH presentaron una corteza muy desarrollada, con un gran número de ovocitos. La membrana basal estaba ausente, las células somáticas corticales fueron muy pocas y no constituyeron cordones. En la médula subcortical muy compacta, se observaron cordones macizos con numerosos gonocitos separados por las células intersticiales. Los sistemas lacunares estaban poco desarrollados y presentaron pequeñas hendiduras y algunas células necrosadas. Por el contrario, los ovarios cultivados en presencia de FSH, mostraron una corteza mínima y no hubo

organización de las células en cordones. En la médula subcortical los cordones medulares presentaron gonocitos separados por las células intersticiales, como por tejido conjuntivo. Los sistemas lacunares presentaron bastantes hendiduras, dando un aspecto reticular; concluyéndose que ambas hormonas actuaron antagónicamente en la regulación del desarrollo de la corteza.

En ovarios embrionarios de pollo, González-Morán, G. y colaboradores (1985) realizaron estudios morfológicos, en los cuales inyectaron *in vivo* hCG en embriones de pollo. Al nacimiento de los pollos disecaron el ovario izquierdo, observando que la corteza no presentó modificaciones, pero el volumen de los cordones de células intersticiales aumentó en los ovarios de los animales tratados, presentando gotas de lípidos más prominentes en el citoplasma (Avila, R. et al. 1990). Simultáneamente, observaron un incremento en el contenido de proteínas. También observaron un aumento en los canales vasculares de la médula externa de los ovarios tratados, lo que se interpreta como una reacción de la estimulación glandular. Con observaciones a nivel de microscopía electrónica, se encontró un incremento en el área del citoplasma y en el área de las mitocondrias de las células intersticiales de la médula ovárica (González del Pliego, M. et al. 1988; Avila, R. et al. 1990). También en las células indiferenciadas hubo signos de estimulación, lo que sugirió que hubo una transformación de las células indiferenciadas en células intersticiales de los cordones medulares. En las células epiteliales del sistema lacunar, hubo estímulo en sus organelos citoplasmáticos.

La LH y la hCG actuaron sobre las células intersticiales de la médula ovárica, estimulando la síntesis de esteroides, los que serían el factor intrínseco responsable de la diferenciación sexual del ovario izquierdo funcional y de la atrofia del ovario derecho (Avila, R. et al. 1990).

OBJETIVO.

Sabiendo que el ovario de pollo recién nacido responde al estímulo con hormona gonadotropina coriónica, tratado en etapa embrionaria, provocando un incremento en las hormonas esteroides. Se propuso estudiar, en este trabajo, el efecto de la hormona gonadotropina coriónica humana, sobre el número y tamaño de las diferentes subpoblaciones celulares del ovario de pollo recién nacido, ya que existen trabajos realizados con la hormona FSH y con hormonas esteroides, en los cuales algunas poblaciones celulares aumentan en número, debido a la estimulación de la mitosis en estas células

MATERIALES Y MÉTODOS.

Se obtuvieron huevos fértiles de pollo, de la raza White Leghorn, de la granja La Italiana, de Cuernavaca, Morelos. Los huevos se incubaron en el Laboratorio de Biología de la Reproducción a 38° C en una incubadora (Iamex, S.A.), con humedad y ventilación constantes, hasta la eclosión de los huevos.

Al día 11 de desarrollo de los embriones, se realizó una ovoscopia para determinar el grado de desarrollo, la viabilidad de los embriones y marcar con un lápiz el límite de la cámara de aire.

Los embriones que se encontraron viables y en buenas condiciones de desarrollo se colocaron, con el eje mayor de manera horizontal, en bases de cartón que previamente se limpiaron con una gasa humedecida con alcohol al 70%. Se formaron dos lotes, uno control en el cual los embriones se dejaron intactos y el segundo lote fue el de los embriones experimentales, a los cuales se les manipuló de la siguiente manera: los huevos se trasladaron a un cuarto estéril (esterilizado una hora antes con calor seco, utilizando dos mecheros para este fin), donde se limpiaron con una gasa estéril humedecida con alcohol al 70%, una vez limpios los huevos, se perforaron con una aguja de disección por la parte de la cámara de aire, después se hizo un orificio triangular en la parte superior del huevo, encontrándose en posición horizontal, este orificio se realizó con una segueta de metal, cuidando de perforar sólo el cascarón y no dañar las membranas internas. Una vez perforado, se retiró el cascarón y se agregó suero fisiológico (Solución de NaCl al 0.9%) sobre la membrana externa, dejándolo reposar un momento. Con la ayuda de una aguja de disección se hizo un pequeño

orificio en la membrana externa y, con la ayuda de un bulbo, se succionó a través del orificio hecho a la cámara de aire, para que se separara de la membrana externa y bajara la membrana corioalantoidea, junto con el embrión, y evitar así un derrame sanguíneo que provocara la muerte del embrión. Una vez separada la membrana corioalantoidea de la membrana externa, se retiró ésta con la ayuda de unas pinzas, al quedar el orificio completamente libre de residuos de membrana externa, se cubrió con cinta adhesiva, igual que el orificio hecho a la cámara de aire. Los huevos se colocaron nuevamente en la incubadora y se dejaron transcurrir dos días. Al día 13 de incubación los huevos del lote control y del lote experimental se trasladaron al cuarto estéril, donde se les realizó una ovoscopia para determinar la sobrevivencia del embrión y para darles el tratamiento hormonal. Al lote experimental se le agregó una dosis de Hormona Gonadotropina Coriónica Humana (hCG) [Sigma Chemical Co. (St. Louis, Mo.)], en una concentración de 1 UI/100 μ l, agregándose la hormona sobre la membrana corioalantoidea. Las dosis de hormona se agregaron en los días 13, 15 y 17 de incubación de los embriones. Durante el desarrollo de los embriones se cuidó que la temperatura, humedad y ventilación de la incubadora fueran constantes.

Una vez concluido el desarrollo de los pollitos, dentro de las 24 horas después de la eclosión (21 días), se sacrificaron por decapitación. En seguida se les extrajo el ovario izquierdo, el cual se lavó con una solución libre de Calcio-Magnesio, para después seccionar el ovario en dos o tres fragmentos y fijarlos en glutaraldehído al 2.5% (ver apéndice) [Sigma Chemical Co. (St. Louis Mo.)] durante dos horas. Después de esta primera fijación, los ovarios se lavaron con una solución amortiguadora de fosfatos (ver apéndice) y se realizaron tres

lavados, de 30 minutos cada uno, una vez terminados los lavados se retiró el exceso de solución amortiguadora y se hizo una segunda fijación con Tetraóxido de Osmio al 1% (ver apéndice) (Polyscience, Inc., Warrington, PA., USA.) durante dos horas. Pasadas las dos horas de fijación, los ovarios se lavaron con solución amortiguadora de fosfatos durante 30 minutos, después de este lavado los ovarios se deshidrataron con acetona gradual (50%, 70%, 90% y 100%), realizándose 3 cambios de cada acetona, de 10 minutos cada uno.

Después de la deshidratación se procedió a preincluir en una mezcla de Epón 812 (ver apéndice) (Polyscience, Inc., Warrington, PA., USA.) y acetona, en una proporción 1:1 durante 18 horas. Pasado este tiempo, se procedió a incluir en Epón 812 y dejarlo en una estufa para su polimerización.

Una vez incluidos los ovarios, los bloques se rebajaron con una navaja de un filo, hasta formar una pequeña pirámide, dejando a la vista sólo el tejido a cortar. Se realizaron cortes de 1 μm de grosor, en un ultramicrotomo (Nova LKB, Bromma), los cuales se tiñeron con azul de toluidina (ver apéndice) [Sigma Chemical Co. (St. Louis Mo.)], fijando el colorante con calor, para tal efecto los cortes se pasaron sobre la flama de una lámpara de alcohol, seguidamente se lavaron con agua corriente, para después hacer observaciones en el microscopio de luz (American Optical) y así poder analizar los cortes.

Una vez que se hicieron las observaciones histológicas en el microscopio de luz, se realizó un estudio morfométrico con la ayuda de una digitalizadora (Argus-20, Hammamatsu), en la que se realizaron conteos, para la corteza ovárica, del número de células germinales u ovocitos, y del número y el área de las células pregranulosas. Haciéndose tres repeticiones de cada conteo celular en

un área de $15360 \mu\text{m}^2$. En la médula subcortical se delimitaron los cordones de células esteroideogénicas, los vasos sanguíneos y los canales lacunares, para poder obtener su área. También en la médula subcortical se obtuvieron el número de células indiferenciadas, el número de células esteroideogénicas y el porcentaje que ocupaba el intersticio, tomándose en cuenta que todo lo anterior se midió en un área de $15360 \mu\text{m}^2$.

A partir de los datos obtenidos en la digitalizadora, éstos se transformaron haciendo una regla de tres, para obtener una relación porcentual, ya que considero al área total como el 100%, entonces el área obtenida de cada grupo celular tuvo un porcentaje determinado. Respecto al número de células, éste se unificó para todos los tipos celulares, de los cuales se realizaron conteos en un área de $1000 \mu\text{m}^2$

El promedio del volumen de las células intersticiales medulares se determinó dividiendo la densidad volumétrica por la densidad numérica.

La densidad volumétrica se determinó por la técnica de conteo de puntos, expresada en porcentaje.

La densidad numérica representa el número de células intersticiales medulares por unidad de volumen del ovario, obtenida por la ecuación de Floderus (Weibel, E. y Bolender, R. 1973).

Una vez obtenidos los resultados se procedió a aplicar la prueba de T de Student, para determinar si el tratamiento hormonal aplicado a los embriones presentaba diferencias significativas, en cuanto a las poblaciones celulares analizadas.

RESULTADOS

Histológicamente los ovarios de los pollos recién nacidos, del grupo control presentaron una corteza con células germinales y pregranulosas. En las células germinales se observó un arreglo en grupos no homogéneos y pequeños, presentando una forma esférica irregular con un mínimo de citoplasma, un gran núcleo y dentro cromosomas aislados o en pares. Las células pregranulosas se encontraron distribuidas hacia la periferia del grupo celular, rodeando a las células germinales, las cuales tenían una forma irregular alargada, con poco citoplasma, un gran núcleo y un nucleolo evidente (fig. 1A).

En cuanto a la médula subcortical observamos los sistemas lacunares al igual que los vasos sanguíneos, los cuales no fueron numerosos y no estaban muy desarrollados. Las células endoteliales de los vasos sanguíneos estaban aplanadas, diferenciándose de las células epiteliales de los sistemas lacunares, que fueron grandes y redondas. Se apreció también que los cordones de células intersticiales medulares no fueron abundantes y fueron pequeños. Las células de los cordones intersticiales medulares con un núcleo evidente, presentaron inclusiones lipídicas en su citoplasma, que ayudaron a limitarlos perfectamente; pero no así a cada una de las células (fig. 1B, 2).

En cuanto a las células pobremente diferenciadas se encuentran aisladas ocasionalmente, ya que frecuentemente se encontraron juntas entre sí,

observándose varios tamaños. Estas células tuvieron un mínimo de citoplasma y un núcleo grande con nucleolos evidentes (fig. 2).

En los ovarios tratados con hCG la corteza presentó una mejor limitación entre los grupos de células germinales como en la distribución de las células pregranulosas, observándose una forma alargada de las células pregranulosas, que rodearon a las células germinales, así como un aumento de las mismas en el centro del grupo celular.

En la médula subcortical de los ovarios tratados con hCG, los sistemas lacunares aumentaron en tamaño y se encontraron distribuidos en mayor número, sus células fueron grandes y redondas, en comparación con los ovarios controles; los vasos sanguíneos aumentaron también en tamaño y en número, y las células endoteliales se observaron no tan aplanadas, aumentando un poco su tamaño. Los cordones de células intersticiales medulares aumentaron su tamaño y fueron más numerosos con el tratamiento con hCG, respecto a los ovarios controles, las células de los cordones conservaron las inclusiones lipídicas en su citoplasma y su núcleo evidente.

Al existir un mayor volúmen ocupado por los cordones de células intersticiales, sistemas lacunares y vasos sanguíneos, el intersticio se redujo en los ovarios tratados, en comparación con los ovarios controles.

Al realizar la morfometría , se observó que en la corteza ovárica de los pollos recién nacidos , no existió una diferencia significativa en el número de células germinales y células pregranulosas, pero sí hubo un aumento de 1.1 veces más en cuanto al área de las células pregranulosas en los ovarios de pollos tratados con hCG, aunque esta diferencia no llegó a ser significativa (Tabla 1).

En cuanto a los datos morfométricos de la médula subcortical, se observó en la grafica 1, que hubo un aumento de 1.4 veces más en el porcentaje de cordones de células intersticiales medulares de los ovarios tratados, en relación al porcentaje de los cordones de los ovarios controles, ésta diferencia tuvo una significancia igual a $P > 0.001$. Se observó que los sistemas lacunares de los ovarios tratados tuvieron un aumento de 2.3 veces más que en los ovarios controles, encontrándose una diferencia significativa igual a $P > 0.001$, y en cuanto a los vasos sanguíneos, existió un aumento de 1.3 veces más en los ovarios tratados que en los controles, con una diferencia significativa igual a $P > 0.005$.

Se observa también que existe una diferencia significativa en el volumen individual de las células intersticiales de los ovarios tratados con hCG, encontrándose un aumento de 1.4 veces más (gráfica 2) en comparación con los ovarios controles, con una significancia de $P > 0.00$ (Tabla 2).

El número de células pobremente diferenciadas se conservó casi en la misma proporción en los ovarios tratados que en los ovarios controles, al igual que

el número de células intersticiales medulares que se encontraron en los cordones, lo que significa que el incremento en los cordones intersticiales medulares, fue debido al aumento en el volumen de las células intersticiales y no al número de éstas (Tabla 3).

FIGURA 1.

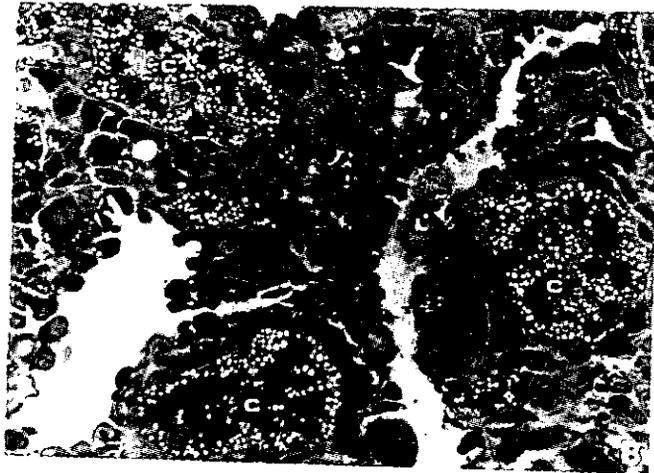


FIGURA 2.

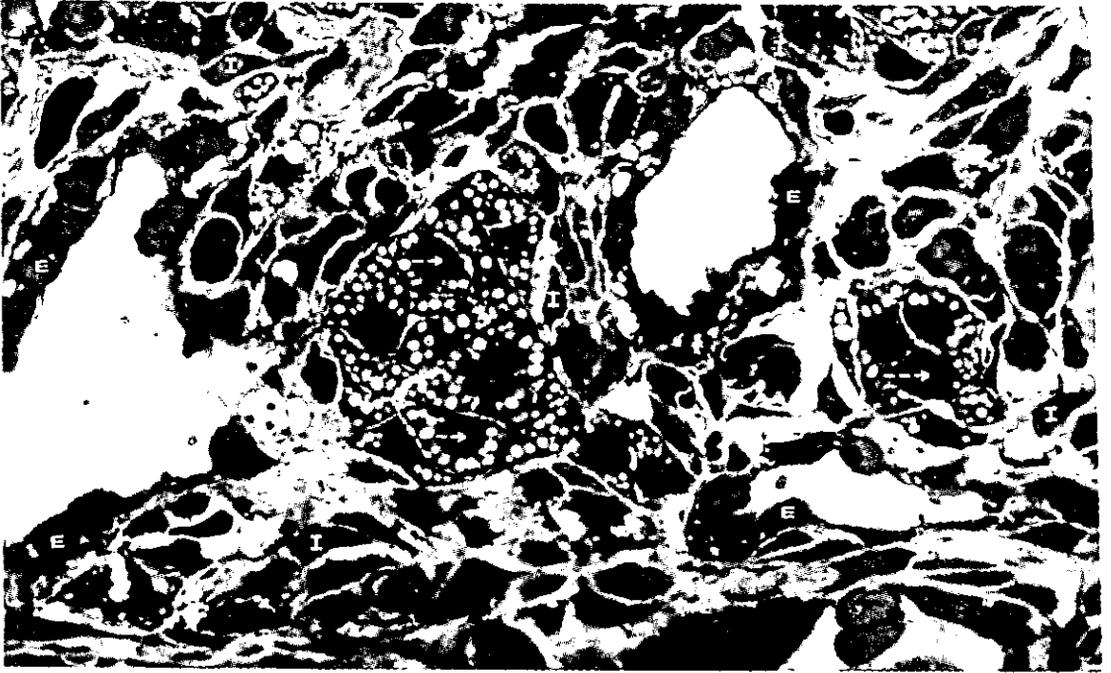


TABLA 1

DATOS MORFOMÉTRICOS DEL EFECTO DE LA hCG SOBRE LA CORTEZA OVÁRICA DE POLLOS RECIÉN NACIDOS.

Tratamiento	Número de células germinales / $1000\mu\text{m}^2$	Número de células pregranulosas / $1000\mu\text{m}^2$	Area de las células pregranulosas (μm^2)
CONTROL	5.9 ± 0.22	2.9 ± 0.17	17.6 ± 0.66
hCG	5.6 ± 0.11	2.6 ± 0.07	19.7 ± 0

Los valores son expresados con la media \pm error estándar. Significancia estadística: Control vs hCG, no significativa, n= 9 animales por grupo.

TABLA 2

DATOS MORFOMÉTRICOS DEL EFECTO DE LA hCG SOBRE LA MÉDULA SUBCORTICAL DEL OVARIO DE POLLO RECIÉN NACIDO

Tratamiento	Cordones (%)	Vasos Sanguíneos (%)	Sistema Lacunar (%)	Intersticio (%)
CONTROL	9.1 ± 0.12	0.65 ± 0.02	3.7 ± 0.26	86.4 ± 0.86
hCG	12.9 ± 0.66 ***	0.86 ± 0.05 **	8.5 ± 0.16 ***	77.8 ± 0.83 ***

Los valores que se observan se indican con su media ± error estándar. Significancia estadística: Control vs hCG, *** = P > 0.001, ** = P > 0.005 y n = 9 animales por grupo.

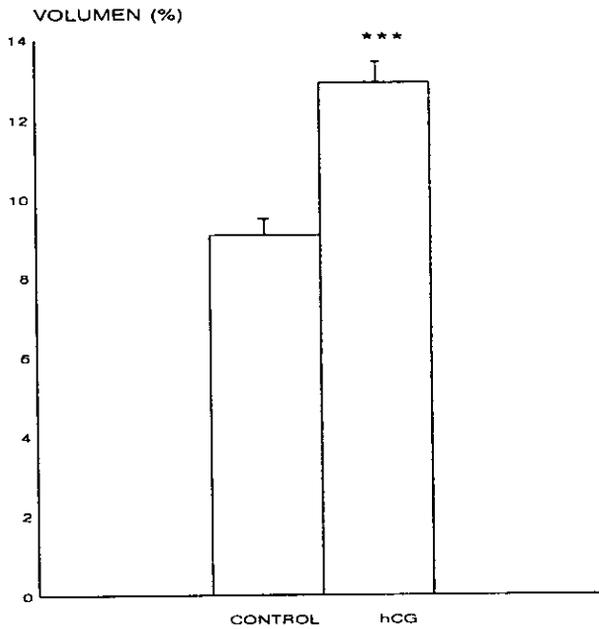
TABLA 3

DATOS MORFOMÉTRICOS DEL EFECTO DE LA hCG EN LA MÉDULA SUBCORTICAL DEL OVARIO DE POLLO RECIÉN NACIDO

Tratamiento	Número de células indiferenciadas / $1000\mu\text{m}^2$	Número de células intersticiales / $1000\mu\text{m}^2$	Volúmen individual de células intersticiales(μm^3)
CONTROL	23 ± 0.46	9.7 ± 0.8	6865.1 ± 174
hCG	23.4 ± 0.24	9.9 ± 0.29	9714.3 ± 199 ***

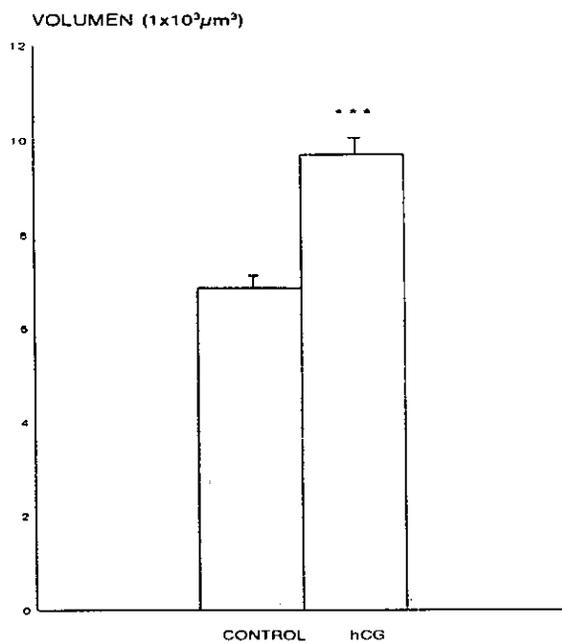
Los valores que se observan se indican con su media \pm error estándar. Significancia estadística: Control vs hCG, ***= $P > 0.001$, los otros valores no son significativos y $n = 9$ animales por grupo.

CORDONES INTERSTICIALES DE LA MÉDULA OVÁRICA



Gráfica 1. Comparación del porcentaje de los cordones intersticiales en la médula subcortical del ovario de pollo recién nacido. Los valores son expresados como la media \pm error estándar, para 9 animales por grupo. Significancia estadística: control vs hCG *** $P < 0.001$.

VOLUMEN INDIVIDUAL DE CÉLULAS INTERSTICIALES



Gráfica 2. Comparación del volumen individual de las células intersticiales de los cordones medulares del ovario de pollo recién nacido. Los valores son expresados como la media \pm error estándar, para 9 animales por grupo. Significancia estadística: control vs hCG *** $P < 0.001$.

DISCUSIÓN.

El ovario de pollo responde a la estimulación exógena con hormonas gonadotrópicas, durante el desarrollo embrionario, tanto *in vitro* (Grassi-Milano, E. y Pitini, A, 1978, Teng, C. y Teng, C., 1979; Teng, C. et al., 1982; Woods, J. et al., 1989) como *in vivo* (González-Morán, G. et al., 1985; González-Del Pliego, M. et al., 1988; González-Morán, G. y Mancilla, C., 1998). Las hormonas gonadotrópicas se unen a sus células blanco por medio de receptores membranales. Los receptores de gonadotropinas continúan madurando antes de que se genere el eje pituitario gonadal (día 13.5 de desarrollo) y la administración hormonal exógena activa los receptores hormonales en las gónadas (Woods, J. et al. 1977), esto sugiere que a esta temprana edad, la hormona por sí misma, induzca la formación de receptores hormonales (Shahin, M. et al. 1981).

En el presente trabajo la respuesta del ovario de pollo recién nacido tratado con hCG durante el desarrollo embrionario, se determinó por el incremento en el desarrollo de la corteza, presentándose una mejor limitación de los grupos de células germinales como en la distribución de las células pregranulosas. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Grassi-Milano y Pitini en 1978, ya que observaron, en embriones de pollo de 18 días, que los ovarios tratados con LH presentaron una corteza muy desarrollada y con los ovocitos ordenados en cordones celulares. En estudios *in vitro*, Velázquez y colaboradores (1997), encontraron que el número de células germinales y pregranulosas no incrementó

después del tratamiento con hCG, al observar que no hubo incorporación de timidina tritiada en las células, pero después del tratamiento con FSH el número de células aumentó al observarse un incremento en la incorporación de timidina tritiada. Lo mismo se observó en estudios *in vivo* (Shahin, M. et al., 1981), en los cuales se encontró que el número de células germinales aumentó después del tratamiento con FSH y del tratamiento con LH + FSH.

Respecto a la médula subcortical de lo ovarios tratados con hCG, los sistemas lacunares se encontraron muy desarrollados y distribuidos en mayor número, respecto a los ovarios controles, al igual que los vasos sanguíneos, asociándose este evento a una estimulación glandular efectuada por el ovario. Estos resultados no coinciden con trabajos anteriores, como los de Grasi-Milano y Pitini (1978), ya que observaron muy poco desarrollados los sistemas lacunares, esto se pudo deber a la metodología empleada, ya que lo realizaron en un cultivo organotípico.

En los cordones de células intersticiales medulares se observó un aumento en su tamaño, pero este aumento no se debió a un incremento en el número de células que forman a los cordones, sino que aumentaron su tamaño por el incremento en el volumen de las células intersticiales, sugiriéndose que estas células son afectoras a la hCG en el ovario de pollo embrionario (González-Morán, G. et al., 1985). Resultados similares fueron obtenidos por Woods (1989) en embriones de 10.5 hasta 18.5 días de desarrollo, observando por medio de inmunocitoquímica, que las células intersticiales de la médula ovárica mostraron

cambios en su forma, indicando que estas células se diferencian bajo la influencia de elevados niveles de LH plasmática, cambiando de una forma irregular a una forma ovalada y aumentando el número de estas células, así como su capacidad de síntesis de hormonas esteroideas, (Shahin, M. et al. 1982). También se han caracterizado *in vitro* fracciones celulares aisladas del ovario de pollo recién nacido, por medio de gradientes de metrizamide, mostrando que las células esteroideogénicas metabolizan progestina en andrógenos (Alvarez-Fernández, G. et al. 1995). En trabajos anteriores, con células en cultivo, se sugiere que las gónadas embrionarias forman colesterol si se les estimula con gonadotropina coriónica humana (Haffen, K. et al. 1969), incrementándose la producción de pregnenolona endógena, que a su vez forma la progesterona (Guichard, A. et al. 1979), la cual es necesaria para que se produzca LH (Scanes, C. et al. 1978).

Los resultados muestran que el efecto de la hCG propicia una hipertrofia en las células intersticiales medulares y no una hiperplasia, como sucede con el tratamiento con FSH (González-Morán, G. y Mancilla, C. 1998). Lo que indica que la hipertrofia de las células intersticiales es la característica más importante para la expansión de los cordones de las células intersticiales, en los animales tratados con hCG, ya que el número de células intersticiales permanece constante.

En cuanto a las células pobremente diferenciadas se observa que el número de éstas se conservó casi en la misma proporción, tanto en los ovarios tratados como en los ovarios controles, sugiriendo que este grupo celular persiste en la médula ovárica hasta el nacimiento y pueden transformarse en células

esteroidogénicas bajo estimulación gonadotrópica (González-Morán, G. et al. 1985). Alvarez-Fernández y colaboradores (1995) realizaron *in vitro*, fracciones celulares aisladas del ovario de pollo recién nacido por medio de un gradiente de metrizamida, y observaron que las células medulares indiferenciadas aromatizan andrógenos en estrógenos. En estudios *in vitro* de células de gónadas femeninas de 7 a 18 días de desarrollo, en presencia y ausencia de LH bovina, se determinó por el método de radioinmunoensayo, la cantidad de estradiol en el medio de cultivo, encontrando que para todos los estados de desarrollo hubo secreción de estradiol, pero para los estados más jóvenes fue más alto el contenido de colesterol, concluyendo que el número de receptores por célula secretora de estradiol disminuyó con la edad (Weniger, J. y Chourraqui, J. 1988).

El efecto que tiene la hCG en el ovario de embrión de pollo, no es proliferativo, de acuerdo con nuestros resultados, en todas las poblaciones estudiadas, pero en organismos adultos se ha observado que tanto la LH como la FSH actúan en las células de la granulosa causando su proliferación, así como el mecanismo de crecimiento folicular efectuado por la FSH y la estimulación en la producción de progesterona por las células de la granulosa con la LH (Yoshimura, Y. y Tamura, T. 1988), con esto se sugiere que tanto la LH como la FSH estimulan distintos eventos celulares en el embrión y en el animal adulto.

CONCLUSIÓN.

Con los resultados obtenidos se puede concluir que el ovario de pollo recién nacido, tratado con hCG en etapa embrionaria, no tiene un efecto proliferativo, ya que no provoca cambios significativos en el número de las distintas poblaciones celulares ováricas, respondiendo solamente las células intersticiales medulares al tratamiento con hCG, induciendo un incremento en su tamaño celular, sugiriendo que estas células son posiblemente células blanco a la hCG, siendo posible que esta gonadotropina actúe principalmente en la actividad endócrina y diferenciación celular del ovario prefolicular.

APÉNDICE.

Fijador de Glutaraldehído al 2.5%.

Agregar 2.5 ml de glutaraldehído a 25 ml de solución amortiguadora de fosfatos, agitando ligeramente para homogenizar.

Tetraóxido de Osmio al 1%.

Agregar 1gr. de tetraóxido de Osmio a 100 ml de solución amortiguadora de fosfatos, homogenizar con un agitador magnético, bajo una campana de extracción.

Solución amortiguadora de Fosfatos con un pH de 7.4.

Agregar 2.07gr de fosfato de sodio monobásico 0.3M en 50 ml de agua destilada. Preparar una segunda solución, agregando 8.82gr de fosfato de sodio dibásico en 200 ml de agua destilada; agitar ambas soluciones hasta homogenizar.

De la solución de fosfato de sodio monobásico se toman 19 ml, que se agregan a 81 ml de la solución de fosfato de sodio dibásico, la mezcla de ambas soluciones debe tener un pH=7.4.

Resina de Epón 812.

Colocar en un matraz 17.2 ml de Epón 812(Polímero), 5.84 ml de NMA (Plasticador), 17.2 ml de DDSA (Endurecedor) y 1.22 ml de DMP 30 (Catalizador), agitar hasta homogenizar.

Azul de Toluidina al 1%.

A 100 ml de agua destilada se le agrega 1 gr de azul de toluidina y se agita hasta homogenizar.

REFERENCIAS.

- Alamargot, J.1982.Manual de Anatomía y de Necropsias de las Aves.Editorial Continental.México.
- Alvarez-Fernández, G., Juárez-Oropeza, M., Velázquez, P., González-Del Pliego, M., Méndez-Herrera, M. y Pedernera, E.1995.Newly hatched chick ovarian cell subpopulations metabolize distinctively progesterin and androgen precursors.Gen. Comp. Endocrinol. 97, 31-41.
- Amin, S. y Gilbert, A.1970.Cellular changes in the anterior pituitary of the domestic fowl during growth, sexual maturity and laying.Br. Poult. Sci. II, 451-459.
- Austin, C. y Short, R.1982.Procesos de Reproducción en los Mamíferos.Hormonas en la Reproducción.La Prensa Médica Mexicana.México.
- Avila, R., Samar, M. y De Fabro, S.1990.*In vitro* effects of gonadotrophic and steroid hormones on the interstitial cells of the chick embryo ovaries.Rev. Fac. Cien. Med. Univ. Nac. Córdoba, 48, 13-17.
- Bahl, O.1977.Human Chorionic Gonadotropin, its receptor and mechanism of action.Fed. Proc., 36,2119-2127.

- Blazquez, E., Rubalcava, B., Montesano, R., Orci, L. y Unger, R.1976.Development of insulin and glucagon binding and the adenylate cyclase response in liver membranes of the prenatal, postnatal and adult rat:evidence of glucagon "resistance".Endocrinol., 98,1014-1023.
- Cole, H. y Cupps, P.1959.Reproduction in domestic animals II.Academic Press, New York.
- Cooke, D., Crowe, M., Roche, J. y Headon, D.1996.Gonadotrophin heterogeneity its role in farm animal reproduction.Anim. Rep. Sci., 41, 77-99.
- Crawford, R.1990.Poultry Breeding and Genetics.Elsevier, Amsterdam.
- Cunningham, J.1992.Fisiología Veterinaria.Interamericana-McGraw-Hill, México.
- Chester-Jones, R., Ingleton, P. y Phillips, J.1987.The structure and function of the hypothalamus and pituitary gland.In: Fundamentals of Comparative Vertebrate Endocrinology.R., Chester-Jones, P, Ingleton y J., Phillips.
- Daikoku, S., Ikeuchi, C. y Nakagawa, H.1974.Development of the hypothalamohypophyseal unit in the chick.Gen. Comp. Endocrinol., 23, 256-275.
- Darnell, J., Lodish,H. y Baltimore, D.1991.Biología Celular y Molecular.Editorial Labor, México.

- De Alba, J. 1985.Reproducción Animal.La Prensa Médica Mexicana. México.
- Dorskocil, M.1970.Development of the chick hypophysis.Acta Univ. Carol. (Med. Praha), 40, 1-131.
- Ede, D.1975.Anatomía de las Aves.Acribia, Zaragoza, España.
- Fugo, N.1940.Effects of hypophysectomy in the chick embryo.J. Exp. Zool. 85, 271-297.
- Gasc, J. y Sar, M.1981.Appearance of LH-immunoreactive cells in the Rathke's pouch of the chicken embryo.Differentia., 20, 77-80.
- Gilbert, A.1969.Innervation of the ovary of the domestic hen.Q. J. Exp. Physiol., 54, 404.
- Gilbert, A.1971.The ovary.In: Physiology and Biochemistry of the Domestic Fowl,Vol.3.D.J. Bell y B.M. Freeman.Academic Press.London.
- Ginsberg, M y Eyal-Giladi, H.1987.Primordial germ cells of the young chick blastoderm originate from the central zone of the area pellucida irrespective of the embryo forming process.Develop., 101, 209-219.

-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.

-González-Morán, G. y Mancilla, C. 1998.Histomorfometric analysis in the ovary of newly hatched chicks treated with follicle-stimulating hormone during embryonic development.Eur. J. Morphol., 36, 1-8

-Grassi-Milano, E. y Pitini, A. 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.

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

-Haffen, K., Cedard, L. y Guichard, A.1969.Formation de cholestérol radioactif à partir d' acétate de Na-1-¹⁴C par les gonades embryonnaires de poulet, cultivées *in vitro*.C. R. Acad. Sci., 263, 2914-2917.

-Hardisty, M.1978.Primordial germ cells and the vertebrate germ line.In: The Vertebrate Ovary.ed. R. Jones.Plenum Press.New York.

-Hardy, R.1992.Fisiología del sistema endócrino.El Manual Moderno, México.

-Harvey, S., Scanes, C. y Phillips, J.1987.Avian reproduction.In: Fundamentals of Comparative Vertebrate Endocrinology.Eds. I. Chester-Jones, P. Ingleton y J. Phillips.

-Houillon,Ch.1978.Sexualidad.Omega.Barcelona, España.

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

-Huettnner, A.1958.Fundamentals of Comparative Embryology of the Vertebrates.The McMillan Company.New York.

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

-Johnson, A.1986.Reproduction in the female.In: Avian Physiology.Ed. P. Sturkie.New York.

-Johnson, A., Bridgham, J. y Wagner, B.1996.Characterization of a chicken luteinizing hormone receptor (cLH-R) complementary deoxyribonucleic acid, and expression of cLH-R messenger ribonucleic acid in the ovary.Biol. Reprod., 55, 304-309.

-Jones, R.1978.The vertebrate ovary.In: Comparative Biology and Evolution.Plenum Press.New York.

-Krishnan, K., Proudman, J. y Bahr, J.1994.Purification and partial characterization of isoforms of luteinizing hormone from the chicken pituitary gland.Comp. Biochem. Physiol. Vol. 108B, 2, 253-264.

-Lofts, B. y Murton, R.1973.Reproduction in birds.In Avian Biology.III.D. Farner y J. King.Academic Press.New York.

-McDonald, L. y Pineda, M.1991.Endocrinología Veterinaria y Reproducción.Interamericana-McGraw-Hill, México.

-Merchant, H.1991.Tópicos Selectos de Biología de la Reproducción.Porrúa-UNAM, México.

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

-Mills, N. y Means, A.1972.Sorbitol dehydrogenase of rat testis:changes of activity during development after hypophysectomy and following gonadotrophic hormone administration.Endocrinol., 91, 147-156.

-Pearson, R.1972.The Avian Biology.Academic Press.New York.

-Rugh, R. 1977.A Guide to Vertebrate Development.Burgess Publishing Company,minnesota.

-Ruiz, M.1988.Fundamentos de Embriología y Fisiología de la Reproducción.Recopilación, UNAM.México.

-Sauveur, B.1992.Reproducción de las Aves.Ediciones Mundi Prensa, Madrid. España.

-Scanes, C., Chadwich, A., Sharp, P. y Bolton, N.1978.Diurnal variation in plasma luteinising hormone levels in the domestic fowl (*Gallus domesticus*).Gen. Comp. Endocrinol.34,45-49.

-Scanes, C. y Fagioli, H. 1980.Effets of mammalian and avian gonadotropins on *in vitro* progesterone production by avian ovarian granulosa cells.Gen. Comp. Endocrinol., 41, 1-7.

-Shahin, M., Csaba, G. y Dobozy, O.1981.Effects of mammalian hypophyseal hormones:gonadotropins, thyrotropin and adrenocorticotropin, on the embryonic development of 8-days chick embryo gonads.Arch. Anat. Hist. Embr. norm. et exp., 64, 111-119.

-Shahin, M., Torok, O y Csaba,G. 1982.The overlapping effects of thyrotropin and gonadotropins on chick embryo gonads *in vitro*.Acta Morphologica Acad. Sci. Hung. 30(2) 109-125.

-Sharp, P.1980.Female Reproduction.In.Avian Endocrinology.A. Epple y Stetson, M.Academic Press.New York.

-Shumway, W.1989.Introduction to Vertebrate Embryology.John Wiley and Sons, New York.

-Smidt, D. y Ellendorff, F.1972.Endocrinología y Fisiología de la Reproducción de los Animales Zootécnicos.Acribia.Zaragoza, España.

-Stritesky, J. y Rychter, Z. 1977. Contribution to the problem of the vascularization of the hypophysis cerebri in the chick embryo. Proc. XIXth Morphol. Cong. Folia Morphol., 25, 324-328.

-Sturkie, P. 1965. Fisiología Aviar. Acribia. Zaragoza, España.

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

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

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

-Tokarz, R. 1978. Oogonial proliferation, oogenesis and folliculogenesis in nonmammalian vertebrates. In: The Vertebrate Ovary. Plenum Press. New York.

-Van Tienhoven, A. 1959. Reproduction in the domestic fowl. Physiology of the female. In: Reproduction in the Domestic Animals. Eds. H. Cole y P. Cupps. Academic Press. New York.

-Velázquez, P., Peralta, Y. y Pedernera, E.1997.Proliferative effect *in vitro* of follicle-stimulating hormone on the left ovary of the chick embryo.Gen. Comp. Endocrinol., 105, 40-49.

-Vogel,N.1956.Pituitary-gonad.Relationship in the Chick Embryo. PhD. Dissertation.Indiana University.

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

-Wallach, D.1987.Fundamentals of Receptor Molecular Biology.Marcel Dekker, New York.

-Weibel, E. y Bolender, R. 1973.Stereological techniques for electron microscopic morphometry.In:Principles and Techniques of Electron Microscopy.Vol. 3. Van Nostrand Reinhold.New York.

-Wells, J. y Gilbert, A.1984.Ovarian steroid hormone reproduction.In:Physiology and Biochemistry of the Domestic Fowl.Vol. 5.B. Freeman.Academic Press, London.

-Weniger, J. 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.1955.Ontogeny of endocrine correlation.In: Analysis of Development.Eds. B. Willier, P. Weiss y V. Hamburger.Saunders.Philadelphia.

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

-Woods, J., Podczaski, E., Erton, L., Rutherford, J. y McCarter, C.1977.Establishment of the adenohipofyseal-testicular axis in the chick embryo.I. Testicular androgen levels.Gen. Comp. Endocrinol., 32, 390-394.

-Woods, J., Hopkins, W., Caliendo, J., Sorrentino, M., Martens, J. y Thommes, R.1985.Ontogenesis pars distalis of the chick embryo.In: Current Trends in Comparative Endocrinology.Eds. B. Lofts y W. Holmes.University Press.Hong Kong.

-Woods, J.1987.Maturation of the Hipotalamo-Adenohipofyseal-Gonadal (HAG) axes in the chick embryo.J. Exp. Zool. (supplement), 1:265-271.

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

**ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

-Yoshimura, Y. y Tamura, T. 1988.Effects of gonadotrophins, steroid hormones, and epidermal growth factor on the *in vitro* proliferation of chicken granulosa cells.Poult. Sci., 67, 814-818.