

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO



FACULTAD DE CIENCIAS

“EFECTO DE LAS HORMONAS GONADOTROPICAS  
SOBRE LA EXPRESION DE LOS RECEPTORES DE  
PROGESTERONA EN EL OVARIO PREFOLICULAR  
DE *Gallus domesticus*”

285880

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

B I Ó L O G O

P R

ERIC GUTIÉRREZ BORDERO



FACULTAD DE CIENCIAS  
SECCION ESCOLAR

MÉXICO, D.F.

2000



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

**MAT. MARGARITA ELVIRA CHÁVEZ CANO**  
Jefa de la División de Estudios Profesionales  
P r e s e n t e

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo de Tesis:

**“Efecto de las hormonas gonadotrópicas sobre la expresión de los receptores de progesterona en el ovario prefolicular de *Gallus domesticus*”**

realizado por **Eric Gutiérrez Cordero**

Con número de cuenta **8926972-3** , pasante de la carrera de **Biología**

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

A t e n t a m e n t e

Director de tesis  
Propietario

**Dra. María Genoveva González Morán**

Propietario

**Dr. Ignacio Camacho Arroyo**

Propietario

**Dra. Marcela Esperanza Aguilar Morales**

Suplente

**M. en I.B.B. Saúl Cano Colín**

Suplente

**Dra. Concepción Sánchez Gómez**

**FACULTAD DE CIENCIAS  
U. N. A. M.**

Consejo Departamental de Biología

*Edna María Suárez Díaz*

**Dra. Edna María Suárez Díaz**



**DEPARTAMENTO  
DE BIOLOGIA**

**Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Biología de la Reproducción Animal de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la dirección de la Dra. Genoveva González Morán.**

## ***Dedicatorias***

***Con cariño, para todas las personas que han contribuido a mi formación personal.***

*A mis padres Miguel y Margarita por su cariño, apoyo y comprensión que me han brindado las fuerzas para concluir este trabajo.*

*A toda mi familia por el apoyo que he recibido siempre y por alentarme en cada paso que doy.*

*A todos mis compañeros del laboratorio por su amistad.*

## ***Agradecimientos***

*A mi directora de Tesis por los momentos agradables que compartimos; por su amistad y confianza, apoyo en la parte académica; pero sobre todo el apoyo en lo personal. Además quiero agradecerle el que me permitiera experimentar con la inquietudes que tuve.*

*Al Dr. Ignacio Camacho Arroyo del departamento de Biología de la Facultad de Química de la U.N.A.M. por proporcionar las sustancias necesarias para realizar este trabajo.*

*A los revisores de la tesis por participar con interés en la revisión.*

*A la Coordinación de programas académicos, por la beca otorgada para realizar este trabajo.*

*Al laboratorio del que forme parte y a la Universidad Nacional Autónoma de México por la oportunidad que me brindaron para desarrollarme como profesionista.*

# ÍNDICE

---

## I. RESUMEN

## II. INTRODUCCIÓN

<i>Aparato reproductor de la gallina</i> .....	1
<i>desarrollo embrionario del aparato reproductor</i> .....	2
<i>ovario prefolicular</i> .....	5
<i>ovario folicular</i> .....	7
<i>esteroidogénesis</i> .....	7
<i>Sistema Neuroendocrino</i> .....	9
<i>hipotálamo</i> .....	9
<i>hipófisis</i> .....	10
<i>eje hipotálamo-hipófisis-gónada</i> .....	11
<i>Hormonas</i> .....	12
<i>síntesis y transporte de las hormonas</i> .....	13
<i>Hormonas gonadotrópicas</i> .....	14
<i>hormona foliculo estimulante (FSH)</i> .....	15
<i>hormona luteinizante (LH)</i> .....	16
<i>acción conjunta de la FSH y la LH</i> .....	17
<i>Hormonas ováricas</i> .....	18
<i>esteroides</i> .....	18
<i>estrógenos</i> .....	19
<i>progesterona</i> .....	19

<i>Mecanismos de acción hormonal</i> .....	20
<i>de hormonas hidrosolubles</i> .....	22
<i>Receptores hormonales</i> .....	24
<i>receptor de progesterona</i> .....	24
<i>Inmunohistoquímica</i> .....	27
<i>técnica de avidina-biotina ligada a peroxidasa</i> .....	29
<b>III. JUSTIFICACIÓN</b> .....	30
<b>IV. ANTECEDENTES</b> .....	31
<b>V. HIPÓTESIS</b> .....	34
<b>VI. OBJETIVOS</b> .....	35
<b>VII. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	36
<i>Incubación</i> .....	36
<i>Manipulación de los embriones y aplicación de las dosis de hormonas</i> .....	36
<i>Obtención del material biológico</i> .....	37
<i>Tinción con hematoxilina-eosina</i> .....	38
<i>Técnica inmunohistoquímica para la identificación del RP</i> .....	39
<i>Análisis histológico</i> .....	40
<i>Análisis inmunohistoquímico</i> .....	40
<i>Prueba estadística</i> .....	40
<b>VIII. RESULTADOS</b> .....	41
<i>Inmunoreactividad en el grupo control</i> .....	41
<i>Efecto de la FSH sobre la inmunoreactividad al RP</i> .....	45
<i>Efecto de la LH sobre la inmunoreactividad al RP</i> .....	45



---

*Cuantificación de las células intersticiales inmunoreactivas al RP en los  
cordones medulares.....*

**45**

**IX. DISCUSIÓN..... 48**

**X. ESTUDIOS SUBSECUENTES..... 52**

**XI. CONCLUSIONES..... 53**

**XII. LITERATURA CITADA..... 54**

**XIII. APÉNDICE..... 61**

## I. RESUMEN

---

Se estudió la distribución del receptor de progesterona (RP) en el ovario de pollos recién nacidos, usando la técnica indirecta de inmunoperoxidasa para microscopía fotónica. Para la localización del RP se utilizó el anticuerpo monoclonal Let 81 que se une a la región amino terminal del RP del pollo. Además, se estudió el efecto de la hormona foliculo estimulante (FSH) y de la hormona luteinizante (LH), sobre la expresión del RP en las diferentes subpoblaciones celulares del ovario del pollo recién nacido, cuando son administradas durante el desarrollo embrionario en tres dosis de refuerzo los días 13, 15 y 17 de incubación.

El RP se detectó únicamente a nivel nuclear. La inmunoreactividad se localizó en las células del epitelio germinal, células germinales, células intersticiales y células epiteliales de los canales lacunares profundos. El mayor número de células e intensidad de la inmunotinción para el RP se localizó en las células del epitelio germinal, células germinales y células de los canales lacunares profundos, mientras que las células indiferenciadas no presentaron inmunoreactividad.

Después del tratamiento con la FSH, aumentó el número de núcleos inmunoreactivos e intensidad en las células intersticiales de los cordones medulares y se observó una inducción de la inmunoreactividad en las células indiferenciadas. En cambio, la LH provocó una disminución en el número e intensidad de la inmunoreactividad de las células intersticiales.

Se concluye que varias poblaciones celulares del ovario prefolicular del pollo recién nacido son células blanco a la progesterona y que las hormonas gonadotrópicas participan en la regulación de la expresión del RP en las células esteroideogénicas medulares del ovario.

## II. INTRODUCCIÓN

---

### APARATO REPRODUCTOR DE LA GALLINA

El aparato reproductor de la gallina al igual que en la mayoría de las aves, está formado únicamente por un ovario y un oviducto izquierdos funcionales, el ovario y oviducto derechos degeneran durante el desarrollo embrionario y quedan como rudimentos (Mc Lelland, 1992; North y Bell, 1993). El ovario se localiza en la parte superior de la cavidad abdominal unido a la pared dorsal del cuerpo por el ligamento mesovárico, además se apoya en el extremo anterior del riñón izquierdo, en estrecho contacto con la glándula suprarrenal (Fig.1).

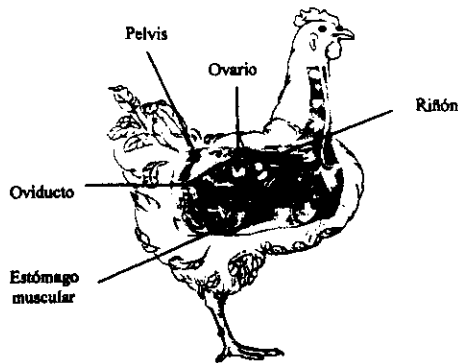


Fig. 1.. Localización del aparato reproductor de la gallina. Modificado de Hoffmann-Völker (1969).

El ovario se compone de una corteza externa y una médula interna. La corteza está rodeada de una capa de tejido conjuntivo llamada túnica albugínea que a su vez está recubierta por un epitelio germinal que contiene a los folículos, los cuales protegen a los óvulos (Sturkie, 1965). La médula contiene tejido conjuntivo, vasos sanguíneos y linfáticos, nervios y tejido intersticial (Alamargot, 1982).

El oviducto es un tubo muscular mucoso, que se abre en la cavidad abdominal cerca del ovario; el otro extremo desemboca en la cloaca. En el oviducto en actividad se reconocen cinco segmentos bien marcados: infundíbulo, magnum, istmo, útero y vagina (Alamargot, 1982) (Fig. 2).

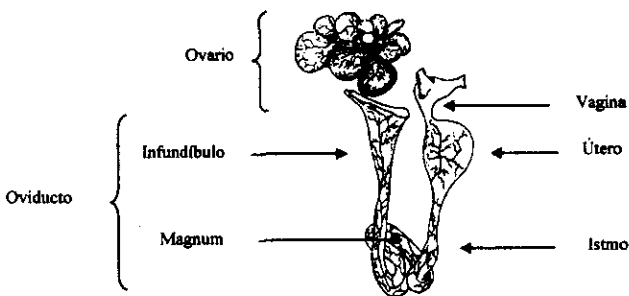


Fig. 2. Aparato reproductor de la gallina en puesta. Modificado de Sauveur (1992).

### **Desarrollo embrionario del aparato reproductor**

Al comienzo del desarrollo embrionario del pollo se forman dos engrosamientos longitudinales en el epitelio mesodérmico que reciben el nombre de crestas urogenitales (Ede, 1975; Balinsky, 1978; Houillon, 1978). La mayor parte del epitelio de las crestas urogenitales está formado por células que se parecen a las células del epitelio del peritoneo, y en menor grado, están formadas por otro tipo de células llamadas células germinales primordiales (CGP), que darán origen a las ovogonias (Balinsky, 1978). Las CGP no se originan en las crestas germinales, sino que provienen del saco vitelino (endodermo extraembrionario), de ahí migran y al tercer día de incubación llegan a las crestas germinales y se intercalan entre las células del epitelio peritoneal que, a partir de

este momento, recibe el nombre de epitelio germinativo (Houillon, 1978). A su llegada a las crestas germinales, las CGP se acumulan en la misma proporción en ambas gónadas, pero a medida que el embrión se desarrolla, el incremento de las CGP se hace de 2 a 5 veces más rápido en la gónada izquierda. Con la llegada de las células germinales primordiales ocurre un primer crecimiento de los cordones sexuales primitivos (Balinsky, 1978). En este momento se consideran gónadas indiferenciadas y se componen de dos partes funcionalmente distintas, la corteza (constituida por el epitelio germinativo) y la médula (constituida por los cordones sexuales). La corteza tiene la potencialidad de dar lugar al tejido ovárico; mientras que la médula puede dar origen al tejido testicular. Sin embargo, la gónada izquierda difiere de la gónada derecha pues, la gónada izquierda tiene ambos componentes (corteza y médula) lo que la hace sexualmente bipotencial, mientras que la gónada derecha sólo tiene la porción medular y residuos de corteza debido a la acumulación asimétrica de las CGP, por lo tanto es capaz de originar exclusivamente testículo (Ede, 1975). En este período, las gónadas indiferenciadas se localizan en la región anterior del mesonefros (riñón secundario) y se encuentran conectadas a éste mediante los conductos mesonéfricos (conductos de Wolff), que son una homología de los túbulos seminíferos (Ede, 1975; Houillon, 1978).

La diferenciación sexual comienza entre el quinto y el séptimo día de desarrollo embrionario (Ede, 1975; North y Bell, 1993). Se lleva a cabo gracias a la acción de hormonas, cuya producción depende del sexo genético. En ausencia de las hormonas no se lleva a cabo la diferenciación ni el desarrollo (Austin y Short, 1982). Las hembras en las aves son el sexo heterogamético (ZW), mientras que los machos son el sexo homogamético (ZZ). Cuando el animal está genéticamente predeterminado a ser hembra, las hormonas inducen a que la gónada izquierda prosiga su desarrollo, en tanto que la gónada derecha involuciona, sobre todo porque el ovario izquierdo normal inhibe el desarrollo de la gónada derecha mediante la secreción de estrógenos (Ede, 1975; Houillon, 1978; García *et al.*, 1995). La diferenciación de la gónada izquierda forma un ovario que se caracteriza por:

- un primer crecimiento de los cordones sexuales primitivos con potencialidad masculina, que después abortan y son absorbidos, provocando la aparición de lagunas. Con esto el interior de la gónada se llena de mesénquima poco compacto atravesado por vasos sanguíneos.
- un segundo crecimiento de los cordones sexuales, y a veces un tercero, del que resulta la formación de un epitelio germinativo grueso, al tiempo que la médula de la gónada se reduce. Las células germinales de los cordones del segundo crecimiento se desarrollan dando lugar a ovogonias.
- una reducción de la capa del mesénquima llamada albugínea ovárica que separa los dos crecimientos y la degeneración de los conductos mesonéfricos (Houillon, 1978).

Durante el período de diferenciación sexual se desarrolla el conducto de Müller izquierdo, que es un tubo abierto que dará origen al único oviducto, en tanto que el conducto derecho degenera persistiendo sólo un vestigio que desemboca en la cloaca (Ede, 1975; Houillon, 1978). También se lleva a cabo la diferenciación de las células germinales primordiales que comienza hacia el octavo día del desarrollo embrionario. En este período las CGP se transforman en ovogonias, las cuales sufren repetidas divisiones mitóticas dando lugar a los denominados ovocitos primarios que son células diploides, éstos ya no se dividen, sólo aumentan de tamaño. En el momento del nacimiento, el núcleo del ovocito primario se encuentra en la fase de paquíteno de la profase meiótica (cuando los cromosomas homólogos se están entrecruzando y presentan enroscamiento en espiral), para evolucionar lentamente a la fase de diploteno (cuando los cromosomas homólogos ya se están separando y solamente permanecen unidos en los quiasmas o puntos de entrecruzamiento) en la que permanecen meses o incluso años. En el animal sexualmente maduro, aproximadamente 24 hrs antes de la ovulación, el ovocito primario sufre en el interior del folículo la primera división de maduración, que es un proceso de división reduccional, dando lugar a un ovocito haploide denominado ovocito secundario, con la consecuente expulsión del primer corpúsculo polar. Posteriormente se produce la ovulación por la ruptura de las paredes del folículo maduro a nivel del estigma, gracias al estímulo de la hormona luteinizante.

La segunda división de maduración (con la correspondiente expulsión del segundo corpúsculo polar) tiene lugar en el infundíbulo, tras la fecundación (Alamargot, 1982; Sauveur, 1992). En las aves los folículos que degeneran no dan origen al cuerpo lúteo como en los mamíferos (Mc Lelland, 1992).

### **Ovario prefolicular**

El tracto genital del pollo, al final del desarrollo embrionario y cerca de la eclosión ya es asimétrico, siendo únicamente funcionales el ovario y el oviducto izquierdos (Houillon, 1978). El ovario en el nacimiento está constituido por una corteza y una médula bien definidas (Sauveur, 1992) y se pueden distinguir las siguientes subpoblaciones celulares: células intersticiales o esteroiogénicas, células germinales, células epiteliales indiferenciadas, células prefoliculares y fibroblastos (Álvarez-Fernández *et al.*, 1995). También se pueden encontrar vasos sanguíneos y elementos del sistema lacunar. Las células esteroiogénicas de los cordones medulares presentan abundantes gotas de lípidos en su citoplasma y forman cordones de talla irregular en la médula, en los que penetran nervios (González-Morán *et al.*, 1985; González del Pliego *et al.*, 1988). Las células germinales se localizan principalmente en la corteza, aunque algunas se llegan a encontrar en la médula, presentan un núcleo grande y en su mayoría son ovocitos primarios que se encuentran en la fase de paquiteno de la profase I, por lo cual son evidentes los cromosomas (González-Morán *et al.*, 1985; Álvarez-Fernández *et al.*, 1995). Las células epiteliales indiferenciadas se localizan entre los grupos de células intersticiales en la médula ovárica (González del Pliego *et al.*, 1988), tienen escaso citoplasma y un núcleo grande con uno o más nucleolos (González-Morán *et al.*, 1985; González del Pliego *et al.*, 1988; Álvarez-Fernández *et al.*, 1995) éstas originan las células de la teca de los folículos (Narbaiz y De Robertis Jr., 1968). Las células prefoliculares se localizan en la corteza ovárica entre los ovocitos y tienen un núcleo

ovoide con uno o más nucleolos (Álvarez-Fernández *et al.*, 1995). Los vasos sanguíneos se encuentran en la médula (Alamargot, 1982) al igual que el sistema lacunar delimitado por células epiteliales (González-Morán *et al.*, 1985; González del Pliego *et al.*, 1988) (Fig. 3).

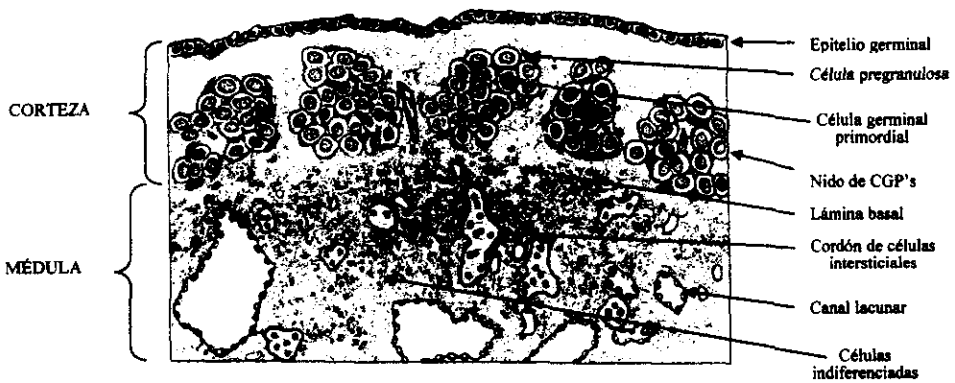


Fig. 3. Esquema que muestra la histología del ovario izquierdo del pollo recién nacido, donde (CGP's) son las células germinales primordiales.

A partir de la 5ª semana de vida del embrión aparecen una serie de estrías que aumentan en número y en profundidad, el tejido medular se desarrolla hacia el exterior y la distinción entre la médula y la corteza se va haciendo cada vez más difícil. A medida que tiene lugar el desarrollo de los folículos, la corteza va adquiriendo un aspecto más granuloso (Sauveur, 1992).



### **Ovario folicular**

Hacia las 24 semanas de edad, la gallina es sexualmente activa y su ovario sufre muchos cambios como consecuencia de la síntesis de hormonas esteroides (Sauveur, 1992). El ovario aumenta de peso 11 días antes de la puesta del primer huevo, porque se desarrollan de 4 a 6 folículos entre los miles que se encuentran en él, por estímulo de la FSH. Por lo tanto, se observan sobre la superficie del ovario, folículos de diferente tamaño y desarrollo que le dan al ovario aspecto de racimo de uvas grande y amarillento (Ede, 1975; García *et al.*, 1995). En la gallina se encuentran entre 25 000 y 100 000 folículos ováricos pero aproximadamente 1 500 van a madurar y los demás sufrirán una atresia lipídica (Alamargot, 1982). La distinción entre la médula y la corteza en el ovario desaparece. Los folículos más desarrollados están suspendidos del ovario por un pedículo por donde penetran de 2 a 4 arterias que forman una red capilar densa alrededor de la membrana basal (Sturkie, 1965) y su estructura es la siguiente:

- una capa perivitelina acelular, segregada por la granulosa,
- una capa monocelular llamada granulosa,
- una capa basal,
- dos tecas, una interna y otra externa, que contienen células intersticiales,
- una capa de tejido conjuntivo (salvo en la zona del estigma) y
- un epitelio superficial (Sauveur, 1992).

Durante la ovulación, las paredes del folículo se rompen en el estigma que es una zona escasamente irrigada por donde se libera al ovocito (Mc Lelland, 1992).

### **Esteroidogénesis**

El ovario de la gallina secreta, bajo el control de las hormonas gonadotrópicas, tres tipos de esteroides sexuales: estrógenos, andrógenos y progesterona (Sauveur, 1992;

North y Bell, 1993; García *et al.*, 1995). Los principales esteroides liberados son el  $17\beta$ -estradiol y la progesterona y en menor grado androstenediona y testosterona (Ruckebusch *et al.*, 1994). También son liberados otros factores no esteroidales como aminas biogénicas, prostaglandinas, factores inhibidores müllerianos, inhibina, relaxina y factores de crecimiento. La esteroidogénesis, sin embargo, comienza desde el desarrollo embrionario del pollo. Por ejemplo, se han detectado andrógenos,  $17\beta$ -estradiol y estrona en las gónadas indiferenciadas de ambos sexos hacia el día 3 de incubación, así como la producción activa de progestinas, andrógenos y estrógenos en el tejido ovárico diferenciado entre los días 6 y 8 de incubación. En el suero sanguíneo del embrión se detecta testosterona y  $17\beta$ -estradiol entre los días 5.5 a 7.5 de incubación, mientras que los estrógenos conjugados se acumulan en el fluido alantoico por el día 8. A la vez, se han detectado enzimas como la  $3\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa en los cordones medulares del ovario, entre el segundo y cuarto día de incubación, antes de la aparición de células secretoras características y de la diferenciación ovárica; esta enzima, al igual que la  $\Delta 5$ - $\Delta 4$ -isomerasa catalizan la conversión de pregnenolona a progesterona (Johnson, 1990).

En el ovario de pollos recién nacidos se encuentran al menos dos subpoblaciones de células esteroidogénicas; una de estas poblaciones son las células esteroidogénicas de los cordones medulares que metabolizan progestinas a andrógenos, las otras son las células epiteliales indiferenciadas que aromatizan andrógenos a estrógenos (Pedernera *et al.*, 1988; Álvarez-Fernández *et al.*, 1995). En el ave adulta la síntesis de estrógenos está asegurada principalmente por el segundo y el tercer folículo de mayor tamaño. La máxima capacidad esteroidogénica requiere de la interacción de las células de la granulosa y de la teca y esta síntesis es regulada por hormonas gonadotrópicas. Las células de la teca producen de manera principal andrógenos, los cuales pasan por difusión a las células de la granulosa, donde se transforman en estrógenos por la acción de la enzima aromatasa. (Ruckebusch *et al.*, 1994).

## SISTEMA NEUROENDOCRINO

Todas las funciones reproductoras están reguladas por la interacción entre los sistemas nervioso y endocrino. Así, algunas regiones del encéfalo reciben informaciones sensoriales del organismo y del ambiente, luego las transmite al hipotálamo y éste a su vez las transmite a la hipófisis, que es la glándula que tiene gran influencia sobre la fisiología del ovario mediante la liberación de hormonas (Fig. 4).

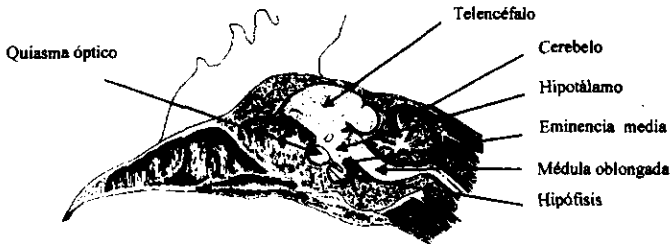


Fig. 4. Cavidad craneana de la gallina (corte sagital). Muestra la localización del hipotálamo y de la hipófisis (componentes del sistema neuroendocrino). Tomado de Hoffmann-Völker (1969).

### **Hipotálamo**

El hipotálamo se encuentra en la zona más ventral del diencefalo, forma el piso del tercer ventrículo y queda situado por encima de la hipófisis. Comprende al quiasma óptico, al tuber cinerium, a los cuerpos mamilares y a la eminencia media (Cunningham, 1992). El hipotálamo contiene células neurosecretoras (los núcleos supraópticos, paraventriculares e infundibulares); sus axones forman ciertos haces de fibras (los haces supraóptico-hipofisiario, paraventrículo-hipofisiario y tubero-hipofisiario), los cuales tienen ramas hacia la eminencia media. La mayor parte de las fibras del haz supraóptico-

hipofisiario terminan en el lóbulo posterior de la hipófisis (Sturkie, 1965). El hipotálamo es el centro de mando de un gran número de vías de control dentro del sistema autónomo. Produce hormonas liberadoras de gonadotropinas (GnRH) que coordinan la secreción de hormonas de la hipófisis, entre las que se encuentran las hormonas gonadotrópicas (Smidt y Ellendorff, 1972; Cunningham, 1992).

### ***Hipófisis***

La hipófisis es una glándula que está situada en la depresión del hipotálamo en forma de silla de montar del hueso esfenoides (silla turca), inmediatamente por detrás del quiasma óptico y en posición ventral respecto del hipotálamo. Se halla rodeada por la dura madre compacta y bien vascularizada que forma una cubierta hacia la parte dorsal, atravesada solamente por el pedúnculo hipofisiario y los vasos sanguíneos (Sturkie, 1965; Smidt y Ellendorff, 1972).

La glándula comprende un lóbulo anterior llamado adenohipófisis y un lóbulo posterior (neurohipófisis), separados por una capa de tejido conjuntivo (Cunningham, 1992). Tanto el lóbulo anterior como el lóbulo posterior son de origen ectodérmico (Sturkie, 1965). La adenohipófisis está formada por dos porciones: la pars distalis y la pars tuberalis. En las aves no existe la pars intermedia como en los mamíferos (Sturkie, 1965; Smidt y Ellendorff, 1972; Cunningham, 1992). La pars distalis es la más grande y contiene poblaciones múltiples de células endocrinas que secretan las hormonas trópicas hipofisarias (Mc Donald y Pineda, 1991). La pars tuberalis consiste en proyecciones dorsales de células a lo largo del tallo infundibular. Funciona principalmente como un andamio para la red capilar del sistema porta-hipofisiario (Mc Donald y Pineda, 1991).

Las principales hormonas producidas por la adenohipófisis aviar son las siguientes: hormona del crecimiento (GH, también llamada somatotropina), prolactina (PRL), estimulante de la tiroides (TSH), foliculo estimulante (FSH), luteinizante (LH) y adrenocorticotrópica (ACTH) (Sturkie, 1965; Cunningham, 1992).

La neurohipófisis está formada por la pars nervosa, por el tallo infundibular y la eminencia media (Hardy, 1992). Se origina del infundíbulo del cerebro y permanece sujeta al hipotálamo por el tallo neural; está formada por tejido nervioso y mantiene su inervación directa de los núcleos hipotalámicos. (Mc Donald y Pineda, 1991).

### ***Eje hipotálamo-hipófisis-gónada***

Las funciones reproductivas están gobernadas por la correlación fisiológica de los sistemas nervioso y endocrino (Smidt y Ellendorff, 1972). El hipotálamo regula la actividad adenohipofisiaria por medio de informaciones neurales y hormonales. Sus neuronas sintetizan hormonas liberadoras de gonadotropinas (GnRH), las cuales son transportadas por los axones y liberadas en la eminencia media, dentro de los capilares y llevadas por el sistema porta hipofisiario a células endocrinas específicas en la adenohipófisis, en donde estimulan la liberación de hormonas gonadotrópicas (Smidt y Ellendorff, 1972; Mc Donald y Pineda, 1991; Cunningham, 1992). Las hormonas gonadotrópicas (FSH y LH) controlan la esteroidogénesis ovárica (Cooke *et al.*, 1996). Ahora bien, las hormonas ováricas ejercen un control de retroalimentación tanto positiva como negativa; el más importante es la inhibición por retroalimentación negativa, en el cual hay un gran aumento en la concentración de las hormonas ováricas que tienden a frenar la producción de las hormonas gonadotrópicas que estimulan su aparición, mediante la interacción de las hormonas ováricas sobre las células neurosecretoras del hipotálamo y en menor grado sobre la adenohipófisis (Yen y Jaffe, 1991) (Fig. 5). En el hipotálamo suprimen la producción de hormonas liberadoras de gonadotropinas (GnRH), por lo cual se inhibe la liberación de gonadotropinas por parte de la hipófisis y con esto cesa el estímulo del ovario para la producción de hormonas (Mc Donald y Pineda, 1991; Cunningham, 1992). También existen los sistemas de retroalimentación positiva, aunque son mucho menos frecuentes que los de retroalimentación negativa. De esta manera el eje hipotálamo-hipófisis-gónada es un sistema que permite el control de

las funciones reproductoras, lo cual incluye la maduración y regulación del sistema reproductor (Cunningham, 1992). Sin embargo este eje comienza a ser funcional durante el desarrollo embrionario sólo a partir del día 13 - 13.5 de incubación en machos y día 14 en hembras (Woods, 1987). Por lo tanto antes de la formación del eje hipotálamo-hipófisis-gónada el desarrollo de la gónada es independiente de la hipófisis. Su desarrollo depende de las hormonas esteroides producidas de manera autónoma por el ovario (Woods *et al.*, 1981).

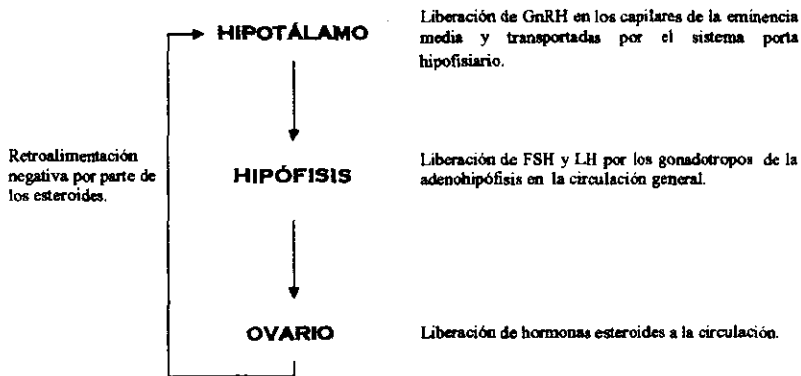


Fig. 5. Establecimiento del eje hipotálamo-hipófisis-gónada en el día 13.5 de incubación.

## HORMONAS

Las hormonas son mensajeros químicos que alteran específicamente las actividades de ciertos tejidos susceptibles (órganos o células blanco). Son sintetizadas por tejidos específicos (glándulas) y son secretadas directamente a la sangre, que las transporta a sus lugares de acción (Stryer, 1990; Cunningham, 1992). Por ejemplo, pueden inducir el crecimiento, la diferenciación y/o la alteración de la actividad metabólica de las células (Austin y Short, 1982).

En la actualidad se pueden sintetizar compuestos análogos a hormonas naturales y se agrupan en dos clases: unos imitan la acción de la hormona, se unen al receptor y producen la respuesta hormonal, estos son los llamados agonistas. Otros compuestos se unen al receptor, pero no activan las funciones inducibles por la hormona, a estos compuestos se les llama antagonistas. Un antagonista unido compite con la hormona natural y bloquea su actividad fisiológica (Darnell, 1991).

Desde el punto de vista químico las hormonas pueden clasificarse en cuatro tipos:

- las hormonas polipeptídicas, que son moléculas grandes (PM 10000 o más). Son solubles en agua y no pasan a través de la membrana plasmática, sino que ejercen su acción sobre ésta al unirse específicamente a sus receptores. El mecanismo de acción de estas hormonas implica la formación de un mensajero secundario intracelular, que forma parte de una cascada de señalización.
- las hormonas esteroides son pequeñas moléculas (PM 300); están compuestas de un anillo ciclopentanoperhidrofenantrénico como en el colesterol. Son solubles en grasas y difunden libremente en la mayor parte del cuerpo, así como a través de la membrana plasmática. Ejercen su acción dentro de la célula, controlando la síntesis de proteínas específicas.
- las hormonas catecolaminas y las yodotironinas que son derivados de tirosina.
- las prostaglandinas (Mc Donald y Pineda, 1991).

### ***Síntesis y transporte de las hormonas***

Las hormonas proteínicas son sintetizadas como hormonas activas, se almacenan en gránulos dentro de la glándula hasta que se requieren (Cunningham, 1992). Cuando son necesarias, se secretan hacia los capilares eferentes y se transportan en el plasma en forma soluble (Austin y Short, 1982; Mc Donald y Pineda, 1991), pueden circular en forma monomérica o polimérica (Cunningham, 1992). Una vez liberadas en la sangre

tienen una vida media de tan sólo unos segundos o minutos y son degradadas rápidamente por proteasas de la sangre y los tejidos (Darnell, 1991).

Las hormonas esteroides se derivan del colesterol y son secretadas de manera inmediata después de su formación por difusión simple a través de la membrana celular, debido a su estructura lipofílica. Por lo tanto, la velocidad de secreción de las hormonas esteroides está controlada de manera estrecha por su velocidad de síntesis. La única forma de almacenamiento de los esteroides dentro de las células, involucra el de una molécula precursora, el colesterol en forma de éster (Mc Donald y Pineda, 1991; Cunningham, 1992). Ahora bien, las hormonas esteroides no circulan en la sangre como hormona libre sino que son transportadas en el plasma ligadas a proteínas llamadas portadoras que aumentan su solubilidad en la sangre; así mismo las protegen de su metabolismo en el hígado. Sin embargo, este enlace limita su difusión a través de los tejidos y además las hace biológicamente inactivas (Austin y Short, 1982). Para que puedan ejercer su acción biológica deben liberarse de las proteínas portadoras. Hay dos tipos de proteínas transportadoras: una es la globulina de unión a corticoesteroide (CBG) también llamada transcortina que une adrenocorticoesteroides y progesterona; la otra proteína transportadora es la globulina de unión de hormonas sexuales (SHBG), que une estradiol y testosterona (Mc Donald y Pineda, 1991).

### **HORMONAS GONADOTRÓPICAS**

Entre las hormonas secretadas por la adenohipófisis aviar, se encuentran dos hormonas que tienen una gran influencia en el sistema reproductor femenino y que están estrechamente relacionadas. Estas hormonas son la FSH y la LH, son glicoproteínas producidas por el mismo tipo de células de la pituitaria, los gonadotropos, de aquí que se les llame hormonas gonadotrópicas (Austin y Short, 1982; Cunningham, 1992; Cooke *et al.*, 1996; Sauveur, 1992). Estas hormonas poseen una subunidad  $\alpha$  y una  $\beta$  asociadas por uniones no covalentes (Combarrous, 1988). La subunidad  $\alpha$  de todas las



gonadotropinas es idéntica (e intercambiable) entre las tres glicoproteínas (Stewart *et al.*, 1987). La especificidad biológica depende de la subunidad  $\beta$ , única para cada hormona (Boothby *et al.*, 1981). Las hormonas gonadotrópicas son liberadas en la sangre como múltiples isoformas de cada hormona (Cooke *et al.*, 1996).

El mecanismo de acción de estas hormonas comprende la estimulación de receptores en la membrana plasmática, con la consecuente estimulación de la célula para producir mensajero secundario llamado adenosin monofosfato cíclico (AMPC) que interviene en la respuesta generada por la célula.

#### **Homona folículo estimulante (FSH)**

La FSH es una glicoproteína que se forma en los gonadotropos (células basófilas) de la adenohipófisis (Smidt y Ellendorff, 1972). Consta de una cadena  $\alpha$  de 92 aa y una cadena  $\beta$  de 118 aa (Darnell, 1991). Tiene un peso molecular aproximado de 30 000. Su contenido de carbohidratos es del 27% y de ácido siálico 5% (Austin y Short, 1982). Contiene todos los aminoácidos esenciales excepto la metionina. Es fácilmente soluble en agua. A temperaturas elevadas es lábil. Las enzimas proteolíticas como la tripsina, apenas atacan a la FSH (Smidt y Ellendorff, 1972). La vida media de la FSH es de 1 hora o menos (Yen y Jaffe, 1991).

Las acciones principales de la FSH son: regular el crecimiento y maduración de los folículos del ovario y la actividad secretora de éste (Sturkie, 1965; Mc Donald y Pineda, 1991). Se piensa que estimula el desarrollo de los folículos desde la fase antral hasta la preovulatoria y produce cambios bioquímicos, como el aumento en el consumo de oxígeno y la síntesis de proteínas, especialmente en las células de la teca (Austin y Short, 1982). Desencadena la síntesis de estradiol y progesterona, dos esteroides cruciales en el desarrollo de las características sexuales femeninas (Darnell, 1991). Sin embargo, la FSH sola no puede llevar el desarrollo del folículo hasta su estado de maduración final, ni la secreción normal de estrógenos por las células granulosas y

tecales del ovario. La FSH estimula la división mitótica de las células de la granulosa, así como la transformación de las células del estroma en células tecales. En los animales inmaduros produce una maduración acelerada de los ovarios, así como una maduración sexual precoz de los animales (Smidt y Ellendorff, 1972).

### ***Hormona luteinizante (LH)***

La hormona luteinizante es una glicoproteína globular que se forma en los gonadotropos de la adenohipófisis (Smidt y Ellendorff, 1972). Consta de una cadena  $\alpha$  de 92 aa y una cadena  $\beta$  de 115 aa (Darnell, 1991). Tiene un peso molecular de 28 000 a 30 000 (Smidt y Ellendorff, 1972). Su contenido de ácido siálico es de 1.4% (Austin y Short, 1982). Contiene todos los aminoácidos esenciales, a excepción de triptófano (Smidt y Ellendorff, 1972). Es soluble en agua. En forma considerablemente pura y en reacción próxima a la neutralidad, es más estable que la FSH. La tripsina, la quimiotripsina o las carboxilasas reducen la actividad de la LH y la oxidación con peryodato o con agua oxigenada, destruyen su actividad biológica (Smidt y Ellendorff, 1972). La vida media de la LH es de una hora o menos (Yen y Jaffe, 1991).

La LH es responsable del desarrollo del ovario, de la secreción de hormonas esteroides por el ovario y sobre todo de la ovulación. Sin embargo, la acción ovulatoria de la LH es diferente de su acción esteroidogénica y se controla de una manera muy distinta. (Sauveur, 1992).

Después de que los folículos han alcanzado cierto tamaño, por efecto de la FSH, la LH provoca la secreción de estrógenos por parte de las células granulosa y tecales. En el estadio final del desarrollo folicular, la importancia de la FSH pasa a ser secundaria y por último, se produce la ovulación por efecto de la LH, la cual en aves se incrementa de 6 a 8 horas antes de la ovulación (Sturkie, 1965; Smidt y Ellendorff, 1972). El aumento de la liberación de la LH por parte de la hipófisis, responsable de la

ovulación, es producido por una retroalimentación positiva del estradiol sobre el hipotálamo, que causa una descarga de la GnRH (Austin y Short, 1982).

La LH puede aumentar la producción de progesterona en el ovario, la cual a su vez influye en la función de otras células. También estimula la síntesis de esteroides en todos los tipos celulares del ovario (la teca, la granulosa y las células intersticiales). Su acción principal es estimular la conversión del colesterol en pregnenolona. Después de la administración de LH el ovario se vacía de colesterol (y de ácido ascórbico) que se moviliza para aumentar la síntesis de esteroides. La LH también induce un aumento en la circulación del ovario (efecto hiperémico). Al proporcionar un mayor abastecimiento de ciertos metabolitos necesarios, la hiperemia probablemente es una parte integral del mecanismo de acción de las hormonas trópicas en sus "órganos blanco" (Austin y Short, 1982).

La LH actúa en las células esteroidogénicas del ovario regulando las concentraciones locales y periféricas de las hormonas esteroides. También participa en la ovulación, causando la ruptura del folículo preovulatorio y la liberación del óvulo (Yen y Jaffe, 1991).

#### ***Acción conjunta de la FSH y la LH***

La FSH y la LH ejercen un efecto sinérgico en el desarrollo y en la ovulación de los folículos ováricos; sin embargo, la FSH juega una función más dominante durante el crecimiento de los folículos, mientras que la LH predomina durante la fase final de la maduración del folículo a través de la ovulación (Cunningham, 1992). Aún cuando la FSH y la LH son compuestos notoriamente diferentes, no siempre se pueden diferenciar de forma perfectamente clara por sus funciones pues, en cierta medida, pueden ser reemplazadas entre sí, y por otra parte, sólo en estrecha colaboración son completamente eficaces (Smidt y Ellendorff, 1972). Sinérgicamente provocan secreción de estrógenos, maduración de los folículos y la ovulación (Mc Donald y Pineda, 1991;

Yen y Jaffe, 1991). El ciclo sexual femenino parece estar regulado por los cambios en la proporción existente entre ambas hormonas y no tanto por las cantidades absolutas de FSH y LH (Smidt y Ellendorff, 1972).

## **HORMONAS OVÁRICAS**

El ovario de las aves, bajo el control de las hormonas gonadotrópicas secreta los tres principales tipos de esteroides sexuales: andrógenos, estrógenos y progesterona (Sauveur, 1992).

### ***Esteroides***

Son pequeñas moléculas (PM ~300) que se componen de un anillo ciclopentanoperhidrofenantrénico como el colesterol; las diferentes hormonas esteroides difieren en la composición de sus cadenas laterales, entre éstas se encuentran los andrógenos, los estrógenos y las progestinas (Austin y Short, 1982). Son solubles en grasas y se difunden libremente en la mayor parte del cuerpo, pudiendo atravesar la membrana plasmática (Mc Donald y Pineda, 1991). Su vida media en el plasma es de horas, el tiempo de acción es de horas o días. Sus receptores pueden ser citosólicos o nucleares, su mecanismo de acción es mediante el control de la transcripción y estabilidad del ARNm (Darnell, 1991).

Las hormonas esteroides tienen una influencia importante en el comportamiento, aunque también juegan un papel fundamental en la diferenciación y maduración de los gametos, del desarrollo del aparato reproductor y el establecimiento de los caracteres sexuales secundarios (Austin y Short, 1982). Los esteroides actúan como agentes autocrinos, ya que actúan sobre las células en las cuales se producen; o como agentes

paracrinós, que influyen en las células adyacentes y como hormonas transportadas por medio de la circulación a células blanco remotas (Ruckebusch *et al.*, 1994).

### **Estrógenos**

Son hormonas sexuales femeninas que promueven el desarrollo de las características sexuales secundarias (Kimball, 1986). Son los responsables del desarrollo, mantenimiento y cambios del tracto genital de la hembra, de las características sexuales secundarias, así como de la conducta, del metabolismo del calcio y grasa en las aves (Austin y Short, 1982; Mc Donald y Pineda, 1991). Están relacionados con el crecimiento celular e hiperplasia (Ruckebusch *et al.*, 1994).

Los estrógenos se secretan en pequeñas cantidades en las suprarrenales y en los testículos, así como en las células tecales y granulosas del ovario (Austin y Short, 1982). La forma biológicamente más activa de los estrógenos está representada por el 17- $\beta$ -estradiol, seguido de la estrona y el estriol. Son los reguladores más activos de la secreción de gonadotropinas en ambos sexos (Smidt y Ellendorff, 1972).

Participan en el control de prácticamente todas las fases de formación del huevo como en el crecimiento del oviducto, síntesis de las proteínas y de los lípidos de la yema en el hígado, el transporte sanguíneo de las lipoproteínas y del calcio, así como su depósito en el foliculo, la síntesis de las proteínas de la clara en el magnum, el comportamiento de ovoposición y aparición de los caracteres sexuales secundarios (Sauveur, 1992)

### **Progesterona**

Al igual que todas las hormonas esteroides juega un papel importante en la diferenciación tisular durante la maduración sexual de los animales. Tiene control sobre

las actividades celulares implicadas en el crecimiento del oviducto y en la síntesis de ciertas proteínas del albumen; en este último caso, actúa en sinergismo con los estrógenos. Controla los ritmos de ovulación y de ovoposición o puesta y regula el movimiento del huevo por el oviducto (Sauveur, 1992; Ruckebusch *et al.*, 1994). La progesterona proviene en su mayor parte, de la granulosa del folículo preovulatorio y en menor medida, del folículo postovulatorio (Austin y Short, 1982). También se produce durante el desarrollo temprano del embrión (Tanabe *et al.*, 1986), pero no se conoce bien su acción biológica en esta etapa. Se piensa que podría tener un papel morfogénico en la diferenciación tisular, no sólo en la diferenciación sexual del tracto urogenital. También se cree que podría participar en la regulación de la síntesis de esteroides, puesto que las células intersticiales de los cordones medulares son células blanco de esta hormona (Gasc, 1991).

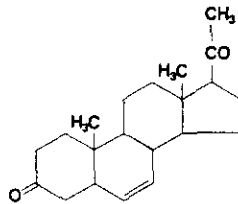


Fig. 6. Molécula de progesterona

### MECANISMOS DE ACCIÓN HORMONAL

Para que una hormona pueda ser captada del torrente sanguíneo por las células blanco, éstas deben tener receptores específicos para cada hormona. Las células que responden a una hormona determinada se llaman células blanco de ese mensajero

(Austin y Short, 1982). Un mismo receptor para una hormona puede encontrarse en diferentes células, sin embargo, desencadena respuestas diferentes (Darnell, 1991).

Cuando la hormona (ligando) se une al receptor, se forma un complejo hormona-receptor; esta unión provoca que cambien las características del receptor, lo que induce una serie de respuestas por parte de la célula que hacen que cambie su estado funcional (Darnell, 1991).

Las células blanco de las hormonas polares o hidrosolubles, como la FSH y la LH, tienen sus receptores en la superficie de la membrana celular (Lehninger, 1989). Como estas hormonas no pueden penetrar la membrana celular ni interactuar con receptores intracelulares (Lehninger, 1989; Darnell, 1991), la presencia del complejo hormona-receptor en la membrana plasmática provoca la formación, durante un corto periodo, de un mensajero secundario (Cunningham, 1992) conocido como adenosin monofosfato 3'5' cíclico (AMPC) que propaga el efecto de la hormona (mensajero primario) hacia el interior de la célula (Stryer, 1990) ya sea estimulando o deprimiendo rápidamente alguna actividad bioquímica característica de la célula (Austin y Short, 1992). El AMPC que se produce permanece en el interior de la célula, lo que evita la estimulación generalizada de las demás células (Lehninger, 1989). Este tipo de reacción permite a la célula responder en forma rápida con efectos inmediatos y de corta duración (Darnell, 1991).

Las hormonas liposolubles interactúan directamente con receptores en el núcleo celular formándose un complejo hormona-receptor (Landers y Spelsberg, 1992). Estas hormonas alteran principalmente el patrón de la expresión génica mediante la fijación del complejo hormona-receptor a regiones reguladoras del ADN. El receptor actúa como factor de transcripción (Darnell, 1991), activando la producción de ARNm, el cual es translocado hacia el citoplasma para alcanzar la maquinaria de síntesis: los ribosomas, dando lugar a la síntesis directa de proteínas que producen un efecto biológico (Cunningham, 1992).

Estas hormonas inducen respuestas más lentas y de mayor duración en comparación con las hidrosolubles (Darnell, 1991).

**Mecanismo de acción de las hormonas hidrosolubles**

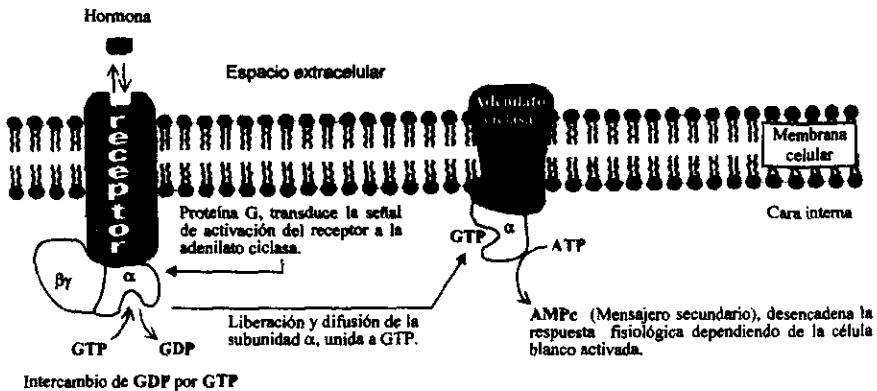
Cuando la hormona hidrosoluble se une al receptor en la membrana plasmática (unión de tipo no covalente), éste se activa formándose el complejo hormona-receptor adquiriendo un cambio conformacional que le permite unirse a la proteína G (Stryer, 1990) que se encuentra unida en la cara interna de la membrana celular (Darnell, 1991). Esta proteína consta de 3 cadenas polipeptídicas: una cadena  $\alpha$  (PM 42 000), una  $\beta$  (45 000) y una  $\gamma$  (10 000) (Darnell, 1991). Se llama proteína G porque en la subunidad  $\alpha$  puede fijar fosfatos de guanosina (GDP o GTP) (Stryer, 1990). Cuando la proteína G se encuentra en su forma inactiva las subunidades se encuentran unidas ( $G\alpha-G\beta\gamma$ ) y además hay GDP unido a la subunidad  $G\alpha$ . Sólo cuando el complejo hormona-receptor se une a la proteína G se favorece el intercambio de GDP (guanosa difosfato) por GTP (guanosa trifosfato) en la subunidad  $\alpha$ , lo que induce la activación de la proteína G, esto provoca la separación de la subunidad  $\alpha$  de la subunidad  $G\beta\gamma$ , porque se genera un cambio conformacional. La subunidad  $G\alpha$ -GTP se une entonces a la adenilato ciclasa que también está unida en la cara interna de la membrana celular, esta enzima probablemente sufre un cambio conformacional que le permite catalizar la síntesis de adenosin monofosfato cíclico (AMPc) a partir de ATP. El AMPc es el mensajero secundario que mediará la actividad de muchas enzimas dependientes de AMPc llamadas proteína cinasas, fosforilando proteínas específicas que dan el efecto en la célula. De esta manera se transduce la señal de la hormona desde que se une al receptor hasta la formación del AMPc (Fig. 7). Lo más importante de esta cascada de reacciones y de este mecanismo de acción es que la señal se amplifica considerablemente, porque cada complejo hormona-receptor activa a varias proteínas G produciendo la conversión de varios complejos  $G\alpha-G\beta\gamma$  a la forma activa  $G\alpha$ -GTP y cada subunidad  $G\alpha$ -GTP activa muchas moléculas de adenilato ciclasa y cada una de ellas cataliza la conversión de muchas moléculas de ATP en AMPc. Por lo tanto la fijación de una molécula de hormona a su receptor favorece la síntesis de varios centenares de moléculas de AMPc antes de que la hormona se disocie del receptor. Esto es lo que favorece una respuesta



rápida de corta duración cuando se presenta un estímulo. Pero para que la hormona active a un receptor se necesita una concentración adecuada de la hormona debido a la constante de disociación del complejo hormona-receptor.

La finalización de la respuesta se lleva a cabo en diferentes puntos, por ejemplo se piensa que la subunidad  $G\alpha$  tiene una cierta actividad GTPasa (Stryer, 1990), hidrolizando el GTP que tiene unido en GDP, cuando esto ocurre la subunidad  $G\alpha$ -GDP se disocia de la adenilato ciclasa inhibiendo su acción. Después la subunidad  $G\alpha$ -GDP se asocia nuevamente a la subunidad  $G\beta\gamma$ . Pero la finalización de la actividad de la adenilato ciclasa depende de la velocidad de sustitución del  $G\alpha$ -GDP por  $G\alpha$ -GTP comparado con la actividad GTPasa de la subunidad  $G\alpha$ . Otro punto que influye en la finalización de la respuesta es que la sustitución de  $G\alpha$ -GDP por  $G\alpha$ -GTP en la proteína G disminuye la afinidad del receptor por la hormona; es decir, la constante de disociación del complejo hormona-receptor tiende a la disociación del complejo y al revés, la hidrólisis de GTP produce un aumento en la afinidad del receptor por la hormona incrementando su capacidad de respuesta a cualquier aumento adicional de la concentración de hormona. Otro punto crucial de la disociación de la hormona del receptor es que se dan procesos de endocitosis en los cuales se internalizan hacia el citoplasma los complejos hormona-receptor en donde es degradada la hormona por enzimas lisosomales mientras que el receptor es reciclado hacia la membrana plasmática. Por lo cual se necesita un aporte continuo de hormona para mantener la activación de la adenilato ciclasa y producción del mensajero secundario. La hormona también tiene una vida media que limita su actividad.

Algunas hormonas pueden producir una disminución en el nivel de AMPc y otras provocar un aumento. Esta variación puede tener efectos marcadamente distintos en los diferentes tipos de células. (Stryer, 1990; Darnell, 1991).



**Fig. 7.** Mecanismo de acción de las hormonas hidrosolubles. La activación de la adenilato ciclasa por la unión de una hormona con su receptor está mediada por la proteína estimuladora G. El AMPc producido por la activación de la adenilato ciclasa es utilizado en diferentes procesos celulares. Modificado de Stryer (1990).

## RECEPTORES HORMONALES

Los receptores hormonales son proteínas especializadas capaces de fijar a una hormona con gran especificidad y una alta afinidad. Los receptores para las hormonas proteicas se encuentran en la membrana plasmática de las células blanco y los de las hormonas esteroides se encuentran en el citoplasma y el núcleo (Lehninger, 1989; Mc Donald y Pineda, 1991; Cunningham, 1992).

### **Receptor de progesterona**

El receptor de progesterona es miembro de una familia de receptores nucleares que se unen al ADN y regulan la transcripción. Su actividad está regulada alostéricamente por su unión con la hormona correspondiente (Gómez *et al.*, 1996; Willy y Mangelsdorf, 1998). El receptor de progesterona de pollo existe como dos

isoformas (RP-A y RP-B) con pesos moleculares de 72 000 y 82 000 daltones (da), respectivamente (Gronemeyer *et al.*, 1987; Conneely *et al.*, 1987). Entre varias especies, estas dos formas se originan como resultado tanto del procesamiento alternativo del ARNm, como por la transcripción de promotores alternos dentro del mismo gen. El RP-B tiende a ser un activador fuerte de genes blanco mientras que el RP-A puede actuar como un represor dominante del RP-B, siendo éste el mecanismo por el cual la célula puede generar respuestas diferentes y puede inducir o reprimir la transcripción (Vegeto *et al.*, 1993; Graham y Clarke, 1997).

El receptor de progesterona está formado por diferentes regiones que han sido delimitadas por su función. Estas regiones se denominan dominios y son cuatro (Fig. 8): El dominio I es un dominio regulador de la transcripción, también llamado como dominio A/B y se encuentra en el extremo amino-terminal; el dominio II es el dominio de unión al ADN; el dominio III es el dominio bisagra y el dominio IV es el dominio de unión al esteroide y se encuentra en el extremo carboxilo-terminal.

El dominio I es una región no conservada; evolutivamente es una región hipervariable, se piensa que participa en la regulación específica de la transcripción, también en la formación de dímeros del receptor o la formación de heterodímeros del receptor con otras proteínas. Este dominio trabaja independientemente de la unión del ligando.

El dominio II o dominio de unión al ADN es la región más conservada y contiene dos motivos ("motifs") semejantes a dedos de zinc que hacen contactos estrechos con secuencias nucleotídicas en el ADN, llamados elementos de respuesta a la hormona, para inducir cambios en la transcripción. Parece ser que es la única porción de la proteína receptora requerida para mediar la transcripción de los genes de respuesta a esteroides. Se piensa que el segundo motivo semejante a dedo de zinc interactúa con otras proteínas, como por ejemplo factores de transcripción para formar heterodímeros. Otras de sus funciones son el control de la activación transcripcional y la unión específica a los elementos de respuesta a esteroides (SRE), así como la formación de homodímeros.

El dominio III o región bisagra contiene una secuencia de aminoácidos básicos (argininas y lisinas), cuya secuencia no es altamente conservada. Esta región básica funciona como señal de localización nuclear. Otras de sus funciones son la activación de la transcripción y la formación de homodímeros.

El dominio IV o dominio de unión al esteroide se encuentra localizado en la región C-terminal. Es un dominio clave en la regulación de la actividad transcripcional del receptor, esta actividad es relativamente independiente de la estructura del receptor.

Se han identificado ciertas subregiones del dominio de unión al esteroide que son responsables de conferirle una función de activación transcripcional (TAF), otra función de este dominio es el de unir al esteroide, de unir a la hsp90; este dominio es altamente conservado e interviene en la formación de homodímeros. También funciona como señal de localización nuclear. (Landers y Spelsberg, 1992; Horwitz *et al.*, 1996; Graham y Clarke, 1997).

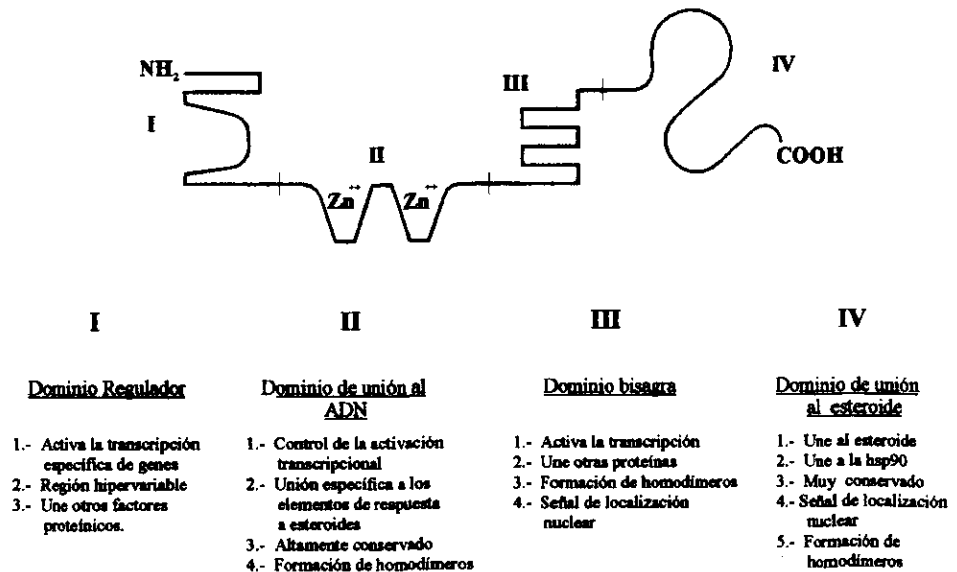


Fig. 8. Dominios funcionales del receptor de hormonas esteroides. Modelo que resume las características y las funciones asociadas con los diferentes dominios del receptor. (Tomado de Landers y Spelsberg, 1992).

## **INMUNOHISTOQUÍMICA**

Es una técnica ampliamente usada en la actualidad para identificar y localizar antígenos tales como los componentes de células o tejidos. Se basa en reacciones inmunológicas (interacciones antígeno-anticuerpo) que ocurren continuamente en nuestro organismo como respuesta a la entrada de algún agente extraño, las cuales son altamente específicas. Esta técnica abarca campos de estudio como la histología, la química y la bioquímica (González-Morán, 1996).

Los antígenos son proteínas o polisacáridos que al no ser reconocidos por el organismo como propios desencadenan una respuesta inmune (Kalthoff, 1996). Los anticuerpos son macromoléculas constituidas de 4 cadenas de proteínas unidas por puentes disulfuro; en general tienen forma de Y, que comúnmente se representa invertida. Los anticuerpos tienen la función de reconocer y unirse a un antígeno específico. La región de reconocimiento se encuentra en los extremos de los brazos de la Y; a esta región se le denomina sitio antigénico (González-Morán, 1996).

Para que las reacciones inmunológicas sean visibles al microscopio se marca el anticuerpo con un compuesto que pueda ser visualizado (Kalthoff, 1996) ya sea formando productos insolubles coloreados o electrodensos (González-Morán, 1996). Así, por ejemplo se pueden usar compuestos fluorescentes como rodamina (Smith, 1990) y fluoresceína (Kalthoff, 1996) visibles en el microscopio de luz ultravioleta; también se pueden usar compuestos diseminadores de electrones como la ferritina y el oro coloidal usados para microscopía electrónica (González-Morán, 1996). Otro tipo de marcaje consiste en el empleo de enzimas estables como la peroxidasa (Smith, 1990; Kalthoff, 1996), la fosfatasa alcalina y la  $\beta$ -galactosidasa, tanto para microscopía electrónica como para fotónica (González-Morán, 1996).

Independientemente del tipo de marca que se utilice, existen dos métodos de marcar al anticuerpo. Uno es el método directo que consiste en marcar el anticuerpo primario (anticuerpo que interacciona con el antígeno) (Smith, 1990; González-Morán, 1996), pero este método tiene baja sensibilidad y puede alterar la especificidad de la

reacción por esta razón se han desarrollado métodos indirectos que emplean un segundo anticuerpo (anticuerpo secundario) (González-Morán, 1996). En el método indirecto el anticuerpo primario no está marcado. El anticuerpo secundario es el que se marca y se une al anticuerpo primario como un antígeno (Kalthoff, 1996). Este segundo anticuerpo se encuentra acoplado a una marca o a una enzima como en el método directo. Gracias al método indirecto se puede amplificar la marca sin riesgo de alterar la especificidad y la afinidad del anticuerpo primario por lo tanto es más sensible (González-Morán, 1996).

La marca se observa donde está localizado el anticuerpo secundario. Asumiendo que el anticuerpo secundario está unido sólo al anticuerpo primario, y que el anticuerpo primario está unido únicamente al antígeno de interés, podemos reconocer que el marcador indica el sitio donde está localizado el antígeno de interés en la muestra (Kalthoff, 1996).

Las cualidades de esta técnica son que conserva la distribución química normal y genera un producto visible e insoluble (González-Morán, 1996).

La inmunohistoquímica permite distinguir diferencias funcionales entre distintas subpoblaciones celulares, reconocer diferentes estadios de diferenciación de las células, tipificar a las células, además permite distinguir isoformas de componentes celulares, por ejemplo diferentes formas de un receptor (Syvälä *et al.*, 1996). El perfeccionamiento de la técnica la ha hecho muy confiable. Se aplica en diagnósticos de patología humana y veterinaria (Smith, 1990); por ejemplo, permite la identificación de moléculas asociadas a ciertos tumores, la inmunofenotipificación de cáncer (Kell *et al.*, 1993; Montaña, 1995), la identificación de hormonas en patología endocrina y la identificación de la presencia o producción de anticuerpos. La confiabilidad de la técnica se debe al desarrollo de anticuerpos monoclonales (MAbs) que tienen mayor especificidad que los anticuerpos policlonales que anteriormente se usaban (Smith, 1990).

Actualmente existen varios métodos indirectos de mayor complejidad que tienden a mejorar la sensibilidad y la especificidad de la reacción. Dentro de estos métodos se encuentra la técnica de avidina-biotina ligada a peroxidasa que se utilizó en el presente estudio y que se describe más adelante. Esta técnica ha dado buenos

resultados en la identificación de receptores nucleares hecha por otros investigadores (Isola *et al.*, 1987b; Salomaa *et al.*, 1989; Isola, 1990; Gasc, 1991; Syväälä *et al.*, 1996).

#### Técnica inmunohistoquímica de avidina-biotina ligada a peroxidasa

Es un método indirecto que está basado en la gran afinidad de la avidina por la biotina. Utiliza un anticuerpo primario sin marca que se une a un antígeno específico, posteriormente se introduce un anticuerpo secundario que está conjugado con biotina (anticuerpo biotinilado), éste reconoce al anticuerpo primario y se une a él, en el tercer paso se añade otro conjugado, el de estreptavidina ligada a peroxidasa. Ya que la avidina tiene alta afinidad por la biotina, un gran número de estreptavidinas van a quedar unidas a la biotina logrando una gran huella del radio del anticuerpo (mayor sensibilidad). A su vez cada estreptavidina tiene unidas varias moléculas de peroxidasa. Tales enzimas llevan a cabo una reacción colorida en un cuarto paso, al ponerlas en contacto con su sustrato (cromógeno + peróxido de hidrógeno). Las peroxidases promueven la oxidación del cromógeno transfiriendo sus hidrógenos al peróxido de hidrógeno que es reducido para formar moléculas de agua. Al ser oxidado el cromógeno se produce un compuesto visible (fig. 9) (Smith, 1990). El cromógeno es una sustancia que produce el color y en la técnica de inmunoperoxidasa se pueden usar la 3,3-diaminobenzidina (DAB) o el 3-amino-9 etilcarbazol (AEC) (Smith, 1990; González-Morán, 1996).

Es importante notar que cada peroxidasa unida a la estreptavidina puede catalizar la reacción entre muchas moléculas de diaminobenzidina con peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ).

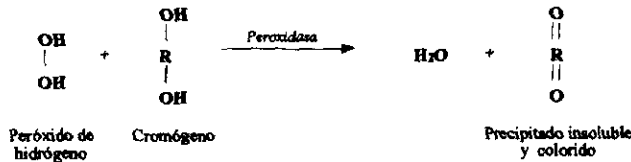


Fig. 9. Reacción de oxidación del cromógeno catalizada por las peroxidases que se encuentran ligadas a la estreptavidina, con lo cual se produce un precipitado insoluble que confiere un color café en el lugar de la reacción. (Tomado de González-Morán, 1996).

### III. JUSTIFICACIÓN

---

Estudios recientes han puesto de manifiesto el efecto que tienen las hormonas gonadotrópicas sobre el desarrollo, diferenciación y esteroidogénesis del ovario del pollo recién nacido; éstos se enfocan en los cambios histológicos a nivel de microscopía fotónica y electrónica, así como los cambios hormonales en la sangre. Algunos trabajos indican que las hormonas gonadotrópicas regulan la síntesis de hormonas esteroides y que la progesterona se encuentra presente en el suero sanguíneo de los embriones de pollos desde etapas tempranas, pero se desconoce su función (Guichard, *et al.*, 1973; Tanabe, 1986). Por lo tanto, este trabajo pretende investigar los efectos que tienen las hormonas FSH y LH al ser administradas en etapa embrionaria sobre el estado fisiológico del ovario de pollo recién nacido, con el propósito de conocer algo más acerca de la participación de las hormonas gonadotrópicas durante el desarrollo embrionario. Nos enfocamos principalmente al efecto fisiológico de la respuesta a una hormona importante en el estado adulto que es la progesterona, de la que no se conoce con claridad su participación durante la diferenciación y desarrollo embrionario del ovario. Sin embargo para entender el papel de la progesterona durante el desarrollo embrionario también es necesario determinar cuáles son las células blanco de la progesterona en el ovario de pollo en el momento del nacimiento, así como la regulación del RP por parte de la FSH y LH.



#### IV. ANTECEDENTES

---

Todavía no se conoce con precisión cómo se regula la diferenciación y el desarrollo embrionario del ovario del pollo. Sin embargo, se sabe que las hormonas esteroides son las principales hormonas que intervienen en dichos procesos, cuya síntesis es independiente en etapas tempranas del desarrollo embrionario, pero a partir del día 13.5 de incubación, la síntesis de esteroides pasa a ser regulada por las hormonas gonadotrópicas, debido a que se establece la comunicación del hipotálamo con la hipófisis al desarrollarse las venas del sistema porta, por lo tanto queda constituido lo que se conoce con el nombre de eje hipotálamo-hipófisis-gónada (Woods, 1987), de manera que las hormonas gonadotrópicas adquieren un papel importante sobre el desarrollo ovárico del pollo a partir de este día. La morfogénesis del ovario se ha comenzado a entender gracias a los estudios realizados *in vivo* en los cuales se ha demostrado que ocurren cambios histológicos en el ovario del pollo recién nacido cuando son tratados en etapa embrionaria con hormonas gonadotrópicas. Con la FSH se induce la proliferación e hipertrofia de células, tanto en la corteza como en la médula del ovario, lo que provoca un desarrollo de los canales lacunares y de los cordones medulares, así como el aumento en grosor de la corteza; además, existe un incremento en los niveles de estradiol en suero (González-Morán, 1998; González-Morán y Mancilla, 1998). En cambio, con el estímulo de la LH se presentan cambios sólo a nivel de la médula, tales como el desarrollo del sistema lacunar y de los cordones medulares, pero este desarrollo se debe principalmente a la hipertrofia de las células (González-Morán *et al.*, 1985; González del Pliego *et al.*, 1988). Además un estudio *in vitro* usando la LH demostró un incremento en la secreción de estradiol, testosterona y progesterona (Guichard *et al.*, 1979). Estos cambios morfológicos y hormonales inducidos por las hormonas FSH y LH administradas en etapa embrionaria hacen suponer que, además, se están produciendo cambios bioquímicos en las células que afectan su estado funcional; por ejemplo, se ha visto que el RP se incrementa en las células de la granulosa de gallinas en puesta antes de la ovulación; y algunos experimentos mostraron que la LH puede ser la responsable de la inducción de estos RP antes de la ovulación; mientras que la FSH no tiene ningún efecto (Yoshimura, 1995). Por lo tanto, este trabajo pretende

determinar si existe algún tipo de regulación bioquímica en el ovario embrionario por parte de la FSH y la LH. El estudio se enfocó a la regulación de la expresión del RP. Esto contribuirá a la comprensión de la participación de estas hormonas gonadotrópicas en la regulación de la diferenciación y el desarrollo de la gónada durante el desarrollo embrionario. Por otro lado se comprenderá mejor el papel de la progesterona durante el desarrollo embrionario. Porque si bien es cierto que la progesterona se conoce por ser una de las hormonas importantes para la reproducción de la hembra y la diferenciación tisular en animales en desarrollo, se conoce poco su papel específico en el proceso de la diferenciación sexual embrionaria de la gónada hasta el nacimiento, aunque se le han atribuido acciones proliferativas (Graham y Clarke, 1997). Uno de los métodos utilizados para conocer el papel de la progesterona en estos procesos ha sido la identificación de células blanco para esta hormona, a través de la localización de los RP mediante técnicas inmunohistoquímicas. Así, en tejidos embrionarios se ha comenzado a entender la importancia del receptor de progesterona; por ejemplo, en la implantación de los embriones de ratón, así como en el desarrollo de sus tractos reproductivos (Hou y Gorski, 1993; Gorski y Hou, 1995). En pollos no se conoce la función del RP, pero sí su distribución. Estos estudios indican una amplia distribución del RP en tejidos embrionarios del pollo, como en el hipotálamo y la hipófisis (Guennoun y Gasc, 1990), en las células mesoteliales del peritoneo, en células musculares del ileum, del colon y la cloaca (Salomaa *et al.*, 1989), en el oviducto se han encontrado en el núcleo de las células del epitelio luminal, células glandulares epiteliales, células del estroma, en el mesotelio y en fibras del músculo liso (Gasc *et al.*, 1984; Isola *et al.*, 1987a; Pekki *et al.*, 1989; Isola, 1990). En el ovario de pollo el RP se ha observado desde etapas muy tempranas del desarrollo, aún antes de la diferenciación del aparato reproductor en el día 5 de incubación y hacia el día 6 se observan únicamente en la médula. En etapas posteriores, como el día 10, se observan principalmente en la médula, en las células intersticiales, aunque también hay células positivas en la corteza del ovario izquierdo (Gasc, 1991). En pollos de 4 a 5 semanas de edad las células que contienen RP son las células del epitelio germinal, parte de las células tecales y parte de las células del

estroma. En las gallinas en puesta se marcan las células del epitelio germinal, de la teca, del estroma y de la granulosa (Isola *et al.*, 1987b).

Por otro lado, se ha observado la regulación del RP por parte de los esteroides. En el hipotálamo, corteza cerebral y útero de conejos hembra adultos, los RP son regulados positivamente por estrógenos y negativamente por la progesterona o progestinas (Camacho-Arroyo *et al.*, 1996). Este tipo de regulación también se ha observado en el hipotálamo y la hipófisis en embriones del pollo de 10 días de incubación (Guennoun y Gasc, 1990), en células del oviducto de pollos inmaduros (Pekki *et al.*, 1989; Syväälä *et al.*, 1996; Syväälä *et al.*, 1997), así como en el ovario de pollos de 4 a 5 semanas de edad, en los cuales, los estrógenos aumentan el número de células inmunoreactivas del estroma y de la teca, así como la intensidad de los núcleos. Además, las células de la granulosa sólo se tiñen después del tratamiento con estrógenos (Isola *et al.*, 1987b). Pero los RP no son regulados por estradiol en las gónadas en los días 8 y 10 (Gasc, 1991).

Aunque se han estudiado los efectos de las hormonas esteroides sobre la expresión de los RP, no se han estudiado los efectos de las hormonas gonadotrópicas sobre la expresión del RP al menos durante la etapa embrionaria. En gallinas en puesta la LH induce al RP en las células granulosas de los folículos ováricos *in vivo* pocas horas antes de la ovulación. (Yoshimura *et al.*, 1995). En el ovario de ratas y en cultivo de células granulosas se ha observado que tanto la LH como la FSH inducen la expresión de ARNm para RP (ARNm-RP) en las células granulosas de los folículos preovulatorios *in vivo* (Park-Sarge y Mayo, 1994).

Por lo tanto el propósito de este estudio es conocer la participación de las hormonas gonadotrópicas (FSH y LH) en la expresión del RP en etapa embrionaria.

## V. HIPÓTESIS

---

Si las hormonas gonadotrópicas inducen cambios histológicos en el ovario de pollo recién nacido, así como cambios en los niveles de progesterona cuando se administran en etapa embrionaria, es muy probable que también induzcan cambios a nivel de la transcripción del RP; por lo tanto, suponemos que las hormonas gonadotrópicas administradas durante el desarrollo embrionario modularán la expresión del RP en las células blanco del ovario de pollo recién nacido.

## VI OBJETIVOS

---

### Objetivo general:

- Determinar las poblaciones celulares que son blanco a la progesterona en el ovario de pollo recién nacido.
- Esclarecer la influencia de la FSH y la LH sobre la expresión del RP en el ovario del pollo recién nacido, cuando son aplicadas durante el establecimiento del eje hipotálamo-hipófisis-gónada (día 13 de incubación).

### Objetivos particulares:

- Determinar mediante inmunohistoquímica la localización del RP en el ovario del pollo recién nacido.
- Determinar la intensidad inmunoreactiva en las distintas subpoblaciones celulares del ovario del pollo recién nacido.
- Cuantificar el número de células intersticiales inmunoreactivas por volumen relativo de los cordones medulares respecto de un volumen medular.
- Analizar el efecto de la FSH y la LH sobre la expresión del RP en las subpoblaciones celulares del ovario de pollo recién nacido, cuantificando la intensidad relativa de la inmunoreacción y cuantificando el número de núcleos inmunoreactivos de las células esteroidogénicas.

## VII MATERIALES Y MÉTODOS

---

### INCUBACIÓN

Para la realización de este trabajo se obtuvieron huevos fértiles de pollo de la raza *White leghorn*.

Los embriones se colocaron en una incubadora automática desinfectada, bajo condiciones estables de temperatura (38°C), humedad y ventilación. Los huevos se mantuvieron en movimiento automático periódico hasta el día 12 evitando de esta manera que las membranas de los embriones se pegaran. Mediante ovoscopia se verificó la viabilidad de los embriones.

### MANIPULACIÓN DE LOS EMBRIONES Y APLICACIÓN DE LAS DOSIS DE HORMONA

En el interior de un cuarto estéril se identificó y se marcó la cámara de aire mediante ovoscopia, posteriormente se hizo un orificio en la cámara de aire con una aguja de disección estéril. En un costado del huevo se realizó una ventana en forma de triángulo con una segueta estéril desinfectando la zona con alcohol. Al hacer la ventana se cuidó de no dañar las membranas para evitar hemorragias. El cascarón se removió con una aguja de disección y se puso solución salina estéril sobre la membrana externa por unos segundos, después con un bulbo para pipeta pasteur se succionó aire a través del primer orificio que se hizo con la aguja de disección para provocar la separación y descenso de la membrana corioalantoidea de la membrana externa, de esta manera se formó una segunda cámara de aire; se quitó la membrana externa en la zona de la ventana con unas pinzas estériles procurando que no cayeran en el interior del huevo pedazos de la misma. Se sellaron con diurex los orificios hechos en el huevo y al día siguiente (día 13) comenzó la aplicación de las dosis de hormonas directamente sobre la membrana corioalantoidea (Fig. 10).

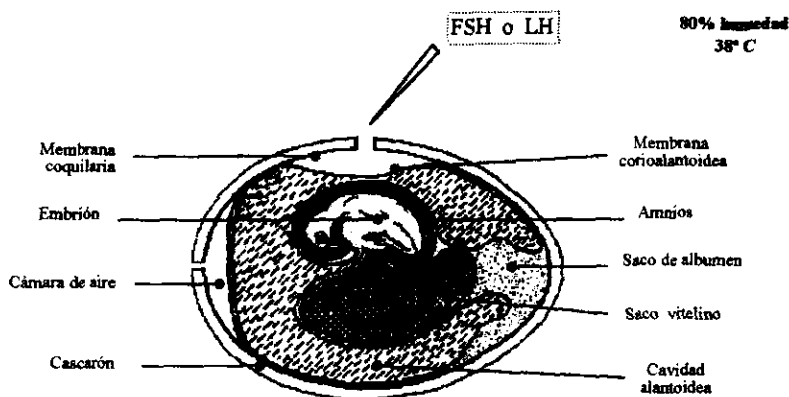


Fig. 10. Membranas que envuelven al embrión del pollo alrededor de los 13 días de incubación, con una abertura en el cascarón por donde se aplica la hormona. La membrana corioalantoidea se muestra artificialmente separada del cascarón y de la membrana externa. Modificado de Hoffmann-Völker (1969).

Los embriones se dividieron en 3 lotes: lote control (NaCl 0.9%), lote tratado con FSH (Fertinorm HP, Urofolitropina -Serono de México, S.A.) y lote tratado con eLH (NIH-LH-S1; Sigma Chemical Co., St. Louis, MO. USA), utilizando 1µg de hormona en cada 100µl de solución por dosis, los días 13, 15 y 17 de desarrollo embrionario.

#### **OBTENCIÓN DEL MATERIAL BIOLÓGICO**

Después del día 21 de desarrollo nacieron los pollos y dentro de las 24 hrs. siguientes se sacrificaron por decapitación. Mediante una incisión en forma de v en el vientre, se cortó y se levantó el esternón para poder sacar libremente las vísceras y poder extraer el ovario izquierdo que se encuentra en la parte posterior de la cavidad abdominal en forma de grano de arroz no muy definido, de color blanco, y más grande que el ovario derecho. Los ovarios se lavaron inmediatamente después de su disección en una solución amortiguadora libre de  $Ca^{++}$  y  $Mg^{++}$  durante unos segundos. Después se

sometieron a un tratamiento de fijación con paraformaldehído al 4% durante 4 hrs, transcurrido este tiempo se lavaron 3 veces en amortiguador de fosfatos durante 20 min. c/u; se deshidrataron en alcoholes graduales (30%, 50%, 70%, 80% y 96%) cambiándolos cada 15 min. y en alcohol 100% dos lavados de 20 min. c/u. Después de la deshidratación fue necesario aclarar el ovario en xilol durante 15 min. o por lo menos hasta que el ovario se pusiera brillante; se hizo un cambio a xilol-paraplast 1:1 durante 15 min. en una estufa con una temperatura de 60°C; se cambió a paraplast puro durante 15 min. a 60°C y por último, se pusieron los ovarios en cajas de inclusión con paraplast dejándolos a temperatura ambiente para su solidificación durante 24 hrs.

#### **TINCIÓN CON HEMATOXILINA-EOSINA**

Se hicieron cortes de 5 µm de espesor de los ovarios y se pusieron en un baño de flotación con gelatina a una temperatura de 46°C, hasta que se estiró el tejido y se colectaron los cortes en laminillas para su posterior tinción. Las laminillas se pusieron en xilol durante 5 min. para desparafinar. Posteriormente se hidrataron en alcoholes graduales (100%, 96%, 70% y 50%), un cambio de 3 min. en cada uno hasta llegar a agua destilada, donde se dejaron 5 min. Después se tiñó con hematoxilina de Harris 40 segundos, se lavó rápidamente en agua corriente para quitar el exceso de colorante y hacer virar el color. Se pasó a agua destilada durante 3 min.; se tiñó con eosina acuosa durante 10 segundos y se comenzó con el proceso de deshidratación en alcoholes graduales (50%, 70%, 80%, 96% y 100%) un cambio de 3 min. en cada alcohol, posteriormente se pusieron en alcohol-xilol 1:1 durante 5 min. y por último en un cambio de xilol 5 min. para después montarse con bálsamo de Canadá.



## **TÉCNICA INMUNOHISTOQUÍMICA PARA LA IDENTIFICACIÓN DEL RP**

Para la técnica inmunohistoquímica se prepararon, previamente, laminillas con adhesivo de Poli-L-lisina 1:10 (Sigma, Poly-L-Lysine, S.T. Louis, MO. USA). Se hicieron cortes de 5  $\mu\text{m}$  de espesor y se estiraron en un baño de flotación con agua destilada a 46°C sin grenetina. Se dejaron secar los cortes a temperatura ambiente durante 1 día para que se adhiriera bien el tejido, después se desparafinó en xilol, 2 cambios de 2 min. c/u, posteriormente se hidrataron los cortes en alcoholes graduales: 100% 2 cambios de 2 min. c/u, 96% 1 cambio de 2 min., 70% 2 cambios de 2 min. c/u, y 50% 1 cambio de 2 min. Después, se lavaron 2 veces en agua destilada durante 5 min. c/u. Se lavaron con PBS 1X, pH 7.5 durante 5 min. Se bloquearon con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (3%) a 25°C durante 5 min. Posteriormente, se lavaron 2 veces con PBS (un lavado con pipeta pasteur y otro con canastilla durante 5 min.). Se bloquearon con suero normal de conejo (SNC) a una dilución de 1:2000 durante 20 min. a 25°C. Se lavaron con PBS (un lavado con pipeta pasteur y otro con canastilla durante 5 min.). Se permeabilizaron con tritón x-100 (Sigma -St Louis, MO. USA) al 0.5% en PBS durante 20 min. Se lavaron los cortes con PBS (un lavado con pipeta pasteur y otro con canastilla durante 5 min.). Se incubó con el anticuerpo primario contra progesterona (Let 81) (Groyer-Picard *et al.*, 1990) a una concentración de 0.06  $\mu\text{g}/\text{ml}$  durante 72 hrs a 4°C, mientras que los controles negativos se trataron con suero normal de ratón a una dilución de 1:2000.

Todos los cortes se lavaron 2 veces con PBS (un lavado con pipeta pasteur y otro con canastilla durante 5 min.). Se incubó con el anticuerpo de unión del kit ABC (avidin-biotin complex) (Dako Corporation, CA, USA) a 25°C durante 30 min. Se lavaron los cortes en PBS (un lavado con pipeta pasteur y otro con canastilla durante 5 min.). Se incubaron con el conjugado (estreptavidina-peroxidasa) a 25°C durante 30 min. Se lavaron con PBS (un lavado con pipeta pasteur y otro con canastilla durante 5 min.). Se incubaron con el sustrato (cromógeno) de diaminobenzidina, a una dilución de 20  $\mu\text{l}/\text{ml}$  en amortiguador a 25°C durante 3 min. Se lavaron 2 veces con agua destilada durante 5 min. c/u. Se deshidrataron en alcoholes graduales (50%, 70%, 96% y

100%), 2 cambios de 2 min. por cada alcohol; por último se montaron en bálsamo de Canadá.

### **ANÁLISIS HISTOLÓGICO**

Por medio de la microscopía fotónica se describieron las subpoblaciones celulares encontradas en el tejido ovárico de los pollos recién nacidos.

### **ANÁLISIS INMUNOHISTOQUÍMICO**

Por microscopía fotónica se determinó la localización celular e intensidad de la marca inmunohistoquímica.

Sólo para la población de células intersticiales se contó el número de núcleos inmunoreactivos por densidad de volumen de los cordones de células intersticiales; esto se hizo en tres secciones tomadas aleatoriamente en cada animal. La densidad de volumen (volumen de los cordones medulares por unidad de volumen de médula) se determinó mediante la técnica de conteo de puntos (Weibel *et al.*, 1966).

### **PRUEBA ESTADÍSTICA**

Para la evaluación estadística se aplicó la prueba Wald-Wolfowitz para cada dos grupos, considerando un nivel de significancia del 5% y un nivel de confianza global del 95% para rechazar la hipótesis nula (Conover, 1980).

## VIII. RESULTADOS

---

### INMUNOREACTIVIDAD EN EL GRUPO CONTROL

El ovario izquierdo de los pollos recién nacidos es de color blanco amarillento con forma de arroz aplanado y mide aproximadamente 3 milímetros; el ovario derecho se encuentra degenerado.

En el ovario izquierdo se observaron histológicamente dos áreas bien definidas. El área más externa representa la corteza de la gónada en la cual se observa un epitelio germinativo formado por células cúbicas que contienen moderado citoplasma y un núcleo redondo. También se visualizaron células germinales formando nidos, algunas en etapa de ovogonias y otras en etapa de ovocitos primarios. Las células germinales tienen el núcleo más grande y redondo que el resto de las células, con un citoplasma escaso. Las que se encuentran en etapa de ovocitos primarios se distinguen por presentar en su núcleo los cromosomas condensados. Rodeando a las células germinales se encuentran las células pregranulosas con un núcleo pequeño y redondo u ovalado y escaso citoplasma (Fig. 11A). La parte interna del ovario representa la médula, la cual está formada por conjuntos de células que forman cordones de forma irregular y tamaño variable, estas células se llaman intersticiales y tienen un núcleo redondo y pequeño, su citoplasma es muy abundante y se caracteriza por la presencia de gotas de inclusiones lipídicas en su citoplasma. Rodeando a los cordones se encuentran las células indiferenciadas, que presentan forma alargada con núcleos pequeños y redondos u ovalados, tienen escaso citoplasma. Los canales lacunares están formados por células epiteliales grandes con núcleos ovalados y con escaso citoplasma. Además se observan vasos sanguíneos formados por células endoteliales planas con escaso citoplasma (Fig. 11B).

Mediante la técnica inmunohistoquímica se identificó al receptor de progesterona en diferentes subpoblaciones celulares del ovario. El anticuerpo primario *Let 81* (Groyer-Picard *et al.*, 1990) reconoce a ambas isoformas (A y B) del RP. La marca inmunohistoquímica se observó como una mancha definida de color café. Esta se observó exclusivamente a nivel nuclear independientemente del tratamiento hormonal.

Las células que presentaron inmunoreactividad en el ovario control fueron las células del epitelio germinal, las células germinales (Fig. 12A-12C), las células intersticiales de los cordones medulares y las células epiteliales de los canales lacunares profundos (Fig. 13A-13C). Las células que presentan el mayor número de células inmunoreactivas e intensidad, fueron las células del epitelio germinal, las células germinales, y las células epiteliales de los canales lacunares profundos. En cambio, las células intersticiales tuvieron el menor número de células inmunoreactivas e intensidad de la inmunoreactividad (Tabla 1). En las laminillas del control negativo no se presentó marca, lo cual demostró la especificidad de la reacción (Fig. 12D y 13D).

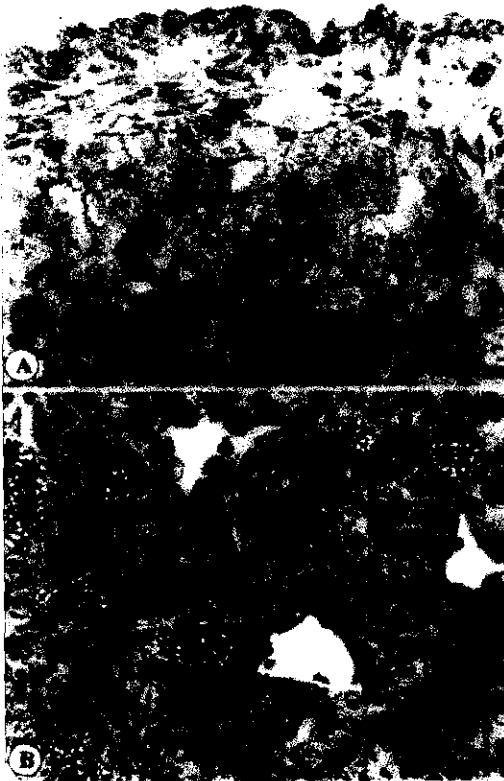
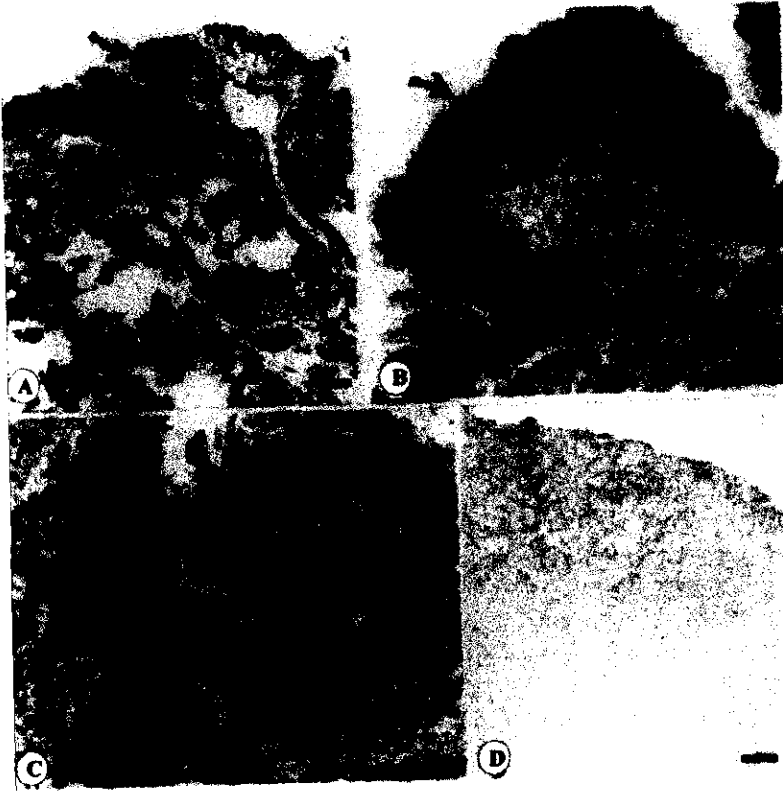


Fig. 11.- Microfotografía del ovario izquierdo de pollo recién nacido en el grupo control. La amplificación está representada por una escala de 10  $\mu$ m.

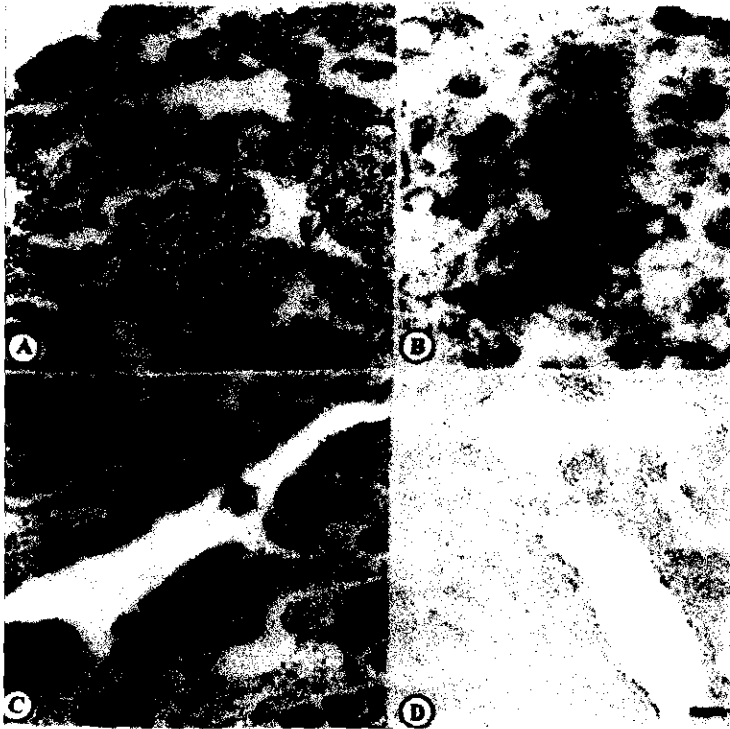
A) Corteza ovárica. Se observan células epiteliales corticales ( $\rightarrow$ ) y nidos de células germinales (G).

B) Médula subcortical. Se observan cordones de células intersticiales (I), células indiferenciadas ( $\rightarrow$ ) y células epiteliales de los canales lacunares (E).



**Fig. 12.-** Inmunolocalización del RP con el anticuerpo *Let 81* en la corteza ovárica de pollos recién nacidos del grupo control. La amplificación está representada por una escala de 10 $\mu$ m.

- A) La inmunotinción del RP se observa en el núcleo de las células epiteliales germinales (→) y células germinales (G).
- B) Mayor amplificación de la inmunotinción del RP en las células epiteliales germinales (↔).
- C) Mayor amplificación de la inmunotinción del RP en las células germinales (→).
- D) Tejido control negativo que carece de inmunoreacción, incubado con suero preinmune en lugar del anticuerpo primario.



**Fig. 13.-** Inmunolocalización del RP con el anticuerpo *Let 81*, en la médula ovárica de pollos recién nacidos del grupo control. La amplificación esta representada por una escala de 10  $\mu$ m.

- A)** Expresión del RP en las células intersticiales ( $\rightarrow$ ) y células epiteliales de los canales lacunares (E).
- B)** Mayor amplificación de la inmunotinción del RP en las células intersticiales ( $\rightarrow$ ).
- C)** Mayor amplificación de la inmunotinción del RP en las células epiteliales de los canales lacunares ( $\rightarrow$ ).
- D)** Carencia de inmunoreacción en los tejidos control negativos, incubados con suero preimmune en lugar del anticuerpo primario.

### **EFFECTOS DE LA FSH SOBRE LA INMUNOREACTIVIDAD DEL RP**

El número de células RP-inmunoreactivas en las células intersticiales e indiferenciadas se incrementó en los ovarios tratados con FSH y hubo un incremento en la intensidad de la inmunotinción de sus núcleos.

En cambio, en las células del epitelio germinal, germinales y células de los canales lacunares profundos, no hubo variación en el número de células RP-inmunoreactivas, ni en la intensidad de la inmunotinción (tabla 1).

### **EFFECTOS DE LA LH SOBRE LA INMUNOREACTIVIDAD DEL RP**

El número y la intensidad de la inmunotinción de los núcleos de las células intersticiales RP-inmunoreactivas disminuyó en los ovarios de pollos tratados con LH.

Con el estímulo de LH no hubo variación en el número de células RP-inmunoreactivas, ni la intensidad de la inmunotinción de las células del epitelio germinal, células germinales y células de los canales lacunares profundos. Además, con LH no hubo presencia de células indiferenciadas RP-inmunoreactivas (Tabla 1).

### **CUANTIFICACIÓN DE LAS CÉLULAS INTERSTICIALES INMUNOREACTIVAS AL RP EN LOS CORDONES MEDULARES**

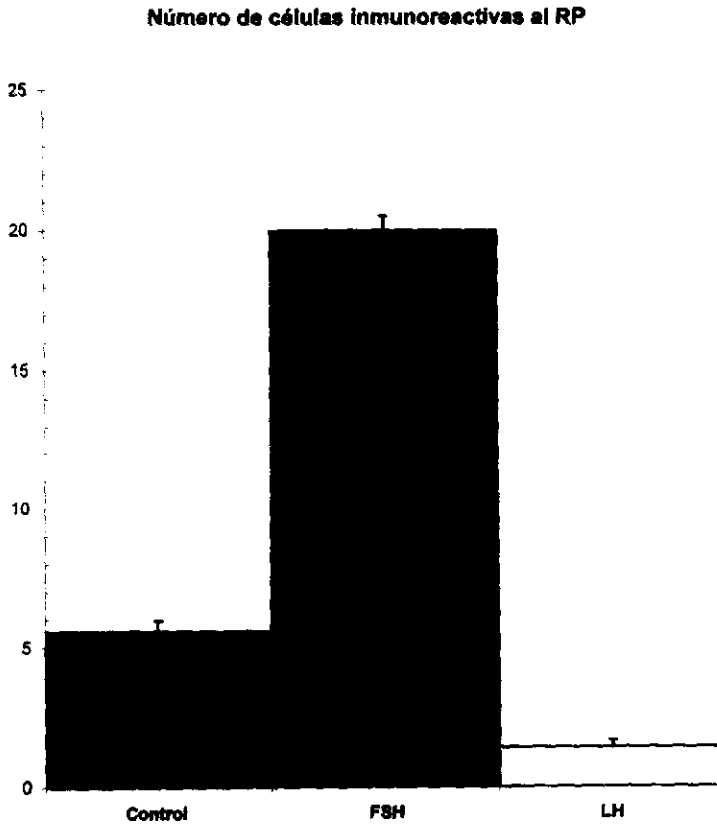
La relación del volumen de los cordones intersticiales medulares y el número de núcleos inmunoreactivos indica que hubo un mayor número de núcleos inmunoreactivos en FSH en relación a los controles, y un menor número de núcleos inmunoreactivos en LH en comparación al control (gráfica 1). Siendo significativas estas diferencias; a un nivel de significancia del 5%.

**Tabla 1.** Efecto de la FSH y LH sobre la intensidad de inmunotinción y el número de células RP-inmunoreactivas en diferentes subpoblaciones celulares del ovario de pollo recién nacido tratado durante el desarrollo embrionario.

Tipo celular	Tratamiento hormonal					
	Control		FSH		LH	
	Intensidad	Porcentaje	Intensidad	Porcentaje	Intensidad	Porcentaje
<i>Cél. del epitelio germinal</i>	XXXX	95%	XXXX	95%	XXXX	95%
<i>Cél. germinales</i>	XXXX	95%	XXXX	95%	XXXX	95%
<i>Cél. indiferenciadas</i>	—	0%	XX	35%	—	0%
<i>Cél. intersticiales</i>	XX	35%	XXX	60%	X	10%
<i>Cél. de los canales lacunares</i>	XXXX	95%	XXXX	95%	XXXX	95%

Los valores están expresados como la media porcentual en 7 ovarios de pollos recién nacidos por grupo.





**Gráfica 1.** Número de células RP-intersticiales positivas al RP en un volumen de 20% de cordones de células intersticiales. Los valores están expresados como la media  $\pm$  error estándar con una significancia estadística del 5%. Diferencias significativas en todos los casos: control vs FSH, control vs LH y FSH vs LH.

## IX. DISCUSIÓN

---

La identificación del RP se realizó con la técnica de inmunoperoxidasa y el empleo del anticuerpo monoclonal Let 81 que reconoce ambas isoformas A y B del RP (Groyer-Picard *et al.*, 1990). Se encontró que el ovario de pollo recién nacido es un órgano blanco a la progesterona. La gran cantidad de receptores encontrados sugiere que hay un requerimiento de la progesterona en esta etapa y por lo tanto, podría tener un papel importante sobre el desarrollo embrionario del ovario. Siendo la concentración de RP mayor en hembras que en machos a partir del día 8 según lo ha observado Gasc (1991). La marca inmunohistoquímica fue intranuclear como se ha observado en estudios previos hechos mediante esta técnica (Isola *et al.*, 1987a).

Gasc (1991) ha descrito que el RP se distribuye principalmente en la médula, en el día 6 de incubación y en el día 10 comienzan a presentarse en la corteza ovárica. Se encontró que la expresión del RP en el nacimiento se incrementa en la corteza, aunque siguen presentes en la médula. Es claro por lo tanto, que la expresión de los RP varía durante el desarrollo embrionario.

La intensidad de la inmunoreactividad varió de un tipo celular a otro. En algunas células es intensa, como en las células del epitelio germinal, germinales y epiteliales de los canales lacunares profundos; en cambio, en las células intersticiales es moderada, mientras que en las células indiferenciadas no se observa marca. Las diferencias en la intensidad de la inmunoreactividad indican la cantidad de receptores presentes y posiblemente indique el grado de sensibilidad de las células al estímulo de la progesterona; así, las células con mayor intensidad inmunoreactiva pueden responder a concentraciones bajas de progesterona y las células con menor intensidad de la marca responden únicamente cuando las concentraciones de la hormona son mayores, mientras que las células sin receptores no responden al estímulo de esta hormona.

Nuestro estudio coincide en gran medida, con la descripción hecha por Gasc (1991) quien reportó que por el día 10 de incubación las células blanco de la progesterona son las células del epitelio germinal, las intersticiales y las del sistema lacunar de la médula profunda. Pero a diferencia de este estudio, nosotros encontramos por primera vez que las células germinales en el pollo recién nacido son células blanco

de la progesterona independientemente del grado de diferenciación (ovogonias u ovocitos). Tampoco aparecen descritas en el estudio hecho por Isola (1987b) en pollos inmaduros de 2-4 semanas de edad donde empiezan a formarse los folículos, quien reporta a las células del epitelio germinal, del estroma, de la teca y de la granulosa como células RP-inmunoreactivas. Aunque se ha reportado la presencia de los RP en los ovocitos de embriones de ratón en los que los RP son importantes para la implantación en estado de blastocisto (Hou y Gorski, 1993; Gorski y Hou, 1995).

Las células intersticiales de los cordones medulares también presentaron inmunoreactividad, pero no todas las células intersticiales dentro de un mismo cordón presentan inmunoreactividad. Esto podría deberse a que existan dos tipos de células intersticiales o que tengan distintos grados de diferenciación; por lo tanto se necesitarían hacer futuras investigaciones. A diferencia de las células indiferenciadas medulares que no presentan RP-inmunoreactividad, estas células también son esteroideogénicas y sintetizan  $17\beta$ -estradiol.

Con el tratamiento hormonal de gonadotropinas se alteró la expresión de los RP. Se observa una modulación positiva con FSH en las células intersticiales e indiferenciadas; mientras que con LH existe una modulación negativa sólo en las células intersticiales. La FSH incrementa 3.6 veces el número de núcleos RP-inmunoreactivos en las células intersticiales con respecto del control, diferencias que mostraron ser significativas y además se incrementó la intensidad de la marca.

A pesar del estímulo con FSH no todas las células intersticiales dentro de un mismo cordón presentan marca, por lo que se vuelve a confirmar que hay dos tipos de células intersticiales con características bioquímicas diferentes.

Por el contrario, el tratamiento con LH disminuye 3.9 veces el número de células RP-intersticiales, así como su intensidad de inmunotinción, pero el patrón de distribución de los RP permanece similar al control.

Estos resultados indican que las hormonas gonadotrópicas, en algunas poblaciones celulares, provocan cambios en la expresión del RP y estos cambios deben ser a nivel de encendido y apagado de genes. Pero el mecanismo de acción de estas

hormonas sobre los RP se desconoce; Woods *et al.* en 1989 y Woods *et al.* en 1991, demostró la presencia de células FSH y LH positivas en el ovario de pollo, entre los días 12.5 y 19.5, así como también se ha demostrado que se presentan variaciones de las concentraciones de hormonas esteroides y otros metabolitos por estímulo de FSH en suero *in vivo* (González-Morán, 1998) y LH *in vitro* (Guichard *et al.*, 1979).

Por lo tanto, es posible que el efecto de las hormonas gonadotrópicas sobre la expresión del RP del ovario prefolicular pueda ser por acción directa de las gonadotropinas sobre las células ováricas o por una consecuencia indirecta a través de cambios en el microambiente.

Sin embargo consideramos necesario que para poder identificar el origen del estímulo es necesario bloquear la acción de algunas hormonas y metabolitos producidos por estímulo de las gonadotropinas.

Para demostrar que los incrementos de la expresión de los RP por parte de la FSH y su disminución por parte de la LH se deben a modificaciones en la transcripción y no a una variación en la velocidad de degradación de los receptores, es necesario cuantificar la cantidad de ARN mensajero que codifica para el RP (ARNm-RP) mediante la técnica de transcripción reversa acoplada a la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Con respecto a la inducción o represión de los RP por parte de las hormonas gonadotrópicas, hace falta saber qué tipo de isoforma es la que se induce o se reprime. Por ejemplo con estrógenos se ha visto una inducción de los RP en células del oviducto de pollo de dos semanas de edad *in vivo* (Syväälä *et al.*, 1996) al igual que en el ovario (Isola *et al.*, 1987b); sobre todo se induce la isoforma RP-A (Syväälä *et al.*, 1997). Esta regulación por estrógenos se ha observado en el hipotálamo, en la corteza cerebral y el útero de conejo (Camacho-Arroyo *et al.*, 1994, 1996). En cambio se ha visto que con progesterona se inhibe la expresión de los RP en el oviducto y ovario de pollos de dos semanas de edad (Pekki *et al.*, 1989; Isola, 1990; Syväälä *et al.*, 1996) y en hipotálamo, corteza cerebral y útero de conejos (Camacho-Arroyo *et al.*, 1994, 1996).

Analizando otro punto encontramos que hay RP, pero no sabemos en qué concentración se encuentra su ligando en el suero durante el nacimiento ni cómo varía esta concentración por el estímulo de las gonadotropinas, por esta razón es necesario que se midan los niveles de progesterona en esta etapa. Porque la gran cantidad de receptores encontrados hacen suponer una gran importancia de la progesterona en el desarrollo ovárico. Para determinar mejor el papel de la progesterona en el ovario en esta etapa es necesario que se realicen dos tipos de experimentos: por un lado bloquear la acción de la progesterona con un antagonista durante las dosis de hormonas; por otro lado se necesita estimular el ovario con progesterona a niveles fisiológicos y ver cuales son los resultados; puesto que ya se conoce que hay células blanco para la progesterona. Pero no se han hecho estudios del efecto de la progesterona en el nacimiento; se han realizado 2 a 4 semanas posteriores al nacimiento y se observa que la progesterona inhibe a su receptor (Isola, 1987b).

Por otro lado, hay que hacer estudios para saber si estos receptores son capaces de activar la transcripción en presencia de la hormona o si son capaces de ser activados. Porque según Boyd-Leinen *et al* (1984) ha observado que aunque haya receptores y la hormona se encuentre en el receptor, no necesariamente hay la actividad ARN polimerasa II por lo tanto no hay transcripción y posiblemente sea por la falta de alguna isoforma (puede ser la RP-B) (Boyd-Leinen *et al.*, 1984) por lo tanto se sugiere que se mida la actividad de esta enzima.

En este estudio se llevó a cabo un análisis inmunohistoquímico; sin embargo, para precisar la cantidad de RP se tiene que hacer un estudio utilizando la técnica de inmunotransferencia "immunoblotting" o un ensayo a nivel de la proteína.

Los resultados del presente estudio indican efectos diferenciales de la LH y FSH sobre la expresión de los RP en las células ováricas. Nosotros concluimos que la administración de FSH durante el desarrollo embrionario induce la expresión del RP en las células indiferenciadas e incrementa el número de las células intersticiales, mientras que el tratamiento con LH disminuye la expresión del RP de este último tipo celular.

## X. ESTUDIOS SUBSECUENTES

---

- Para entender mejor la regulación de la expresión del RP durante el desarrollo embrionario del ovario del pollo por parte de la FSH y la LH se debe, en primera instancia, identificar la distribución de los dos tipos de isoformas del RP que se han reconocido en otros estudios (RP-A y RP-B) y cuantificar la relación de concentración de estas isoformas. Posteriormente se tendría que estudiar si existe variación de la relación de expresión de estas isoformas por estímulo con las gonadotropinas.
- Por otra parte surge la pregunta de si las variaciones de la expresión del RP se debe a un efecto directo de las gonadotropinas o a un efecto indirecto por parte de otros metabolitos que se producen por estímulo de las gonadotropinas. Por lo que se podrían hacer estudios bloqueando receptores de otras hormonas al momento de la aplicación de las hormonas gonadotrópicas, principalmente de estrógenos que se ha observado que en algunas etapas son reguladores positivos de la expresión de los RP.
- Por otro lado falta estudiar la concentración de la progesterona y relacionarla a la variación de la expresión de su receptor.
- Además es importante averiguar si las diferencias en la expresión del RP se deben a aumentos de la síntesis del receptor o a una disminución su tasa de degradación. Esto podría deducirse midiendo los niveles del ARNm-RP.
- Finalmente, un estudio interesante para comprender más sobre la función de la progesterona durante el desarrollo embrionario, sería agregando progesterona y en otros casos bloqueando al RP con un antagonista.

## **XI. CONCLUSIONES**

---

- El ovario de pollo recién nacido es un órgano blanco para la progesterona.
- Las células del epitelio germinal, germinales, intersticiales de los cordones medulares y las epiteliales de los canales lacunares profundos expresan RP en esta etapa de desarrollo.
- Las hormonas gonadotrópicas aplicadas durante el desarrollo embrionario modulan la expresión del RP en las subpoblaciones esteroideogénicas del ovario del pollo en el nacimiento.
- La FSH induce expresión del RP en las células indiferenciadas y aumenta su expresión en las células intersticiales del ovario prefolicular del pollo.
- La LH disminuye la expresión del RP en las células intersticiales del ovario prefolicular del pollo.

## XII. LITERATURA CITADA

---

- Alamargot, J. 1982. **Manual de anatomía y de necropsias de las aves.** Compañía Editorial Continental. México. pp. 85-91.
- Álvarez-Fernández, G., Juárez-Oropeza, M.A., Velázquez, P., González del Pliego, M., Méndez-Herrera, M.C. y Pedernera, E. (1995). Newly hatched chick ovarian cell subpopulations metabolize distinctively progesterin and androgen precursors. *Gen. Comp. Endocrinol.*, **97**:31-41.
- Austin, C.R. y Short, R.V. 1982. **Hormonas en la reproducción.** La Prensa Médica Mexicana. México. pp. 1-27.
- Balinsky, B. 1978. **Introducción a la embriología.** Omega. Barcelona, España. 644p.
- Boothby, M., Ruddon, R.W., Anderson, C., Mc Williams, D. y Boime, I. (1981). A single gonadotropin  $\alpha$ -subunit gene in normal tissue and in tumor-derived cell lines. *J. Biol. Chem.*, **256**: 5121-5128.
- Boyd-Leinen, P., Gosse, B., Rasmussen, K., Martin-Dani, G. y Spelsberg, T.C. (1984). Regulation of nuclear binding of the avian oviduct progesterone receptor: Changes during estrogen induced oviduct development, withdrawal, and secondary stimulation. *J. Biol. Chem.*, **259**(4):2411-2421.
- Camacho-Arroyo, I., Pasapera, A.M. y Cerbón, M.A. (1996). Regulation of progesterone receptor gene expression by sex steroid hormones in the hypothalamus and the cerebral cortex of the rabbit. *NeuroSci. Lett.*, **214**:25-28.
- Camacho-Arroyo, I., Pérez-Palacios, G., Pasapera, A.M. y Cerbón, M.A. (1994). Intracellular progesterone receptors are differentially regulated by sex steroid hormones in the hypothalamus and the cerebral cortex of the rabbit. *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.*, **50**(5/6):299-303.
- Combarrous, Y., (1988). Structure and structure-function relationships in gonadotropins. *Reprod. Nutr. Dev.*, **28**: 211-228.
- Conneely, O.M., Dobson, A.D., Tsai, M.-J., Beattie, W.G., Toft, D.O., Huckaby, C.S., Zarucki, T., Schrader, W.T. y O'Malley, B.W. (1987). Sequence and expression of a functional chicken progesterone receptor. *Molec. Endocr.*, **1**:517-525.
- Conover, W.J. 1980. **Practical non parametric statistics.** 2<sup>da</sup> edición. New York. John Wiley and Sons Inc. pp. 229-237.



- Cooke, D.J., Crowe, M.A., Roche, J. F., Headon, D.R. (1996). Gonadotrophin heterogeneity and its role in farm animal reproduction. *Anim. Reprod. Sci.*, **41**:77-99.
- Cunningham, J.G. 1992. **Fisiología veterinaria**. Interamericana Mc Graw-Hill. México. pp. 409-481.
- Darnell, J. 1991. **Biología celular y molecular**. Labor. México. 1188p.
- Ede, D.A. 1975. **Anatomía de las aves**. Acribia. Zaragoza, España. pp. 94-99.
- García, A., Castejón, F., de la Cruz, L. F., González, J., Murillo, M. D., Salido, G. 1995. **Fisiología veterinaria**. McGraw-Hill Interamericana. Madrid, España. 1074 p.
- Gasc, J.M. (1991). Distribution and regulation of progesterone receptor in the urogenital tract of the chick embryo. *Anat. Embryol.*, **183**: 415-426.
- Gasc, J.M., Renoir J.M., Radanyi, C., Joab, I., Tuohimaa, P. y Baulieu, E. E. (1984). Progesterone receptor in the chick oviduct: an immunohistochemical study with antibodies to distinct receptor components. *J. Cell. Biol.*, **99**:1193-1201.
- Ghetie, V., Chitescu, S.T., Cotofan, V. y Hillebrand, A. (1981). **Atlas de anatomía de las aves domésticas**. Acribia. España : 294pp.
- Gómez, C., De la Vega, G., Ortiz, C. (1996). Análisis cuantitativo para estrógenos y progesterona en el carcinoma de glándula mamaria por análisis de imagen. *Pathos*, **4**(2):5-8.
- 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. 1996. **Técnicas en biología celular: teoría y práctica**. AGT Editor. México 208p.
- González-Morán, G. (1998). Effect of follicle-stimulating hormone on different cell sub-populations in the ovary of newly hatched chicks treated during embryonic development. *Br. Poult. Sci.*, **39**: 128-132.
- 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). Histomorphometric analysis in the ovary of newly hatched chicks treated with follicle-stimulating hormone during embryonic development. *Eur. J. Morphol.*, **36**(1):11-18.
- Gorski, J. y Hou, Q. (1995). Embryonic estrogen receptors: do they have a physiological function?. *Environ Health Perspect.*, **103**(suppl 7):69-72.
- Graham, J.D y Clarke, C.L. (1997). Physiological action of progesterone in target tissues. *The Endocrine Society*, **18**(4):502-519.
- Gronemeyer, H., Turcotte, B., Quirin-Stricker, C., Bocquel, M.T., Meyer, M.E., Krozowski, Z., Jeltsch, J.M., Lerouge, T., Garnier, J.M. y Chambon, P. (1987). The chicken progesterone receptor: sequence, expression and functional analysis. *EMBO J.*, **6**:3985-3994.
- Groyer-Picard, M.T., Vu-Hai, M.T., Jolivet, A., Milgrom, E. y Perrot-Appianat, M. (1990). Monoclonal antibodies for immunocytochemistry of progesterone receptors (PR) in various laboratory rodents, Livestock, Humans, and chickens: identification of two epitopes conserved in PR of all these species. *Endocrinology*, **126**(3):1485-1491.
- Guenoun, R y Gasc, J.M. (1990). Estrogen-independent and estrogen-induced progesterone receptors, and their regulation by progestins in the hypothalamus and pituitary of the chick embryo: an immunohistochemical study. *Dev. Brain Res.*, **55**:151-159.
- 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.
- Guichard, A., Cedard, L. y Haffen, K. (1973). Aspect comparatif de la synthèse de stéroïdes sexuels par les gonades embryonnaires de Poulet à différents stades du développement (étude en culture organotypique à partir de précurseurs radioactifs). *Gen. Comp. Endocrinol.*, **20**:16-28.
- Hardy, R. N. 1992. **Fisiología del sistema endocrino.** El Manual Moderno. México.
- Hoffmann-Völker. 1969. **Anatomía y fisiología de las aves domésticas.** Acribia. Zaragoza, España. 190pp.
- Horwitz, K.B., Jackson, T.A., Rain, D.L., Richer, J.K., Takimoto, G.S. y Tung, L. (1996). Nuclear receptor coactivators and repressors. *Mol. Endocrinol.*, **10**:1167-1177.

- Hou, Q. y Gorski, J. (1993). Estrogen receptor and progesterone receptor genes are expressed differentially in mouse embryos during preimplantation development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**:9460-9464.
- Houillon, C. 1978. **Sexualidad**. Omega. Barcelona, España. 202 p.
- Isola, J. (1990). Distribution of estrogen and progesterone receptors and steroid-regulated gene products in the chick oviduct. *Mol. Cell. Endocrinol.*, **69**:235-243.
- Isola, J., Pelto-Huikko, M., Ylikomi, T y Tuohimaa, P. (1987a). Immunoelectron microscopic localization of progesterone receptor in the chick oviduct. *J. Steroid Biochem.*, **26**(1):19-23.
- Isola, J., Korte, J.M., Tuohimaa, P. (1987b). Immunocytochemical localization of progesterone receptor in the chick ovary. *Endocrinology*, **121**:1034-1040.
- Johnson, A.L. (1990). Steroidogenesis and actions of steroids in the hen ovary. *Poultry Biology*, **2**:319-346.
- Kalthoff, K. 1996. **Analysis of biological development**. Mc Graw-Hill, INC. Pag 76-77.
- Kell, D.L., Kamel, O.W., Rouse, R.V. (1993). Immunohistochemical analysis of breast carcinoma estrogen and progesterone receptors in paraffin-embedded tissue. *Applied immunohistochemistry*, **1**(4): 275-281.
- Kimball, J. 1986. **Biología**. Addison-wesley Iberoamericana. Wilmington, Delaware, USA.
- Landers, J.P., Spelsberg, T.C. (1992). New concepts in steroid hormone action transcription factors, protooncogenes, and the cascade model for steroid regulation of gene expression. *Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr.*, **2**(1):19-63.
- Lehninger, A.L. 1989. **Bioquímica**. Ediciones Omega. Barcelona, España. pp 820-834.
- Mc Donald, L. E. y Pineda, M. H. 1991. **Endocrinología veterinaria y reproducción**. Interamericana Mc Graw-Hill. 551p.
- Mc Lelland, J. 1992. **Atlas en color de anatomía de las aves**. Interamericana Mc Graw-Hill. México. pp 66-84.
- Montaño, R.F. y Romano E.L. (1995). Anticuerpos monoclonales y su aplicación en hematología. *Interciencia*, **20**(4): 194-202.

- Narbaitz, R., y De Robertis, E.M., Jr. (1968). Postnatal evolution of steroidogenic cells in the chick ovary. *Histochemie*, **15**:187-193.
- North, M.O. y Bell, D.D. 1993. **Manual de producción avícola**. Manual Moderno. México, D.F. 829 p.
- Park-Sarge, C.K. y Mayo, K.E. (1994). Regulation of the progesterone receptor gene by gonadotropins and cyclic adenosine 3',5'-monophosphate in rat granulosa cells. *Endocrinology*, **134**:709-718.
- Pedernera, E., Gómez, Y., Velázquez, P., Juárez-Oropeza, M.A., y González del Pliego, M. (1988). Identification of steroidogenic cell subpopulations in the ovary of the newly hatched chicken. *Gen. Comp. Endocrinol.*, **71**, 153-162.
- Pekki, A., Joensuu, T., Vidqvist, K., Toft, D., Tuohimaa, P. (1989). Progesterone receptor concentration differences in the chick oviduct cells and apparent down-regulation by ligand. A semiquantitative immunohistochemical study. *J. steroid biochemic.*, **34**(1-6) :351-354.
- Ruckebusch, Y., Phaneuf, L., Dunlop, R. 1994. **Fisiología de pequeñas y grandes especies**. El Manual Moderno. México, D. F. 862p.
- Salomaa, S., Pekki, A., Sannisto, T., Ylikomi, T. y Tuohimaa, P. (1989). Progesterone receptor is constitutively expressed in chicken intestinal mesothelium and smooth muscle. *J. Steroid biochemic.*, **34**(1-6):345-349.
- Sauveur, B. 1992. **Reproducción de las aves**. Mundi-Prensa. Madrid , España. 350p.
- Smith, R.A. (1990). Evaluation of cross-species reactivity of antibodies to human antigens in animal models using immunoperoxidase techniques. *The Journal of Histochemistry*, **13**(4):255-269.
- Smidt, D. y Ellendorff, F. 1972. **Endocrinología y fisiología de la reproducción de los animales zootécnicos**. Acribia.Zaragoza, España. pp. 40-83.
- Stewart, F., Thompson, J.A., Leigh, S.E.A. y Warwick, J.M., (1987). Nucleotide (cDNA) sequence encoding the horse gonadotrophin  $\alpha$ -subunit. *J. Endocrinol.*, **115**: 341-346.
- Stryer, L. 1990. **Bioquímica**. Reverté. Barcelona, España. pp. 981-1009.
- Sturkie, P.D. 1965. **Fisiología aviar**. Acribia. Zaragoza, España. pp. 359-458.

- Syvälä, H., Pekki, A., Bläuer, M., Paasanen, S., Mäkinen, E., Ylikomi, T y Tuohimaa, P. (1996). Hormone-dependent changes in A and B forms of progesterone receptor. *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.*, **58**(56):517-524.
- Syvälä, H., Vienonen, A., Ylikomi, T., Bläuer, M., Zhuang, Y.H. y Tuohimaa, P. (1997). Expression of the chicken progesterone receptor forms A and B is differentially regulated by estrogen *in vivo*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **231**(3):573-576.
- Tanabe, Y., Saito, N., y Nakamura, T. (1986). Ontogenetic steroidogenesis by testes, ovary, and adrenals of embryonic and postembryonic chickens (*Gallus domesticus*). *Gen. Comp. Endocrinol.*, **63**:456-463.
- Vegeto, E., Shahbaz, M.M., Wen, D.X., Goldman, M.E., O'Malley, B.W. y Mc Donnell, D.P. (1993). Human progesterone receptor A form is a cell- and promoter-specific repressor of human progesterone receptor B function. *Mol. Endocrinol.*, **7**: 1244-1255.
- Weibel, E.R., Kistler, G.S. y Scheile, W.F. (1966). Practical stereological methods for morphometric cytology. *J. Cell. Biol.*, **30**:23.
- Willy, P.J. y Mangelsdorf, D.J. (1998). Nuclear Orphan Receptors: The Search for novel ligands and signaling pathways. En: Hormones and signaling. volumen 1. Academic press. O'Malley, B.W.
- 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. (1987). Maturation of the hypothalamo-adenohypophyseal-gonadal (HAG) axis in the chick embryo. *J. Exp. Zool. Suppl.*, **1**:265-271.
- Woods, J.E., Scanes, C.G., Seeley, M., Cozzi, P., Onyese, 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.
- Woods, J.E., Damianides-Keenan, M. y Thommes, R.C. (1991). FSH- and TSH-binding cells in the ovary of the developing chick embryo. *Gen. Comp. Endocrinol.*, **82**:487-494.
- Yen, S.S., y Jaffe, R. B. 1991. **Reproductive endocrinology: Physiology, pathophysiology and clinical management**. W.B. Saunders Company. Philadelphia. 1016p.

Yoshimura, Y., Okamoto, T. y Tamura, T. (1995). Effects of luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone on the progesterone receptor induction in chicken granulosa cells *in vivo*. *Poultry Science*, 74:147-151.

### XIII. APÉNDICE

---

#### PREPARACIÓN DE SUSTANCIAS

##### Suero fisiológico de NaCl

Se disuelven 0.9 g de NaCl en agua destilada y se afora a 100 ml

##### Solución libre de Ca<sup>++</sup> y Mg<sup>++</sup>

Esta solución contiene los siguientes reactivos:

NaCl	8.0 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.2 g
KCl	2.0 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1.15 g
EDTA	0.02 g

Se disuelven uno por uno en agua destilada y se afora a un litro, al final se agregan 2 gotas de rojo fenol. La coloración de la sustancia debe quedar rosa pálido.

##### Paraformaldehído 4%

Se disuelven en frío 4 g de paraformaldehído en PBS 100 mM pH 7.4, se afora a 100 ml. Posteriormente se calienta la solución en baño maría a 60°C hasta que el líquido se transparente; en caso de que no suceda esto se agregan unas gotas de NaOH 1N hasta que se transparente el fijador. La preparación debe hacerse en campana de extracción porque libera vapores tóxicos.

### Amortiguador de Fosfatos 10 mM pH 7.4

El amortiguador contiene la siguiente mezcla: 162 ml de sol. A + 38 ml de sol. B

- Solución A:  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (fosfato de sodio dibásico anhidro, PM 141.96 -Baker-)

Se disuelven 8.82g de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  en 200ml de agua destilada

- Solución B:  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  (fosfato de sodio monobásico monohidratado, PM 137.99 - Sigma-)

Se disuelven 2.07g de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  en 50ml de agua destilada

### Baño de flotación de 1.5 lts

1 g de gelatina (Merck) se hidrata en un poco de agua fría, después se disuelve en 1.5 lts. de agua caliente. Esta solución se filtra y se pone en el baño de flotación manteniendo su temperatura a 46°C.

### Eosina Alcohólica

Eosina (azulosa, amarillenta)	1 g
Orange G	1 g
Alcohol 70%	100 ml

Se disuelven en frío, agregando poco a poco cada sustancia en el alcohol.



### Preparación de laminillas para la técnica inmunohistoquímica:

Laminillas nuevas se limpian con etanol 96% y se secan. Se ponen en una solución de polilisina dilución 1:10 (poly-L-lysine -Sigma-) durante 30 min. a temperatura ambiente. Se quita el exceso de polilisina sacudiendo las laminillas sobre una gasa, sin tocar con los dedos la cara de la laminilla donde se colocarán los cortes. Se secan en la estufa a 60°C durante 1hr.

### PBS 1X pH 7.4

Para preparar PBS 1X se hacen las siguientes soluciones: 800 ml de sol. A y 200 ml sol. B

- Solución A:  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0.01M +  $\text{NaCl}$  0.15M (cloruro de sodio, PM 58.44)

1.1357g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  + 7.0128g  $\text{NaCl}$  ; se disuelven en agua destilada y se lleva a 800 ml.

- Solución B:  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  0.01M + cloruro de sodio  $\text{NaCl}$  0.15M

0.2760g  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  + 1.7532g  $\text{NaCl}$  ; esta mezcla se lleva a 200 ml con agua destilada

El método de preparación del PBS es agregar poco a poco solución B a la solución A, hasta ajustar el pH a 7.4

### Tritón 0.5 % para la técnica de inmunohistoquímica

25µl de tritón x-100 (Sigma) se afora a 5 ml de PBS 1X pH 7.4

## Anticuerpos

La preparación de los anticuerpos requiere de una **solución diluyente** que contiene:

gelatina (tipo A de piel de porcino -Sigma-)	0.1%
tritón X-100 (Sigma)	0.3%
disueltas en PBS pH 7.4	

Para preparar 5ml de **solución diluyente** se disuelve 5mg de gelatina en PBS, se agita en un vortex hasta disolver; después se agregan 15 $\mu$ l de tritón y se *disuelve perfectamente*. Esta mezcla se deja enfriar a 4°C.

### a) Anticuerpo de progesterona dilución 1:50

Se toman 25  $\mu$ l de anticuerpo de progesterona (3  $\mu$ g/ml) clona Let 81 (anticuerpo monoclonal de ratón) y se disuelven en 1.225 ml de solución diluyente para obtener 1.25 ml de anticuerpo 1:50.

### b) Suero normal de ratón (SNR) dilución 1:2000

Se disuelve 1 $\mu$ l de SNR en 1.999 ml de solución diluyente para preparar 2 ml de anticuerpo 1:2000.

**c) Suero normal de conejo (SNC) 1%**

Este anticuerpo se usa como control negativo y contiene las siguientes sustancias en solución:

1% de SNC

1% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

PBS pH 7.4

Para preparar 2ml de SNC 1% se agregan 20µl de SNC y 67µl de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30%); esto se lleva a 2ml con PBS 1X pH 7.4