



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
IZTACALA

**EFFECTO DE LAS HORMONAS GONADOTRÓPICAS  
SOBRE LAS ISOFORMAS DEL RECEPTOR A  
PROGESTERONA EN EL OVARIO Y OVIDUCTO DE  
POLLOS RECIÉN NACIDOS, TRATADOS EN ETAPA  
EMBRIONARIA.**

**T E S I S.**

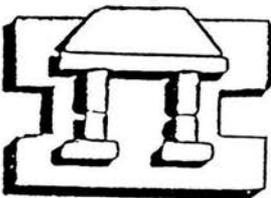
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

**B I Ó L O G O**

P R E S E N T A :

**PEDRO JULIÁN GARCÍA IZQUIERDO.**

DIRECTORA DE TESIS: DRA. EN C. MA. GENOVEVA GONZÁLEZ-MORÁN.



IZTACALA

LOS REYES IZTACALA, ESTADO DE MÉXICO. 2002.



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

Todo el material contenido en esta tesis 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.



U.N.A.M. CAMPUS

## **DEDICATORIAS.**

**IZT.**

*A mis padres Ing. Pedro Julián García Méndez y P.D. Marta Izquierdo Nava por todo el amor y apoyo que me han dado en la vida.*

*A mi hermana (osita) Martha Gabriela García Izquierdo por todos los consejos y apoyo que me ha dado.*

*A mis tías María de Jesús y María Magdalena Izquierdo Nava por su amor y cariño.*

*A mi abuelita Rita Méndez González por su gran cariño.*

*A mi tío Gerardo Gustavo García Méndez por su apoyo.*

*A mis abuelos Angel Izquierdo Fuentes (+) y Pedro García Pérez (+), porque deseaban ver este momento.*

## **AGRADECIMIENTOS.**

*A la Dra. Genoveva González-Morán por su dirección y apoyo durante la realización de esta tesis.*

*A todas las investigadoras del laboratorio de Biología de la Reproducción Animal, Facultad de Ciencias, U.N.A.M., por todo su apoyo.*

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

*A todos los maestros de la carrera de Biología de la FES-Iztacala.*

*A todos mis compañeros de generación por los buenos momentos.*

*A los revisores de tesis por su interés en la revisión y sus consejos.*

# ÍNDICE.

<b>TEMA.</b>	<b>PÁGINA.</b>
<b>INTRODUCCIÓN .....</b>	1
<b>1. Desarrollo embrionario del ovario y oviducto aviar .....</b>	1
1.1. Ovario izquierdo .....	1
1.2. Ovario derecho .....	3
1.3. Oviducto izquierdo .....	4
1.4. Oviducto derecho .....	4
<b>2. Localización y morfología del ovario y el oviducto izquierdo .....</b>	5
2.1. Ovario: posición, irrigación sanguínea e inervación .....	5
2.2. El ovario inmaduro .....	7
2.3. El ovario maduro .....	8
2.4. oviducto: posición, irrigación sanguínea e inervación .....	9
2.5. Morfología del oviducto .....	10
<b>3. Fisiología .....</b>	13
3.1. Control de la actividad reproductora: eje hipotálamo-hipófisis-gónada .....	13
3.2. Descripción del hipotálamo y la hipófisis .....	14
3.3. Hormonas sexuales hipofisarias .....	14
3.4. Ovario .....	15
3.5. Ovogénesis .....	17
3.6. Oviducto .....	18
<b>4. Receptores a hormonas esteroides .....</b>	21
4.1. Síntesis de hormonas esteroides .....	21
4.2. Transporte de hormonas esteroides .....	23
4.3. Mecanismos de acción .....	23
4.3.1. Estructura de los genes de los receptores .....	25
4.3.2. Estructura de los elementos de respuesta a los esteroides .....	26
4.3.3. Funciones de los receptores a esteroides .....	28
4.4. Características de los receptores intracelulares para los tipos de hormonas esteroides .....	30
4.4.1. Corticoesteroides .....	30
4.4.2. Estrógenos .....	31
4.4.3. Andrógenos .....	31
4.4.4. Progesterona .....	32
4.4.4.1 Estructura molecular del receptor a progesterona .....	33
4.4.4.2. Fosforilación .....	34
4.4.4.3. Inmunorreactividad del receptor a progesterona .....	36
4.4.4.4. Función del receptor a progesterona .....	37

<b>ANTECEDENTES .....</b>	39
<i>Ovario .....</i>	39
<i>Oviducto .....</i>	40
<b>JUSTIFICACIÓN .....</b>	44
<b>OBJETIVOS .....</b>	45
<b>HIPÓTESIS .....</b>	46
<b>MATERIAL Y MÉTODO .....</b>	47
<i>Procesamiento del material biológico .....</i>	48
<i>Técnica de hematoxilina-eosina .....</i>	48
<i>Tipos celulares estudiados .....</i>	49
<i>Técnica inmunohistoquímica para la identificación de Receptores a Progesterona .....</i>	49
<i>Análisis inmunohistoquímico del ovario .....</i>	50
<i>Análisis inmunohistoquímico del oviducto .....</i>	50
<b>RESULTADOS .....</b>	52
<i>Ovario .....</i>	52
<i>Comparación de la respuesta de las células RP-inmunoreactivas entre los tratamientos .....</i>	54
<i>Oviducto .....</i>	58
<i>Comparación de la respuesta de las células RP-inmunoreactivas entre los tratamientos .....</i>	60
<i>Oviducto de gallina ponedora .....</i>	63
<b>DISCUSIÓN .....</b>	65
<b>CONCLUSIONES .....</b>	69
<b>BIBLIOGRAFÍA .....</b>	70

# INTRODUCCIÓN.

## 1. Desarrollo embrionario del ovario y oviducto aviar.

### 1.1. Ovario izquierdo.

Desde el punto de vista embriológico la gónada se forma por dos tipos celulares: las *células somáticas* de origen mesodérmico y las *células germinales primordiales*, estas últimas en el pollo pueden ser observadas aproximadamente 18 horas después de la incubación (Romanoff, 1960; Hardisty, 1978). Son células grandes, hinchadas y generalmente redondas u ovoides con núcleos grandes. De acuerdo con Swift (1914) y Danchakoff (1931), su medida promedio es de 15 a 22  $\mu\text{m}$ , aunque a menudo no exceden de 18  $\mu\text{m}$ , pero Goldsmith (1928) da su diámetro entre 10 y 15  $\mu\text{m}$  (Romanoff, 1960).

En aves las células germinales primordiales se derivan de las células del epiblasto, migrando desde la región central del área pelúcida a la zona que forma la cresta en el hipoblasto, en el borde anterior del área pelúcida. Esta región extraembrionaria es llamada *cresta germinal*, y las células germinales primordiales se multiplican en esta zona (Eyal-Giladi, 1981; Gilbert, 1997).

A las 33 hr de incubación las células germinales empiezan su traslado hacia la región de las futuras gónadas por medio de los vasos sanguíneos, donde los elementos germinales avanzan mezclados con las células sanguíneas (Romanoff, 1960; Hardisty, 1978; Balinsky, 1983). También podría producirse un desplazamiento activo debido a las propiedades ameboides de estas células, así como a un desplazamiento pasivo resultante de la ordenación de los tejidos y de los órganos del embrión (Houillon, 1978). A las 48 hr después de la incubación empiezan a llegar al mesenterio dorsal y crestas genitales y la fase de transporte vascular termina virtualmente a las 90 - 120 hr de incubación (Hardisty, 1978).

Aproximadamente 3.5 días después de la incubación, tras llegar a las crestas germinales, las células germinales primordiales se incrustan en el *epitelio germinal* (Merchant-Larios, 1978; Balinsky, 1983). Hacia el final del tercer día de incubación, las gónadas izquierda y derecha contienen el mismo número de células germinales primordiales (Getty, 1982).

Durante el 4º día muchas células germinales se transfieren de la gónada derecha a la izquierda. La gónada izquierda, entonces, tiene cinco veces más células germinales que la derecha. Las células germinales primordiales se incorporan al epitelio germinal y las otras células

de este epitelio son de origen mesenquimatoso (peritoneal) (Romanoff, 1960; Getty, 1982). En esta etapa indiferenciada la gónada esta compuesta por dos elementos: el epitelio germinal y el mesenquima subyacente. El epitelio germinal es esencial para el desarrollo posterior de la gónada, dando origen a los cordones primarios de la médula (Haffen, 1977; Merchant-Larios, 1978).

El 5º día la proliferación de estructuras gonadales empieza con la aparición de la *red de cordones* mesodérmicos, que forman la unión entre el glomérulo nefrítico y los futuros cordones sexuales (Romanoff, 1960; Getty, 1982). Los cordones sexuales de la primera proliferación, se forman como yemas del epitelio germinal y crecen en el interior del estroma, continuando su formación hasta cerca del 7º día, cuando las diferencias morfológicas sexuales aparecen. Durante esta etapa indiferente no se observa distinción morfológica entre los sexos. En el macho, los cordones están destinados a formar los tubulos seminíferos; en la hembra se forman los cordones medulares. La segunda proliferación sucede después de la segunda proliferación sexual (Romanoff, 1960).

A los 6.5 días en el embrión de pollo los cordones y el epitelio empiezan a separarse. Este proceso es realizado por un crecimiento interno del estroma y da como resultado que la membrana basal no continúe más tiempo entre la envoltura epitelial y los cordones proliferados internamente. A continuación de la separación, los cordones sexuales crecen rápidamente y aumentan de diámetro, ocupando más espacio del estroma y contribuyendo al aumento de la gónada. Al final de este día la formación de cordones de la primera proliferación cesa repentinamente, y toman lugar cambios que permiten determinar el sexo del embrión (Romanoff, 1960; Getty, 1982).

El 7º día comienza la diferenciación de los *cordones sexuales primarios* o *cordones medulares*, siendo similar en ambos sexos. La gónada femenina izquierda se dilata en todas direcciones debido principalmente a un aumento en los cordones primarios (Romanoff, 1960), que forman la *médula ovárica* y contribuyen a la constitución de las *células intersticiales medulares*, que tienen una función endocrina. El epitelio germinal prolifera luego en su zona periférica gruesa, de células epiteliales, que da origen a la corteza ovárica. Una capa de tejido conectivo, que es la *túnica albugínea primaria*, separa la corteza de la médula en este estadio (Romanoff, 1960; Getty, 1982).

Durante el 8º día las células germinales primordiales están distribuidas uniformemente en el epitelio germinal. En este periodo, las células germinales comienzan una activa división para formar ovogonias, observándose los siguientes días un rápido aumento del número de células germinales en el epitelio. Grupos de tres o cuatro racimos forman lobulaciones de la superficie interior de él epitelio. Estos abultamientos de ovogonias son los brotes que forman la segunda proliferación, o cordones corticales. La formación de los *cordones corticales de la segunda*

*proliferación*, comienza por una multiplicación y agrupamiento de las células germinales en el borde interior del epitelio germinal, próximo a la túnica albugínea. Para el 10º día los cordones son lentamente unidos al epitelio, aumentando en tamaño y número (Romanoff, 1960). Los cordones sexuales secundarios, las ovogonias y las células intersticiales corticales permanecen superficiales a la túnica albugínea primaria y constituyen la *corteza ovárica* (Getty, 1982).

Del 9º al 11º día, el epitelio germinal del ovario izquierdo es columnar y puede ser de una a cuatro células de grosor (Romanoff, 1960).

Alrededor del 14º día los cordones sexuales secundarios se separan del resto del epitelio germinal por una segunda capa de tejido conectivo, llamada *túnica albugínea definitiva* (Getty, 1982).

Para el 15º día hasta el momento de la eclosión, el ovario izquierdo es reducido de una simple capa de células cuboidales a columnares. La corteza es delgada debido a la presencia de cordones de la segunda proliferación. Las células germinales primordiales del ovario izquierdo son pocas, en comparación con el ovario derecho (Romanoff, 1960).

Antes de la eclosión y un poco después, el ovario está formado por una médula y una corteza que rodea la médula, excepto en el hilio, donde esta última está en contacto con la pared dorsal del cuerpo. Las ovogonias y los ovocitos están confinados en la corteza. La superficie más externa de la corteza se halla recubierta por un epitelio alto, cuboide o aplanado, conocido como *epitelio superficial*, que persiste durante la madurez. Por detrás de este epitelio se encuentra la túnica albugínea definitiva. La *médula* está formada de tejido conectivo con vasos sanguíneos y nervios; también contiene músculo liso. Las ramas arteriales contorneadas, muy numerosas, y las grandes venas hacen de la médula la parte más vascular del ovario (Getty, 1982).

## **1.2. Ovario derecho.**

En la mayoría de las aves el ovario derecho permanece en el estado de gónada indiferente, con los cordones sexuales primarios sin reducir (Balinsky, 1983).

La gónada derecha en la hembra, normalmente, tiene más de testículo que de ovario. A partir de los cordones sexuales primarios se constituye la médula de la gónada, el epitelio germinal usualmente permanece como una simple capa de células cuboidales. Hay proliferación de los cordones sexuales secundarios y, por tanto, no de una corteza activa. Esta clase de gónada derecha tiene un equivalente potencial testicular. Sin embargo, como las células germinales primordiales en sus cordones sexuales primarios han desaparecido a las tres semanas de la incubación, pronto se pierde su capacidad para la espermatogénesis. El desarrollo subsiguiente

del ovario derecho se hace mucho más lento que el del ovario izquierdo. No obstante, persiste en la vida adulta como un tejido bien definido de la superficie ventral del lado derecho de la vena cava caudal. En los más adultos alcanza un tamaño máximo de unos 5 a 6 mm de longitud y menos de 1 mm de diámetro transversal (Getty, 1982).

### **1.3. Oviducto izquierdo.**

Durante los primeros estados del desarrollo embrionario se encuentran presentes los conductos de Wolff del macho y los conductos de Müller u oviductos de la hembra. Antes de la eclosión los conductos de Wolff degeneran en la hembra, así como los oviductos en el macho (Romanoff, 1960).

El oviducto aparece al 4º día de la incubación, como un surco en una tira longitudinal de epitelio peritoneal engrosado conocido como cresta tubal, que asienta dorsolateral sobre el mesonefros y su conducto (Romanoff, 1960; Getty, 1982),

Al 5º día los labios del surco se unen, formando un tubo corto con un ostium celómico abierto cranealmente y un extremo ciego caudalmente. Esta terminación ciega crece caudalmente, lateral al conducto mesonefrico, y adquiere una luz a medida que avanza. Alcanza la cloaca entre el 7º y el 11º días. Alrededor de los 13 días, se aprecia el infundíbulo, el magnum y el útero. La perforación dentro de la cloaca ocurre finalmente después de la eclosión (Getty, 1982).

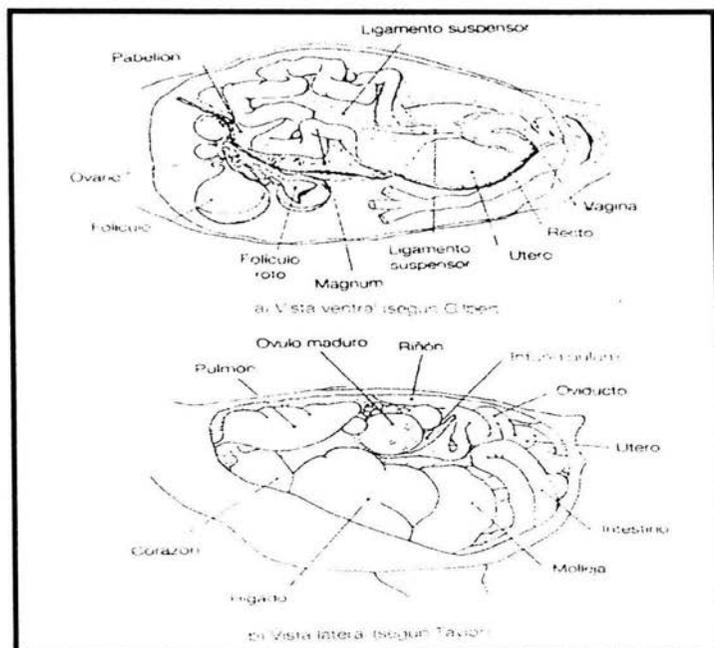
### **1.4. Oviducto derecho.**

El desarrollo del oviducto derecho es esencialmente de la misma forma que el izquierdo, hasta antes del estadio indiferenciado que ocurre al final del 6º día. El desarrollo del oviducto derecho está totalmente terminado en el octavo día y comienza inmediatamente su degeneración. Se pierde la luz de la dirección craneocaudal. Alrededor de los 18 días de incubación, la regresión del oviducto se ha completado, con la desaparición total, excepto por un corto muñón que se mantiene unido a la cloaca (Romanoff, 1960; Getty, 1982).

## 2. Localización y morfología del ovario y el oviducto izquierdo.

### 2.1. Ovario: posición, irrigación sanguínea e inervación.

El ovario izquierdo ocupa la parte dorsal de la región media del celoma (Figura 1). Asienta en contacto con la región craneal del riñón izquierdo y también solapa la división craneal del riñón derecho. Esta relacionado cranealmente con el extremo caudal del pulmón izquierdo. Ventralmente está cubierto por el saco aéreo abdominal izquierdo; dorsalmente está en contacto con la aorta y vena cava cubriendo las glándulas adrenales izquierda y derecha. Las relaciones son particularmente íntimas en la adrenal izquierda, que está parcialmente incorporada en la superficie dorsal del ovario. La base del ovario izquierdo está unida a la pared dorsal del celoma por un pliegue del peritoneo, el mesovario que, básicamente, suspende al ovario del celoma (Sturkie, 1967; Gilbert, 1971a.; Michel y Schwarse, 1980; Getty, 1982; Johnson, 1986). Sin embargo, esta suspensión peritoneal, desde la pared dorsal del cuerpo, está reforzada por tejido conectivo, músculo liso, vasos sanguíneos y nervios y , junto con estas estructuras, constituye un *hilio ovárico* amplio y bien definido que también se llama «pedúnculo ovárico» (Gilbert, 1971a.; Getty, 1982).



**Figura 1.** Ubicación del aparato reproductor de la hembra en la cavidad abdominal. Tomado de Sauveur y Revers, 1992.

El ovario recibe su aporte sanguíneo de la corta arteria ovárica, que usualmente se origina de la arteria renolumbar izquierda, que puede ramificarse directamente de la aorta dorsal. La arteria ovárica se divide en muchas ramas y usualmente 2 a 4 ramas arteriales separadas cursan hacia un pedículo folicular (Sturkie, 1967).

El drenaje venoso se hace mediante dos o más venas ováricas, formadas por anastomosis de los pedúnculos foliculares. Las venas ováricas craneales y la vena adrenal izquierda forman un tronco común que desemboca en el lado izquierdo de la vena cava caudal, a 1 cm craneal de las venas iliacas comunes. La vena ovárica caudal entra en la cara ventral de la vena cava caudal o en la vena iliaca común izquierda ( Gilbert, 1971a.; Getty, 1982).

La inervación del ovario izquierdo deriva del *plexo ovárico*. Este es una lámina más o menos continua de tejido nervioso que asienta dorsalmente a lo largo del hilio ovárico y ventral de la aorta. Contiene no solamente grandes y pequeños haces de nervios, sino también 10 ganglios principales que se extiende a lo largo de las glándulas adrenales. También existen más ganglios pequeños que tienen hasta 100 neuronas (Getty, 1982).

El plexo ovárico recibe ramas *simpáticas* del quinto, sexto y séptimo ganglios torácicos y primero y segundo ganglios lumbosacros de la cadena simpática (Gilbert, 1971a.; Getty, 1982).. Estos ganglios se distribuyen, respectivamente desde el V, VI y VII nervios esplácnicos torácicos y I y II nervios esplácnicos lumbosacros hasta el plexo ovárico (Getty, 1982).

También hay una posible contribución de nervios vagos al plexo, sin embargo, la evidencia no es total. Las fibras preganglionares parasimpáticas puede que estén presentes y surjan de los plexos prevertebral y pelviano, haciendo sinapsis con numerosas células nerviosas en los folículos maduros, pero la fuente precisa de tales fibras es oscura (Gilbert, 1971a.; Getty, 1982).

Existen tres o cuatro ganglios del plexo ovárico que están incrustados en el hilio ovárico propiamente dicho. Desde estos ganglios emergen 10 haces de nervios que pasan a través del hilio a la zona vascular (médula) del ovario, alguno de los cuales inerva los vasos sanguíneos y músculos lisos del hilio ovárico (Getty, 1982). Existen componentes adrenérgicos y colinérgicos. La zona vascular del ovario contiene muchos haces nerviosos, algunos de los cuales están de nuevo relacionados con los vasos sanguíneos y la musculatura lisa (Gilbert, 1971a.; Getty, 1982; Bahr y Nalbandov, 1977). Parece que predominan los elementos colinérgicos sobre los adrenérgicos. No existen células nerviosas en la zona vascular del ovario. En la zona parenquimatosa (corteza) del ovario hay una red extensa de fibras nerviosas que están relacionadas principalmente con los folículos en desarrollo. También están inervados los vasos sanguíneos. Existen abundantes componentes adrenérgicos y colinérgicos. En los folículos

maduros existen células nerviosas, pero no suele ser corriente encontrarlas en la zona parenquimatosa del ovario (Getty, 1982).

## 2.2. El ovario inmaduro.

El ovario del pollo es una pequeña estructura irregular (Michel y Schwarze, 1980; Dyce *et al.* 1991), su color es amarillo rosáceo pálido y su superficie es granular. Tiene alrededor de 3.5 a 7 mm de largo y 1,5 mm de ancho (Getty, 1982). (Figura 2).

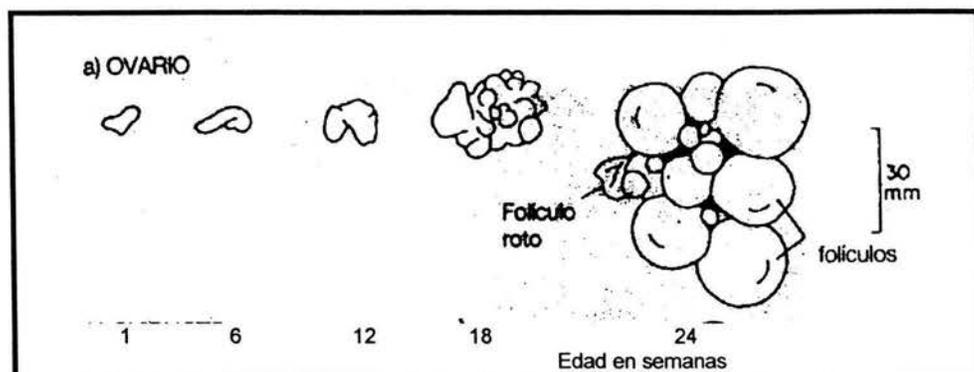


Figura 2. Desarrollo esquemático del ovario en la gallina. Tomado de Sauveur y Reviere, 1992.

Esencialmente está formado por una corteza externa y una médula central separados por la túnica albugínea (Gilbert, 1971a.). La médula contiene tejido conectivo, vasos sanguíneos y linfáticos, cordones de células intersticiales y células indiferenciadas (Gilbert, 1971a.; Getty, 1982; González-Morán *et al.*, 1985; González del Pliego *et al.*, 1988). Las células intersticiales se encuentran en la zona externa de la médula del ovario. Son de forma irregular, con un citoplasma altamente vacuolado y se agrupan en cordones o grupos rodeados por células del estroma (González-Morán *et al.*, 1985). El citoplasma de estas células contiene mitocondrias con crestas tubulares, numerosos depósitos de retículo endoplásmico liso y abundantes gotitas de lípidos. Las mitocondrias de las células intersticiales son más grandes que las de las células indiferenciadas. Cada cordón de estas células recibe una terminal nerviosa que penetra en el agrupamiento celular. Por estudios estructurales postnatales de estas células se ha mostrado que originan las células de la teca de los folículos ováricos (González del Pliego *et al.*, 1988).

Las células indiferenciadas se encuentran rodeados por una definida lámina basal. Estas células presentan escaso citoplasma y pocos organelos, principalmente polirribosomas y depósitos de retículo endoplásmico rugoso. El núcleo es redondo u ovoide con eucromatina y nucleolos prominentes (González del Pliego *et al.*, 1988).

Los sistemas lacunares se parecen a los vasos sanguíneos, pero los rodean células epiteliales más voluminosas. Las células que rodean los vasos sanguíneos son más aplanados y de tipo endotelial (González-Morán *et al.*, 1985).

La corteza está rodeada por un epitelio pseudoestratificado llamado *epitelio germinal*, se encuentran las células germinales (ovogonias y ovocitos) y entre ellas las células pregranulosas. Las ovogonias son más pequeñas que los ovocitos, en las primeras la cromatina se encuentra dispersa en el citoplasma, y en los segundos se puede observar condensada en el núcleo formando cromosomas. Las células pregranulosas son alargadas, en forma ovoide con escaso citoplasma (González-Morán *et al.*, 1985).

### **2.3. El ovario maduro.**

En el ovario inmaduro existen miles de ovocitos. Aproximadamente a las 18 semanas de edad del pollo, el ovario maduro es sexualmente activo y forma los folículos que comúnmente son de seis distintos tamaños de entre 2 y 4 cm de diámetro; acompañados por un gran número de pequeños folículos de 2 y 10 mm de diámetro y otros más pequeños y numerosos que son los folículos blancos. Este grupo de folículos se clasifican de acuerdo a los días faltantes para su ovulación. Se designan como F<sub>1</sub>, F<sub>2</sub>, F<sub>3</sub>, F<sub>4</sub>, F<sub>5</sub> y F<sub>6</sub>, siendo el más grande y próximo a ovular el F<sub>1</sub> (Gilbert, 1971; Bahr y Nalbandov, 1977; Johnson, 1986).

Durante la actividad sexual el ovario izquierdo adulto recuerda un racimo de uvas. Esto es debido a la presencia de varios folículos redondeados de distinto tamaño que se proyectan desde la superficie ventral del ovario, cada uno suspendido por un pedúnculo folicular (Michel y Schwarse, 1980; Getty 1982; Dyce *et al.*, 1991). En un animal en época de reproducción existen 4 ó 5 folículos muy grandes, con diámetros de hasta unos 40 mm (Sturkie, 1967; Getty, 1982).

A simple vista se pueden ver hasta 2,500 ovocitos (Gilbert, 1971a.; Getty, 1982). Existen miles de ovocitos más pequeños que están profundos y adentro del ovario y son visibles al microscópio. Cuando el ovario está activo es muy variable en cuanto a forma y consistencia, puede tener 5 cm o más, tanto cranealmente como transversalmente. En la gallina puede tener un peso de unos 50 g. Después de que la fase de actividad sexual ha terminado, el ovario se reduce en tamaño y en forma, y pasa a la fase de reposo (Getty, 1982).

Durante la *fase de reposo* el ovario izquierdo del adulto tiene una forma oval aplanada (Michel y schwarse, 1980; Getty 1982), con una extremidad craneal redondeada y alargada transversalmente y una extremidad caudal más puntiaguda, de unos 3 cm de longitud craneocaudalmente, 2 cm transversalmente y de 3.5 mm a 10 mm dorsoventralmente. En este

estado su peso es solamente de 2 a 6 g. Los ovocitos son pequeños o diminutos y tiene un color blanco o grisáceo (Getty, 1982).

En las aves los folículos en diferentes estados de maduración se encuentran limitados por una gruesa pared del epitelio y una capa conjuntiva del ovario. Este tejido se alarga con el volúmen de la yema y se une al ovario por un tallo folicular. En la parte distal de éste se encuentra una región más delgada del epitelio, sin capa conjuntiva. Es el estigma (Sturkie, 1967; De Alba, 1985; Johnson, 1986).

El folículo ovárico está altamente vascularizado, excepto en el estigma (el punto de ruptura durante la ovulación) que contiene un menor número de arterias y venas fundamentales (Sturkie, 1967; De Alba, 1985; Johnson, 1986).

El sistema venoso del folículo es más prominente que el sistema arterial y forma tres capas o redes: 1) la más interna, localizada en la teca; 2) una capa media, y 3) la capa periférica o externa, que consiste en unas pocas venas grandes que rodean al folículo y lo abandonan por el pedículo. Eventualmente todas las venas del ovario se unen en dos venas principales, la anterior y la posterior, que se vacían en la vena cava posterior (Sturkie, 1967).

#### **2.4. Oviducto: posición, irrigación sanguínea e inervación.**

El oviducto es un arrollamiento masivo de entre 60 y 80 cm de largo cuando es plenamente funcional, extendiéndose desde el ovario hasta la cloaca y ocupando una gran parte de la cavidad abdominal (Figura 1). Está suspendido del techo de la cavidad corporal por un pliegue peritoneal (mesoviducto) y algunas asas están conectadas por una continuación ventral que forma el prominente ligamento ventral musculoso (Aitken, 1971; Dyce *et al.* 1991). Ambos contienen fibras de músculo liso que son muy abundantes en el borde libre del ligamento ventral donde forman el cordón muscular sólido (Aitken, 1971; Getty, 1982). La pared del oviducto consiste en cuatro capas musculares: serosa, túnica muscular, una submucosa escasa y una túnica mucosa que contiene muchas glándulas (Michel y Shwarse 1980; Dyce *et al.*, 1991).

El oviducto está irrigado por cuatro arterias: 1) la craneal del oviducto, 2) la media, 3) la caudal y 4) la vaginal. Todas son arterias impares del lado izquierdo del cuerpo, únicamente (Getty, 1982).

Las principales venas se vacían en la circulación general por dos rutas diferentes: 1) Las venas uterinas caudales y las venas vaginales se vacían en la vena caudal del oviducto, tributaria de la vena pudenda. A través de estas venas la vagina y la región caudal del útero tienen un

acceso potencial al sistema portal renal o hepático. 2) El resto del oviducto drena en la vena cava caudal. Las venas medias del oviducto (venas uterinas lateral y craneal y, probablemente, una gran extensión de la vena uterina dorsal) desembocan en la vena renal izquierda (eferente). La vena craneal del oviducto se une a las venas ováricas para desembocar directamente en la vena cava caudal, o en la parte terminal de la vena iliaca común izquierda (Getty, 1982).

El oviducto tiene una invasión simpática y parasimpática; todos los nervios surgen del lado izquierdo del cuerpo (Aitken, 1971; Getty, 1982; Johnson, 1986).

La *invasión simpática* proviene fundamentalmente de dos sitios: 1) el *plexo que acompaña a la aorta*, plexo prevertebral, formado de una red extensa de ganglios y nervios simpáticos ventrales a la aorta. Los nervios simpáticos surgen del plexo y acompañan a la arteria isquiática hasta su origen de la arteria media del oviducto; 2) los ganglios de la *cadena del tronco simpático izquierdo* caudal a la arteria iliaca izquierda. Estos dos grupos de nervios simpáticos forman un plexo en el borde lateral del uréter izquierdo de la arteria media del oviducto (Getty, 1982).

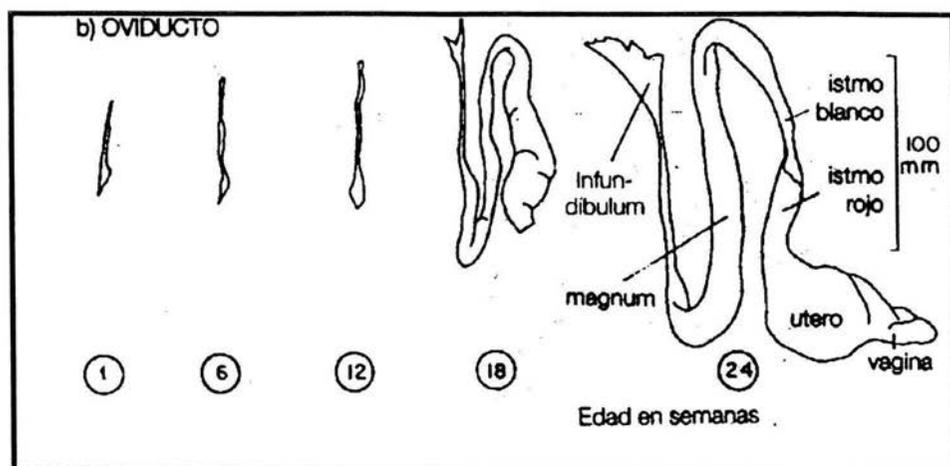
La *inervación parasimpática* deriva desde el VII al XI nervios espinales lumbosacros inclusive (XIII a XXXIII nervios espinales). Cada uno de estos cuatro nervios envía un filamento, y éste, a su vez, cuatro hacia el uréter izquierdo, donde se unen para unir el nervio pudendo (pelviano). El nervio pudendo continúa a lo largo del uréter izquierdo hasta el origen de la arteria vaginal en el primer segmento de la vagina. Hay tres principales ganglios a lo largo de esta parte del nervio pudendo y muchos más en la unión del útero y la vagina. El más caudal y mayor es el cloacal. El ganglio cloacal izquierdo en la hembra se ha llamado *ganglio uterovaginal*, que asienta en la unión del útero y la vagina. Varios filamentos procedentes del nervio pudendo van a lo largo de las arterias vaginal y uterina caudal hasta el útero y la vagina (Sturkie, 1967; Getty, 1982).

El útero y su unión con la vagina tienen considerablemente más tejido nervioso que el istmo y el resto de la vagina. Tiene dos redes nerviosas complejas. La más externa consta de grandes nervios y asienta inmediatamente por detrás de la serosa. La red más profunda, que está conectada con la precedente, está formada por fibras simples aparentemente asociadas a con las células musculares. Las células ganglionares son relativamente numerosas (Getty, 1982).

## **2.5. Morfología del oviducto.**

Hasta las 20 semanas después de la eclosión el crecimiento es lento pero progresivo, el oviducto alcanza una longitud de unos 11 cm y un peso alrededor de 1 g. Después de las 12 semanas el oviducto se alarga rápidamente alcanzando unos 25 cm y unos 22 g de peso a las 21

semanas. La mayor parte del alargamiento afecta al infundíbulo, al magnum, y el istmo (Getty, 1982). (Figura 3).



**Figura 3.** Desarrollo esquemático del oviducto en la gallina. Tomado de Sauveur y Revers, 1992.

El oviducto es una estructura larga, tortuosa, se extiende desde el ovario a la cloaca. Se divide en cinco segmentos, cada uno de los cuales posee una función diferenciada. Dichos segmentos son: infundíbulo, magnum, istmo, útero y vagina (Sturkie, 1967; Aitken, 1971; Getty, 1982; Bahr y Nalvandov, 1977; Banks, 1986; Johnson, 1986; Dyce *et al.*, 1991).

El *infundíbulo* está formado por una especie de embudo seguido de una región tubular. La longitud total de estas dos regiones en la gallina varía de 4 a 10 cm, con una longitud total y un diámetro (de la abertura del embudo) de unos 7 y 10 cm respectivamente (Sturkie, 1967; Getty, 1982; Bahr y Nalbandov, 1977; Dyce *et al.*, 1991). Su color es rosado. La mucosa es algo oblicua, con pliegues longitudinales, que aumentan gradual y progresivamente de altura. La abertura del ostium en el celoma es una hendidura alargada. El embudo desaparece rápidamente para formar la *región tubular* del infundíbulo. La pared de esta parte del embudo es más gruesa que la del embudo, pero más delgada que cualquier otra parte del oviducto. Internamente, los pliegues, que forman una especie de espiral, continúan gradualmente creciendo, pero son mucho más delicados que los del magnum. La transición hacia el magnum es muy abrupta y está marcada por el alargamiento inmediato de los pliegues de la mucosa (Getty, 1982).

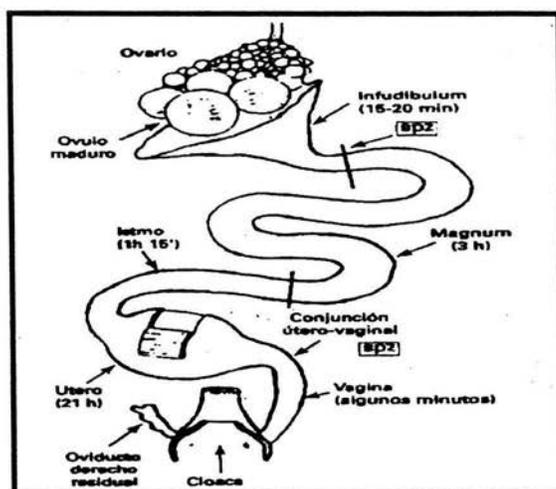
El *magnum* es altamente sinuoso, mide unos 30 cm y es el segmento más largo del conducto. Sus paredes tienen unos masivos pliegues mucosos engrosados por las glándulas que aportan cerca de la mitad de toda la albúmina del huevo. En el extremo distal del magnum los

pliegues mucosos son más bajos y la secreción es más mucosa (Getty, 1982; Dyce *et al.*, 1991). La secreción de su mucosa es de color blanco (Bahr y Nalbandov, 1977).

El *istmo* mide unos 8 cm de largo y es delimitado del magnum por una estrecha zona glandular (translúcida). Es más fino y sus pliegues mucosos son más bajos que los del magnum. Sus glándulas secretan más albúmina y también un material que rápidamente se condensa para formar las dos membranas homogéneas que están entre la albúmina y la cáscara. El color de la mucosa es amarillo oscuro que el resto del oviducto (Getty, 1982; Dyce *et al.*, 1991).

El *útero* es una cámara de pared más fina y un tanto agrandada que mide de 4 a 12 cm de largo (Sturkie, 1967; Getty, 1982; Dyce *et al.*, 1991). Los pliegues de la mucosa están irregularmente intersectados por surcos transversos y oblicuos, que constituyen numerosas laminillas en forma de hoja de hasta 0.5 mm de grueso y 4 mm de alto. El color de la mucosa puede ser desde rosado pálido al rosa vivo o marrón. El interior de la región terminal del útero en forma de embudo, es una región estrecha en forma de anillo de 0.5 a 1 cm de ancho. Histoquímicamente esta región se distingue por la presencia de abundantes lípidos, ésteres de colessterina contenidos en las células ciliadas de la superficie del epitelio (Getty, 1982).

La *vagina* es un tubo muscular en forma de S. Su unión con el útero es señalada por un esfínter (Bahr y Nalbandov, 1977; Dyce *et al.*, 1991). La mucosa de la vagina es blanca. Los pliegues de la mucosa son longitudinales más que espirales y mucho más gruesos y bajos que en otra parte del oviducto, excepto en el embudo del infundíbulo (Getty, 1982). (Figura 4).



**Figura 4.** Representación esquemática del oviducto de la gallina. Tomado de Sauveur y Reviers, 1992.

### 3. Fisiología.

#### 3.1. Control de la actividad reproductora: eje hipotálamo-hipófisis-gónada.

La actividad reproductora gonadal en las aves está controlada y regulada por el eje hipotálamo-hipófisis (Kolb, 1987; García López, 1995) (Figura 5). Este eje se establece a los 13 días para los machos y a los 14 días para las hembras, observándose que ante estímulos externos se producen hormonas liberadoras de las gonadotropinas en las neuronas hipotámicas, las que entran en circulación porta hipofiseal y regulan la síntesis y liberación de las gonadotropinas de la hipófisis, la *hormona folículo estimulante (FSH)* la *hormona luteinizante (LH)*, las cuales estimulan el crecimiento gonadal y la estereoidogénesis (Woods, 1987).

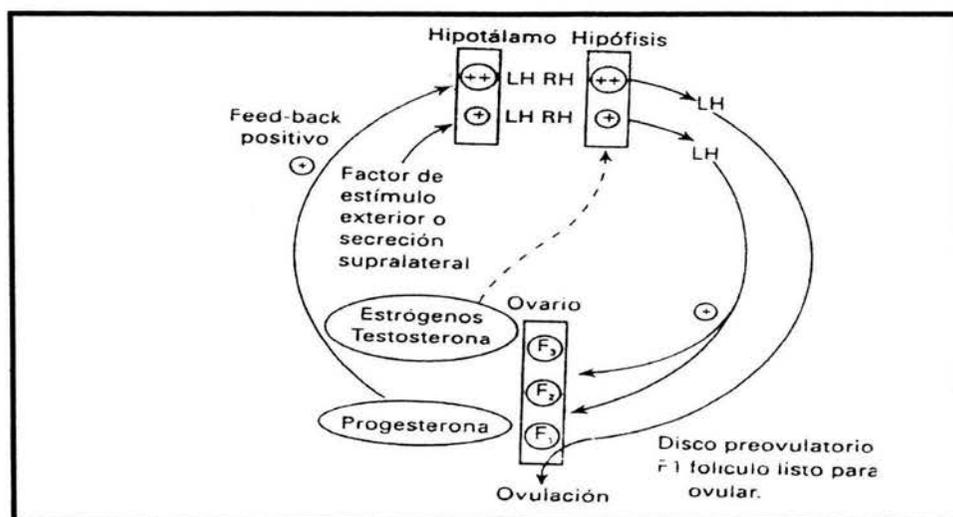


Figura 5. Relación entre hipotálamo-hipófisis y ovario en la gallina. Tomado de García López, 1995.

El hipotálamo es autónomo en estado inicial de desarrollo al sintetizar hormonas liberadoras. Por estudios inmunocitoquímicos se ha observado que las neuronas que regulan la liberación y síntesis de hormonas gonadotrópicas pueden observarse en el infundíbulo a los 5.5 y para los 7.5-8 días la eminencia media anterior es invadida por terminales nerviosas (Woods, 1987). También la hipófisis es capaz de sintetizar hormonas gonadotrópicas antes de que la comunicación vascular con el hipotálamo se establezca. Por técnica inmunocitoquímica se pudo detectar la presencia de LH y de FSH alrededor del 4º día de desarrollo (Woods, 1987; González *et al.*, 1987).

Fugo (1940) y Vogel (1957) realizaron experimentos de hipofisectomía, y observaron que el eje hipotálamo-hipófisis-gónada es funcional desde el día 13 de desarrollo (Gilbert, 1971a.; Woods, 1987). Fugo observó que las gónadas de embriones decapitados a las 33-38 hr exhibían un desarrollo normal hasta los 13 días, y después de ese tiempo las gónadas no incrementan de peso, talla o diferenciación histológica. Vogel (1956, 1957) confirmó y extendió estas observaciones, notando que después del día 13 de incubación la concentración de colesterol en las gónadas de embriones decapitados no continúa aumentando. Este resultado sugirió una reducción en la producción de hormonas sexuales para el día 13, ya que el colesterol es el precursor de las hormonas sexuales (Woods, 1987).

### **3.2. Descripción del hipotálamo y la hipófisis.**

El *hipotálamo* es una pequeña estructura que constituye la base del diencefalo, y se encuentra situado por encima del quiasma óptico de la hipófisis (Ville, 1987). La *hipófisis* o *glándula pituitaria*, está situada en una depresión en forma de silla de montar del hueso esfenoides (la silla turca) en la base del diencefalo (Sturkie, 1967), conectándose íntimamente con el hipotálamo en la base del cerebro (Scanes, 1986).

La hipófisis comprende un lóbulo anterior (adenohipófisis) y un lóbulo posterior (neurohipófisis), siendo separadas por una capa de tejido conjuntivo (Sturkie, 1967). En mamíferos la adenohipófisis forma la *pars distalis* (glándula pituitaria anterior), la *pars intermedia* y la *pars tuberalis*. En las aves no hay *pars intermedia*, por lo que la hipófisis sólo forma la glándula pituitaria anterior y la *pars tuberalis*, cuyas células se encuentran en la base del cerebro (Hipotálamo). La neurohipófisis forma la *pars nervosa* (el equivalente de la glándula pituitaria posterior en ave), el tallo del infundíbulo y la eminencia media (Scanes, 1986).

Cuando el hipotálamo recibe mensajes nerviosos específicos, secreta minúsculas cantidades de hormonas liberadoras, que a lo largo de las fibras nerviosas pasan a la glándula pituitaria anterior. Las distintas hormonas liberadas por la pituitaria anterior pasan por la sangre hasta las glándulas específicas que constituyen sus objetivos (Lenhinger, 1991).

### **3.3. Hormonas sexuales hipofisiarias.**

Entre las hormonas producidas por la adenohipófisis se encuentran las gonadotropinas LH y FSH que se encargan de mantener la actividad de los testículos y los ovarios, siendo regulada su secreción por la retroalimentación de las hormonas gonadotrópicas y los productos de las gónadas sobre las neuronas hipotalámicas que secretan la hormona liberadora de FSH/LH-RH y posiblemente por la acción directa de los esteroides sexuales sobre las células secretoras de FSH/LH de la adenohipófisis (Eckert *et al.*, 1993).

En aves la FSH y la LH son hormonas glicoproteínicas con un peso molecular de aproximadamente 30 kDa y constituidas por una subunidad  $\alpha$  (común para LH, FSH y hormona estimulante de la tiroides (TSH) y una subunidad  $\beta$  (específica de cada hormona) (Scanes, 1986).

La FSH tiene como función regular el desarrollo del folículo y su actividad secretora, es por lo tanto la responsable del crecimiento folicular y la razón por la cual sólo una parte del gran número de folículos que contiene el ovario lleguen a desarrollarse parece estar relacionada con la situación que ocupan: así, los más próximos a los mayores vasos sanguíneos reciben mayor aporte de FSH, por lo que tienen más posibilidades para desarrollarse (Castello *et al.*, 1989; Sauveur y Reviers, 1992; García López, 1995).

La LH es responsable del desarrollo del ovario, de la secreción de hormonas esteroideas y sobre todo de la ovulación. La LH, también llamada hormona inductora de la ovulación (OIH) en las aves, lo mismo que la FSH, es secretada por las células basófilas del lóbulo anterior de la hipófisis (zona cefálica) también de manera continua. No obstante en tres momentos del periodo comprendido entre dos ovulaciones sucesivas se produce un brusco incremento de la secreción de LH (aumento del nivel de sangre) (García López, 1995).

Sobre estos valores máximos que se producen en la secreción de esta hormona se han producido diferentes hipótesis: entre ellas la más interesante dice que el incremento de LH que produce la ovulación es consecuencia de una tercera hormona (Sturkie, 1967; García López, 1995). Se cree que esta hormona podría ser la progesterona debido a que los resultados de pruebas que se han realizado indican que la LH es la hormona de la ovulación y la progesterona el esteroide ovárico necesario para que se produzca la liberación de LH (García López, 1995).

Las células blanco para la FSH son las células de la granulosa, mientras que para la LH son tanto las células de la granulosa como las células de la teca. Los receptores a estas hormonas se encuentran en la superficie celular de las células blanco. La unión de la hormona con el receptor activa la adenil ciclasa y aumenta la concentración intracelular del adenosín 3',5'-monofosfato cíclico (AMPc) (Scanes, 1986).

### **3.4. Ovario.**

El ovario, bajo el control de las hormonas gonatrópicas de la hipófisis, segrega los tres principales tipos de esteroides sexuales: estrógenos, andrógenos y progesterona (Gilbert, 1971b.; Wells y Gilbert, 1984; Sauvier y Reviers, 1992; García López, 1995).

Mediante el uso de precursores radioactivos se ha observado *in vitro* que el ovario embrionario de pollo puede producir  $17\beta$ -estradiol y estrona desde el 7º día de desarrollo. El nivel

de secreción de estas hormonas también ha sido medido por radioinmunoensayo (González-Morán *et al.*, 1985; González del Pliego *et al.*, 1988; Álvarez-Fernández *et al.*, 1995). La presencia de  $\Delta^5$ - $3\beta$  hidroxisteroide deshidrogenasa en los cordones medulares confirma la función esteroidogénica de estas estructuras ya que es una enzima importante en el metabolismo de esteroides (Gilbert, 1971b.; González-Morán *et al.*, 1985).

La secreción de esteroides es, por una parte cíclica, de acuerdo con el desarrollo de la ovulación pero, por otra, también tiene lugar de forma continua (Sauveur y Reviers, 1992). Según un concepto clásico de endocrinología, a largo plazo, estos esteroides tienden a frenar la secreción de hormonas gonadotrópicas (*retroalimentación* negativa) que han estimulado su aparición (Sauveur y Reviers, 1992; García López, 1995).

Los *estrógenos* son sintetizados por células intersticiales de las tecas foliculares. Su síntesis muy temprana aumenta notablemente 2 ó 3 semanas antes de la madurez sexual, disminuyendo cuando la gallina deja de poner. La síntesis de estrógenos está asegurada por el 2.º y 3.º foliculo de mayor tamaño. La capacidad de síntesis del foliculo más grande desaparece casi totalmente la víspera de la ovulación y en este momento se especializa en la síntesis de progesterona (Sauveur y Reviers, 1992; García López, 1995).

Las funciones de los estrógenos son múltiples, pues prácticamente controlan todas las fases de formación del huevo, resultando indispensable en: a) el crecimiento del oviducto; b) La síntesis de proteínas y lípidos de la yema en el hígado; c) el transporte sanguíneo de lipoproteína y de calcio, así como su depósito en el foliculo; d) La síntesis de las proteínas de la clara en el magnum; e) la formación del hueso medular y el aumento de la retención fósforo-calcio al inicio del período de puesta; f) el comportamiento de la oviposición (puesta); g) posiblemente el comportamiento alimentario vinculado a la formación del huevo y h) la aparición de caracteres sexuales secundarios femeninos y la separación de los huesos pelvianos (Sauveur y Reviers, 1992; García López, 1995).

Los *andrógenos* pueden tener un doble origen, las células intersticiales tanto del estroma del ovario como de la teca (Sauveur y Reviers, 1992; García López, 1995). Al ser esteroides sexuales típicamente masculinos, su papel en la hembra está limitado; sin embargo, son indispensables, pues estimulan el crecimiento de la cresta y todos los caracteres secundarios (Gilbert, 1971b.; Sauveur y Reviers, 1992; García López, 1995). Andrógenos y estrógenos, de modo sinérgico, estimulan el desarrollo del oviducto y del hueso medular (Sauveur y Reviers, 1992; García López, 1995).

La *progesterona* proviene en su mayor parte de la capa granulosa del foliculo preovulatorio. Se ha podido demostrar con exactitud que en secuencias normales día/noche tiene

lugar una pequeña liberación de LH unas 10 hr antes de que ocurra la ovulación. A esta liberación de LH sigue una pequeña secreción de progesterona (del folículo más maduro), que a su vez, por el proceso de retroalimentación, da lugar, vía hipotálamo, a una descarga preovulatoria de LH que 6 hr más tarde provocará la ovulación (García López, 1995).

El folículo más desarrollado ( $F_1$ ), más próximo a ovular, segrega casi toda la progesterona, mientras que los que le siguen el proceso ( $F_2$ ,  $F_3$ ,  $F_4$ ) secretan principalmente estrógenos y testosterona (Wells y Gilbert, 1984.; García López, 1995).

La progesterona tiene numerosas funciones, que pueden ser clasificadas en dos categorías:

- a. Controla la actividad de las actividades celulares implicadas en el crecimiento del oviducto, siendo en este caso «agonista» de estrógenos y andrógenos y en la síntesis de ciertas proteínas del albumen, aquí de modo sinérgico con los estrógenos.
- b. Controla los ritmos de la ovulación y de oviposición (puesta), actuando sobre la hormona liberadora de LH del hipotálamo, sobre las contracciones del útero previas a la oviposición y sobre la «conducta de puesta» (Sauveur y Reviers, 1992; García López, 1995).

### **3.5. Ovogénesis.**

La ovogénesis en aves comienza durante el desarrollo embrionario. Hacia el 8º día de desarrollo las células germinales empiezan a su transformación en ovogonias, sufriendo repetidas divisiones mitóticas, dando lugar a los llamados ovocitos primarios (Romanoff, 1960; Sauveur y Reviers, 1992).

El número de ovocitos en el embrión de pollo aumenta de aproximadamente 28,000 en el 9º día de desarrollo a 680,000 en el 17º día, y disminuye subsecuentemente a 480,000 para el día de la eclosión (Tokarz, 1978; Johnson, 1986).

Después del 11º día de incubación, la ovogénesis se efectúa en tres distintas fases: multiplicación, crecimiento y madurez (Gilbert, 1971a; Getty, 1982).

La fase de *multiplicación* está formada de la rápida proliferación de numerosas ovogonias de división mitótica. Por tanto, una ovogonia es esencialmente una célula sexual que se multiplica muy activamente. Este estadio se complementa en el momento de la eclosión. La fase de *crecimiento* comienza en este momento. Se para en la multiplicación y comienzan a formarse los *ovocitos primarios*. Cada uno tiene de 0.01 a 0.02 mm de diámetro y está incluido en un folículo,

que se conoce como *folículo primordial*. El período de *maduración* comienza con el folículo y se completa en el oviducto. Comprende dos divisiones sucesivas y desiguales. La primera división de maduración es donde se reduce el número de cromosomas, y forma un ovocito secundario y el primer corpúsculo polar; esto se completa mientras la célula está aún en el interior del folículo, dos horas antes de la ovulación. La segunda división de maduración y el segundo corpúsculo polar se completan en el oviducto, después de la ovulación (Getty, 1982).

No todos los folículos maduran al mismo tiempo, sino que se produce o establece una jerarquía o escala folicular. El folículo más próximo al momento de la ovulación es el de mayor tamaño, le sigue el que va a sufrir en segundo lugar la dehiscencia, y así sucesivamente. Esta dehiscencia se produce con la rotura del estigma del folículo cuaternario, y el ovocito (yema) liberado va a ser recogido por la bolsa ovárica del infundíbulo (Sauveur y Reviers, 1992; García López, 1995)

### **3.6. Oviducto.**

El oviducto sintetiza las diferentes capas que cubren el ovocito (yema) menos la membrana previtelina interna, que se forma intrafolicularmente. (Figura 5). (García López, 1995).

La vagina no contribuye a la formación del huevo, pero las glándulas vaginales son órganos de almacenamiento de esperma (García López, 1995).

El tiempo que permanece el huevo en cada segmento es distinto; también lo es la velocidad de tránsito a través de cada uno de ellos (Bahr y Nalbandov, 1977; García López, 1995).

La actividad del *infundíbulo* se desarrolla en la ovulación y está condicionada por el óvulo; es en este tramo donde se produce la fertilización del mismo. En el infundíbulo podemos considerar dos partes: la bolsa ovárica, que recoge al óvulo maduro, y la porción chalacífera, que segrega las chalazas, que son fibras de mucina que se retuercen por rotación de la yema (García López, 1995). En el infundíbulo el huevo pasa entre 0,25 y 0,5 hr (Bahr y Nalbandov, 1977).

La principal función del *magnum* es la secreción del albumen (proteínas del huevo) por las glándulas tubulares secretoras. La yema penetra en el magnum 15 ó 20 minutos después de la ovulación y lo abandona al cabo de unas 3,30 hr. A medida que va avanzando, recibe las proteínas acumuladas en las células epiteliales (Bahr y Nalbandov, 1977; García López, 1995).

La albúmina del huevo, en esencia, es una solución acuosa de proteínas y minerales. A diferencia de lo que sucede con las proteínas de la yema, cuya síntesis no se efectúa en el ovario sino en el hígado, las proteínas de la clara son todas ellas sintetizadas por la pared del magnum. A las proteínas del albumen también se les denomina *proteínas oviductales*, ya que su síntesis se

realiza en el oviducto. Esta síntesis tiene lugar entre el paso de dos yemas consecutivas y es especialmente elevada inmediatamente después de uno de estos pasos, como lo demuestra el elevado consumo de oxígeno por parte del magnum, consecuencia de su actividad metabólica. De esta forma, la cantidad de proteínas almacenadas en las células del magnum no es nunca muy superior a la depositada sobre una yema (Sauveur y Reviere, 1992; García López, 1995).

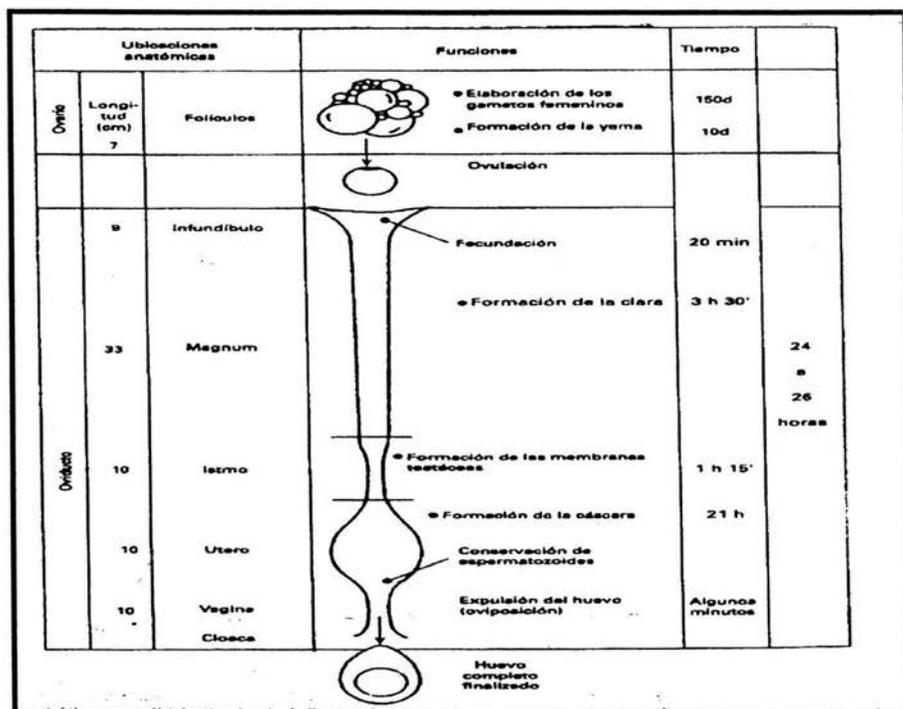


Figura 6. Esquema del proceso de formación del huevo en la gallina. Tomado de Sauveur y Reviere, 1992.

Se sabe que las células calciformes del epitelio son las que segregan la *avidina* y la *ovomucina*; las glándulas tubulares segregan a su vez la *ovoalbúmina* y la *lisozima*. La síntesis de todas ellas depende de las hormonas esteroideas del ovario, aunque esta regulación es muy compleja, puesto que la síntesis de cada proteína parece que está controlada por un equilibrio diferente entre estrógenos, progesterona e incluso la testosterona (Sauveur y Reviere, 1992; García López, 1995).

En el *istmo* tiene lugar la formación de las membranas externa e interna de la cáscara o membranas testáceas sobre el óvulo recubierto de albúmina. La llegada al istmo del huevo en formación tiene lugar entre las 3,50 y las 3,75 hr desde la ovulación. En este tramo el huevo permanece entre 60 y 75 minutos, y a medida que avanza se va recubriendo de fibras proteicas que se entrelazan dando lugar a las llamadas membranas testáceas o coquiliarias. El material secretado por el istmo proviene fundamentalmente de las glándulas tubulares (Sauveur y Reviers, 1992; García López, 1995).

En el *útero* o *glándula coquiliaria*, como se le llama a veces, es la parte del oviducto donde se forma la cáscara. También produce la ovoqueratina, líquido que atraviesa la cáscara en formación hasta que ésta se hace impermeable a este producto. Asimismo el epitelio uterino segrega porfirinas, que dan pigmentación en algunos casos (Bahr y Nalbandov, 1977; Sauveur y Reviers, 1992; García López, 1995).

La *vagina* está separada del útero por el esfínter útero vaginal, que es un músculo constrictor debajo del cual se encuentran unas glándulas de almacenamiento de esperma. La vagina desemboca en la cloaca, pero el huevo no cae en ella, sino que sale directamente al exterior por un prolapso de la misma (Castello *et al.*, 1989; García López, 1995).

La expulsión del huevo, proceso combinado de varios mecanismos, es lo que se denomina *oviposición*. Es evidente que el momento de puesta va a depender de la rotura del folículo ovárico, es decir, de la ovulación, encontrándose la conducta del ave influida por la frecuencia de puesta de huevos, por el tiempo entre las pausas en las secuencias de puesta, así como por el hecho de que las aves incuben o no sus huevos tras la puesta (García López, 1995). En el control de la oviposición, influyen las hormonas de la hipófisis posterior o «neurohipófisis», que en la gallina son la *oxitocina*, la *arginina vasotocina* y, posiblemente, la *vasopresina*. Estas hormonas son liberadas al torrente circulatorio y, aunque el mecanismo no está muy claro, posiblemente sea la arginina vasotocina la hormona desencadenante de las contracciones uterinas durante la oviposición, debido a que esta hormona es mucho más activa en el útero de las gallinas que la oxitocina. La arginina vasotocina aumenta la sensibilidad del útero a medida que se acerca la oviposición (García López, 1995).

## 4. Receptores a hormonas esteroides.

### 4.1 Síntesis de hormonas esteroides.

Las hormonas esteroides se derivan del colesterol producido por síntesis de *novo* o por captación de LDL (lipoproteínas de baja densidad) a través de receptores de este tipo de lipoproteínas. Existe cierto almacenamiento de colesterol en forma de éster de colesterol en gotas de lípidos, que son abundantes en las células estereoidogénicas. Cuando se estimulan las glándulas productoras de esteroides este colesterol se libera a través de síntesis por parte de la glándula. Sin embargo, con el tiempo el incremento en la captación de colesterol es el mecanismo prevalente para el aumento de la estereoidogénesis. Estas glándulas tienen concentraciones particularmente altas de receptores de LDL que se incrementan más aún por estímulos estereoidogénicos, como hormonas trópicas. Esto se debe de modo principal al vaciamiento del colesterol intracelular por el estímulo, con eliminación consecuente de la retroalimentación inhibitoria de la producción de receptores para LDL. Esta disminución también aumenta la síntesis de colesterol, lo que facilita más aún la estereoidogénesis. La producción de esteroides después de tal estimulación puede ser diez veces la cifra de la producción basal (Baxter, 1993; Stryer, 1995).

El paso limitante de la relación en la producción de esteroides, es la ruptura del colesterol para formar la pregnelona a través de las acciones de una enzima de rotura lateral de P-450-colesterol (P450<sub>scc</sub>), localizada en la membrana mitocondrial interna. Esta enzima utiliza: 1) una flavoproteína que es una adrenodoxina reductasa, para los citocromos mitocondriales P450<sub>scc</sub>, P450<sub>c11beta</sub>, P450<sub>c11AS</sub> (llamado también P) y P450<sub>c1alfa</sub>, y la citocromo P450 reductasa para la enzimas microsomaes P450<sub>c17</sub> (17-hidroxilasa), P450<sub>c21</sub> (21-hidroxilasa) y P450<sub>c25</sub> (vitamina D 25-hidroxilasa); 2) una proteína de sulfuro de hierro (adrenoxina con PA50s mitocondrial pero no microsomal); 3) NADPH, y 4) oxígeno. El colesterol se hidroxila en el C<sub>22</sub> y después en el C<sub>20</sub>, y el producto se rompe para dar pregnelona más isocapraldehido. La actividad de este paso está regulada por los estímulos trópicos principales (ACTH, FSH, LH, hCG) en todos los tejidos estereoidogénicos. Se desconocen los detalles de cómo se efectúa esto, pero parece que el estímulo aumenta la disponibilidad de colesterol libre no esterificado para este paso, quizá al promover la transferencia de colesterol desde la membrana mitocondrial interna a la externa; ello a través de estimulación de proteína activadora y polifosfoinosítidos por parte de AMPc (Baxter, 1993).

La pregnelona sale entonces de la mitocondria al retículo endoplásmico liso, donde parte de ella se deshidrogena en una reacción catalizada por la 3 $\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa. Esta enzima tiene un peso molecular de 46 kDa y no es una P450 (Ganong, 1998).

En las zonas fasciculada adrenocortical y reticular, la pregnelona se convierte secuencialmente en  $17\alpha$ -OH-pregnelona (mediante el citocromo P450c17),  $17\alpha$ -OH-progesterona (por medio del complejo enzimático de la  $3\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa- $\Delta^{4,5}$ -isomerasa, que convierte el doble enlace 5,6 a 4,5) y 11-desoxicortisol (mediante citocromo P450c21) (Baxter, 1993; Ganong, 1998). La producción de  $17\alpha$ -OH-pregnelona a partir de pregnelona se conoce como vía  $\Delta^5$  debido a que se conserva el doble enlace 5,6. Entonces, el 11-desoxicortisol, producto final activo, se forma a través de la  $11\beta$  hidroxilación por acción del citocromo P450c11. Esta enzima falta en las gónadas que no producen cortisol o aldosterona (Baxter, 1993).

La glomerulosa suprarrenal produce progesterona a partir de pregnelona mediante las acciones de  $3\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa- $\Delta^{4,5}$ -isomerasa. Esta se denomina vía  $\Delta^4$ . La glomerulosa carece de citocromo P450c17 y únicamente contiene P450c11AS mitocondrial (corticoesterona metil oxidasa I). La progesterona es hidroxilada en el  $C_{21}$  por el P450c21 para producir 11-desoxicoertiesterona, y por P450c11AS a  $C_{11}$  para originar corticoesterona; está se convierte en aldosterona a través de la adición de un grupo aldehído en posición 18 por medio de la actividad de P450AS (Baxter, 1993).

Para la producción de andrógeno y estrógeno, las cadenas laterales en la posición 17 de la  $17\alpha$ -OH-pregnelona o  $17\alpha$ -OH-progesterona son eliminadas por la actividad de la  $C_{17,20}$ -liasa (contenida en el citocromo P450c17) para producir dehidropiandrosterona (DHEA) Y androstenediona respectivamente. La producción de DHEA constituye una vía principal en las suprarrenales y gónadas, y excede en mucho de la de la androstenediona. Pasos subsecuentes que llevan a la producción del estradiol estrogénico principal y la testosterona androgénica tienen lugar en las gónadas pero sólo en una cantidad ínfima en las suprarrenales) (Baxter, 1993).

La vía principal para la producción de testosterona en los testículos está en las células de Leydig a través de la vía  $\Delta^5$  de pregnelona a DHEA y androstenediol y después en testosterona por medio de las acciones de  $17\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa. Muchas acciones androgénicas están mediadas por hidrottestosterona; este esteroide se produce principalmente en los tejidos blanco a través de la actividad de una  $5\alpha$ -reductasa muy poco se genera en los testículos (Baxter, 1993).

En el ovario, las células de la granulosa carecen de citocromos P450c11, P450c17 y P450c21, y por tanto producen progesterona de manera principal. Esta progesterona es captada por las células cercanas de la teca, que la convierten en androstenediona; ésta a su vez regresa a las células de la granulosa donde se vuelve estrona por las acciones de la aromatasa. Esta enzima también convierte la testosterona en estradiol; las concentraciones de aromatasa en las células de la granulosa son tales, que casi toda la testosterona se vuelve estradiol y se libera muy poca

cantidad de aquélla. La estrona y el estradiol también pueden producirse a partir de DHEA y androstenediona en tejidos periféricos, como el adiposo, debido a la presencia de aromatasas (Baxter, 1993).

Una vez sintetizados, los esteroides recién formados se liberan con rapidez. Ya que esto no ocurre con otras clases de hormonas, existe almacenamiento escaso de esteroides en las glándulas, y un incremento en la liberación de esteroides siempre refleja aumento de su síntesis (Baxter, 1993).

#### **4.2. Transporte de hormonas esteroides.**

Las hormonas esteroides, una vez que se sintetizan en los diferentes órganos esteroideogénicos, se secretan a la circulación general o al sistema linfático para ser transportadas y posteriormente captadas de manera específica por sus respectivos órganos blanco. En términos generales, las hormonas esteroides tienen naturaleza lipofílica y son parcialmente insolubles en medio acuoso; sin embargo, la mayoría de los esteroides naturales son hidrosolubles a concentraciones mayores de las que en condiciones normales se encuentran en la circulación general. El mecanismo por el que las hormonas esteroides se incorporan de modo parcial en medios acuosos y se transporta a diversos sitios se realiza gracias a la interacción de estas hormonas con componentes de naturaleza proteica presentes en el torrente circulatorio, con lo que se forman complejos de proteína y esteroide (Pérez Palacios *et al.*, 1995).

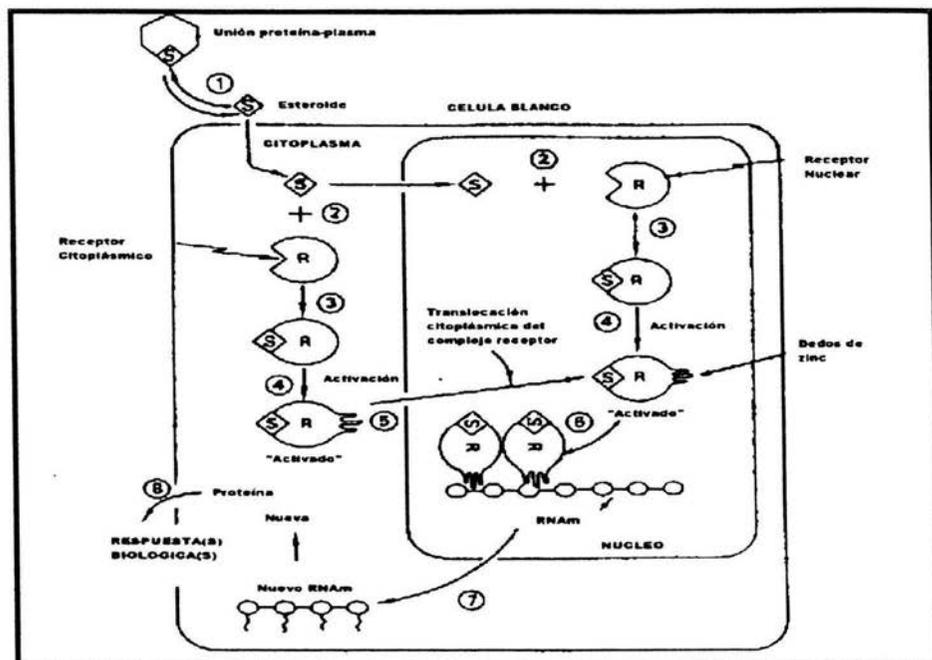
Cuando se liberan hacia la circulación, los esteroides gonadales se fijan a proteínas plasmáticas. El estradiol se fija con avidez a la globulina de transporte llamada *globulina fijadora de hormona sexual* (SHBG) y se fija con menor afinidad a la albúmina. La progesterona se une de manera fuerte a la *globulina fijadora de corticoesteroides* (CBG) y de modo débil a la albúmina (Prieto, 1991; Goldfien y Monroe, 1993; O'Malley y Strott, 1993).

#### **4.3. Mecanismo de acción.**

Una vez que las hormonas esteroides se han transportado desde su sitio de biosíntesis a sus células efectoras, se inicia el mecanismo de acción hormonal. El primer hecho lo constituye el paso del esteroide en su forma libre (desprovisto de su proteína transportadora) al interior de la célula. Aunque no se conoce con precisión la naturaleza de este fenómeno de interacción a través de la membrana celular, se acepta en términos generales que ocurre por difusión pasiva, considerando la característica hidrofóbica-lipofílica de la molécula esteroide (Prieto, 1991; Pérez Palacios *et al.*, 1995). (Figura 7).

Una célula blanco típica contiene aproximadamente 10 000 receptores esteroideos, cada uno de los cuales se unirá específicamente con una molécula de hormona esteroidea de forma reversible y con una elevada afinidad. Cuando los niveles de hormona son altos, la mayoría de los receptores quedarán unidos a moléculas de hormona, y luego, en esta forma activada, se unirán a la cromatina del núcleo. Cuando descienden los niveles hormonales, el equilibrio se desplaza, de modo que las moléculas de hormona se disocian de los receptores, y los receptores libres de hormona vuelven a la reserva citoplasmática. Algunos de los receptores activados por la hormona al unirse a la cromatina regulan específicamente la transcripción de determinados genes. Sin embargo, sólo un reducido número de los genes de cualquier célula blanco está influido directamente por las hormonas esteroideas (Alberts *et. al.*, 1989).

Al ingresar los esteroides libres en las células, se unen con los receptores inactivos en los compartimentos nuclear o citoplasmático. Una vez formados los complejos con las hormonas los receptores experimentan un cambio configuracional alósterico a una forma activa capaz de afectar la transcripción nuclear de los genes. Para la eficiente función de forma directa los receptores deben dimerizarse, interactuar con secuencias específicas del ADN y luego acoplarse con otros factores de la transcripción para formar los complejos multiméricos estables que inducen a la ARN polimerasa para que inicie la transcripción en esos genes. Se sintetizan grandes pre-ARNm que incluyen todos los exones y los intrones de los genes. Los pre-ARNm son procesados por los "complejos de empalme", que recortan todos los intrones y montan todos los exones en secuencias contiguas que codifican los productos proteícos respectivos de cada gen (O'Malley y Strott, 1993).



**Figura 7.** Acción de los receptores de esteroides a nivel citosólico y nuclear. El esteroide libre (5) se disocia de las proteínas unidas al plasma (1), entra a la célula, y se une a un receptor citosólico o nuclear (R). Los receptores son activados y dimerizados (4). Los receptores citosólicos son traslocados en el núcleo (5) y se dimerizan uniéndose por medio de los dedos de zinc a los elementos de respuesta hormonal (HREs) en el DNA (6), facilitando la transcripción. RNAm en el núcleo permite (7) la síntesis de nuevas proteínas asociadas con la acción específica de los esteroides con la célula blanco (8). Tomado de Norris, 1997.

#### 4.3.1. Estructura de los genes de los receptores.

El gen estructural contiene la información que se transcribe en el ARNm y luego en el producto proteico del gen. Sin embargo, el ARNm no es sintetizado a menos que los elementos reguladores del gen estén intactos y "activados". Estos elementos están unidos con el gen y se localizan cerca del comienzo (el extremo 5') de éste; se denominan elementos *cis* por que están unidos con la misma cadena del ADN (unidad del gen). Los elementos *cis*, que regulan la expresión de los genes controlados por los esteroides, se dividen en cuatro grupos principales:

- 1) *Promotores*. El promotor es indispensable para que el gen sea transcrito y para que se produzca el ARNm. El promotor determina la tasa basal de la transcripción y también controla la exactitud de la iniciación de la transcripción.

- 2) *Aumentadores que responden a los esteroides*: Los aumentadores son cortas secuencias del ADN que son potentes estimuladores de la transcripción y que pueden localizarse cerca o lejos de sus genes análogos. Los aumentadores que responden, a señales de las hormonas esteroides, sirven como sitios fijadores del ADN para los complejos esteroide-receptor activados y se denominan *elementos de respuesta a los esteroides* (SRE).
- 3) *Silenciadores*. En contraste, los silenciadores son elementos *cis* con acción opuesta a los aumentadores. Actúan reduciendo o silenciando la transcripción de los genes. Un gen particular puede tener uno o más silenciadores. Si hay un silenciador, el gen adyacente no tiene una tasa basal de transcripción en ausencia de la estimulación por las hormonas esteroides. Sin embargo, la activación del SRE puede superar el efecto del silenciador y poner en marcha la expresión del gen.
- 4) *Aumentadores independientes de las hormonas*. Por último, los aumentadores independientes de los esteroides (SIE), uno o más, pueden localizarse dentro de la región reguladora del gen. Estos elementos *cis* tienden a incrementar la función de los SRE por el mayor aumento en la tasa máxima de la expresión de los genes inducibles (O'Malley y Strott, 1993).

Estos cuatro tipos de elementos *cis* cooperan para lograr la regulación precisa de la expresión de un gen. En ausencia de un promotor un gen no es transcrito con una tasa constante (constitutiva). Si el promotor es "fuerte" la tasa de transcripción es alta; si el promotor es "débil" se expresa con una tasa más baja. En este caso la transcripción del gen no está sujeta a la estimulación (o la supresión) por las hormonas esteroides (SH). En contraste la existencia de un SRE cercano permite que el gen sea colocado bajo el control de las hormonas esteroides. Por ejemplo, la estimulación hormonal podría aumentar la tasa de transcripción otras cinco veces por encima del nivel basal. Si luego se agrega un elemento silenciador a la información reguladora el nivel basal disminuye casi a cero, pero el nivel máximo loggable que la estimulación hormonal no se altere. Esta combinación permite un nivel diez veces mayor de estimulación por parte de la hormona. Por último, el agregado de uno o más aumentadores independientes de los esteroides lleva al aumento sinérgico del nivel máximo de la expresión en respuesta a la hormona, pero no influye en el nivel basal de la transcripción en ausencia de la hormona (O'Malley y Strott, 1993).

#### **4.3.2. Estructura de los elementos de respuesta a los esteroides.**

Los SRE son notables en cuanto a su estructura. Por ejemplo, estos elementos *cis* están compuestos por dos medios-sitios para la fijación de los receptores de los glucocorticoides, cada uno con una composición similar a TGTTCT. En consecuencia un SRE prototípico, como aquel

que promueve la respuesta a los glucocorticoides o a la progesterona tiene una composición de GGTCANNNTGTTCT (N = cualquier base). Los medios-sitios de los SRE en general, se ubican en cadenas complementarias del ADN y apuntan en dirección opuesta para formar un eje doble de simetría (palíndromo). Su secuencia varía sólo levemente para la capacidad de respuesta a las diferentes hormonas, lo que indica una reacción de gran especificidad. Por ejemplo, el GGTCANNNTGACC hace que el receptor de estrógenos se una y active esta secuencia homóloga del SRE y es necesario un SRE algo diferente para la respuesta a las hormonas tiroideas o la vitamina D, y así sucesivamente (O'Malley y Strott, 1993; Granner, 1999).

Las proteínas receptoras son moléculas estrechamente controladas en las células que, debido a su importancia y potencia son nutridos desde su síntesis inicial hasta su degradación final. Los genes que codifican los receptores también están bajo control hormonal. El gen que dirige la síntesis del receptor de la hormona del embarazo, la progesterona, es gen complejo de más de 40 000 bp de longitud, compuesto por ocho exones (regiones codificadoras) que, cuando son procesados por el ARNm final, puede hacer que las células sinteticen el receptor. A su vez, el gen receptor de la progesterona parece ser estimulado para elaborar su producto por las hormonas estrogénicas (Kastner *et al.*, 1990a.; O'Malley y Strott, 1993). Esta observación experimental demuestra la cooperación que se produce entre las hormonas en el aparato endocrino y está de acuerdo con la observación clínica de que para que la progesterona actúe sobre el útero femenino y permita la implantación y el crecimiento de un huevo fertilizado la mujer (o la hembra animal) debe haber estado expuesta previamente al estradiol endógeno o a estrógenos exógenos (O'Malley y Strott, 1993).

Para impedir la peligrosa estimulación crónica de los genes blanco celulares que responden a los receptores activados por las hormonas, los receptores ejercen un efecto regulador por retroalimentación sobre la transcripción de sus propios genes progenitores. En otras palabras, el complejo progesterona-receptor causa una "regulación en menos" de la síntesis de su propio receptor a través de la inhibición, mal comprendida, de la producción del ARNm del receptor a progesterona. De esta forma se minimiza la potencial de sobrestimulación con la progesterona y se protege a las células del daño resultante (O'Malley y Strott, 1993).

Una vez que se ha generado el ARNm a través de la transcripción del gen receptor, el ARNm del receptor migra hacia el citoplasma de las células, donde es traducido a los ribosomas. Algunas de las moléculas de los receptores nacientes, como los de los glucocorticoides, la progesterona, los estrógenos y los andrógenos, son liberadas hacia sus células para formar complejos con las proteínas "de choque térmico". Se cree que estas proteínas de choque térmico ayudan al receptor a plegarse en la configuración apropiada que permite la posterior actividad biológica y tiende a protegerlo contra la degradación por las celulares. Las proteínas de choque

térmico se denominan así porque su actividad es estimulada en todas las células por el "choque" del estrés severo, como la temperatura elevada o ciertas sustancias químicas. Se cree que ayudan en la síntesis, el plegamiento y el transporte de cierto número de complejas proteínas eucarióticas. Mientras están unidos con las proteínas de choque térmico los receptores de los esteroides no pueden unirse muy bien con el ADN. Cuando las hormonas esteroides se unen con los receptores las proteínas de choque térmico son liberadas y queda en evidencia su capacidad nativa para unirse de forma específica con sus SRE análogos. No hay pruebas de la asociación entre las proteínas de choque térmico y los receptores de las hormonas tiroideas y de la vitamina D (O'Malley y Strott, 1993).

#### **4.3.3. Funciones de los receptores a esteroides.**

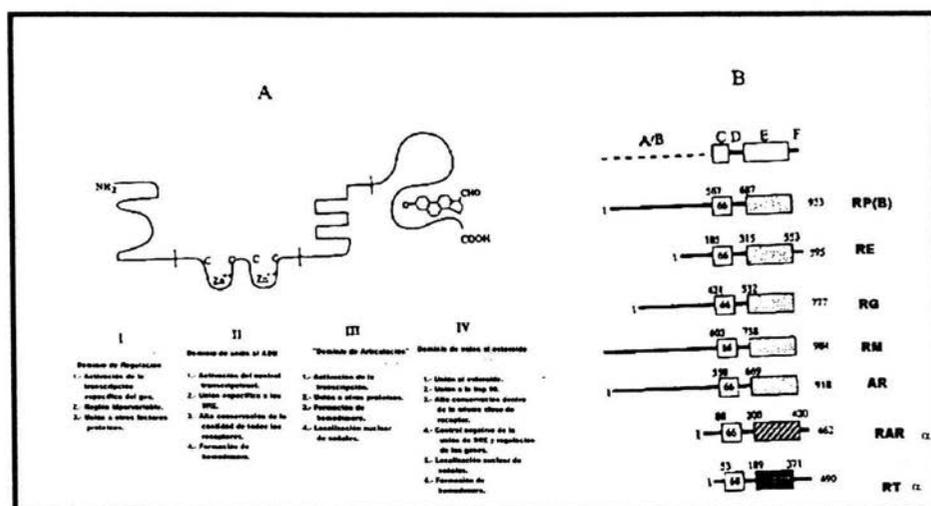
Los receptores para esteroides y hormonas tiroideas están codificados por genes que forman una gran superfamilia de factores de transcripción que incluye no sólo los receptores para estas hormonas, sino también aquéllos para vitamina D, retinoides como ácido retinoico y ácido 9-*cis*-retinoico, receptores putativos cuyos ligandos aún no se han identificado (los llamados receptores "huérfanos") y otros factores de transcripción que quizá no sean activados por la unión específica de ligando. Cada receptor está compuesto por una cadena polipeptídica. Puede haber un gen (receptor esteroide) o más de uno (receptores para hormona tiroidea) para cada clase de receptor, y variaciones de la expresión como procesamiento de ARN, puede generar formas alternativas del receptor. Se transportan al núcleo ya sea después de su síntesis (por ejemplo, receptores para hormona tiroidea) o después de su unión a la hormona. Este transporte ocurre a través de poros y requiere localización nuclear de secuencias en los receptores que se unen a receptores de poro para facilitar la transferencia-proceso dependiente de ATP (Baxter, 1993)

Los receptores a esteroides se pueden dividir en cuatro dominios, que son: I) dominio de regulación de la unión a ADN; II) dominio de unión al ADN; III) dominio de articulación, y IV) dominio de unión al esteroide (Prieto, 1991; Landers y Spelsberg, 1992; Bolander, 1994). Algunos autores sólo dividen en tres dominios (O'Malley y Strott, 1993; Baxter, 1993).

El dominio I muestra la mayor cantidad de variaciones entre diversos miembros de la familia en términos de tamaño y secuencia de aminoácidos. Mientras que en algunos casos este dominio resulta esencial para acciones particulares de receptores, otras veces no es fundamental para la función del receptor pero incrementa la actividad de otros dominios. Por ejemplo, cuando el dominio largo del receptor a glucocorticoides se utiliza para reemplazar el dominio equivalente del receptor de hormona tiroidea, se incrementa la actividad del receptor de dicha hormona. Este dominio está fosforilado en gran medida en la mayoría de los casos, aunque aún no se ha establecido la importancia de las fosforilaciones (Baxter, 1993).

Los dominios II y III son de unión al ADN. Aquí se encuentran dos *dedos de zinc* en los que cuatro residuos de cisteína de cada residuo forman complejos de coordinación con iones de zinc. Entre los dos dedos de zinc está una sola hélice que se adapta en la fase principal del ADN cuando el receptor se une a dicho ADN. Los dedos de zinc también ayudan en la especificidad de la fijación del ADN. Estos dominios de fijación de ADN también contienen regiones que pueden participar en la dimerización del receptor. Estos dominios muestran mayor homología que la que tienen otros dominios (Baxter, 1993; Landers y Spelsberg, 1992; Bolander, 1994).

El dominio IV contiene un sitio de unión que se une a la hormona correspondiente con gran afinidad y especificidad. Las estructuras de los ligandos fijadores muestran variaciones considerables y también existen modificaciones estructurales en este dominio entre los diversos miembros de la familia. Este dominio también participa en la dimerización del receptor y en la heterodimerización, así como en la localización nuclear y en interacciones con otros factores de transcripción que incluyen proteínas promotoras proximales. La unión de la hormona en este sitio origina cambios de conformación en los receptores, que influyen en su asociación con otras proteínas, los otros dominios de los receptores y las propiedades reguladoras transcripcionales de los receptores (Baxter, 1993; Landers y Spelsberg, 1992; Bolander, 1994).



**Figura 8.** Dominios funcionales de la superfamilia de receptores a hormonas esteroides. **(A)** Modelo resumido de las características estructurales conocidas de los receptores a esteroides y las funciones asociadas con diferentes dominios receptores. **(B)** Modelo que compara el tamaño e ilustra las secuencias conservadas de los receptores de cada miembro de la superfamilia de receptores a esteroides incluyendo los receptores a progesterona (RP), estrógenos (ER), glucocorticoides (GR), mineralocorticoides (RM), andrógenos (AR), ácido retinoico (RAR) y hormonas tiroideas (RT). Tomado de Landers y Spelsberg, 1992.

## **4.4 Características de los receptores intracelulares para los tipos de hormonas esteroideas.**

### **4.4.1. Corticoesteroides.**

En las diferentes células blanco se han identificado receptores que específicamente se unen con alta afinidad a esteroides con actividad glucocorticoide (por ejemplo, cortisol, dexametasona) a otros que en forma selectiva reconocen a los mineralocorticoides (por ejemplo, desoxicortisona). El receptor de glucocorticoides, en su estado nativo, está constituido por una cadena simple de polipéptidos con peso molecular entre 90 y 100 kDa. En su forma *activada* se han identificado en este receptor por lo menos tres dominios funcionales en su estructura (A, B, C). El dominio A del receptor contiene el sitio activo de unión del esteroide y el dominio B representa el área de la molécula que interactúa con el sitio aceptor nuclear, mientras que al dominio C, que representa aproximadamente el 50% del receptor, no se le han asignado funciones específicas. Una característica distintiva del receptor a glucocorticoides es que, una vez que se une al esteroide y el complejo H-R se activa, el proceso de activación resulta totalmente irreversible. En relación con la función del receptor de glucocorticoides se ha demostrado la inducción de la transcripción específica de múltiples genes que son regulados por estas hormonas, así como algunos efectos a nivel postranscripcional (Pérez Palacios *et al.*, 1995).

Varios estudios tienen confirmada la presencia de receptores a glucocorticoides (RG) fosforilados. Mientras los primeros estudios indicaron que en ciertas funciones fuera improbable la fosforilación o alguna otra modificación de carga covalente, la importancia de la fosforilación en la función de los RG bajo condiciones fisiológicas se tiene demostrada. Orti y colaboradores mostraron que el cambio hormona-dependiente en los RG fosforilados *in vivo* fue específico para los agonistas de los RG pero no para los antagonistas. Otros estudios muestran claramente que los RG son endógenamente fosforilados y hay cuatro residuos de serina específicos, uno en el dominio de unión al ADN y otros tres adyacentes en el dominio de unión. Los autores especulan que la fosforilación de una región rica en serina próxima al dominio de unión al ADN puede servir para desestabilizar las interacciones de carga requeridas para la unión con el ADN y por lo tanto jugar un papel importante en el receptor reciclado. En contraste, estudios hechos con células de pituitaria de ratón en cultivo muestran que la fosforilación de los RG no sucede dentro del dominio de unión al ADN. Estos resultados pueden indicar que las diferencias cualitativas del tejido existen en la fosforilación de los receptores a esteroides (Landers y Spelsberg, 1992).

#### 4.4.2. Estrógenos.

El coeficiente de sedimentación del receptor *activado* de hormonas esteroides es de 4 S; sin embargo, el receptor de estradiol requiere la transformación 4 S a 5 S para translocarse e interactuar con los sitios aceptores nucleares en el ADN. Aunque el receptor *activado* es un oligómero con peso molecular de 130 kDa, algunos investigadores han sugerido que el proceso de activación del receptor a estrógenos involucra la adición de un fragmento en el que reside el sitio de unión al ADN; sin embargo, ese fragmento (subunidad) que no une a la hormona aún no se ha purificado (Pérez Palacios *et al.*, 1995). Uno de los efectos más importantes del complejo de estrógeno y receptor *activado* es la transcripción del gen del receptor a progesterona, un ejemplo de cómo la acción de un esteroide dirige el modo de acción de otro esteroide (Pérez Palacios *et al.*, 1995; Kraus *et al.*, 1995).

Otra característica distintiva del mecanismo de acción de los estrógenos es la presencia en ciertos órganos estrogendependientes de sitios de unión para estradiol-<sup>3</sup>H de baja afinidad ( $10^7$  M) y gran afinidad (1-4 pmoles/útero). Estos sitios de unión se han designado como tipo II para distinguir los de los sitios de unión de alta afinidad, clásicos del receptor a estrógeno (tipo I). El tiempo de residencia nuclear de los sitios de unión tipo II es significativamente mayor que el de los tipos de unión tipo I, por lo que se ha sugerido que desempeñan un papel relevante en la mediación de los efectos tardíos del estradiol, como el crecimiento real uterino (Pérez Palacios *et al.*, 1995).

El RE es uno de los pocos receptores nucleares que sufre un proceso de fosforilación/desfosforilación en los residuos de tirosina, que regulan finalmente la capacidad de unión del receptor a la hormona. Esto sucede en el dominio I por una dependencia calcio-calmudolina tirosincinasa. El RE puede además ser fosforilado en el dominio I por una dirección prolina-proteincinasa. Esta última modificación aparece para aumentar la afinidad del RE por los ERE e incrementar la transcripción. Así como los RG, la desfosforilación es necesaria para el reciclamiento del RE (Landers y Spelsberg, 1992; Bolander, 1994).

#### 4.4.3. Andrógenos.

A diferencia de los que ocurre con otras hormonas esteroides, la testosterona, a nivel de sus células blanco, puede ser metabolizada a otros compuestos, principalmente derivados reducidos en el anillo A de la molécula, los cuales presentan mayor afinidad por el receptor de Andrógenos. La reducción enzimática de la testosterona en 5  $\alpha$  conduce a la síntesis de la 5  $\alpha$ -dihidrotestosterona (DHT), un compuesto que muestra mayor afinidad por el receptor intracelular de andrógenos que la testosterona. La purificación del receptor intracelular de andrógenos ha sido

particularmente difícil por su baja concentración tisular y por la labilidad de la molécula. La forma activada del receptor (4S) tiene un peso molecular de 85 Kda y muestra gran afinidad tanto para testosterona como por DHT. Los efectos genómicos de los andrógenos incluyen síntesis de proteínas específicas y activación de sistemas enzimáticos en sus órganos blanco (Pérez Palacios *et al.*, 1995).

Los receptores de andrógenos (RA) son nucleares, pero no citoplasmáticos, siendo fosforilados en los residuos de tirosina. En adición, otros dos sitios, uno en el dominio de regulación de la unión a ADN y otro en el dominio de articulación, son fosforilados por una serinacinasas desconocida en respuesta a la DHT. El último es asociado con alta afinidad de unión al ADN (Bolander, 1994).

#### **4.4.4. Progesterona.**

No obstante que la progesterona se difunde pasivamente a través de la membrana celular, sólo aquellas células sensibles, dependientes o ambas, de la acción genómica de esta hormona esteroide poseen la información genética necesaria para realizar la síntesis de un receptor específico (por ejemplo, células de endometrio, hipófisis anterior, hipotálamo, glándula mamaria, corteza cerebral) (Pérez Palacios *et al.*, 1995).

Existen, sin embargo, dos tipos de receptor intracelular para la progesterona: el receptor cuya síntesis requiere de manera obligada un efecto estrogénico previo (receptor estrógeno regulado) y el receptor que no necesita de la acción estrogénica para su síntesis (receptor estrógeno sensible). La existencia de estas dos poblaciones de receptores tiene gran implicación fisiológica, ya que los órganos que poseen el receptor estrógeno regulado sólo pueden expresar los efectos hormonales de la progesterona después de haber recibido un estímulo (endógeno o exógeno) de estrógenos (por ejemplo, endometrio y glándula mamaria), mientras que algunas estructuras del sistema nervioso central (por ejemplo, corte cerebral, cerebelo, amígdala) que de modo único o predominante poseen el receptor estrógeno insensible expresan los efectos progestacionales sin requerir estímulos previos. La dinámica de la interacción de la progesterona con sus receptores, no obstante, es similar para las dos poblaciones (Pérez Palacios *et al.*, 1995).

Para la identificación del receptor intracelular a progesterona y, en general, de las hormonas esteroides, se requiere cumplir con varios criterios que incluyen sus características de capacidad de unión, afinidad, especificidad hormonal, localización tisular y correlación con efectos biológicos específicos, así como sus características fisicoquímicas y de inmunoreactividad (Pérez Palacios *et al.*, 1995).

4.4.4.1. *Estructura molecular del receptor a progesterona.* Los estudios iniciales tendientes a caracterizar el receptor a progesterona (RP) y los de otros esteroides sugiere su naturaleza proteica, ya que dichos receptores eran digeridos por enzimas proteolíticas, eran termolábiles y no se afectaban después de la exposición a ADNasas y ARNasas. Debido a que el contenido intracelular de receptores es muy bajo, su purificación ha sido particularmente difícil. Sin embargo, el uso de técnicas de cromatografía por afinidad o inmunoafinidad ha permitido la purificación parcial (casi homogeneidad) de las moléculas receptoras de algunas hormonas esteroides (Pérez Palacios *et al.*, 1995).

Los RP se han caracterizado en varias especies, incluyendo humanos, pollos, conejos, ratones y ratas (Kastner *et al.*, 1990a.; Kato *et al.*, 1993; Park-Sarge y Mayo, 1994; Graham y Clarke, 1995), aunque Loosfelt y colaboradores propusieron en 1986 que en conejo sólo hay una forma de receptor (llamada B) (Kastner *et al.*, 1990a.; Kato *et al.*, 1993; Park-Sarge y Mayo, 1994; Syväla *et al.*, 1996). Aunque en pollo, humano, ratón y rata aparentemente existen dos formas de receptor (llamadas A y B) (Schraeder y O'Malley, 1972; Boyd y Spelsberg, 1979; Kastner *et al.*, 1990a.; Park-Sarge y Mayo, 1994; Syväla *et al.*, 1996), siendo RP-A una forma truncada amino-terminal de RP-B (Kastner *et al.*, 1990a.; DeMarzo *et al.*, 1991; Wen *et al.*, 1994; Park-Sarge y Mayo, 1994; Syväla *et al.*, 1996). En el humano el RP-B tiene un peso molecular de 116 kDa y el RP-A de 94 kDa, careciendo esta última de 164 aminoácidos presentes en la forma B (Kastner *et al.*, 1990a.; Wen *et al.*, 1994). En las aves tienen un peso molecular de 110 kDa y 79 kDa respectivamente, careciendo el RP-A en su parte terminal de 127 aminoácidos presentes en el RP-B (Conneely *et al.*, 1989; Kastner *et al.*, 1990a.; Kastner *et al.*, 1990b.).

El mecanismo de acción de los RP ha sido estudiado principalmente en el oviducto de pollo. Este órgano produce una proteína (avidina) que es dependiente de la progesterona (Heap y Flint, 1977).

Las proteínas de unión a progesterona del oviducto de pollo consisten de dos fracciones 4 S, llamadas A y B, que se encuentran en cantidades iguales, pudiendo sedimentar juntas formando un complejo 8 S. Los dos componentes tienen idénticos sitios de unión a la hormona y especificidad al esteroide, por lo que se sugiere que la misma clase de sitios de unión envuelve a las dos isoformas. Las dos isoformas difieren en su estabilidad en ultracentrifugación con bajo gradiente de sacarosa, en donde el componente A es inestable pero las fracciones 4 S del componente B permanecen. El componente A es menos estable que el componente B en soluciones sin 1-tioglicerol. Estas dos formas no pueden ser interconvertidas o recombinadas. Mientras la forma A se une preferentemente al ADN, la forma B se une a la cromatina, indicando esta separación dos tipos de interacción del receptor nativo (Schraeder y O'Malley, 1971).

Las proteínas de la cromatina de varios tejidos de pollo pueden ser disociadas desde el ADN y reconstituidas después en el ADN del mismo o de diferente tejido. Los análisis químicos y la electroforesis en gel de policramida demuestran que las histonas son cuantitativamente reintegradas en la cromatina sin detectarse degradación cuando las inhibidores de proteasas están presentes durante la reconstitución. La comparación de la composición química y el análisis inmunoquímico de cromatinas no tratadas y reconstituidas indican que las proteínas no histónicas (ácidas) además pueden ser cambiadas de la cromatina del oviducto al ADN de otros tejidos para formar cromatinas híbridas. La cromatina reconstituida del oviducto de pollo mantiene la capacidad de unir el complejo progesterona-receptor. Esta unión al tejido específico es transferida a cromatinas de órganos no blanco por cambio de las proteínas ácidas de la cromatina durante la reconstitución (Spelsberg *et al.*, 1972).

En el oviducto de pollo, la progesterona induce la síntesis de las proteínas del huevo, y se postula que la inducción está mediada por la unión de los RP con los genes que codifican estas proteínas. La inducción hormonal de la ovoalbúmina se tiene descrito en este sistema, y este ADNc fue uno de los primeros secuenciados completamente. En la región 5' del gen de la ovoalbúmina contiene varias regiones de unión de los RP, siendo estas regiones postuladas para unir otras proteínas y esto propiciar la regulación de los genes receptores de progesterona y estrógeno (Mulvihill, 1982; Graham y Clarke, 1995). El estrógeno es además capaz de activar la transcripción en estas regiones y en algunas células actúa con la unión progesterona RP-A, pero no con el RP-B, para inducir la transcripción en el gen de la ovoalbúmina, no quedando claro si el RP y el RE actúan en distintos motivos (motifs) en estas regiones (Kastner *et al.*, 1990a.; Wen *et al.*, 1994; Kraus *et al.*, 1995; Graham *et al.*, 1995; Graham y Clarke, 1995). La acción del estrógeno en la proximidad de la región de respuesta al esteroide del gen de la ovoalbúmina involucra interacción del complejo *fos-jun* con esta región (Graham y Clarke, 1995).

**4.4.4.2. Fosforilación.** El receptor a progesterona y los receptores a otras hormonas esteroideas, al igual que otras proteínas reguladoras, existen en dos estados: el estado inactivo en el que la molécula no puede unir la hormona esteroide, y el estado activo en el que, por efecto de un estado de fosforilación, el sitio de unión de la molécula para la hormona esteroide es funcionalmente activo (Bolander, 1994).

La fosforilación del RP se tiene reportada en el dominio I y el dominio III. La progesterona aumenta la fosforilación en ambos sitios, localizándose en este último la serina 530 en la isoforma B (S-530B), y aunque la cinasa no ha sido bien identificada, la fosforilación de la S-530B es precedida por la fosforilación de la S-528B (Bolander, 1994).

La fosforilación esta asociada con la proteína de choque térmico de 90 kDa (Hsp 90) que se encuentra unida al receptor en ausencia del esteroide y parece que esta proteína es la que cubre el dominio de unión al ADN. Cuando el esteroide se une al receptor, el cambio de conformación es la liberación de esta proteína de choque térmico, lo cual expone el dominio de unión al ADN (Carson-Jurica *et al.*, 1989; DeMarzo *et al.*, 1991; Landers y Spelsberg, 1993; Bolander 1994; Ganong, 1998). Entre otras Hsp relacionadas con este proceso esta la proteína de 70 kDa (Hsp 70), que pueden ser liberadas por la adición de ATP, sugiriéndose que pueden ayudar a solubilizar y plegar proteínas mal plegadas, mediante ciclos de unión e hidrólisis de ATP (Alberts *et al.*, 1989; Smith *et al.*, 1992). Kost y colaboradores (1989) aislaron el RP-A y el RP-B de oviducto de pollo, separadamente en ausencia de la hormona esteroide obteniendo la asociación de las Hsp 90 y 70 y encontrando que el receptor activado aislado de los extractos nucleares del oviducto estaban asociados con la Hsp 70 pero no con la Hsp 90, observándose una disociación hormona-dependiente de la forma citosólica del complejo receptor dentro de las primeras cuatro horas de tratamiento de progesterona, lo que puede explicar la carencia del complejo receptor nuclear. Sus resultados pueden indicar que las dos proteínas asociadas al receptor interactúan por diferentes mecanismos y que probablemente afecten la estructura o función del receptor en diferentes vías. Aparte de estas proteínas Kosano y colaboradores (1998) encontraron otras tres que son la Hsp 40, Hop (proteína de organización de Hsp) y la p23 (proteína de unión a la Hsp 90). Cada una de las cinco proteínas mostró dependencia de la concentración. Las Hsp 70 y 90 y la p23 presentaron similar concentración para tener un ensamble óptimo, pero la Hsp 40 y la Hop fueron efectivas al 1/10 de la concentración de las otras proteínas.

La interacción de la hormona esteroide en el sitio de unión de la molécula receptora da lugar al complejo de esteroide y receptor. En todos los sistemas en que se ha estudiado, el complejo de esteroide y receptor localizado en el citosol no puede migrar al núcleo (translocación) o unirse a ADN, cromatina o secuencias génicas específicas; ello, a menos que este complejo se modifique estructuralmente mediante un proceso conocido como activación o transformación. La activación del complejo lo habilita para efectuar dos de los más importantes procesos en el mecanismo de acción hormonal: su translocación nuclear y la localización de sitios aceptores en los diferentes componentes nucleares (Pérez Palacios *et al.*, 1995).

Se ha demostrado que el proceso de activación del complejo H-R depende de la temperatura y la fuerza iónica del medio de la misma hormona, y que muy frecuentemente se acompaña de modificaciones en su estructura molecular, como cambios en peso molecular, conformación cuaternaria y propiedades de sedimentación. En forma general, los complejos H-R se pueden clasificar en dos grupos: los que presentan un coeficiente de sedimentación  $\geq 7$  S, que corresponde a complejos no activados (en estado nativo) y aquellos que tienen coeficiente de

sedimentación  $< 5 S$  y que generalmente se mencionan como complejos *activados* o *transformados* (Pérez Palacios *et al.*, 1995).

Otro parámetro adicional indicativo del proceso de activación del complejo H-R es su incremento notable en estabilidad. Los complejos se disocian siguiendo una cinética de primer orden pero el complejo activado tiene una vida media por lo menos tres veces más larga que en su estado nativo. Desde el punto de vista termodinámico, este incremento en la estabilidad del complejo resulta de un mayor cambio en la entalpía, lo que sugiere un cambio conformacional en la molécula (Pérez Palacios *et al.*, 1995).

*4.4.4.3. Inmunorreactividad del receptor a progesterona.* La disponibilidad de preparaciones de progesterona, así como de otros receptores a esteroides, localizados en la fracción de citosol, permitió la producción de anticuerpos policlonales y monoclonales contra las moléculas receptoras. Las inmunoglobulinas antirreceptoras esteroides han sido esenciales en la caracterización de estas proteínas intracelulares. La especificidad de estos anticuerpos es una de sus características muy tempranamente reconocidas. Así, los anticuerpos desarrollados contra el receptor de la hormona esteroide (por ejemplo, antirreceptor a progesterona) reconocen de manera exclusiva y específica a ese receptor sin presentar reacción cruzada con otros receptores intracelulares con capacidad de unir esteroides. Con el uso de estos anticuerpos se ha podido demostrar que existe alto grado de homología estructural de los receptores a esteroides entre las diferentes especies de mamíferos. Un anticuerpo desarrollado en caprino contra el receptor a progesterona, obtenido del citosol de útero de coneja, puede reconocer al receptor de progesterona en la rata, el caballo y el ser humano, incluyendo en esta última especie tejidos normales y neoplásicos. Sin embargo, debe señalarse que este anticuerpo caprino no reconoce al receptor de progesterona en las aves, hallazgo previsible si se considera que la estructura molecular del receptor de progesterona es diferente en estas dos clases de animales. Los resultados de estudios recientes realizados han demostrado que el anticuerpo antirreceptor de progesterona puede reconocer tanto al receptor de progesterona estrogénorregulado como al receptor estrogénoin sensible del sistema nervioso central; esto indica que ambas poblaciones de receptores comparten determinantes antigénicos en su forma nativa, y que muy probablemente pertenecen al mismo grupo de macromoléculas. En apoyo a la homología estructural de los receptores de esteroides en diferentes especies, los estudios de clonación y de determinación de secuencia de los ADN complementarios específicos para receptores han revelado que existen grandes áreas de secuencia (dominios) en la molécula de un determinado receptor, área que comparten diferentes especies e incluso diferentes clases. Así, por ejemplo, el receptor de estradiol en aves muestra una secuencia de aminoácidos idéntica en 80% a la del mismo receptor en el ser humano. Más aún, los receptores para diferentes hormonas esteroides comparten entre sí algunas áreas de secuencias y, de alguna manera, son similares a las moléculas de ciertos virus

aviarios. Desde el punto de vista estructural, es interesante señalar que el receptor, una vez activado, tiene características fisicoquímicas similares a las del receptor nuclear (Pérez Palcios *et al.*, 1995).

En los últimos años varios informes en la literatura han cuestionado la localización citoplasmática de los receptores de esteroides en su forma nativa, particularmente los de estradiol, progesterona y vitamina D. Varios estudios inmunohistoquímicos realizados con anticuerpos monoclonales demostraron que en las células blanco intactas (fijadas) los receptores están confinados al compartimiento nuclear, observación que invalidaría el concepto de translocación citosol → núcleo en el mecanismo de acción hormonal. Una explicación alterna de este hallazgo experimental sería que en el compartimiento nuclear existen receptores no ocupados (sin unión a su hormona), los cuales estarían en equilibrio con los receptores citoplasmáticos. Sin embargo, el concepto establecido de que los receptores de esteroides, al igual que todas las proteínas, se sintetizan a nivel ribosomal en el citoplasma, aunado a la demostración reciente de la localización citoplasmática, requiere una evaluación crítica y muy cautelosa de estas observaciones. Cabe esperar que nuevos estudios puedan aclarar esta situación controversial aunque debe enfatizarse que, independientemente de los resultados que se obtengan, no se alterará el concepto general del modo de acción hormonal de los esteroides (Pérez Palcios *et al.*, 1995).

*4.4.4.4. Función del receptor a progesterona.* La función biológica del complejo de progesterona y receptor activado se inicia después de su translocación al compartimiento nuclear, donde induce la transcripción de genes específicos y, además de esta función nuclear, ejerce efectos postranscripcionales (Pérez Palcios *et al.*, 1995).

La estructura nuclear, sobre la cual interacciona el receptor activado, se conoce como receptor nuclear. Topográficamente, el sitio receptor nuclear se ha ubicado en diferentes componentes de la cromatina nuclear (proteínas cromáticas nohistonas, ADN, matriz nuclear), aunque en fecha reciente se ha sugerido que el receptor activado se une preferentemente con alta afinidad a secuencias de bases (nucleótidos) en el ADN en la región del gen (o muy cercano a él) de las proteínas no reguladas (Pérez Palcios *et al.*, 1995).

## **ANTECEDENTES.**

Los estudios que se han realizado sobre receptores a progesterona en pollo son muy pocos, siendo en su mayoría hechos en ovario y oviducto de animales inmaduros y maduros.

Gasc (1991) estudio la distribución y regulación del RP en el tracto urogenital embrionario de pollos desde el día 5 de incubación cuando es observado en los núcleos celulares del mesenquima y el epitelio celómico próximos al seno urogenital. De los 6 a los 10 días las células inmunomarcadas por RP se encontraron en el mesenquima que rodea el epitelio urodeal y proctodeal. La primera diferencia entre los embriones machos y hembras aparece el día 8, con una alta densidad de RP contenido por las células del epitelio del seno urogenital de las hembras. En los machos se puede inducir una distribución inmunorreactiva semejante a la de las hembras por tratamiento de estrógeno. La aplicación de antiestrógenos en el día cero de incubación no evito o demoro la aparición de RP, pero indujo la distribución tipo masculina en los embriones femeninos. En las gónadas, las células inmunomarcadas aparecieron sin ambigüedad el día 6 en la médula. En estadios posteriores, el receptor se muestra principalmente en la médula, aunque hay células positivas en la corteza del ovario izquierdo. La inmunorreactividad fue modificada significativamente por estradiol o antiestrógenos. El mesonefros fue desprovisto de inmureactividad, mientras que la mayoría de las células del mesénquima metanéfrico son receptor-positivas. En los conductos de Müller el RP no se detecto en las animales control hasta después del día 10. Entre los días 6 y 7 los conductos de Müller tuvieron respuesta al estradiol, que indujo el RP en las células epiteliales lumbinales. En el cordón espinal, el receptor se detecto en las neuronas y en las meninges, empezando el día 6. El RP es altamente regulado (up-regulation) por estradiol en las células del mesenquima, conductos de Müller y mesotelio, pero no en las gónadas o el cordón espinal. Sus resultados pueden indicar que la extensa y específica distribución del RP tiene una aparición programada en varios órganos, necesitando de la regulación hormonal.

Pasanen y colaboradores (1997) investigaron la expresión de los RP en varios órganos de pollos inmaduros tratados con estrógeno. Encontraron que la expresión de los RP se localiza en el mesotelio y el estroma del esófago, hígado, vaso, páncreas, corazón y pulmón. El tratamiento con estrógeno induce la expresión de los RP en el estroma y el músculo liso de la vesícula biliar, el epitelio y estroma de la traquea. En el ovario de animales inmaduros los RP fueron localizados en el epitelio germinal, estroma y músculo liso, siendo inducidos en las células de la granulosa por el estrógeno. En la mayoría de los tejidos encontraron que fue la mayor la expresión del PR-B que la del PR-A, permaneciendo esta dominancia después del tratamiento con estrógeno. Sus resultados



U.N.A.M. CAMPUS

sugieren que la progesterona y el estrógeno pueden tener efectos fisiológicos en muchos órganos fuera del sistema genital no conocidos anteriormente como órganos blanco de esteroides.

## Ovario.

IZT.

González-Morán y colaboradores (1985) administraron LH/hCG los días 13,15 y 17 de incubación a embriones de pollo y observaron que el ovario de pollo empieza a responder al estímulo por gonadotropinas desde el desarrollo embrionario. La respuesta de este a LH/hCG aparece primero en el ovario de pollo que en el de ratas y conejos. Las células intersticiales de los cordones medulares presentaron características estructurales e histoenzimológicas de células estereoidogénicas. Las células indiferenciadas que rodean los cordones intersticiales demostraron que pueden ser modificadas por la LH/hCG. La transformación de células relativamente indiferenciadas en células intersticiales maduras puede explicar el aumento en el volumen de los cordones intersticiales. El sistema lacunar presentó un gran desarrollo, pero al no existir un acuerdo acerca de su función, se tiene que discutir el significado fisiológico de estos cambios. Los capilares sanguíneos también tuvieron un gran desarrollo lo que se puede interpretar como una reacción asociada con estimulación glandular. Las células germinales se localizaron normalmente en la corteza ovárica, pero cierto número se observó en la médula, las que se redujeron al seguir el tratamiento con LH/hCG. Por lo tanto, la migración y eliminación de las células germinales en la médula puede ser influenciada por cambios hormonales. Probablemente el aumento en la secreción de hormonas esteroides estimuladas por LH/hCG causa una modificación en el número de células germinales.

Isola y colaboradores (1987) estudiaron la localización de los RP en el ovario de pollo inmaduros tratados y no tratados con estrógeno, así como el de gallinas ponedoras detectándolos por técnica inmunohistoquímica y observándolos al microscopio de luz. Los RP se observaron en las células del epitelio germinal de pollos tratados y no tratados con estrógeno. En los animales tratados se encontraron RP en parte de la teca, células de la granulosa y células del epitelio germinal más no en los no tratados, sugiriendo está inducibilidad de los RP una sensibilidad al estrógeno. En el ovario de las gallinas ponedoras se localizaron en el epitelio germinal, teca, estroma y células de la granulosa. A nivel subcelular los RP sólo se localizaron en los núcleos celulares.

Yoshimura y colaboradores (1995) investigaron los factores que inducen los RP en las células de la granulosa inyectando pollos con hormona luteinizante ovina (oLH) y hormona foliculoestimulante porcina (pFSH). En las aves inyectadas con oLH, el receptor a progesterona de 79 y 110 kDa fue observado en las células de la granulosa de los folículos grandes, mientras que en los folículos pequeños sólo se encontró el receptor de 110 kDa, por lo que puede haber una



sensibilidad mayor en las células de la granulosa de los folículos grandes que en las de los pequeños. La pFSH no indujo lo RP en las células de la granulosa de folículos grandes o pequeños, disminuyendo la cantidad de FSH unida a en las células de la granulosa de los folículos en desarrollo. Estos resultados sugieren que la FSH tiene poco efecto en las células de la granulosa de folículos grandes, por lo tanto es probable que no participe en la inducción del RP en las células de la granulosa de folículos preovulatorios. Sawada y colaboradores (1997) confirmaron estas observaciones y además encontraron que la LH ejerce sus efectos en los tejidos celulares por vía de los sistemas proteína cinasa A y C que pueden ser estimulados por AMPc y PMA respectivamente.

Yoshimura y Bahar (1991) investigaron la distribución de los RP en folículos pre y postovulatorios en gallina por análisis inmunohistoquímico y Western blot, utilizando los anticuerpos monoclonales para pollo PR6 y PR13. Los RP fueron localizados en los núcleos de la teca externa de los fibroblastos y en las células del epitelio germinal en regiones del estigma y fuera del estigma de terceros grandes folículos preovulatorios ( $F_3$ ). En los grandes folículos preovulatorios ( $F_1$ ), los PR están presentes en la teca externa de los fibroblastos, células del epitelio germinal y en las células de la granulosa y algunos en la teca interna de los fibroblastos en el estigma y en la región no estigmática. 24 horas después de la ovulación, los RP de los fibroblastos de la teca externa de los folículos postovulatorios (FPO) fueron marcadamente reducidos, pero la cantidad de RP de las células de la granulosa fueron similares a los observados en los  $F_1$ . En los fibroblastos, pared arterial, fibras de músculo liso y tejido conjuntivo libre de los folículos pre y postovulatorios encontraron una alta densidad de RP. La presencia de los RP en tejidos específicos del ovario sugiere que estos tejidos son órganos blanco de la progesterona y que la progesterona puede jugar un papel importante en la regulación de la maduración folicular y durante la ovulación.

### Oviducto.

González-Morán y colaboradores (1993) observaron que con la administración de bajas dosis de  $17\beta$ -estradiol a embriones de pollo los días 15 y 17 de incubación se induce un aumento en la densidad celular de la mucosa del magnum y la formación de un epitelio pseudoestratificado con invaginaciones de las células hacia el estroma iniciando la formación de las glándulas tubulares, así como un incremento del área de la pared y la luz del magnum en los pollos recién nacidos. Sus resultados demuestran que la administración de estradiol induce cambios en el oviducto del embrión de pollo provocando citodiferenciación y modificaciones en la mucosa del magnum durante el desarrollo. En estudios hechos con la hormona folículo-estimulante (FSH) administrada los días 13, 15 y 17 del desarrollo embrionario, González-Morán y Camacho-Arroyo (1998) Evaluaron la histomorfometría y la ultraestructura del oviducto de pollos recién nacidos así

como la expresión del receptor a progesterona (RP) por inmunohistoquímica, observando que hay una marcada diferencia en la histología de los oviducto de pollos tratados con FSH en relación con los no tratados. La mucosa del magnum de los animales tratados presentó un epitelio pseudoestratificado con invaginaciones de la luz hacia el epitelio y de este hacia el estroma subyacente donde se inicia la formación de las glándulas tubulares. En cambio en la mucosa del magnum de los animales controles se presentó únicamente un epitelio columnar sin evaginaciones. La FSH indujo la formación de cilios y microvellosidades en el epitelio del magnum que se proyectan hacia la luz, así como un incremento en las áreas de la pared y la luz y en la densidad de núcleos por unidad de área del epitelio. La inmunorreactividad del RP fue solamente observado en el oviducto de los animales tratados con FSH. El RP fue localizado en los núcleos celulares del epitelio luminal, el estroma de la mucosa y en el músculo liso. Sugieren que la FSH induce un medio hormonal adecuado para la citodiferenciación y expresión génica del RP en el oviducto de pollo.

Tanto las isoformas A y B del RP de pollo (RPc) como del humano (RPh), muestran diferentes actividades biológicas dependiendo de la célula y el promotor, ya que en el oviducto de pollo inmaduro la proporción entre ambas isoformas puede cambiar de la dominancia del RP-B al RP-A ante la inducción de estrógeno, lo que puede indicar que la proporción entre las isoformas de RP puede ser alterada por una alta regulación (up-regulation) del RP-A por la acción del estrógeno *in vivo* (Syväla *et al.*, 1997). La regulación transcripcional del RP involucra la inducción por estrógeno la baja regulación (down-regulation) por progestinas, ácido retinoico y proteínas AP-1. Los elementos de respuesta a estrógeno que se encuentran presentes en el gene de RP, se une al receptor de estradiol y media la inducción de estrógeno y 4-OH tamoxifen. La expresión del gene de RP puede ser igualmente estimulada por el estradiol y el 4-OH tamoxifen ante la supresión del receptor a estrógenos. La represión por progestinas, ácido retinoico y las proteínas AP-1 puede ser mediada por los mismos elementos de respuesta a estrógenos aunque el ácido retinoico y las proteínas AP-1 no se ligan a estos elementos. La represión por estas proteínas parece involucrar diferentes regiones de transactivación del receptor a estrógenos, mientras que los receptores retinoicos involucra sólo la activación de la función 2 y los RP y las proteínas AP-1 necesitan ambos dominios funcionales. Estas proteínas actúan sin contacto directo al ADN, por lo que la represión probablemente se realice por interacciones proteína-proteína entre diferentes dominios de receptor a estrógenos y la maquinaria transcripcional (Savouret *et al.*, 1994).

Turcotte y colaboradores (1990) estudiaron el control de la transcripción y encontraron que gen promotor del receptor a progesterona de pollo requiere distintos elementos de respuesta a progestinas internos. El inicio de la transcripción celular específica fue observada en fibroplastos de embriones de pollo transfectados utilizándose 876 bases pareadas de la región superior del RP de pollo (RPc). La transcripción de estos genes puede ser inducida por progestinas en la presencia

de la forma A de RPc pero no de la forma B. Los sitios de unión fueron identificados *in vitro* por análisis de ADNasa I hipersensitiva en la región del promotor de RPc, *in vivo* la transcripción nuclear mostró que ni la estimulación primaria con progestinas ni el tratamiento secundario de pollos estimulados con estrógenos ante progestinas, glucocorticoides o andrógenos tuvieron algún cambio significativo de la transcripción del gene de RPc en el oviducto, lo que sugiere desarrollo específico celular para estos elementos de respuesta a progestinas. Sus resultados sugieren que aunque el estrógeno es conocido por incrementar los niveles del RP en el oviducto de pollo, este efecto no involucra la estimulación del gene de la transcripción del RP.

Kastner y colaboradores (1990b.) reportan que ambas isoformas se originan de un simple gene de RP, iniciando su traducción en un codón más abajo del ATG (en el ATG2) y que la existencia de una abundante región 5' truncada en el ARNm del RP de pollo es capaz de codificar para la isoforma A pero no para la B por lo que sugieren que las dos isoformas son traducidas por diferentes transcripciones.

Boyd y Spelsberg (1979) encontraron que en el oviducto de pollos inmaduros, los RP presentan variaciones con los cambios estacionales, reportando que durante el fin del invierno-principio de primavera hay una gran reducción en la actividad del RP-A en comparación con otros periodos del año. En 1982 estos mismos autores sugieren que la ausencia de la función reproductiva de pollos inmaduros y gallinas viejas se debe a una disminución en las concentraciones de RP, lo que provoca una disminución en las cantidades de la isoforma B y una pérdida en los sitios nucleares de unión de RP, por lo que suponen que la pérdida de los RP-A durante el invierno y la pérdida de los RP-B en pollos inmaduros y gallinas viejas sugieren como mínimo la existencia de dos modos diferentes de control del receptor, misma conclusión a la que llegaron Hora y colaboradores (1987).

Syvälä y colaboradores (1996) estudiaron la influencia de diferentes tratamientos de estrógeno y/o progesterona en la concentración del PR-A y el PR-B en diferentes tipos celulares del oviducto de pollo, analizando las concentraciones de RP celular por técnica inmunohistoquímica en células epiteliales, glándulas, músculo liso y células del mesotelio, para lo cual utilizo los anticuerpos monoclonales PR6 (que reconoce sólo la forma B) y el PR22 (que reconoce ambas isoformas). Las medidas de las concentraciones variaron entre los diferentes tipos celulares y de célula a célula, observando una disminución significativa en las concentraciones de RP, que se noto por una disminución en la intensidad de marca, en los tipos celulares de animales sacrificados 2 y 6 hr después de ser inyectados con progesterona con o sin administración simultánea de estrógeno, verificando esta disminución por inmunoblotting y ensayo inmunoenzimométrico. Después la baja regulación (down-regulation) recupera los niveles del RP a su normalidad dentro de las 48 hr siguientes a la administración de estrógeno o

progesterona. La administración de estrógeno sólo causó cambios en la concentración de RP-A, teniendo poco efecto en la concentración de RP-B dependiendo del tipo celular estudiado. Estos descubrimientos indican que el estrógeno y la progesterona causan cambios celulares específicos no sólo en la concentración total de los RP, sino también en la proporción celular del RP-A y del RP-B.

## **JUSTIFICACIÓN.**

Varios trabajos han demostrado que las hormonas gonadotrópicas regulan la síntesis de las hormonas esteroides en las gónadas de las aves, así como su efecto en el desarrollo gonadal desde etapas tempranas del desarrollo embrionario. En trabajos recientes en nuestro laboratorio se han identificado las células blanco a la progesterona en el ovario del pollo recién nacido. Por tal motivo en el presente trabajo se pretende estudiar si las hormonas gonadotrópicas intervienen en la expresión de las isoformas del receptor a progesterona en el ovario y el oviducto del pollo recién nacido y la importancia que puede tener este efecto sobre la función fisiológica y el desarrollo de estos órganos, además de conocer un poco más del papel que juegan las hormonas gonadotrópicas sobre el desarrollo y la diferenciación del aparato reproductor desde el estado embrionario.

## **OBJETIVOS.**

### OBJETIVO GENERAL.

Identificar el tipo de isoforma del receptor a progesterona en ovario y oviducto de pollos recién nacidos, así como observar el efecto de las hormonas gonadotrópicas sobre la expresión de las isoformas del receptor a progesterona.

### OBJETIVOS PARTICULARES:

- Identificar el tipo de isoforma del RP en las distintas subpoblaciones celulares del ovario de pollo recién nacido.
- Identificar el tipo de isoforma del RP en las distintas subpoblaciones celulares del oviducto de pollo recién nacido.
- Cuantificar las variaciones en el número de células e intensidad inmunorreactiva sobre la expresión de las isoformas del RP en las distintas subpoblaciones celulares del ovario de pollo recién nacido.
- Cuantificar las variaciones en el número de células e intensidad inmunorreactiva sobre la expresión de las isoformas del RP en las distintas subpoblaciones celulares del oviducto de pollo recién nacido.

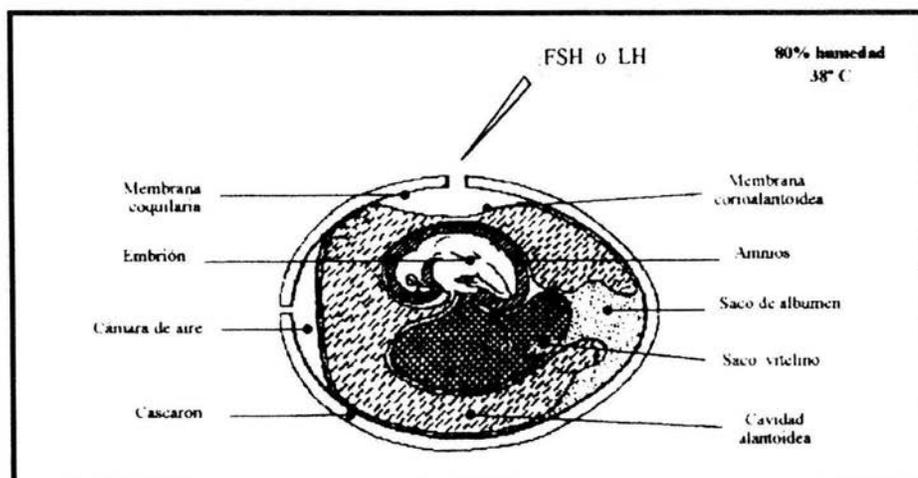
## **HIPÓTESIS.**

Si las hormonas gonadotrópicas producen cambios histológicos; y variaciones en el número celular y síntesis de hormonas esteroideas en las gónadas embrionarias y éstas son blanco a la progesterona, suponemos que las hormonas gonadotrópicas también induzcan cambios en la expresión de las isoformas del receptor a progesterona en el ovario y oviducto de pollos recién nacidos, tratados durante el desarrollo embrionario.

## MATERIAL Y MÉTODO.

Para la realización de este trabajo se obtuvieron huevos fértiles de pollo de la raza *White leghorn*, los cuales fueron incubados a 38 °C en una incubadora con humedad y ventilación constantes.

A los 11 días de desarrollo los huevos fueron introducidos a un cuarto estéril, donde se les limpió con alcohol al 70%. Una vez limpios, se realizó un orificio en la cámara de aire por medio de una aguja de disección. En la parte superior del huevo se abrió un orificio en forma triangular con una segueta de metal cuidando el no dañar las membranas para evitar hemorragias. El cascarón se retiró con una aguja de disección y se colocó suero fisiológico (solución de NaCl al 0.9% estéril) para humedecerla, dejando reposar unos segundos, después se realizó un pequeño orificio en la membrana externa con ayuda de una aguja de disección. Con un bulbo para pipeta Pasteur se succionó a través del orificio de la cámara de aire para separar y bajar la membrana corioalantoidea junto con el embrión, para evitar un derrame sanguíneo que sea la causa de la muerte del embrión. Después se retiró la membrana externa con ayuda de unas pinzas y se sellaron la abertura y el orificio de la cámara de aire con cinta adhesiva, volviendo a colocarse los huevos en la incubadora (Figura 9).



**Figura 9.** 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 Hoffman-Völker (1969).

A los 13 días de desarrollo se aplicaron las hormonas y se dividieron los embriones en tres lotes, que fueron: lote I, control (NaCl al 0.9%), lote II, estimulado con 1 µg de hormona foliculo estimulante (FSH) (Fertinorm HP, Urofolitropina-Serono de México, S.A.) y lote III, estimulado con 1 µg hormona luteinizante (LH) (NIH-LH-S1; Sigma Chemical Co., St. Louis, MO. U.S.A), los días 13, 15 y 17 de desarrollo embrionario.

### Procesamiento del material biológico.

Una vez terminado su desarrollo (21 días), los pollos fueron sacrificados dentro de las 24 hr después de la eclosión por decapitación. Se extrajo el ovario y oviducto y se limpiaron en una solución libre de calcio y magnesio, fijándose posteriormente en una solución de paraformaldehído al 4% durante 4 hr. Una vez transcurrido este tiempo se lavaron 3 veces en amortiguador de fosfatos durante 20 minutos cada uno y se deshidrataron en alcoholes graduales (30%, 50%, 70%, 80%, 96%, durante 15 minutos cada uno y en 100% dos lavados de 20 minutos cada uno). Después se pasaron a xilol durante 15 minutos, todos estos pasos realizados a temperatura ambiente. Después se pasaron a xilol-paraplast, a concentración 1:1, durante 15 minutos en una estufa a 60 °C, pasando a paraplast puro durante 15 minutos, también a 60 °C. Después se colocaron en cajas para inclusión con paraplast durante 24 horas.

Posteriormente se realizaron cortes de un grosor de 3 µm y se teñieron por la técnica de Hematoxilina-Eosina para su posterior observación y localización de la zona.

### Técnica de Hematoxilina-Eosina.

Se hicieron cortes de 3 µm de grosor en los ovarios y oviductos y se pusieron en un baño de flotación con gelatina a 46 °C, hasta que se estirara el tejido. Las laminillas se desparafinaron en xilol durante dos tiempos de 15 min cada uno y se pasaron a alcohol-xilol (OH al 100%-xilol concentración 1:1) durante 10 min, pasando a hidratarse en alcoholes graduales (100%, 96%, 70% y 50%) con cambios de 5 min cada uno hasta llegar a agua destilada 5 min, posteriormente pasaron a hematoxilina de Gill donde permanecieron 10 min. Posteriormente se lavaron 3 veces en agua corriente y se pasaron por alcohol-ácido y carbonato de litio, posteriormente se tiñeron con eosina durante unos segundos y se deshidrataron en alcoholes graduales (96%, dos lavados de entrada por salidad el primero y de 5 min el segundo, 100%, un lavado de 5 min), alcohol-xilol, un lavado de 5 min, y xilol, dos lavados de 5 min cada uno. Después se montaron con resina sintética. Todos estos pasos se realizaron a temperatura ambiente.

Posteriormente se observaron en un microscopio *American Optical* para encontrar las zonas de poblaciones celulares y escoger los mejores cortes para la prueba inmunohistoquímica, técnica indirecta de inmunoperoxidasa para microscopía fotónica (González-Morán, 1996).

### Tipos celulares estudiados.

En el ovario las zonas de estudio fueron la corteza, donde se observaron las células del epitelio germinal y la células germinales (ovogonias y ovocitos), y la médula donde los grupos celulares observados fueron las células de los cordones intersticiales, células indiferenciadas y células epiteliales de los canales lacunares.

### Técnica inmunohistoquímica para la identificación de Receptores a Progesterona.

Para la técnica inmunohistoquímica se preparan laminillas con Poli-L-lisina 1:10 (Sigma, Poly-L-Lysine, St. Louis, MO. U.S.A). Se hicieron cortes de 5  $\mu\text{m}$  de grosor y se estiraron en un baño de flotación con agua destilada y sin gelatina a 46 °C, y se dejaron secar todo un día para que los cortes se adhieran bien. Las laminillas se dividieron en controles positivos y negativos. Se desparafinaron en xilol (2 cambios de 2 min cada uno), y se hidrataron en alcoholes graduales de 100% ( 2 cambios de 2 min cada uno), 96% (1 cambio de 2 min), 70% ( 2 cambios de 2 min cada uno) y 50% (1 cambio de 2 min). Después se lavaron en agua destilada ( 2 cambios de 5 min cada uno). Después las laminillas se introdujeron en ácido cítrico y se calentaron en el horno de microondas dando un tiempo de 10 minutos a partir de la ebullición y un descanso de 5 minutos y otro tiempo de 10 minutos a partir de la ebullición y un descanso de 20 minutos, lavándose 2 veces en PBS inmediatamente después. Al terminar el lavado con PBS se bloquearon el peróxido endógeno con  $\text{H}_2\text{O}_2$  al 3% por 10 min a temperatura ambiente. Al terminar este paso se volvieron a lavar en PBS con dos cambios de 5 min cada uno. Después se permeabilizaron con Tritón X-100 (Sigma-St. Louis, MO. U.S.A.) al 0.5% a temperatura ambiente por 20 min. Después se lavaron en PBS con dos cambios de 5 min cada uno. El siguiente paso fue bloquear con suero normal de cerdo a temperatura ambiente durante 20 min. Después se lavaron en PBS con dos cambios de 5 min cada uno. Después los controles positivos se incubaron con el anticuerpo primario contra progesterona (PgR Ab-8, que reconoce las isoformas A y B; y PgR-Ab-6, que reconoce sólo la isoforma B, Neomarker) a una dilución 1:50 durante 24 hr a 4 °C (refrigerador), mientras que los controles negativos se incubaron con suero normal de ratón a una dilución de 1:2000. Al pasar las 24 hr se sacaron del refrigerador y se dejó que tomaran temperatura ambiente para después lavarse en PBS con dos cambios de 5 min cada uno. Después se incubaron con el anticuerpo de unión del kit ABC (avidin-biotin complex) (DAKO Corporation, CA, U.S.A.) a temperatura ambiente

por 30 min. Después se lavaron en PBS con dos cambios de 5 min cada uno. El siguiente paso fue incubar en el conjugado estreptoavidina-biotina durante 30 min a temperatura ambiente. Después se lavaron en PBS con dos cambios de 5 min cada uno. Después se lavaron en PBS con dos cambios de 5 min cada uno. Después se incubaron con el sustrato (cromógeno) de diaminobenzidina, a una dilución de 20  $\mu\text{l/ml}$  en amortiguador durante 5 min a temperatura ambiente. Después se lavaron en agua destilada dos veces de 5 min cada una. Se deshidrataron en alcoholes graduales (50%, 70%, 96% y 100%), introduciéndose dos veces en cada alcohol durante dos minutos, para después aclararse en xilol (2 cambios de 1/2 min cada uno) y se montaron con resina sintética.

### Análisis inmunohistoquímico del ovario.

Se utilizaron siete ovarios izquierdos por lote para el estudio de inmunohistoquímica, realizándose tres laminillas por ovario con siete cortes en cada una. Una laminilla fue utilizada para tefirse con Hematoxilina-Eosina, y otras laminillas fueron usadas para inmunohistoquímica (PgR Ab-8 y PgR Ab-6). El número de células de RP inmunoreactivas y la intensidad de inmunotinción se observaron en dos laminillas con cortes por ovario usando un objetivo a 100X.

En la corteza ovárica el número de células RP-inmunorreactivas se contaron en las células del epitelio germinal por área de corteza y en las células del epitelio germinal, fueron evaluadas en 1000  $\mu\text{m}^2$  de la parte superior de la corteza ovárica.

Para la médula subcortical, el número de células RP-inmunorreactivas se conto en las células indiferenciadas por área de médula ovárica y en las células intersticiales por ovario. El número de células epiteliales lacunares fue evaluado en 100  $\mu\text{m}$  del perímetro del lacunar.

### Análisis inmunohistoquímico del Oviducto.

Se utilizaron siete oviductos izquierdos por lote para el estudio de inmunohistoquímica, realizándose tres laminillas por oviducto con siete cortes en cada una. Una laminilla fue utilizada para tefirse con Hematoxilina-Eosina, y otras laminillas fueron usadas para inmunohistoquímica (PgR Ab-8 y PgR Ab-6). El número de células de RP inmunomarcadas y la intensidad de tinción se observaron en dos laminillas con cortes por oviducto usando un objetivo a 100X.

Se conto el número de células RP-inmunorreactivas en las células del epitelio luminal y estroma del oviducto por unidad de área y las células de la serosa se midió en un área de 100  $\mu\text{m}$  de su superficie.

Las áreas fueron determinadas usando el procesador de imagen Argus-20 (Hamamatsu, Japón).

La intensidad inmunorreactiva se midió mediante el programa Scan Pro 4.0, en el cual los valores se miden de 0 (negro) a 255 (blanco), restándose el valor obtenido al valor del control negativo.

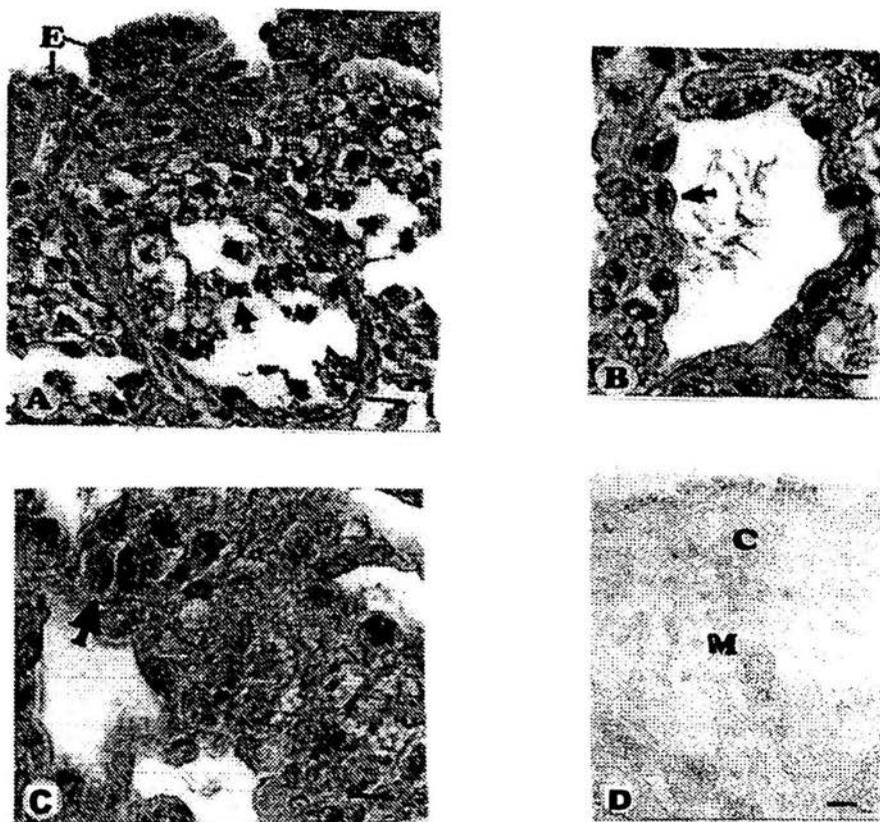
Para el análisis estadístico se utilizó la prueba de Levene aplicado a la prueba de Wald-Wolfowitz para comparar entre dos grupos, considerando un nivel de significancia al 5 % (Conover, 1980).

## RESULTADOS.

La localización de las isoformas de RP para el ovario y oviducto izquierdo de pollos recién nacidos se realizó mediante técnica inmunohistoquímica, utilizándose los anticuerpos PgR Ab-8 (que reconoce las isoformas A y B) y PgR-Ab-6 (que reconoce sólo la isoforma B), siendo la marca de color café. Para comprobar la especificidad del anticuerpo se utilizó como control negativo suero normal de ratón a una dilución 1:2000 en vez del anticuerpo primario. (Figuras 10 y 14).

### Ovario.

El ovario izquierdo del pollo recién nacido es una pequeña estructura irregular de color amarillo rosáceo pálido y tiene alrededor de 3.5 a 7 mm de largo y 1.5 mm de ancho. Histológicamente, está formado por una corteza externa y una médula central separados por la túnica albúginea. La corteza está rodeada por el *epitelio germinal*, formado por células cúbicas que contienen moderado citoplasma y un núcleo redondo. En esta zona se encuentran las *células germinales*; ovogonias y ovocitos. Las ovogonias son más pequeñas que los ovocitos y la cromatina se encuentra dispersa en el citoplasma; en los ovocitos la cromatina se puede observar condensada formando cromosomas. Entre las células germinales se encuentran las *células pregranulosas*, que son alargadas, en forma ovoide con escaso citoplasma. La médula contiene tejido conectivo, vasos sanguíneos y linfáticos, cordones de células intersticiales y células indiferenciadas. Las *células intersticiales*, son de forma irregular, con un citoplasma altamente vacuolado y se agrupan en cordones rodeados de *células indiferenciadas*, que presentan forma alargada con núcleos pequeños y redondos u ovalados. En la médula también se observan *canales lacunares* rodeados de células epiteliales grandes con núcleos ovalados y escaso citoplasma y vasos sanguíneos formados por células endoteliales planas con escaso citoplasma.



**Figura 10.** Distribución de las células RP-inmunorreactivas en el ovario de pollo recién nacido. La inmuno histoquímica se realizó utilizando el anticuerpo PgR Ab-8 que reconoce ambas isoformas. La barra de escala representa 10  $\mu$ m.

- A)** Corteza ovárica. Las células del epitelio germinal (**E**) y las células germinales (**→**) son RP-positivas.
- B)** Médula ovárica. Las células epiteliales de los canales lacunares (**→**) son RP-positivas.
- C)** Médula ovárica. Las células intersticiales (**→**) son RP-positivas.
- D)** En las laminillas de control negativo se observa una ausencia de inmunorreactividad, estas fueron incubadas en suero preinmune levantado en anticuerpo primario. Corteza (**C**) y médula ovárica (**M**).

## Comparación de la respuesta de las Células RP- Inmunorreactivas entre los tratamientos.

Se observaron las laminillas tratadas con los anticuerpos RP-AB y RP-B en el microscopio fotónico para identificar los tipos celulares que presentan RP en la corteza y en la médula ovárica.

Una vez identificada la respuesta en los tipos celulares se realizó el conteo de células RP-inmunorreactivas mediante el procesador de imagen.

En la corteza ovárica los tipos celulares que presentaron RP-inmunorreactividad fueron las células del epitelio germinal y las células germinales. El número de células RP-inmunorreactivas en estas células fue similar en el grupo control y en el ovario tratado con LH, incrementándose en el ovario tratado con FSH. (Figura 11).

En la médula ovárica los tipos celulares cuantificados fueron las células intersticiales, indiferenciadas y epiteliales de los canales lacunares. (Figura 12).

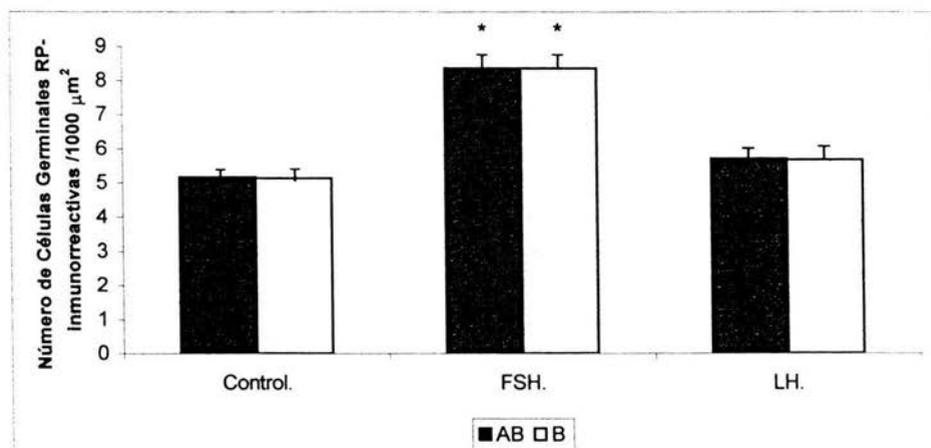
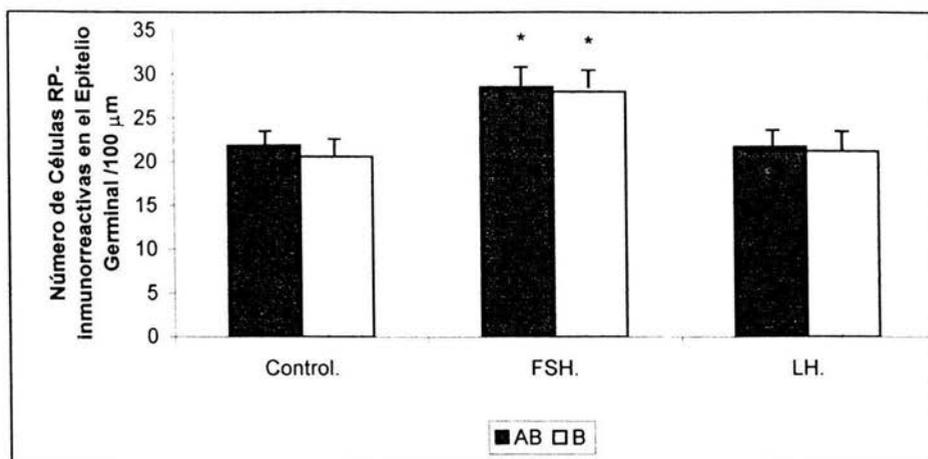
El conteo del número de células RP-inmunorreactivas en las intersticiales se realizó por ovario y se encontró que el tratamiento con FSH incremento el número de las células intersticiales a diferencia de la LH que disminuye el número de células RP-inmunorreactivas.

En el grupo control y el grupo tratado con LH las células indiferenciadas no presentan RP-inmunorreactividad, mientras que en el tratamiento con FSH se induce la expresión de células RP-inmunorreactivas.

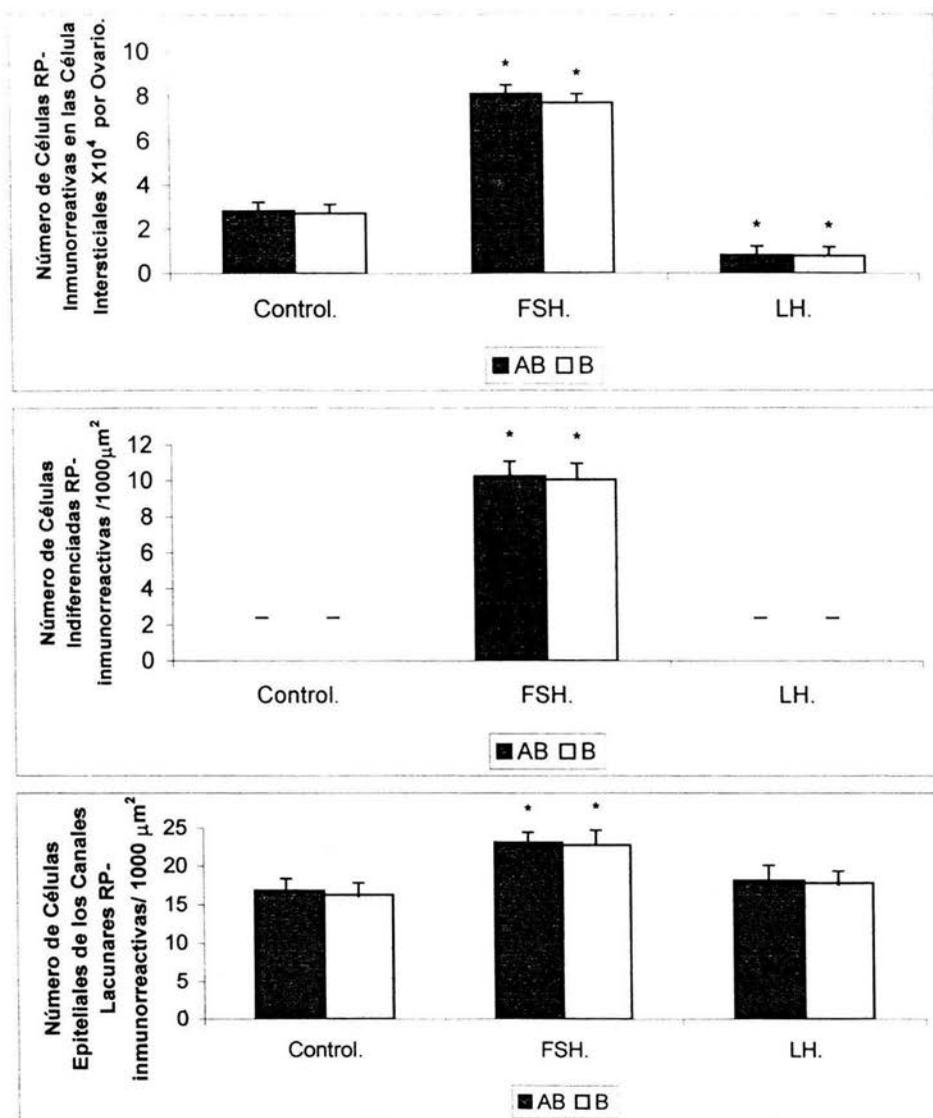
En las células epiteliales de los canales lacunares, el grupo tratado con FSH mostro un mayor número de células RP-inmunorreactivas en relación a los grupos control y tratado con LH, comparando el grupo control y el grupo LH no hubo diferencia.

La intensidad inmunorreactiva mostro que el tratamiento con FSH y LH no modifica la Intensidad Inmunorreactiva en las células del epitelio germinal y células germinales de la corteza ovárica y en las células epiteliales de los canales lacunares de la médula ovárica, a diferencia de las células células intersticiales que su intensidad inmunorreactiva en el ovario tratado con FSH incremento, pero disminuye con el tratamiento con LH.(Figura 13).

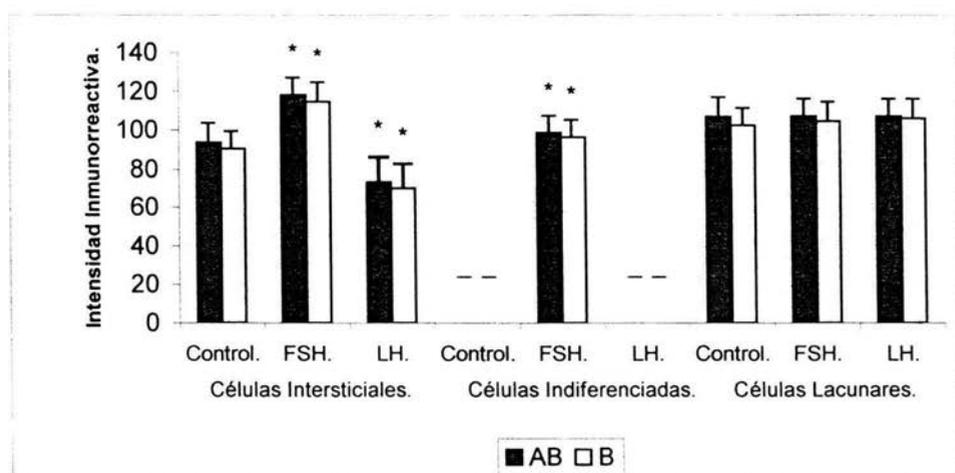
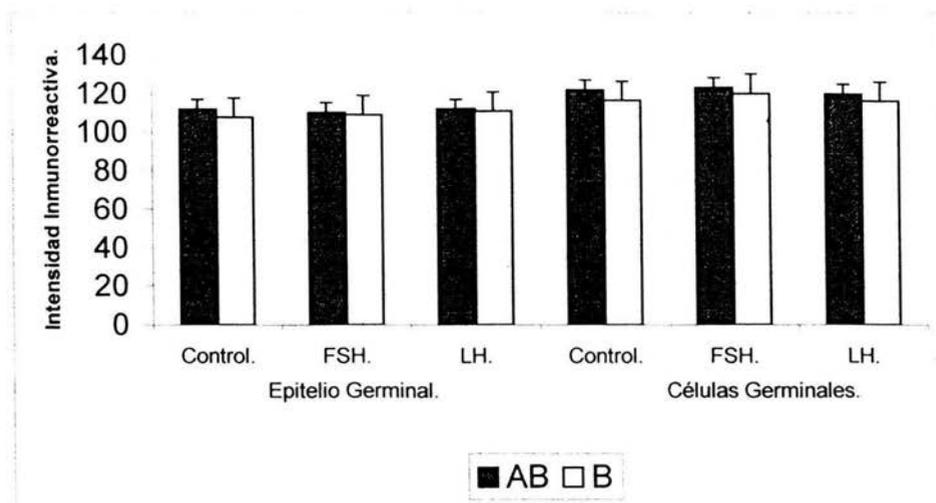
Al hacer la comparación entre los grupos marcados con RP-AB y RP-B en cuanto al número de células RP-inmunorreactivas y evaluación de intensidad no se encontró gran diferencia por lo que se dedujo que la isoforma B del receptor a progesterona fue la dominante.



**Figura 11.** Efecto de la FSH y LH en el número de células RP-inmunorreactivas de la corteza del ovario izquierdo. N= 7. Los datos están representados como la media  $\pm$  error estándar. Diferencia significativa \*  $P < 0.05$  . FSH vs Control y LH.



**Figura 12.** Efecto de la FSH y LH en el número de células RP-inmunorreactivas de la médula del ovario izquierdo. N = 7. (—) = No hubo reacción. Los datos están representados como la media  $\pm$  error estándar. Diferencia significativa \*  $P < 0.05$ . Células Intersticiales FSH vs Control y LH; LH vs Control y FSH. Células Indiferenciadas FSH vs Control y LH. Células Epiteliales de los Canales lacunares FSH vs Control y LH.

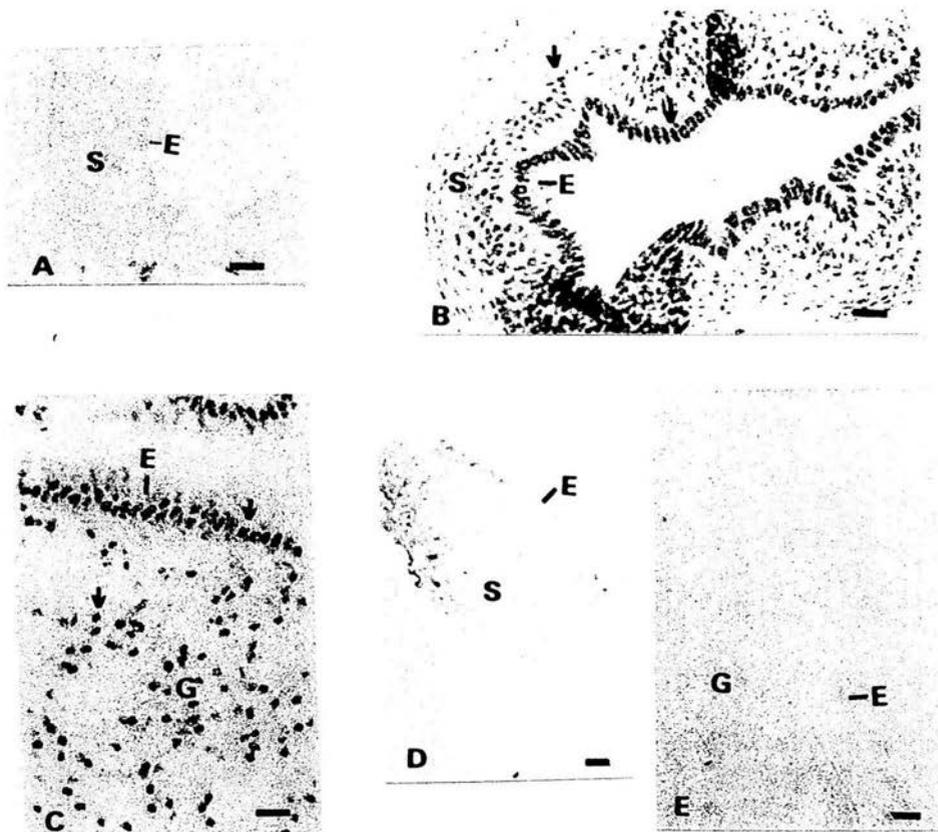


**Gráfica 13.** Efecto de la FSH y la LH sobre la intensidad inmunorreactiva. Diferencia de intensidad inmunorreactiva entre los las distintas subpoblaciones celulares de la corteza y la médula del ovario izquierdo de pollos recién nacidos que presentan RP. N = 7. (—) = No hubo reacción. Diferencia significativa \* P < 0.05. Células Intersticiales FSH vs Control y LH; LH vs Control y FSH. Células Indiferenciadas FSH vs Control y LH. Células Epiteliales de los Canales lacunares FSH vs Control y LH.

## Oviducto.

El oviducto de las aves se divide en cinco regiones histológicas que son: el *infundíbulo*, el *mágnun*, el *istmo*, el *útero* y la *vagina*.

Para nuestro resultados la región estudiada fue el *magnum* debido a que es donde se encuentran las células caliciformes que segregan la avidina y la ovomucina; así como las glándulas tubulares que segregan a su vez la ovoalbúmina y la lisozima, dependiendo la síntesis de todas ellas de las hormonas esteroideas del ovario. En el magnum del oviducto de pollo recién nacido se puede observar histológicamente, el *epitelio luminal* y el *estroma*. En el epitelio luminal se pueden observar células epiteliales, en el estroma células del estroma, y formación de algunas fibras musculares y las rodean las células de la serosa. En el animal adulto la lámina epitelial consiste de células columnares. La lámina propia, contiene numerosas glándulas tubulares ramificadas las cuales están revestidas por epitelio cuboidal o columnar. Los gránulos de secreción se presentan a lo largo del epitelio apical. El tejido conjuntivo de la lámina propia de la submucosa es de tipo areolar con tejido linfático difuso; en este caso son típicas la túnica muscular y el peritoneo.



**Figura 14.** Inmunolocalización de los receptores a progesterona (RP) en el mágnun de oviductos de pollos recién nacidos y en gallina ponedora.

- A)** Control. (Recién nacido).
- B)** Tratamiento con FSH. (Recién nacido).
- C)** Adulto.
- D)** Control negativo. (Recién nacido).
- E)** Control negativo. (Adulto).

Epitelio (**E**), estroma (**S**), células glandulares (**G**), las (**→**), indican las células RP-inmunorreactivas. La barra representa 10  $\mu\text{m}$ .

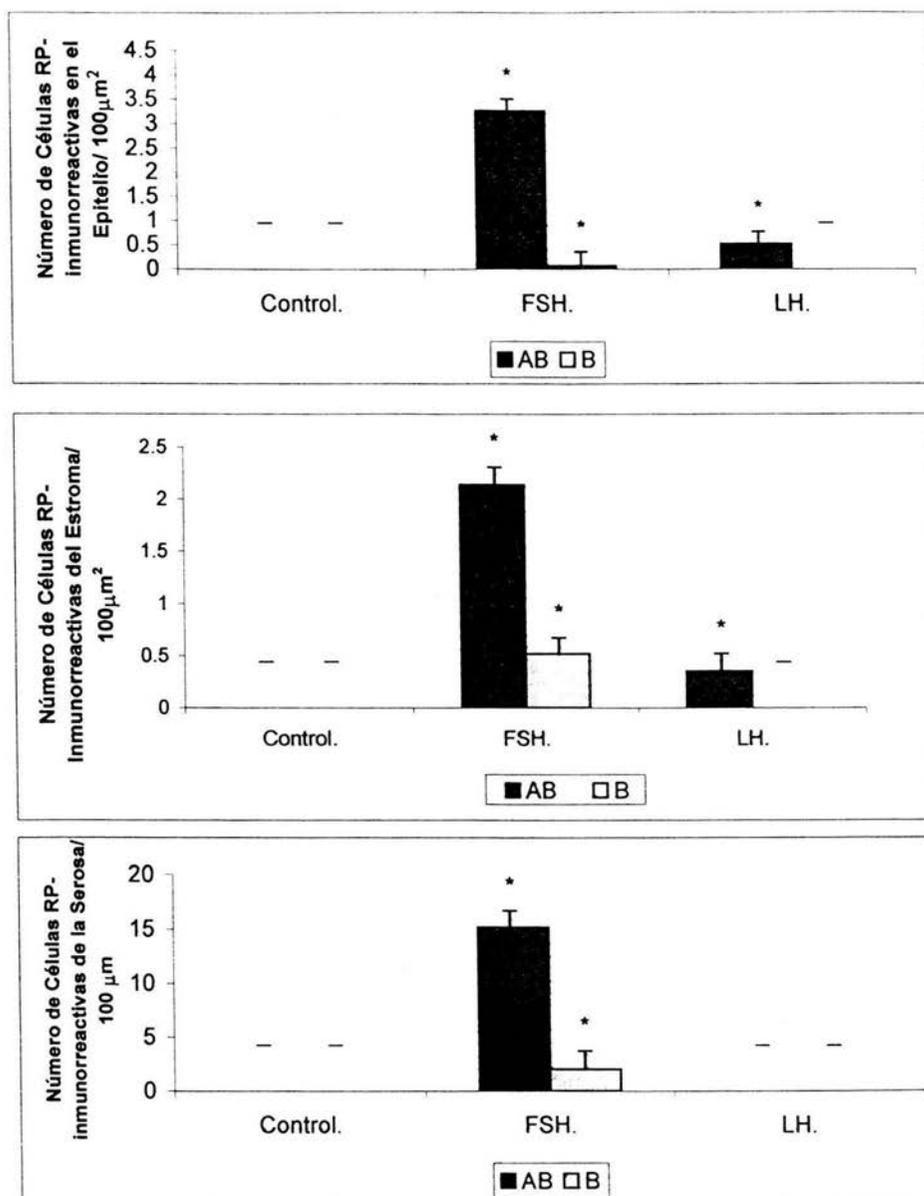
## Comparación de la respuesta de las Células RP- Inmunorreactivas entre los tratamientos.

Se observaron las laminillas tratadas con los anticuerpos RP-AB y RP-B en el microscopio fotónico para identificar los tipos celulares que presentan RP en el epitelio luminal y el estroma del magnum del oviducto de pollo recién nacido.

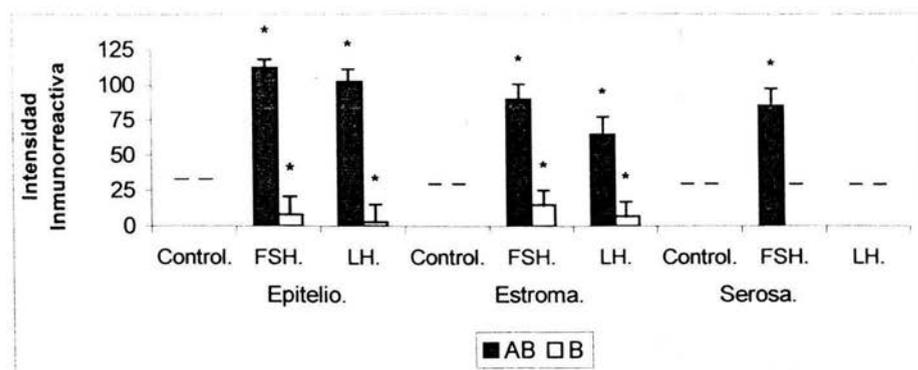
En el grupo control del magnum de oviductos de pollos recién nacidos no se encontraron células RP-inmunorreactivas en el epitelio luminal, ni en el estroma ni tampoco en la serosa. En el grupo tratado con FSH se induce la expresión de células RP-inmunorreactivas en el epitelio luminal, estroma y serosa, mostrando una mayor respuesta al anticuerpo PgR Ab-8 (que reconoce la isoforma A y la B) que al PgR Ab-6 (que sólo reconoce la isoforma B). El grupo tratado con LH mostro una respuesta mucho menor en cuanto al número de células RP-inmurreactivas al anticuerpo PgR Ab-8 que en FSH en el epitelio luminal y en el estroma, pero en la serosa no se encontraron células RP-inmunorreactivas, ante el anticuerpo PgR Ab-6 , no presentó células RP-inmunorreactivas. (figura 15).

La intensidad inmunorreactiva (IIM) mostro que en el epitelio luminal se presenta una mayor IIM que en el estroma tanto en FSH como en LH, mientras que en la serosa su IIM fue menor en FSH, no existiendo en LH. (Figura 16).

Comparando la respuesta entre las isoformas RP-AB y RP-B entre los grupos tratados con FSH y LH, fue mayor en RP-AB, ya que en RP-B casi no existió marca, por lo que la isoforma dominante del receptor a progesterona fue la A.



**Gráfica 15.** Efecto de la FSH y LH en el número de células RP-inmunorreactivas del magnum del oviducto izquierdo de pollos recién nacidos. N = 7. (—) = No hubo reacción. Los datos están representados como la media  $\pm$  error estándar. \* P < 0.05. Células Epiteliales FSH vs Control y LH; LH vs Control y FSH. Células del Estroma FSH vs Control y LH; LH vs Control y FSH. Células de la Serosa FSH vs Control y LH.



**Gráfica 16.** Efecto de la FSH y la LH sobre la intensidad inmunorreactiva entre los las distintas poblaciones subcelulares del magnum del oviducto izquierdo de pollos recién nacidos que presentan RP. N = 7. (—) = No hubo reacción. \* P < 0.05. Células Epiteliales FSH vs Control y LH; LH vs Control y FSH. Células del Estroma FSH vs Control y LH; LH vs Control y FSH. Células de la Serosa FSH vs Control y LH.

## Oviducto de Gallina Ponedora.

Se utilizó un oviducto de la gallina ponedora como control positivo, debido a que se sabe que en este tejido se presentan las dos isoformas del RP.

Los tipos celulares medidos fueron las células del epitelio, glándulas tubulares, musculares y del peritoneo.

Los resultados indican que las células del epitelio, glándulas tubulares, musculares y del peritoneo son RP- inmunorreactivas y mostraron muy poca diferencia entre su respuesta al RP-AB y RP-B.

La intensidad inmunorreactiva en las células del epitelio y de las glándulas tubulares tuvo muy poca diferencia entre RP-AB y RP-B, pero las células musculares y las del peritoneo tuvieron un ligero aumento de la isoforma RP-B contra la isoforma RP-A.

Al comparar la respuesta entre la intensidad de RP-A y RP-B, se determinó que se presentaban las dos isoformas del RP. (Tabla 1).

**Tabla 1.** Número de células RP-inmunorreactivas e intensidad inmunorreactiva en las distintas poblaciones celulares del magnum del oviducto de gallina ponedora.

<b>Tipos Celulares.</b>		<b>Número de Células RP- inmunorreactivas.</b>	<b>Intensidad Inmunorreactiva.</b>
<b>Epitelio/100<math>\mu\text{m}^2</math>.</b>	RP-AB	0.48 $\pm$ 0.05	106.61* $\pm$ 2.14
	RP-B	0.44 $\pm$ 0.06	53.95 $\pm$ 2.20
<b>Glándulas Tubulares/100<math>\mu\text{m}^2</math>.</b>	RP-AB	0.218 $\pm$ 0.04	107.8* $\pm$ 2.4
	RP-B	0.200 $\pm$ 0.03	57.06 $\pm$ 1.98
<b>Músculo/100<math>\mu\text{m}^2</math>.</b>	RP-AB	0.159 $\pm$ 0.03	116.42* $\pm$ 2.9
	RP-B	0.161 $\pm$ 0.03	65.73 $\pm$ 2.3
<b>Peritoneo/100<math>\mu\text{m}</math>.</b>	RP-AB	8.09 $\pm$ 0.75	117.96* $\pm$ 2.3
	RP-B	8.10 $\pm$ 1.12	64.13 $\pm$ 2.2

Los valores están representados como la media  $\pm$  desviación estándar. \* P < 0.05. RP-AB vs RP-B en todos los tipos celulares.

## **DISCUSIÓN.**

La progesterona es una hormona importante para la regulación de la función reproductiva normal en el sexo femenino, esta acción biológica de la progesterona está regulada por receptores intracelulares que se presentan en dos isoformas llamadas RP-A y RP-B, siendo RP-A una forma truncada de RP-B (Park-Sarge y Mayo, 1994; Graham y Clarke, 1997).

El interés de nuestro trabajo fue el identificar el tipo de isoforma del RP presente en el ovario y el oviducto izquierdo de pollos recién nacidos y cuantificar el estímulo de las hormonas gonadotrópicas en la expresión de los RP.

De las dos zonas histológicas reconocibles en el ovario de pollo recién nacido, la corteza fue la que presentó una mayor distribución de los receptores tanto en las células del epitelio germinal y germinales (ovogonias y ovocitos). Hay evidencia que nos indica que en el ovario de las aves la ovogénesis empieza hacia el 8° día de desarrollo embrionario relacionándolo con la síntesis de esteroides (Romanoff, 1960; Sauveur y Reviers, 1992). Guichard *et al.* (1977) reporta que en las gónadas de embriones de pollo hembra de 7.5 a 18 días de incubación la progesterona aumenta del día 7.5 al 15, siendo el incremento más importante entre los días 12 y 13, lo que nos dice que las hormonas esteroides ya tienen acción desde los primeros días de desarrollo embrionario.

En la médula se observaron RP en las células intersticiales, las cuales presentan actividad estereoidogénica (Getty, 1982). Entre las células intersticiales varía la intensidad inmunorreactiva entre células, lo que podría indicar una diferente concentración de RP. En el adulto estas células forman las células de la teca donde se han localizado receptores de RP.

Existen muy pocos trabajos que identifiquen los RP en el embrión de aves, Gasc (1991) encontró que el día 6 de incubación se pueden encontrar núcleos marcados en la médula de ambas gónadas, pero no en el epitelio germinal, lo cual se observó hasta el día 8. El día 9 se presentaron los cambios más significativos en la corteza de la gónada izquierda, sobre todo a nivel del epitelio germinal. A partir del día 10 hubo un incremento a nivel de la corteza y en la médula profunda entre las células de los canales lacunares. En la gallina adulta Isola (1987) encontró receptores en el epitelio germinal, células de la teca, células de la granulosa y células del estroma, pero no en las células germinales, de hembras de 2 a 4 semanas de edad.

Estos resultados coinciden con los nuestros con respecto a los tipos celulares que presentan receptores, aunque no se reporta la presencia de receptores en las células germinales

(ovogonias y ovocitos). Además, esta distribución de los RP en el ovario de pollos recién nacidos corrobora los resultados obtenidos en trabajos anteriores en nuestro laboratorio.

Los resultados obtenidos en el ovario del pollo recién nacido nos indican que la isoforma dominante fue la RP-B, pero no se puede negar la presencia de la isoforma RP-A, la cual no se ha podido aislar para aplicarse sola, dentro de las células blanco durante esta etapa.

Nuestros resultados demostraron que el tratamiento con la FSH en la corteza ovárica induce un aumento en el número de células RP-inmunoactivas en las células del epitelio germinal y germinales con respecto al control y al grupo LH, en cuanto a la intensidad inmunoactiva no hubo mucha diferencia entre los tres grupos tratados. En las células germinales del ovario inmaduro de pollo no se habían reportado RP, pero 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 el estado de blastocisto (Hou y Gorski, 1993; Gorski y Hou, 1995). En la médula ovárica se observaron cambios como respuesta a las hormonas gonadotrópicas en cuanto al número de células RP-inmunoactivas y la intensidad inmunoactiva sobre todo a nivel de las células intersticiales ya que con la FSH hay un incremento de células intersticiales e intensidad inmunoactiva, disminuyendo ambas ante el estímulo con LH. Algunos trabajos histomorfométricos sobre el ovario de pollo recién nacido, han demostrado que la FSH induce la división mitótica en las distintas subpoblaciones celulares del ovario de pollo recién nacido, a diferencia de la LH que no induce división mitótica en ninguna población celular del ovario, pero induce una mayor esteroidogénesis y desarrollo ovarico (González-Morán y Calderón, 2000).

Yoshimura *et al.* (1995) y Sawada *et al.* (1997) reportan que en las células de la granulosa de gallina la LH induce la expresión de RP, no así la FSH. También este último encontró que aparte de la isoforma A de 79 kDa y la isoforma B de 110 kDa se encontraba una isoforma de 80 kDa (A'), la cual había sido reportada por Sullivan *et al.* (1988) en oviducto de pollos de 2 semanas los cuales fueron tratados con progesterona, sugiriendo que esta última isoforma es la especie más activa.

Estos reportes sugieren que los mecanismos de regulación de la expresión de los RP pueden cambiar al ir madurando los componentes celulares del ovario, ya que nosotros encontramos que en la etapa de recién nacido la FSH incrementa la expresión de los receptores a progesterona a diferencia del tratamiento con LH que disminuye el número e intensidad inmunoactiva de las células intersticiales.

Uniendo estos resultados con los anteriores parece demostrar que existe una relación entre el incremento en el número de células y la expresión de los RP, lo cual sería muy interesante

estudiar. Esto indicaría que la FSH induce una alta regulación (up-regulation) y la LH una baja regulación (down-regulation) de los RP en las células intersticiales de la médula ovárica.

En el oviducto de pollos recién nacidos no encontramos receptores a RP-A o RP-B, siendo confirmado este resultado por el estudio realizado por Gasc (1991) quien no encontró RP en el oviducto de pollos durante las primeras etapas de desarrollo embrionario y González- Morán y Camacho-Arroyo (1998) en oviductos de pollo recién nacidos.

Ante el estímulo por las hormonas gonadotrópicas FSH y LH, en el oviducto hubo una mayor respuesta ante la FSH, ante la cual se presentó un mayor desarrollo en el epitelio luminal y una mayor diferenciación en comparación al oviducto tratado con LH. La isoforma dominante que se expresó ante la presencia de gonadotropinas fue la RP-A, mostrando respuesta en las células del epitelio luminal, del estroma y de la serosa ante la FSH.

La aparición de la isoforma RP-A en el magnum del oviducto ante el estímulo por FSH en esta etapa de desarrollo puede explicarse por que en el magnum se realiza la síntesis de ovoalbúmina, cuyo promotor puede ser activado por la isoforma RP-A pero no por la RP-B (Kastner *et al.*, 1990a.).

La FSH produjo una variación en cuanto a la pared del epitelio luminal del oviducto de pollos recién nacidos tratados con FSH, en comparación con el oviducto del grupo control y del grupo LH entre los que no hubo mucha diferencia. Además la presencia del RP-A coincide con los resultados obtenidos por González-Morán y Camacho-Arroyo (1998), que reportan la presencia de un epitelio pseudoestratificado con invaginaciones de la luz hacia el estroma subyacente donde se inicia la formación de las glándulas tubulares. Ellos sugieren que los RP no son inducidos directamente por la FSH en el oviducto, sino que es una inducción indirecta a través de la síntesis de estradiol en el ovario lo que puede ser responsable de que se observen efectos por la inducción o represión de proteínas que jueguen un papel crucial en la citodiferenciación del magnum. En nuestras observaciones fue en las invaginaciones del epitelio donde se encontraron más núcleos RP-inmuno-reactivos, que en otras áreas del epitelio.

Syvälä *et al.* (1996) reportó que en pollos de 2 semanas ante el tratamiento por estrógeno había un aumento de los RP, existiendo una disminución ante una combinación de estrógeno/ progesterona o con progesterona sola y que la concentración de la isoforma RP-A era regulada por el estrógeno, mientras que la concentración de la isoforma RP-B no sufría cambios, por lo que la forma de regulación de ambas isoformas es diferente, pero RP-A puede funcionar como un supresor de la función de RP-B.

Comparando la respuesta encontrada en el oviducto embrionario con el adulto encontramos que en adulto se encuentran ambas isoformas sin presentar una dominancia definitiva de alguna de las dos, ya que según lo reportado por Boyd y Spelsberg (1979), la ausencia de la isoforma RP-A, es causante de la esterilidad de las gallinas durante el periodo de fin de invierno-principio de primavera y lo reportado por Boyd-Leinen *et al.* (1984), la ausencia de la isoforma RP-B en gallinas viejas o jóvenes estériles indica dos formas de regulación diferentes para cada isoforma lo cual hay que seguir investigando.

Con base en estos resultados podemos concluir que las hormonas gonadotrópicas inducen respuestas diferentes en la expresión de los RP y el tipo de isoforma dominante del RP, depende del órgano, tipo celular y su estadio de desarrollo.

## **CONCLUSIONES**

- En el ovario del pollo recién nacido la isoforma dominante de los RP en todos los tipos celulares es la RP-B.
- En el magnum del oviducto de pollo recién nacido no se expresan los receptores a progesterona.
- La FSH induce la expresión de RP en los distintos tipos de células tanto del ovario como del oviducto de pollo recién nacido.
- La LH disminuye la expresión de los RP en las células intersticiales de la médula ovárica.
- La isoforma dominante del RP expresada en el ovario de pollos recién nacidos por efecto de la hormonas gonadotrópicas es la RP-B.
- La isoforma dominante del RP expresada en el oviducto de pollos recién nacidos por efecto de la hormonas gonadotrópicas es la RP-A.
- En el magnum del oviducto de gallina adulta se expresan ambas isoformas del RP.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Aitken, R. N. C. 1971. Oviduct. In "**Physiology and Biochemistry of the Domestic Fowl**". F. J. Bell y B. M. Freeman, eds. Vol 3. Academic Press. New York / London. p.p. 1237-1289.
2. Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. y Watson, J. D. 1987. **Biología Molecular de la Célula**. Omega. Barcelona, España. p.p. 767-819.
3. Álvarez-Fernández, G., Juárez, Oropezca, M. A., Velázquez, P., González del Pliego, M., Méndez-Herrera, M. C. y Pedemera, E. 1995. Newly hatched chick ovarian cell subpopulations metabolize distinctively progesterin and androgen precursors. *Gen. Comp. Endocrinol.* **97**:31-41.
4. Bahr, J. M. y Nalbandov, A. V. 1977. Reproducción Aviar. En "**Reproducción en los animales domésticos**". H. H. Cole y P. T. Cupps, ed. 3a. ed. Acribnia, España. p.p. 453-472
5. Balinsky, B. J. 1983. **Introducción a la Embriología**. 5 ed. Omega. España. p.p. 485-500.
6. Banks, W. J. 1984. **Histología Veterinaria Aplicada**. 2a. ed. Manual Moderno. México. p.p. 655-657.
7. Baxter, J. D. 1996. Conceptos generales en endocrinología. En "**Endocrinología básica y clínica**". 3a. ed. F. S. Greenspan y J. D. Baxter, ed. Manual Moderno. México. p.p. 1-71.
8. Bolander, F. F. 1994. **Molecular Endocrinology**. 2nd. ed. Academic Press. San Diego. p.p. 118-143.
9. Boyd, P. y Spelsberg, T. C. 1979. Seasonal changes in the molecular species and nuclear binding of the chick oviduct progesterone receptor. *Biochem.* **18**:3685-3690.
10. Boyd-Leinen, P. A., Fournier, D. y Spelsberg, T. C. 1982. Nonfunctioning progesterone receptors in the developed oviducts from estrogen-withdrawn immature chicks and aged nonlaying hens. *Endocrinol.* **111**:30-36.

11. Carson-Jurica, M. A., Lee, A. T., Dobson, A. W., Conneely, W., Schrader, W. T. y O'Malley, B. W. Interaction of the chicken progesterone receptor with heat shock protein (Hsp) 90. *J. Steroid biochem.* **34**:1-9.
12. Castello Riobet, J. A., Lleonart Roca, F. C., Campo Chavarri, J. L. y Orozco Piñán, F. 1989. **Biología de la Gallina**. Real Escuela de Agricultura. Barcelona, España. p.p. 113-134.
13. Conneely, O. M., Kettelberger, D. M., Tsai, M. J., Schrader, W. T. y O'Malley, B. W. The chicken progesterone receptor A and B isoforms are products of an alternate translation initiation event. *J. Biol. Chem.* **264**(24):14082-14084.
14. Conover, W. J. 1980. **Practical non parametric statistics**. 2nd. ed. New York. John Wiley and Sons Inc. p.p. 229-237.
15. De Alba, J. 1985. **Reproducción Animal**. La Prensa Médica Mexicana. México. p.p. 501-522.
16. DeMarzo, A. M., Beck, C.A., Oñate, S. A. y Edwards, D. P. 1991. Dimerization of mammalian progesterone receptors occurs in the absence of DNA and is related to the release of the 90-kDa heat shock protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **88**:72-76.
17. Dyce, K. M., Sack, W. O. Y Wensing, C. J. G. 1991. **Anatomía Veterinaria**. Editorial Médica Panamericana, S.A. Argentina. p.p. 816-818.
18. Eckert, R., Randall, D., y Augustine, G. 1989. **Fisiología Animal: mecanismos y adaptaciones**. 3a. ed. Interamericana-McGraw-Hill. p.p. 266-328.
19. Eyal-Giladi, 1981. Avian primordial germ cells are of epiblastic origin. *J. Embriol. Exp. Morphol.* **65**:139.147.
20. Ganong, W. F. 1998. **Fisiología médica**. 16a. ed. Manual Moderno. p.p. 399-426.
21. García López, P. 1995. Reproducción aviar. Fisiología de la puesta. En "**Fisiología Veterinaria**". Interamericana-Mc Graw-Hill. España. p.p. 999-1012.

22. Gasc, J. M. 1991. Distribution and regulation of progesterone receptor in the urogenital tract of the chick embryo. *Anat. Embryol.* **183**: 415-426.
23. Getty, R. 1982. **Anatomía de los animales domésticos**. 5a. Ed. Salvat Editores, S. A. México. p.p. 2122-2141.
24. Gilbert, A. B. 1971a. The Ovary. In "**Physiology and Biochemistry of the Domestic Fowl**". Vol 3. F. J. Bell y B. M. Freeman, eds. Academic Press. New York / London. p.p. 1163-1208.
25. Gilbert, A. B. 1971b. The Endocrine Ovary in Reproduction. In "**Physiology and Biochemistry of the Domestic Fowl**". Vol 3. F. J. Bell y B. M. Freeman, eds. Academic Press. New York / London. p.p. 1149-1168.
26. Gilbert, S. F. 1997. **Developmental Biology**. 5 th. ed. Sinaver Associates, Inc. Publishers. Massachusetts, U.S.A. p. p. 848-849.
27. Goldfien, A. y Monroe, S. E. 1996. Ovarios. . En "**Endocrinología básica y clínica**". 3a. ed. F. S. Greenspan y J. D. Baxter, ed. Manual Moderno. p.p. 485-544.
28. González del Pliego, M., González-Morán, G. y Pedemera E. 1988. Ultrastructure of the ovarian medulla in the newly hatched chick treated with human corionic gonadotropin. *Cell Tissue Res.* **253**:665-670.
29. González, C. B., Charreau, E. H., Aragonés, A., Lantos, C. P. y Follet, B. K. 1987. The ontogenesis of reproductive hormones in the female embryo of the domestic fowl. *Gen. Comp. Endocrinol.* **68**:369-374.
30. González-Morán, G. 1996. **Técnicas en biología celular: teoría y práctica**. AGT. Editor. S.A. 208p.
31. González-Morán, G. y Calderón, S. 2000. Effect of luteinising-hormone *in vivo* on ovarian cell subpopulations of newly-hatched chicks. *Br. Poult. Sci.* **41**:494-501.
32. González-Morán, G. y Camacho-Arroyo, I. 1998. Histomorphometric and progesterone receptor immunohistochemical analysis in the oviduct of newly hatched chicks treated with follicle-stimulating hormone during embryonic development. *Anat. Histol. Embryol.* **27**:277-282.

33. González-Morán, G., Ballinas, O. y Pedernera, E. 1993. Histomorphological changes in the chicken oviduct after  $17\beta$ -estradiol treatment during embryonic development. *Rev. Zool. ENEPI*. **5**:13-22.
34. 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.
35. Gorski, J. y Hou, Q. 1995. Embryonic estrogen receptors: do they have a physiological function?. *Environ Healt Perspect.* **103**(suppl 7):69-72.
36. Graham, J. D. y Clarke, C. L. 1997. Physiological action of progesterone in target tissues. *End. Rev.* **18**:502-519.
37. Granner, D. K. 1999. Hormonas de las gónadas. En "**Bioquímica de Harper**" 14a. ed. R. K. Murray, P. A. Matyes, D. K. Granner y V. W. Rodwell, eds. Manual Moderno. México. p.p. 665-681.
38. Haffen, K. 1977. Sexual differentiation of the ovary. In "**The Ovary**". Vol 1. Lord Zuckerman y Barbara Weir, eds. Academic Press. New York. p.p. 75-79.
39. Hardisty, M. W. 1978. Primordial germ cells and the Vertebrate germ line. In "**The Vertebrate Ovary**". Jones, R. E. Ed. Plenum Press. New York / London. p.p. 1-37.
40. Heap, R. B. y Flint, A. P. F. 1977. Progesterone. In "**Reproduction in Mammals: Mechanisms of Hormone Action**". Vol 7. Austin, C. R. y Short, R. N. Eds. Cambridge University Press. Great Britain. p.p. 185-232.
41. Hoffman, G. y Völker, H. 1969. **Anatomía y fisiología de las aves domésticas**. Acribia. Zaragoza. España. 190 pp.
42. Hora, J. M., Goldberger, A., Horton, M. y Splesberg, T. C. 1987. Nuclear components responsible for retention of steroid hormone receptor complexes: specific acceptor protein-DNA complexes for the avian oviduct progesterone receptor. In "**Steroid Hormone Receptors. Their Intracellular Localisation**". C. R. Clark, ed. Ellis Horwood. Great Britain. p.p. 61-85.

43. 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.
44. Houillon, Ch. 1978. **Sexualidad**. Omega. Barcelona, España. p.p. 201.
45. Isola, J., Korte, J. H. y Tuohimaa, P. 1987. Immunocytochemical localization of progesterone receptor in the chick ovary. *Endocrinol.* **121**: 1034-1040.
46. Johnson, A. L. 1986. Reproduction in the Female. In "**Avian Physiology**". P. D. Sturkie, ed. 4th. Edition. Springer-Verlag. New York. p.p. 403-431.
47. Kastner, P., Krust, A., Turcotte, B., Stropp, U., Tora, L., Gronemeyer, H. y Chambon, P. 1990a. Two distinct estrogen-regulated promoters generate transcripts encoding the two functionally different human progesterone receptor forms A and B. *EMBO J.* **9**:1603-1614.
48. Kastner, P., Bocquerel, M. T., Turcotte, B., Garnier, J. M., Horwitz, K. B., Chambon, P. y Gronemeyer. 1990b. Transient expression of human and chicken progesterone receptors does not support alternative translational initiation from a single mRNA as the mechanism generating two receptors isoforms. *J. Biol. Chem.* **265**(21):12163-12167.
49. Kato, J., Hirata, Sh., Nozawa, A. And Mouri, N. 1993. The ontogeny of gene expression of progesterone receptors in the female rat brain. *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.* **47**:173-182.
50. Kolb, E. 1987. **Fisiología Veterinaria**. Vol. 2. Acribia. España. p.p. 794-799.
51. Kosano, H., Stensgard, B., Charlesworth, M. C., McMahon, N. y Toft, D. 1998. The assembly of progesterone receptor-hsp 90 complexes using purified proteins. *J. Biol. Chem.* **273**:32973-32979.
52. Kost, S. L., Smith, D. F., Sullivan, W. P., Welch, W. J. y Toft, D. O. 1989. Binding of heat shock proteins to the avian progesterone receptor. *Mol. Cell. Biol.* **9**:3829-3838.
53. Kraus, W. L., Weis, K. E. y Katzenellenbogen, B. S. 1995. Inhibitory cross-talk in between steroid hormone receptors: differential targeting of estrogen receptor in the repression of its transcriptional activity by antagonist by agonist- and antagonist-occupied progesterone receptors. *Mol. Cell. Biol.* **15**(4):1847-1857.

54. Landers, J. P. y Spelsberg, T. C. 1992. New concepts in steroid hormone action: transcription factors, proto-oncogenes, and the cascade model for steroid regulation of gene expression. *Crit. Rev. Eukaryot. Gene Exp.* 2(1):19-63.
55. Lehninger, A. L. 1991. **Bioquímica**. 2a. ed. Omega. Barcelona, España. p.p. 817-838.
56. Merchant-Larios, H. 1978. Ovarian differentiation. In "**The Vertebrate Ovary**". Jones, R. E. Ed. Plenum Press. New York / London. p. p. 47-81.
57. Michel, G. y Schwarze, E. 1980. **Compendio de Anatomía Veterinaria**. Vol. 5. Acribia. España. p.p. 108-113.
58. Mulvihill, E. R., LePenne, J. P. y Chambon, P. 1982. Chicken oviduct progesterone receptor: location of specific regions of high-affinity binding in cloned DNA fragments of hormone-responsive genes. *Cell*. 24:621-632.
59. Norris, D. O. 1997. **Vertebrate endocrinology**. 3th. ed. Academic Press. New York. p.p. 69.
60. O'Malley, B. W. y Strott, C. A. 1993. Hormonas esteroides: metabolismo y mecanismo de acción. En "**Endocrinología de la Reproducción. Fisiología, Fisiopatología y manejo clínico**". 3a. ed. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires, Argentina. p.p. 179-202.
61. Park-Sarge, O. K. and Mayo, K. E. 1994. Molecular biology of endocrine receptors in the ovary. In "**Molecular Biology of the Female Reproductive System**". J. K. Findlay, ed. Academic Press. p.p. 153-169.
62. Pasanen, S., Ylikomi, T., Syvälä, H. y Tuohimaa, P. 1997. Distribution of progesterone receptor in chicken: novel target organs for progesterone and estrogen action. *Mol. Cell. End.* 135:79-91.
63. Pérez Palacios, G., Larrea, F., Cerbón, M. A. y Vilchis, F. 1995. Metabolismo de hormonas esteroides. En "**Bioquímica**". 2a. ed. Zagoya, J. C. y Hick Gómez, J. J. eds. Interamericana-Mac Graw-Hill. p.p. 640-666.
64. Prieto, J. C. 1991. Hormonas hipotalámicas, hipofisarias, tiroideas y esteroideas. En "**Bioquímica. Aspectos estructurales y vías metabólicas**". E. Herrera, ed. 2a. ed. Interamericana-McGraw-Hill. México. p.p. 1145-1172.

65. Romanoff, A. R. 1960. **The Avian Embryo**. MacMillan, New York. p.p. 783-812.
66. Sauveur, B. y Reviere, M. 1992. **Reproducción de las Aves**. Mundi-Prensa. España. p. p. 37-77.
67. Savouret, J. F., Rauch, M., Redeuilh, G., Sar, S., Chaucherau, A., Woodruff, K., Parker, M. G. y Milgrom, E. 1994. Interplay between estrogens, progestins, retinoic acid and AP-1 on a single regulatory site in the progesterone receptor gene. *J. Biol. Chem.* **269**(46):28955-28962.
68. Sawada, Y., Yoshimura, Y. y Tamura, T. 1997. Effects of gonadotropins and their second messengers on the induction of progesterone receptor in chicken granulosa cells *in vitro*: evidence for its dependency on luteinizing hormone and cyclic AMP and relationship to follicular growth. *Jpn. Poult. Sci.* 3494-102.
69. Scanes, C. G. 1986. Pituitary Gland. In "**Avian Physiology**". P. D. Sturkie, ed. 4th. Edition. Springer-Verlag. New York. p. p. 383-402.
70. Schraeder, W. T. and O'malley, B. W. 1972. Progesterone-binding components of chick oviduct. IV. Characterization of purified subunits. *J. Biol. Chem.* **247**:51-59.
71. Smith, D. F., Stensgard, B. A., Welch, W. J. y Toft, D. O. 1992. Assembly of progesterone receptor with heat shock proteins receptor activation are ATP mediated events. *J. Biol. Chem.* **267**(2):1350-1356.
72. Spelsberg, T. C., Steggle, A. W., Chytil, F. y O'Malley, B. W. 1972. Progesterone-binding components of chick oviduct. V. Exchange of progesterone-binding capacity from target nontarget tissue chromatin. *J. Biol. Chem.* **247**(5):1368-1374.
73. Stryer, L. 1995. **Bioquímica**. 4a. Ed. Reverté. España. p. p. 685-711.
74. Sturkie, P. D. 1967. **Fisiología Aviar**. Acribia. España. p. p.359- 365.
75. Syväälä, H., Pekki, A., Bläuer, M., Pasanen, S., Mäkinen, E., Ylilomi, T. and Tuohimaa, P. 1996. Hormone-dependent changes in A and B forms of progesterone receptor. *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.* **58**:517-524.

IZT.

76. Syväälä, H., Vienonen, A., Ylicomi, T., Bläuer, M., Zhuang, y. H. Y Tuohimaa, P. 1997. Expresion of the chicken progesterone receptors forms A and B is differentially regulated by estrogen *in vivo*. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **231**:573-576.
77. Tokarz, R. R. 1978. Oogonial proliferation, oogenesis, and folliculogenesis in nonmammalian vertebrates. In **"The Vertebrate Ovary"**. Jones, R. E. Ed. Plenum Press. New York / London. p. p. 165-170.
78. Turcotte, B., Meyer, M. E., Bellard, M., Dretzen, G., Gronemeyer, H. y Chambon, P. 1991. Control of transcription of the chicken progesterone receptor gene. *In vitro* and *in vivo* studies. *J. Biol. Chem.* **266**(4):2582-2589.
79. Wells, J. M. y Gilbert, A. B. 1984. Steroid Hormone Production by the Ovary. In **"Physiology and Biochemistry of the Domestic Fowl"**. Vol 5. F. J. Bell y B. M. Freeman, eds. Academic Press. New York / London. p. p. 323-343..
80. Wen, D. X., Xu, Y. F., Mais, D. E., Goldman, M. E. y MacDonell, D. P. 1994. The A and B isoforms of the human progesterone receptor operate through distinct signaling pathways whitin target cells. *Mol. Cell. Biol.* **14**(12):8356-8364.
81. Woods, J. M. 1987. Maturation of the hypothalamo-adenohypophyseal-gonadal (HAG) axes in the chick embryo. *J. Exp. Zool. Suppl.* **1**:265-271.
82. Yoshimura, Y. y Bahr, J. M. 1991. Localization of progesterone receptors in pre-and postovulatory follicles of the domestic hen. *Endocrinol.* **128**:323-330.
83. Yoshimura, Y., Okamoto, T. y Tamura, T. 1995. Effects of luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone on the progesterone receptor induccion in chicken granulosa cells *in vivo*. *Poult. Sci.* **74**:147-151.



U.N.A.M. CAMPUS