



Universidad Nacional
Autónoma de México

Facultad de Medicina

“Cambios en la distribución de las
ovogonias en el ovario de embrión
de pollo inducidos por TGF β 1”

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
LICENCIADO EN INVESTIGACION BIOMEDICA
BASICA

PRESENTA

JOSE RENE ESCALONA MUGICA

DIRECTOR DE TESIS:

Dr. ENRIQUE PEDERNERA ASTEGIANO

MEXICO, D.F.

2006

Facultad de Medicina





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

AGRADECIMIENTOS

A mis padres:

Por apoyarme en todo momento respetando mis decisiones, sin importar cuan malas hubiesen sido y sobre todo por aguantar mi peculiar carácter (pero ni modo querían tener hijos). Sin ustedes no habría llegado hasta aquí.

A mi hermano:

Por su valiosa compañía durante todos estos años, por esos divertidos momentos que hemos pasado y por ser la futura promesa del diseño en México.

A los Drs. Enrique Pedernera y Carmen Méndez:

Por permitirme realizar este trabajo en su laboratorio, por su valiosa asesoría, por el apoyo que me brindaron y sobre todo por la paciencia que tuvieron conmigo.

A Verónica Rodríguez Mata:

Por su ayuda en la realización de las técnicas histológicas.

A los sinodales:

Por su crítica objetiva y valiosos comentarios que mejoraron notablemente esta tesis.

A la QFB Carmen Mondragón:

Por su invaluable apoyo técnico durante la elaboración de este trabajo.

A la Bióloga Nallely Cabrera:

Por su asesoría en las técnicas de biología molecular usadas en esta tesis así como en mi servicio social.

A Valentín Mendoza y al Dr. Fernando López Casillas:

Por habernos proporcionado amablemente el β glicano soluble usado en nuestros experimentos.

A mis compañeros de generación (Genaro, José, Valeria, Marco, Ana y Georgina):

Por su amistad y por todos esos buenos momentos que pasamos, que hicieron leve el tormento de la licenciatura.

Al lab 225 Norte del IFC (Paola, Ana, Miguel Ángel y José Miguel):

Por aceptarme como un miembro más de su laboratorio y haberme brindado su amistad.

A mis compañeros del laboratorio de embriología (Leti, Carmen, Oscar, Lupita, y Rodrigo):

Por su compañía y toda la ayuda que me brindaron para realizar esta tesis.

A mis amigos de la perpa Libertad, el Broder, Monse, Diego; y por supuesto a la banda Erick, Alejandro, Marco e Isaac:

Por su invaluable amistad (todas esas increíbles anécdotas que compartimos) y por siempre creer en mí.

A la Dra. Ana Maria Ceballos:

Por ser una magnífica tutora y por la increíble paciencia que tuvo conmigo en mi primera rotación.

A la Dra. Georgina Garza:

Por darme la oportunidad de trabajar a su lado, por ser un magnífico ejemplo y por todo lo que aprendí de ella.

A la Dra. Gloria Hernández y a todos los miembros del lab 201 Oriente del IFC:

Por todo lo que me enseñaron y por todo el apoyo que me brindaron durante mi rotación y para realizar mi tesis.

A la Dra. Rosa Navarro:

Por ser mi primer acercamiento a la biología del desarrollo, lo cual me permitió definir el tema que quería desarrollar en mi tesis.

A Susana Cano y a la Sra. Celia Villena por su apoyo en la realización de este trabajo.

Este trabajo fue realizado con el apoyo de PAPIIT (IN214403) y del CONACYT (45030-Q)

Índice

1.	Resumen.....	1
2.	Antecedentes.....	2
3.	Introducción.....	5
3.1	Desarrollo gonadal en el embrión de pollo.....	7
3.2	Estructura de las células germinales primordiales en las aves.....	9
3.3	Origen y migración de las células germinales en las aves.....	10
3.4	Migración celular.....	11
3.5	El sistema TGF- β	13
2.4.1	Receptores para el TGF- β	14
2.4.2	Unión del ligando y la activación del receptor del TGF- β ..	15
2.4.3	Vías alternas de señalización del TGF- β	16
3.6	La familia de las GTPasas Rho como reguladores de la migración.....	17
4.	Objetivos.....	18
.		
5.	Material y Métodos.....	19
5.1	Material biológico.....	19
5.2	Reactivos.....	19
5.3	Equipo.....	20
5.4	Cultivo organotípico.....	20
5.5	Cuantificación del número de células germinales y somáticas...20	
5.6	Distribución de las ovogonias en el ovario.....	21
5.7	Extracción de RNA y síntesis de cDNA.....	22
5.8	PCR.....	23
6.	Resultados.....	24

6.1	El TGF- β 1 reduce el número de células somáticas del ovario, sin afectar el número de ovogonias.....	24
6.2	La reducción en el número de células somáticas inducido por TGF- β 1 no es reversible.....	24
6.3	Histología del ovario cultivado.....	24
6.4	El TGF- β 1 cambia la distribución de las ovogonias en el ovario cultivado por 72 h.....	25
6.5	El efecto del TGF- β 1 sobre la distribución de las ovogonias es reversible.....	25
6.6	Efecto local del TGF- β 1 sobre el ovario.....	26
6.7	Expresión del mRNA del receptor II para TGF- β en el ovario de embrión de pollo de 9 días.....	27
6.8	Figuras.....	28
7.	Discusión.....	35
8.	Conclusiones.....	39
9.	Perspectivas.....	40
10.	Bibliografía.....	41
11.	Abreviaturas.....	50
12.	Apéndices.....	51

Resumen

Mientras que los mecanismos que regulan la llegada de las células germinales hacia el primordio gonadal han sido estudiados por diversos grupos en varios organismos modelo, los mecanismos que regulan la distribución de las células germinales dentro de la gónada no son del todo claros.

En este trabajo evaluamos el efecto del TGF- β 1 sobre la distribución de las células germinales en el ovario de embrión de pollo. El TGF- β y otros miembros de la superfamilia del TGF- β son conocidos factores reguladores del desarrollo gonadal y folicular; este hecho lo hace particularmente atractivo para evaluar sus efectos sobre la distribución de las células germinales. El tratamiento con TGF- β induce una migración transitoria de las células germinales de la corteza hacia la médula sin afectar el número total de células germinales, lo cual puede sugerir que la distribución normal de las células germinales en la gónada es un proceso activo, muy probablemente modulado a través de una molécula que ejerza algún efecto quimiotáctico sobre ellas, que vea afectado su patrón de expresión con el tratamiento con TGF- β .

El estudio de factores involucrados en regular el destino de las células germinales dentro de la gónada, aportará evidencias de que el desarrollo de diversos tipos celulares en la gónada debe estar coordinado no sólo de una manera temporal sino también de manera espacial, para la histogénesis temprana del ovario, para la diferenciación en ovogonias y para permitir el inicio del desarrollo folicular.

Antecedentes

A pesar del interés sobre la naturaleza migratoria de las células germinales primordiales (CGP) en el embrión de pollo, los mecanismos de esta migración han sido poco estudiados. Originalmente se había propuesto que en las aves, las CGP abandonaban el sistema circulatorio mecánicamente; es decir, quedaban atrapadas en los finos vasos capilares de la región gonadal (Kuwana et al., 1999). Esta hipótesis quedó parcialmente descartada, debido a que se encontró que los capilares de la región de la cabeza y saco vitelino son más angostos y por lo tanto más susceptibles a atrapar a las células germinales. Sin embargo, un 23% de las CGP quedan atrapadas en regiones adyacentes a la gónada (Kuwana et al., 1999), lo que sugiere que en la migración de las CGP podrían estar implicados factores mecánicos y moleculares.

En el ratón, se han centrado la mayoría de las investigaciones en el área de migración de las CGP. Uno de los primeros esfuerzos por caracterizar los mecanismos moleculares de la migración de las CGP en el ratón, fue realizado por el grupo de Wylie (1991). Este grupo propuso que el TGF- β 1 tiene dos efectos sobre la población de células germinales primordiales: primero que inhibe la proliferación de estas en cultivo *in vitro* y segundo, que posee un efecto quimiotáctico sobre las CGP cultivadas sobre una capa de fibroblastos. Este estudio también muestra que la cresta genital atrae a las CGP y este efecto puede deberse al TGF- β 1, ya que anticuerpos neutralizantes del TGF- β 1 contrarrestan esta atracción. Se han propuesto dos modelos para este efecto: que se debe a un efecto directo, en el cual las CGP presentan receptores específicos para TGF- β 1 y responden a un gradiente de concentración de la señal, o segundo que el TGF- β 1 estimula la secreción de componentes de la matriz extracelular y/u otros factores que podrían facilitar la migración. Además, se ha demostrado que el TGF- β induce la migración en otros tipos celulares como son las células epiteliales de conejo (Boland et al., 1996; Zicha et al., 1999) y las células cebadas humanas (Olsson et al., 2000), a través de la activación de las GTPasas Rho.

Estudios posteriores usando ratones mutantes en el receptor I del TGF- β (Alk5^{-/-}) demuestran que la señalización del TGF- β por ALK5 no tiene efecto antiproliferativo sobre las CGP (de Sousa Lopes et al., 2005). Sin embargo el comportamiento migratorio de las CGP mutantes se alteró, ya que las células abandonaron el intestino posterior y colonizaron la gónada antes que las células silvestres, por lo que se sugirió que el TGF- β no actúa como un quimiotrayente. Este grupo propone que probablemente el mecanismo de acción del TGF- β sea indirecto, a través de un aumento en la secreción de colágena I, la cual restringe la migración de las células germinales del intestino posterior al mesenterio, en su migración hacia la gónada.

Recientemente, se han comenzado a estudiar los mecanismos moleculares de la migración de las CGP en el embrión de pollo; donde hay evidencias de que el factor derivado de células estromales 1 α (SDF-1 α), a través de su receptor de siete dominios transmembranales acoplado a proteína G (CXCR4), está involucrado en guiar a las CGP en su migración del torrente sanguíneo hacia la gónada. El RNAm del SDF-1 α es expresado a lo largo de la ruta migratoria de las CGP y su expresión fuera de la gónada ocasiona la localización ectópica de las CGP en esa misma zona (Stebler et al., 2004).

Es posible especular sobre una posible interacción entre el SDF-1 y el TGF- β para regular la migración de las CGP; ya que se ha demostrado que el pretratamiento con TGF- β aumenta la respuesta al SDF-1 en algunos tipos celulares, como por ejemplo en los linfocitos T, induciendo un aumento en el número de células migrando con un gradiente de SDF-1. Este hecho se produce a través de un aumento de la expresión del receptor de SDF-1, de la polimerización de actina inducida por SDF-1 y de la fosforilación de Pyk2, una cinasa de adhesión focal involucrada en la migración mediada por integrinas (Frantza et al., 2002).

Por otro lado, se ha demostrado la expresión de TGF- β 2 en la gónada embrionaria, el cual es expresado tanto en el ovario como en el testículo durante el desarrollo embrionario (Hattori et al., 2002). Además se ha

encontrado que el TGF- β 2 es un inhibidor de la proliferación de las CGP en un sistema *in vitro* en medio libre de suero (Fujioka et al., 2004).

Mientras que los mecanismos que regulan la llegada de las células germinales hacia el primordio gonadal han sido estudiados por diversos grupos en varios organismos modelo, los mecanismos que regulan la distribución de las células germinales dentro de la gónada no son del todo claros. El estudio de los factores involucrados en regular el destino de las células germinales dentro de la gónada, aportaría evidencias de que el desarrollo de diversos tipos celulares en la gónada debe estar coordinado no solo de una manera temporal sino también de manera espacial, para un desarrollo normal de la gónada. En este trabajo nos interesamos en estudiar el papel del TGF- β 1 en la distribución de las ovogonias dentro del ovario de embrión de pollo, mediante el uso de un modelo de cultivo de órgano *in vitro*.

Introducción

Todos los organismos que se reproducen sexualmente se originan a partir de la unión de dos gametos; estos gametos (ovocito y espermatozoide) provienen de las células germinales primordiales (CGP). La unión de estos dos gametos da lugar a un ovulo fertilizado, el cual es totipotencial; es decir tiene las condiciones para generar un organismo completo (Wylie, 1999).

En las aves como en otros vertebrados, las CGP se localizan fuera de la gónada, por lo que deben llegar a ella para diferenciarse en espermatogonias u ovogonias, que son las células precursoras de los gametos. Las CGP en las aves tienen la particularidad de migrar, desde la creciente germinal hasta la gónada en desarrollo, a través del torrente sanguíneo.

En el ratón, las CGP se visualizan en los estadios E7-E7.5 en la región del intestino posterior y en estos estadios no son móviles. Hasta el E9.5 es cuando comienzan a migrar activamente hacia la cresta urogenital; alrededor del E11.5 la mayoría de las células ha alcanzado la gónada (Bendel-Stenzel et al., 1998); entonces las células germinales pierden su movilidad y es hasta el E12.5 cuando las células se organizan en cordones en el macho y de manera aleatoria en la hembra (Morrish et al., 2002). Para el E13 las CGP del macho entran en detención mitótica y las de la hembra entran en meiosis (Bendel-Stenzel et al., 1998).

Se ha demostrado *in vitro* que la cresta genital, puede atraer a las CGP, aún cuando no se ha determinado la molécula responsable de esta actividad (Godin et al., 1990). Algunas moléculas necesarias durante la migración de las CGP son: el receptor de membrana con actividad de cinasa tirosina c-Kit y su ligando "steel" ("kit ligand"), expresados en las CGP y en las células somáticas, respectivamente (De Miguel et al., 2002). Es posible que la señalización a través del sistema "c-kit/Steel," juegue un papel permisivo para la proliferación y la supervivencia de las CGP durante su migración. El principal candidato, para ser la molécula guía de las CGP durante su migración, es el factor

derivado de células estromales 1 (SDF-1), una quimiocina cuyo receptor (CXCR4) se expresa en las CGP, mientras que el ligando es secretado en la cresta genital (Molyneaux et al., 2003).

Al igual que en muchos procesos de migración, las CGP se asocian con la matriz extracelular y las células que la rodean. Las glucoproteínas de la matriz extracelular y sobre todo la fibronectina juegan un papel importante en la migración celular (Hynes et al., 1980); por ejemplo, en ratón las células germinales carentes del receptor para fibronectina tienen una migración deficiente hacia la gónada (Anderson et al., 1999).

Además de los estudios referidos anteriormente en los que se describe los factores que tienen un papel quimioatrayente (Molyneaux et al., 2003; de Sousa Lopes et al., 2005), así como la importancia de la matriz extracelular, especialmente la fibronectina (Anderson et al., 1999); hay autores que proponen que la migración es pasiva y depende de los movimientos morfogénéticos durante del desarrollo (Freeman, 2003). Lo más probable es que la llegada de las CGP a la gónada sea resultado de la combinación de ambos mecanismos.

El estudio de la migración de las células germinales tiene importantes implicaciones clínicas, ya que se ha calculado que el 3% de los tumores pediátricos malignos son de células germinales; además más del 50% de estos tumores, y el 18% de los tumores de células germinales en adultos se originan fuera de la gónada (Gobel et al., 2000). Así, se ha sugerido, que estos tumores podrían provenir de células germinales ectópicas que fallaron en morir (Schneider et al., 2001). Los sitios de localización extragonadal más frecuentes de estos tumores más frecuentemente son: el mediastino, la región sacrococcígea y algunas partes del sistema nervioso central como la glándula pineal y la neurohipófisis. Por otro lado, los tumores de CGP representan el 95% de los tumores de testículo y el 30% de los tumores de ovario (Ueno et al., 2004).

Desarrollo gonadal en el embrión de pollo

La determinación del sexo en aves al igual que en otros vertebrados, es proporcionada por los cromosomas; en las aves los machos portan dos cromosomas sexuales Z, mientras que las hembras portan un cromosoma Z y uno W (Fig. 1). Este último tiene una secuencia parecida a la del cromosoma Y de mamíferos, sin embargo estos no se consideran como homólogos (Saitoh et al., 1991).

Debido a que no se ha encontrado un homólogo del gen *Sry* (gen de la región sexual en el cromosoma Y), no se ha podido establecer un mecanismo básico de determinación gonadal (McBride et al., 1997). Así, se ha propuesto que el sexo puede ser determinado por la dosis del cromosoma Z o bien por un factor determinante de ovario en el cromosoma W (Smith & Sinclair, 2001).

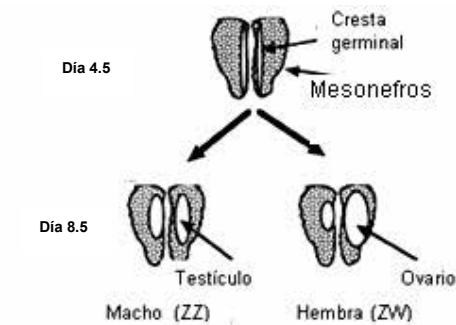


Fig. 1. Determinación genética del sexo.

La gónada se forma en estadios tempranos del desarrollo embrionario, aproximadamente al día 3.5 de incubación (d.i.) (estadio 22, Hamburger & Hamilton, 1992); y surge como un engrosamiento a lo largo de la superficie ventromedial del mesonefros. En esta etapa la gónada está recubierta por una capa epitelial derivada del epitelio celómico (corteza), y por debajo de esta se encuentra la estructura denominada médula, que se compone de cordones de células somáticas (cordones primarios) separados por mesénquima (Smith & Sinclair, 2004). A los 5.5 d.i. (28 HH.) se forma una gónada bipotencial, en la cual los sistemas urogenitales izquierdo y derecho son idénticos tanto en hembras como en machos (Morris & Sinclair 2002).

Alrededor de los 6.5 d.i. comienza el proceso de diferenciación gonadal. En los embriones ZW solo la gónada izquierda se convertirá en ovario, el cual está caracterizado por presentar una fragmentación de la médula y una hipertrofia del epitelio germinal (Carlson & Stahl, 1985).

Entre los 8 y 9 d.i. (35 HH.) la corteza crece por la proliferación de las células germinales y somáticas; la médula aumenta significativamente de tamaño a expensas de los cordones sexuales (originados a partir de los cordones primarios), y se forman espacios lacunares. En este estadio, la médula presenta dos capas: una capa subcortical y una capa reticular interna con grandes intersticios. La gónada derecha sigue inicialmente el desarrollo hacia ovario, pero debido a influencias corticales la proliferación celular se detiene, más tarde toda la estructura involuciona quedando como un vestigio (Morris & Sinclair, 2001; Smith & Sinclair, 2004).

Después del d.i. 13 las células germinales entran en profase meiótica. Las células de la teca y de la granulosa probablemente derivan de células somáticas corticales que rodean a las células germinales, o de células de la médula que migran hacia la corteza (Smith & Sinclair, 2004).

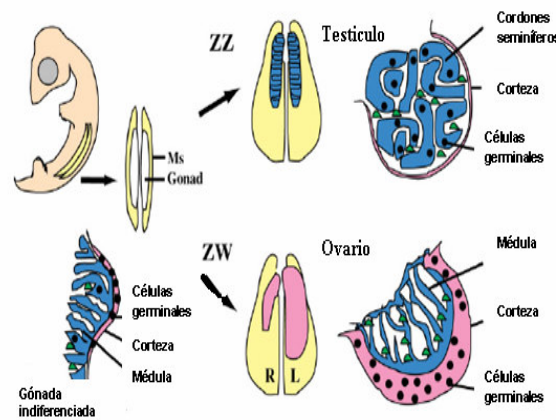


Fig. 2. Resumen de la diferenciación gonadal (Modificado de Smith & Sinclair, 2001).

Por otro lado, la gónada en embriones ZZ se diferencia hacia testículo, el cual presenta un epitelio germinal menos desarrollado, con cordones sexuales primarios solamente (que darán lugar a los cordones seminíferos) y se presenta una mayor cantidad de estroma entre dichos cordones. A diferencia de las hembras en los machos se presenta un tamaño relativamente similar entre la gónada izquierda y la derecha; además de que las células germinales se encuentran prácticamente ausentes de la corteza (Smith & Sinclair, 2001) (Fig. 2).

Se han aislado y estudiado en el pollo, los patrones de expresión de los genes homólogos de mamíferos, que están involucrados en dirigir el desarrollo gonadal (Smith et al., 1997; Haines et al., 1996). Se ha demostrado que estos genes conservan en el pollo un patrón de expresión similar al de sus contrapartes en mamíferos; por ejemplo el gen Sox9, que codifica para un factor de transcripción de la familia SOX, está conservado estructuralmente y se

expresa específicamente en machos de mamíferos, aves y reptiles (Kent et al., 1996). Además del gen Sox9, se ha analizado la expresión de genes que codifican para una glucoproteína que sólo se expresa en machos; la hormona inhibidora de los conductos de Muller los cuales de otra manera se convertirían en oviductos, útero y cervix (Smith & Sinclair., 2004).

Otro gen de importancia para el desarrollo del ovario es gen el que codifica para la enzima P450_{aromatasa}, que es necesaria para la esteroidogénesis. Este complejo enzimático convierte la testosterona en estradiol, el cual es crítico para diferenciación gonadal en hembras. El receptor para estrógenos alfa (RE α) es expresado en las gónadas de ambos sexos, mientras que la P450_{aromatasa} sólo se expresa en las gónadas de la hembra (Smith et al., 1997). Esta enzima es detectable desde los 6.5 d.i., es decir desde el inicio de la diferenciación gonadal (Villalpando et al., 2000). La P450_{aromatasa} se expresa principalmente en los cordones medulares del ovario, mientras que el RE α en la corteza, esto señala al estradiol como el responsable de la proliferación cortical. El RNAm del RE α se expresa en niveles inferiores en la gónada derecha respecto a la izquierda, lo cual puede explicar su incapacidad para crecer y diferenciarse en ovario (Andrews et al., 1997). Estos hechos representan la adquisición de funciones diferentes en el testículo y en el ovario (Eusebe et al., 1996; Yoshida et al., 1996). Además, estos resultados proveen evidencias de que el control genético de la determinación del sexo y del desarrollo gonadal está conservado a través de la escala filogenética.

Estructura de las células germinales en aves

Las CGP son grandes (entre 14 y 19 μm), y su forma varia entre redondas y ovoides. En algunas ocasiones las CGP tienen forma irregular debido a la presencia de pseudopodos. Su núcleo es esférico y excéntrico, de gran tamaño (incluso mayor que el

Célula
germinal
primordial

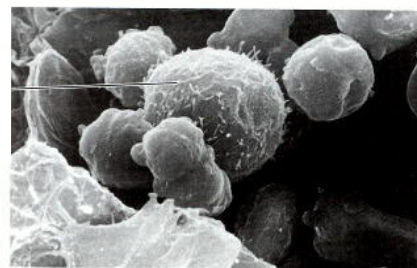


Fig. 3. Foto micrografía de una célula germinal de ave en la circulación sanguínea. Se reconoce por su tamaño de los demás tipos celulares (Gilbert, 2003).

de muchas células somáticas completas), y mide entre 8 y 10 μm (Fig. 3). Además, está rodeado por una envoltura nuclear muy evidente.

El aparato de Golgi de las CGP varía en apariencia, entre compacto y disperso en el citoplasma, llegando incluso a rodear al núcleo; sus mitocondrias se presentan distribuidas homogéneamente en el citoplasma, con un tamaño de 3-4 micras.

Una vez que las CGP son diferenciadas a ovogonias, su tamaño es ligeramente menor, y las mitocondrias se organizan alrededor del núcleo, en una estructura conocida como cuerpo de Balbiani (Romanoff, 1960; Ukeshima et al., 1991).

Origen y migración de las células germinales en las aves

En las aves las células germinales primordiales, al igual que las células de la cresta neural y las células sanguíneas, se originan lejos de sus ubicaciones definitivas. Surgen de las células del epiblasto, que migran desde la región central del área pelúcida hacia la creciete germinal en el hipoblasto (Gilbert et al., 2003) (Fig. 4).



Fig. 4. Creciente germinal de un embrión de pollo de 18 h. Las CGP están marcadas en negro (Gilbert, 2003).

Las CGP en pollo se detectan en estadios de desarrollo donde el embrión ha alcanzado un grado de desarrollo comparativamente mayor al de otros organismos (18 horas, 4 HH.); por ejemplo en *Ascaris* se ha podido establecer a la línea germinal, en una de las células resultantes de las primeras dos divisiones celulares (Romanoff, 1960; Gilbert et al., 2003).

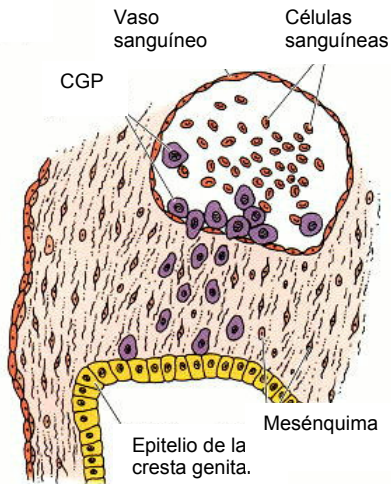


Fig. 5. Diagrama de la migración de las CGP a la gónada (Gilbert, 2003).

Cuando los vasos sanguíneos se forman en la periferia de la creciete germinal (HH. 10-11), las CGP entran en ellos y comienzan a circular por el disco embrionario. Esta es considerada la fase inicial de migración, en la cual las CGP se encuentran proliferando hasta el estadio 16 HH; luego las células germinales abandonan el torrente sanguíneo y migran hacia el primordio gonadal (Tsunekawa et al., 2000), donde se distribuyen asimétricamente con una mayor concentración en lado izquierdo (Clinton, 1998) (Fig. 5). Esta etapa de migración es similar a la

de otras especies, incluso es muy parecida a la de los leucocitos y de las células metastásicas (Stebler et al., 2004).

El mecanismo molecular por el cual las CGP abandonan el torrente sanguíneo y migran hacia la gónada ha sido poco estudiado. Experimentos en los cuales CGP purificadas del torrente sanguíneo fueron cultivadas entre el primordio gonadal y otros tejidos embrionarios demuestran una quimiotaxis hacia la gónada (Kuwana et al., 1999). Por otro lado, se ha comenzado a caracterizar el papel de ciertas quimiocinas como SDF-1 α (Stebler et al., 2004) y de factores de crecimiento como el TGF- β (de Sousa Lopes et al., 2005) que probablemente intervengan como reguladores de la migración de las células germinales en aves y mamíferos.

Migración celular

La migración celular juega un papel esencial durante el desarrollo embrionario, en la reparación de tejidos dañados y en la respuesta inmune, entre otros procesos. Este es un proceso activo que depende de la maquinaria intracelular (citoesqueleto), y la matriz extracelular. En muchos casos, las células muestran una locomoción dirigida hacia un atrayente soluble (quimiotaxis). Además, la migración celular se presenta en ciertas enfermedades como el cáncer, en el cual células metastásicas invaden otros tejidos (Franz et al., 2002).

Para que una célula migre direccionalmente debe ser capaz de detectar un gradiente de factores de crecimiento, quimiocinas o componentes de la matriz extracelular y polarizarse en esa dirección. Estos factores se unen a receptores de membrana, desencadenando una cascada de eventos, entre los que se incluyen activación de proteínas G, de cinasas de tirosinas, de factores de intercambio de nucleótidos de guanina, entre otros. Por ejemplo, en algunos tipos celulares se presenta la activación de la PI3K (una cinasa de fosfoinositidos de membrana), lo que ocasiona un gradiente de fosfoinositidos, que polariza la extensión del citoesqueleto en el extremo frontal. Esta polarización es posible a través de proteínas que contienen dominios con homología a *pleckstrina* (dominios PH) que se unen a dichos fosfoinositidos (Alberts et al., 2003).

Al migrar las células, su respuesta inicial a un quimioatrayente es extender proyecciones de la membrana celular en la dirección hacia la que va a migrar; estas pueden ser grandes y anchas (lamelipodios) o en forma de filamentos (filipodios). Dicha extensión es generada por la polimerización de componentes del citoesqueleto (actina), accionada por las GTPasas del tipo Rho y por sus efectores en respuesta a estímulos externos (Small et al., 2003). Dicha extensión es controlada a través de proteínas que estabilizan, cortan y ramifican los filamentos de actina o tubulina, o bien controlan la disponibilidad de los monómeros de actina (Pollard et al., 2003).

Las extensiones de la membrana citoplasmática se estabilizan mediante la unión a componentes de la matriz extracelular y a través de receptores de membrana, entre los que destacan la familia de las integrinas (Ridley, 2001). Al frente de la célula estos receptores actúan como sus “pies”, formando adhesiones para generar tracción; mientras que en el polo celular opuesto se genera un desensamble de estos puntos focales de adhesión para permitir la retracción de la célula (Geiger et al., 2001).

La migración celular no solo depende de las señales adecuadas, sino que en ocasiones requiere de la modificación de los componentes de la matriz extracelular (colágenas, fibronectina, lamininas, etc.), a través de la secreción

de proteasas (Sternlicht et al., 2001). Sin embargo, la degradación de componentes de la matriz extracelular no siempre es suficiente para permitir la migración, en ciertos casos es necesaria la modificación de estos componentes de la matriz extracelular o la producción de otros.

El sistema TGF- β

La superfamilia de proteínas del factor de crecimiento transformante beta comprende a los TGF- β 's, a las proteínas morfogenéticas del hueso (BMP's), a las activinas y otras proteínas relacionadas estructuralmente. El TGF- β controla un amplio número de procesos celulares entre los que están la proliferación celular (induce una detención de la mitosis en células hematopoyéticas, epiteliales, etc.), la diferenciación celular (en células mesenquimales), la apoptosis (células epiteliales, hepatocitos, etc.) y el desarrollo embrionario (Massagué, 1998).

Actualmente se conocen 5 isoformas del TGF- β ; los β 1, β 2 y β 3, que están presentes en mamíferos, la β 4 descrita en el pollo, la cual es considerada ortóloga al TGF- β 1 de mamíferos (Halper et al., 2004), y la β 5 en *Xenopus laevis*. La forma activa del

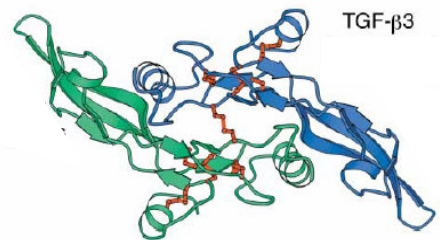


Fig. 6. Estructura de un dímero de TGF- β 3, los puentes de disulfuro se muestran en rojo (Adaptada de Massagué & Shy, 2003).

TGF- β es un heterodímero estabilizado por interacciones hidrofóbicas y por un puente disulfuro entre ambas subunidades (Fig. 6). La estructura secundaria de cada monómero consta de varias hojas beta unidas por tres puentes disulfuro conservados, a los cuales se les conoce como nudos de cisteínas (Sun, 1995).

El TGF- β es secretado como un complejo dimérico latente, el cual contiene al TGF- β maduro en su porción C-Terminal y en su dominio N-terminal se presenta la proteína asociada a la latencia (LAP). El dímero está unido por un puente disulfuro (Gentry et al., 1988). Durante su secreción, el TGF- β es escindido de la LAP, ambas porciones permanecen unidas mediante uniones no covalentes. A este complejo de TGF- β unido a su LAP se acopla una de las

cuatro proteínas de unión al TGF- β latente (LTBP's) (Dallas et al., 1994), que tienen el papel de almacenar al TGF- β latente en la matriz extracelular. Para que el TGF- β pueda unirse a su receptor, es necesario que se libere de la matriz extracelular, mediante la proteólisis de la LTBP por proteasas de serina. Además, se requiere de su activación, lo que involucra la disrupción de la interacción entre el TGF- β y la LAP por el efecto de enzimas.

Receptores para el TGF- β

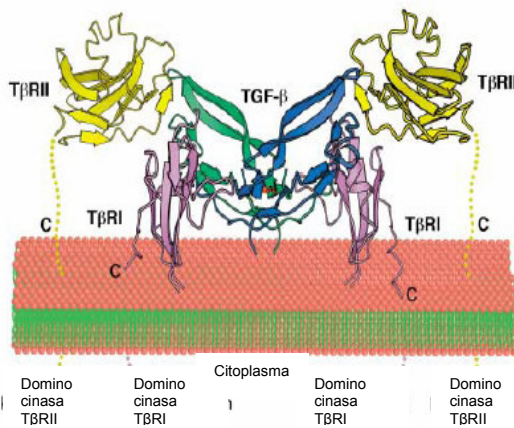


Fig. 7. Modelo del complejo de receptores de TGF- β unidos a su ligando (Adaptada de Shy & Massagué, 2003).

El receptor para el TGF- β es del tipo cinasa de serinas-treoninas, y de este receptor hay dos tipos (receptores tipo I y II). Ambos receptores son glucoproteínas que consisten de aproximadamente 500 aminoácidos, los cuales están organizados en un dominio N-terminal extracelular de unión al ligando, una región transmembranal y un dominio C-terminal, con un

dominio de cinasa de serinas/treoninas. Además, en los receptores tipo I se presenta un motivo rico en glicina y serina (GS) junto al dominio de cinasa; estos receptores (tipo I y II) se encuentran en la membrana en forma de homodímeros (Shi & Massagué, 2003).

Además de los receptores tipo I y II, existe el receptor tipo III (Cheifetz et al., 1987) o betaglicano y la endogлина; a estos receptores no se les conoce alguna función de señalización intrínseca, pero facilitan la unión del ligando a los receptores tipo I y II concentrándolo en la membrana celular. Algunos de estos receptores tienen un papel dual, por ejemplo el betaglicano facilita la unión del TGF- β a sus receptores (López-Casillas et al., 1993), pero también facilita la unión de la inhibina al receptor de activina disminuyendo la actividad estimulante de activina (Lewis et al., 2000).

Unión del ligando y la activación del receptor del TGF- β

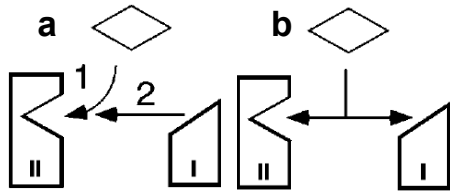


Fig. 8. Esquematización de la unión del ligando al receptor de la superfamilia del TGF β .

El ligando se une al dominio extracelular del receptor tipo II; esta unión permite la incorporación del receptor tipo I, formando un gran complejo que consta del ligando dímérico y cuatro moléculas de receptor; es decir, dos receptores tipo I y dos

receptores tipo II (Fig. 7). Se han propuesto dos modelos para explicar el ensamble del complejo de señalización de los miembros de la superfamilia del TGF- β . En el modelo secuencial la unión del ligando al receptor II, induce un cambio conformacional en el ligando lo cual expone el sitio de unión al receptor I (Hart et al., 2002) este es el mecanismo propuesto para TGF- β , activina y la hormona inhibidora de los conductos de Muller (Fig. 8a). En el modelo cooperativo ambos receptores se unen al ligando con alta afinidad cuando son expresados juntos y con baja afinidad cuando se expresan solos (Fig. 8b), precisamente este es el modelo propuesto para las proteínas morfogénicas del hueso 2 y 7 (BMP 2 y BMP 7), y para el factor de crecimiento y diferenciación 5 (GDF5).

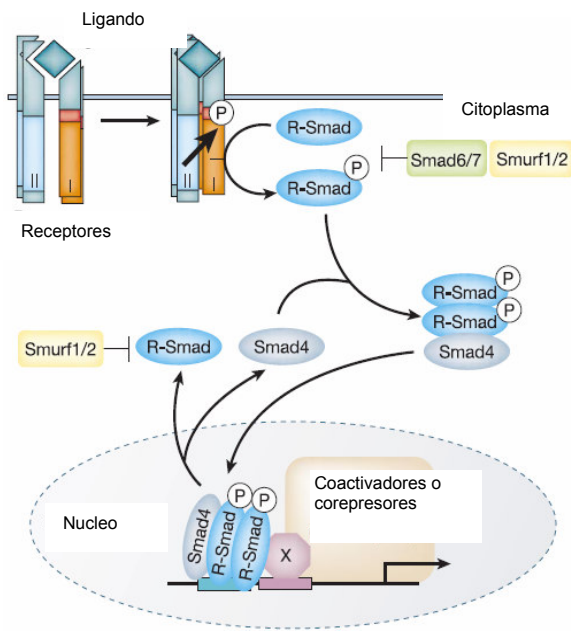


Fig. 9. Mecanismo general de la activación de la transcripción a través del receptor de TGF- β (Shy & Massagué, 2003).

La unión de los dominios extracelulares de ambos tipos de receptores induce un acercamiento y un cambio en la conformación de los dominios intracelulares; dichos eventos facilitan la fosforilación del receptor tipo I en residuos serina y treonina en el dominio GS, por el dominio de cinasa del receptor tipo II. Dicha fosforilación tiene dos efectos; libera al receptor de moléculas inhibitoras y permite la unión de las moléculas efectoras;

las proteínas Smad, las cuales son fosforiladas en su porción C-terminal por el receptor I.

Las Smads activadas por el receptor (R-Smads) son liberadas para formar un complejo heterotrimérico compuesto de dos R-Smads y una Smad común (Smad 4). Dicho complejo es traslocado al núcleo donde activa la transcripción de sus genes blanco, ya sea por la unión directa al DNA o mediante la interacción con otros factores de transcripción (Fig. 9).

Vías alternas de señalización del TGF- β

Además, de la transcripción mediada por las Smads, el TGF- β activa otras cascadas de señalización. Algunas de estas vías regulan la actividad de las Smads, mientras que otras inducen respuestas diferentes a la transcripción a través de las Smads. Existen evidencias de la activación de las cinasas de proteínas activadas por mitógenos (MAPK), de manera Smad independiente mediante una activación de Ras (Engel. et al., 1999; Yue et al., 2000). El TGF- β puede activar a TAK1, una MAPKKK (Yamaguchi et al., 1999), y también puede activar a las GTPasas de la familia RhoA (Bhowmick et al., 2001) (Fig. 10).

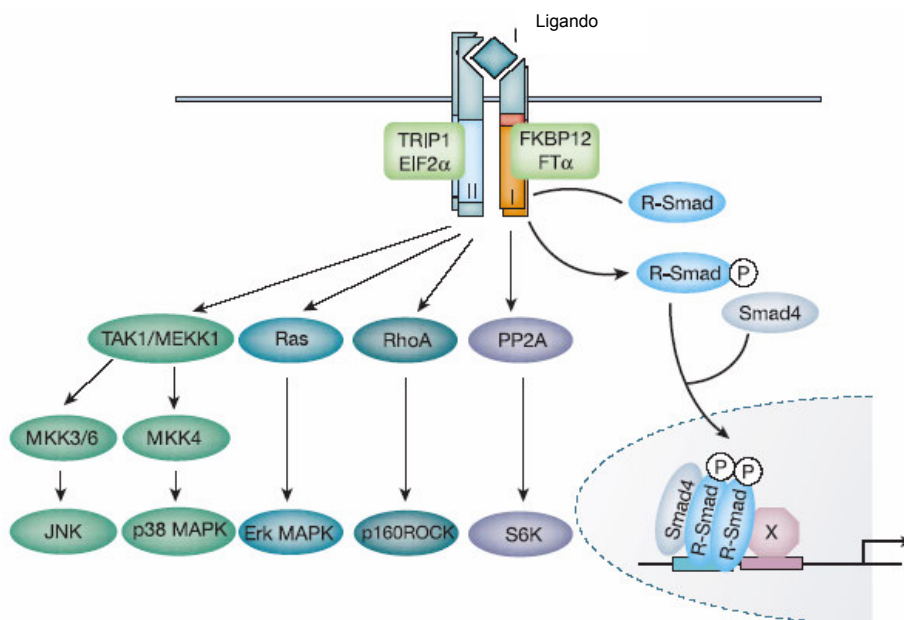


Fig. 10. Vías de señalización Alternas (Derynck et al., 2003).

La familia de las GTPasas Rho como reguladores de la migración celular

Las GTPasas Rho (Rho, Rac, Cdc42) actúan como intermediarios moleculares en las vías de transducción de señales, cambiando entre su forma inactiva unida a GDP y su forma activa unida a GTP la cual les permite interactuar con sus efectores para desencadenar una serie de respuestas intracelulares (Bishop & Hall, 2000), tales como la migración celular (Raftopoulou & Hall, 2004). Su ciclo está regulado por tres grupos de proteínas: a) factores de intercambio de nucleótidos de guanina (GEF), que intercambian el GDP por GTP para activarlas; b) proteínas activadoras de la actividad GTPasa (GAP), que regulan negativamente activando la actividad de GTPasa intrínseca de la proteína Rho, y c) por inhibidores de la disociación de nucleótidos de guanina (GDI) que mantienen a las proteínas en un estado inactivo unido a GDP (Moon & Zheng, 2003). Las señales extracelulares pueden regular el ciclo de activación de las GTPasas Rho a través de la regulación de la actividad de estas proteínas, principalmente sobre los GEF.

Se ha mostrado que la proteína Rho regula la formación de los filamentos contráctiles de actina-miosina, mientras que Rac y Cdc42 regulan la polimerización de actina para formar lamelipodios y filopodios respectivamente (Nobes et al., 1995; Ridley & Hall, 1992; Ridley et al., 2003). Además de sus efectos sobre actina, Rho, Rac y Cdc42 pueden actuar sobre los microtubulos y regular la transcripción de genes mediante distintas vías de señalización (Etienne-Manneville & Hall, 2002).

Las GTPasas Cdc42 y Rac juegan un papel crucial para dirigir la migración celular; ambas son requeridas al frente de la célula para regular la polimerización de actina y la protrusión de la membrana, de hecho, en una célula en migración se puede observar un gradiente de Rac activada, con la mayor concentración en el extremo frontal (Kraynov et al., 2000). Se cree que Rho regula las fuerzas de contracción requeridas en la parte media y posterior de la célula y posiblemente presenta una concentración inversa a Rac (Raftopoulou & Hall, 2004).

Objetivos

Objetivo General

- Evaluar los cambios inducidos por TGF- β 1 en la distribución de las ovogonias en el ovario de embrión de pollo.

Objetivos particulares

- Caracterizar la morfología del ovario de embrión de pollo de 9 días de incubación en cultivo y compararla con el ovario *in vivo*.
- Evaluar los efectos macroscópicos y microscópicos en la morfología del ovario de embrión de pollo inducidos por el TGF- β 1 y compararla con el ovario testigo.
- Comparar la distribución de las ovogonias en el ovario tratado con TGF- β 1 con la del ovario testigo.
- Determinar la reversibilidad de los efectos del TGF- β 1 sobre el ovario.
- Determinar el efecto del TGF- β 1 sobre el número de células somáticas y germinales.
- Determinar un posible efecto quimiotáctico del TGF- β 1 sobre las ovogonias.
- Determinar la expresión del RNAm del receptor II para TGF- β (T β R II), en el ovario de embrión de pollo de 9 d.i.

Material y métodos

Material biológico

Los embriones de pollo de 9 días se obtuvieron a partir de huevos fértiles, (White Leghorn) obtenidos de la granja avícola ALPES (aves libres de patógenos específicos, de Tehuacan, Puebla). Se incubaron a 37°C con 80% de humedad relativa.

Reactivos

El medio de cultivo Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), la tripsina, la albúmina serica bovina (AlbuMAX I), los antibióticos (penicilina, estreptomicina y glutamina) y el reactivo Trizol fueron de GIBCO BRL. El inhibidor de tripsina de soya fue adquirido de Fluka.

El cultivo de órganos se realizó en cajas de petri de 25 mm de diámetro (Nunc, Apogent), sobre membranas de policarbonato de 13mm de diámetro con poros de 1.0 μ M (Nucleopore, Whatman). Se esterilizó el medio con filtros de 0.22 μ M de Millipore.

El medio fue suplementado con factor de crecimiento transformante beta 1 humano recombinante (rhTGF β 1), de R&D Systems. Como inhibidor del TGF- β se uso betaglicano soluble; el cual fue proporcionado por el Dr. Fernando López Casillas, el cual fue preparado de acuerdo con Vilchis-Landeros et al, (2001). Para generar un gradiente de TGF β 1 se usaron perlas de acrílico recubiertas con heparina (Sigma-Aldrich).

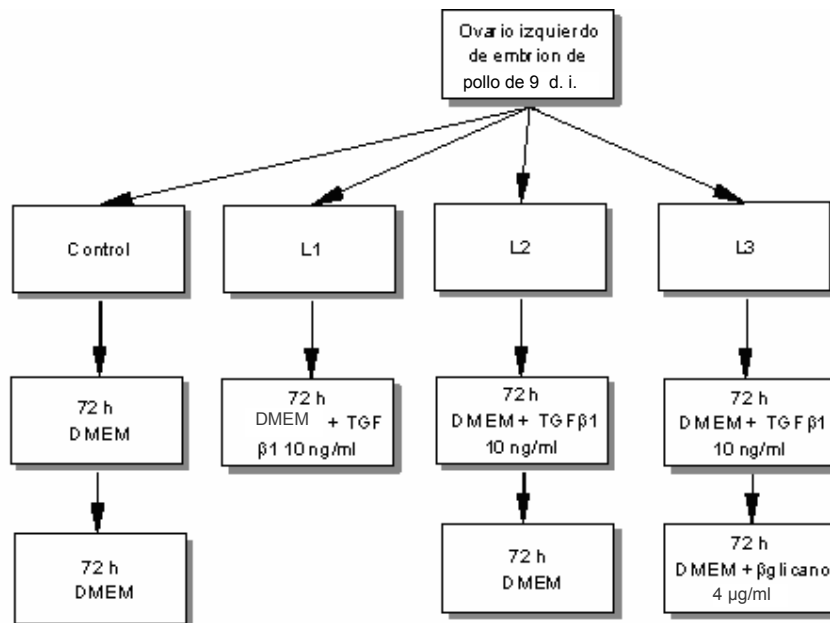
El Kit de síntesis de cDNA (1st Strand cDNA Synthesis kit) y la DNA polimerasa (AmpliTaq) fueron adquiridos de Roche, mientras que los oligonucleótidos fueron ordenados a Sigma Genosys.

Equipo

Para el análisis histológico del ovario se usó un microscopio Nikon, eclipse E600, para el análisis digital de las imágenes se usó el software Image-pro Plus 4.5 para Windows XP. Las reacciones de PCR se realizaron en un termociclador Mastercycler gradient (Eppendorf).

Cultivo organotípico

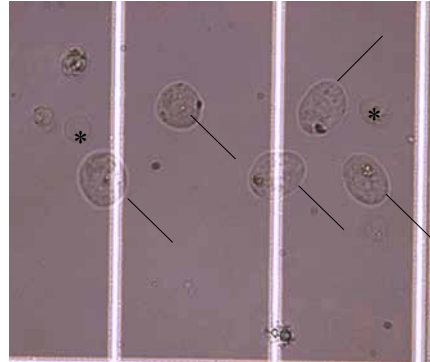
Se disectaron los ovarios izquierdos de embriones de pollo de 9 días de incubación, en condiciones estériles. Se cultivaron tres ovarios sobre una membrana de policarbonato en cajas de petri NUNCON de 25 mm con 2.5 ml de medio DMEM y 0.1% albúmina, a 37°C y 5% CO₂ bajo el siguiente esquema:



Cuantificación del número de células germinales y somáticas

Para la cuantificación del número de células germinales y somáticas por ovario, después de los tratamientos mencionados, las gónadas se incubaron en tripsina al 0.1% en solución salina balanceada, libre de calcio y magnesio (250 μl/ovario) (Apéndice I), durante 10 min. a 37°C con agitación de 90

ciclos/minuto. Al terminar la incubación se disgregó el ovario mecánicamente con un pipeta Pasteur siliconizada de punta flameada; luego se agregó el mismo volumen de inhibidor de tripsina al 0.2% disuelta en DMEM y albúmina 0.1% (250 μ l/ovario). Las células fueron cuantificadas con un hematocitómetro, es posible distinguir a las células germinales por su tamaño de entre 14 y 19 μ m (mayor al de cualquier otro tipo celular del ovario), su forma redonda u ovoide, su núcleo excéntrico y el cuerpo de Balbiani; como se ve en la figura. Se promediaron los resultados de varios casos de los diferentes tratamientos, y se les realizó una prueba de t Student y un análisis de varianza, seguido de la prueba de Tukey (n=5-8 ovarios).



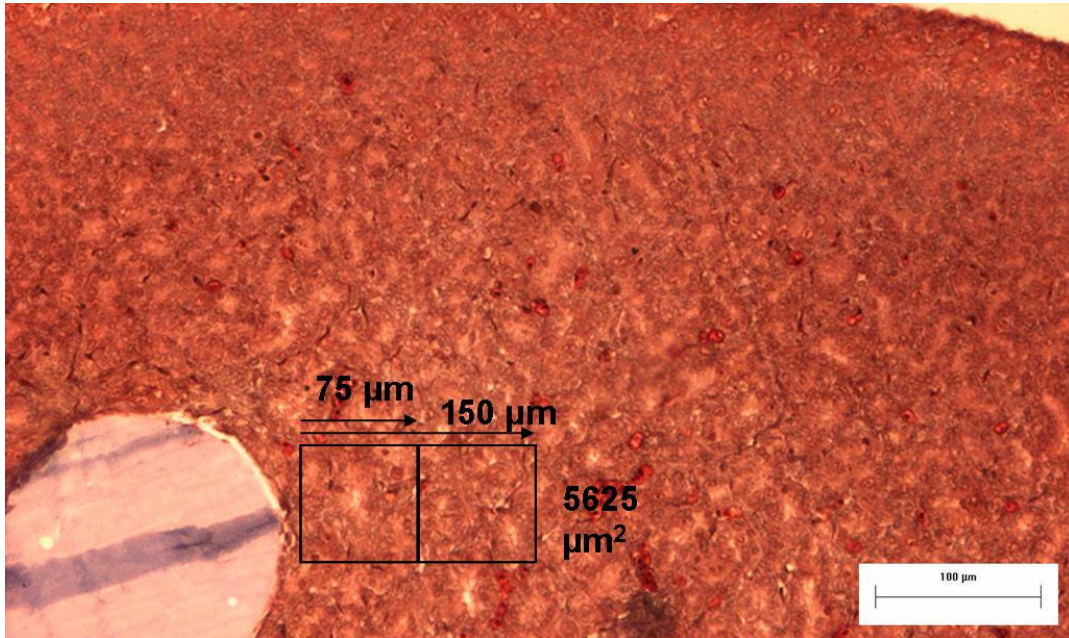
Fotomicrografía (40X) de suspensión de células de ovario de embrión de pollo. Las ovogonias (→) se distinguen de los otros tipos celulares (*).

Distribución de las ovogonias en el ovario

Los ovarios se fijaron en solución de Bouin durante 2 h a TA, fueron deshidratados en concentraciones crecientes de alcohol (30-100%), se incluyeron en parafina (punto de fusión 56° C), se obtuvieron cortes de 5 μ m de grosor y se tiñeron con la tinción tricrómica de Masson para su análisis morfológico (Apéndice I).

En el ovario del embrión de pollo de 9 d.i., las células germinales se localizan en la corteza del ovario (siendo prácticamente inexistentes en la médula); y para determinar su migración hacia otras partes del ovario se siguió la siguiente estrategia: se cuantificó el número de células germinales en un área de 10,000 μ m² en la corteza (la cual comprende 75 μ m desde la superficie del ovario hacia la médula). En varios cortes seriados de cada ovario se cuantificaron varias zonas representativas de la corteza y se promediaron, y se repitió un esquema similar para la médula. Se promediaron los resultados de varios casos de los diferentes tratamientos, y se les realizó un análisis estadístico (n=6-8 ovarios).

Para generar el gradiente de concentración de TGF- β 1, se impregnó una perla de heparina con TGF- β , sumergiéndolas en 5 μ l de TGF- β 1 a 100 ng/ μ l o en PBS (Testigo) durante 1h. La perla se colocó sobre los ovarios en la caja de cultivo y se cultivaron durante 72 h. Se cuantificó la densidad de células germinales a dos distancias de la perla, de 0-75 y 75-150 μ m en cuadros de áreas iguales (5625 μ m²) como se observa en la siguiente figura:



Se promediaron los resultados de al menos tres mediciones por ovario de cada una de las distancias de la perla (P). Se promediaron los resultados de varios casos de los diferentes tratamientos, y se les realizó un análisis estadístico de t Student (n=5-8 ovarios).

Extracción de RNA y síntesis de cDNA

A partir de ovarios de embrión de pollo de 9 días de incubación, se extrajo el RNA total con el reactivo Trizol (Apéndice II) a partir del cual se sintetizó el DNA complementario (cDNA) con el 1st Strand cDNA Synthesis kit de Roche (Apéndice II). El cDNA se utilizó para amplificar, por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), el RNA mensajero del receptor II de TGF- β , así como la isoforma TGF- β 2.

PCR

Para amplificar el cDNA del mensajero del receptor II del TGF- β , se emplearon oligonucleótidos sintéticos diseñados para amplificar un fragmento de 879 pb que corresponde de la base 145 a la 1024 (Barnett et al. 1994; N° de acceso Gene Bank NM_205518):

Oligo sentido 5' CTATGCAAATTCTGTGACGTTAAG 3'
Oligo antisentido 5' TGATAATATGCCGTGTGAGGTATT 3'

El cDNA del mensajero de TGF- β 2 de pollo, fue amplificado con un par de oligonucleótidos que amplifican un fragmento de 451 pb, que comprende de la base 1755 a la 2206 del mensajero (Burt. et al. 1991; N° de acceso Gene Bank NM_001031045):

Oligo sentido 5' GGAGCCTGAAGCAAGATTTGC 3'
Oligo antisentido 5' TGCCAATGTAGTAGAGGATGGTGAG 5'

Como control de PCR se amplificó un fragmento de 296 pb cDNA del mensajero de β actina de pollo, que comprende de la base 404 a la 700 (Kost. et al. 1983; N° de acceso Gene Bank NM_205518):

Oligo sentido 5' CAAAGCCAACAGAGAGAAGA 3'
Oligo antisentido 5' TCACGCACAATTTCTCTCTC 3'

Los productos de PCR fueron visualizados por electroforesis en un gel de agarosa-TAE 0.8 % teñido con bromuro de etidio. Se comprobó el tamaño de los fragmentos usando marcador de peso de 100pb (Apéndice II).

Resultados

El TGF- β 1 reduce el número de células somáticas del ovario, sin afectar el número de ovogonias

La morfología macroscópica del ovario del embrión de pollo en cultivo organotípico, cambia por efecto del TGF- β 1; su tamaño disminuye un 35% aproximadamente y su forma se vuelve irregular en contraste con los ovarios testigo, los cuales eran alargados y ovoides. Para evaluar el crecimiento del ovario cultivado se cuantificó el número total de células; en el grupo testigo el número de células somáticas y de ovogonias aumentó significativamente entre las 72 y las 144 h de cultivo (Fig. 1a y b). Los ovarios que fueron tratados con TGF- β 1, presentaron una reducción significativa en el número de células somáticas, comparados con los ovarios testigo cultivados en el mismo lapso de tiempo (Fig. 1a). El número de ovogonias en los ovarios tratados con TGF- β 1 aumento en niveles similares al testigo (Fig. 1b).

La reducción en el número de células somáticas inducido por TGF- β 1 no es reversible

El número de células somáticas en los ovarios tratados con TGF- β 1 no se recuperó al eliminar o neutralizar al TGF- β 1 del medio de cultivo. Esto se comprobó al cultivar ovarios tratados previamente con TGF- β 1 durante 72 h adicionales, en medio de cultivo libre de TGF- β 1 o suplementado con betaglicano soluble. En ambos casos no se recuperó el número de células somáticas, el cual permaneció en niveles similares al de los ovarios cultivados durante 72 h en presencia de TGF- β 1 (Fig. 1a).

Histología del ovario cultivado

El ovario de embrión de pollo esta cubierto por un epitelio cúbico simple, debajo del cual se localiza la corteza que contiene a las ovogonias. Estas células se identifican morfológicamente porque son de un tamaño mayor al de otros tipos

celulares (14-19 micras), tienen un núcleo grande, excéntrico, cromatina dispersa, un nucleolo prominente y se encuentran rodeadas por células pregranulosas. Debajo de la corteza se encuentra la médula, la cual esta integrada casi en su totalidad por células somáticas, las ovogonias son escasas en ella. El ovario cultivado conserva una morfología muy parecida a la del ovario sin cultivar (Fig. 2a); y presenta una región cortical, una región medular y un predominio de ovogonias en la corteza.

El TGF- β 1 cambia la distribución de las ovogonias en el ovario cultivado por 72 h

En los ovarios testigo, las ovogonias se presentaban casi exclusivamente en la corteza ovárica (Fig. 2a) (20.3 ± 0.9 células/10,000 μm^2), siendo mínimo su número en la médula (1.9 ± 0.5 células/10,000 μm^2) (Fig. 4a). El tratamiento con TGF- β 1 por 72 h modificó la morfología del ovario (Fig. 2b), ya que la densidad de las ovogonias en la corteza disminuyó a la mitad, (10.7 ± 1.5 células/10,000 μm^2), mientras que su densidad aumentó alrededor de nueve veces en la médula (18.2 ± 4.7 células/10,000 μm^2) (Fig. 4a).

El efecto del TGF- β 1 sobre la distribución de las ovogonias es reversible

Para determinar si el efecto del TGF- β 1 sobre la distribución de ovogonias es reversible, se usaron ovarios a los que después de las primeras 72 h de tratamiento, se les substituyó el medio de cultivo con TGF- β 1 por medio libre de TGF- β 1 (Fig. 3a) o suplementado con betaglicano soluble (Fig. 3b), y luego fueron cultivados por 72 h adicionales. Al final de las últimas 72 h de cultivo, estos ovarios revertían casi en su totalidad los cambios sobre la distribución de las ovogonias ocasionados por el TGF- β 1; ya que su histología era similar a los ovarios testigo cultivados por 144 h (Fig. 4b), que presentaban una región cortical con una alta densidad de ovogonias (40.0 ± 2.5 células/10,000 μm^2) y una región medular compuesta por células somáticas. En los ovarios tratados con TGF- β 1 y cultivados en medio de cultivo libre de TGF- β 1 durante 72 h adicionales, la densidad de ovogonias en la corteza fue 20% menor a la del testigo (31.4 ± 4.8 células/10,000 μm^2) (Fig. 4b); mientras que en el grupo en

el cual se neutralizó el TGF- β 1 con betaglicano soluble fue solo un 15% menor a la del testigo (34.4 ± 5.3 células/10,000 μm^2) (Fig. 4b); lo cual contrasta con la disminución del 50% que presentaban los ovarios después de las primeras 72 h de cultivo. El grupo que se mantuvo en TGF- β 1 por 144 h presenta una distribución medular de las ovogonias, así como una disminución en el número de células somáticas (Méndez et al. 2006).

Efecto local del TGF- β 1 sobre el ovario

Los ovarios que fueron cultivados con una perla impregnada con PBS no mostraron cambios significativos sobre la morfología del ovario, ya que se apreciaba un epitelio superficial, una corteza con abundantes ovogonias y una médula compuesta de células somáticas. Además, alrededor de la perla el número de células germinales no estaba aumentado y no se observó ninguna reacción alrededor de esta (Fig. 5).

En los ovarios cultivados con la perla impregnada con TGF- β 1, la corteza presentaba una migración de las ovogonias hacia la zona de la médula, en donde se encontraba la perla (Fig. 6). Es importante hacer notar que alrededor de la perla se formó una capa de células alargadas con apariencia de fibroblastos.

La cuantificación de la densidad de ovogonias en regiones de 5625 μm^2 alrededor de la perla, demostró que la densidad de estas en los primeros 75 μm alrededor de la perla es significativamente mayor en los ovarios cultivados con una perla impregnada con TGF- β 1 comparados con un ovario con una perla impregnada con PBS; 6.15 ± 0.9 y 0.44 ± 0.16 respectivamente. Sin embargo su densidad disminuye conforme se va alejando de la perla; siendo su densidad a los 75-150 μm de la perla 2.3 ± 0.4 y 0.9 ± 0.2 para el tratado con TGF- β 1 y el testigo respectivamente (Fig. 7).

Expresión del mRNA del receptor II para TGF- β en el ovario de embrión de pollo de 9 días

El ovario embrionario de pollo de 9 d.i. expresa al receptor II para TGF- β (T β RII). Las reacciones de PCR dieron productos que correspondían al tamaño esperado para el T β RII (879 pb, Fig. 8b) y para el control (β -actina, 296 pb, Fig. 8c). En el control negativo (reacción de síntesis de cDNA sin transcriptasa reversa), como se esperaba, no se amplificó ningún producto al ser usado como templado para una reacción de PCR para amplificar β -actina (Fig. 8d).

Figuras

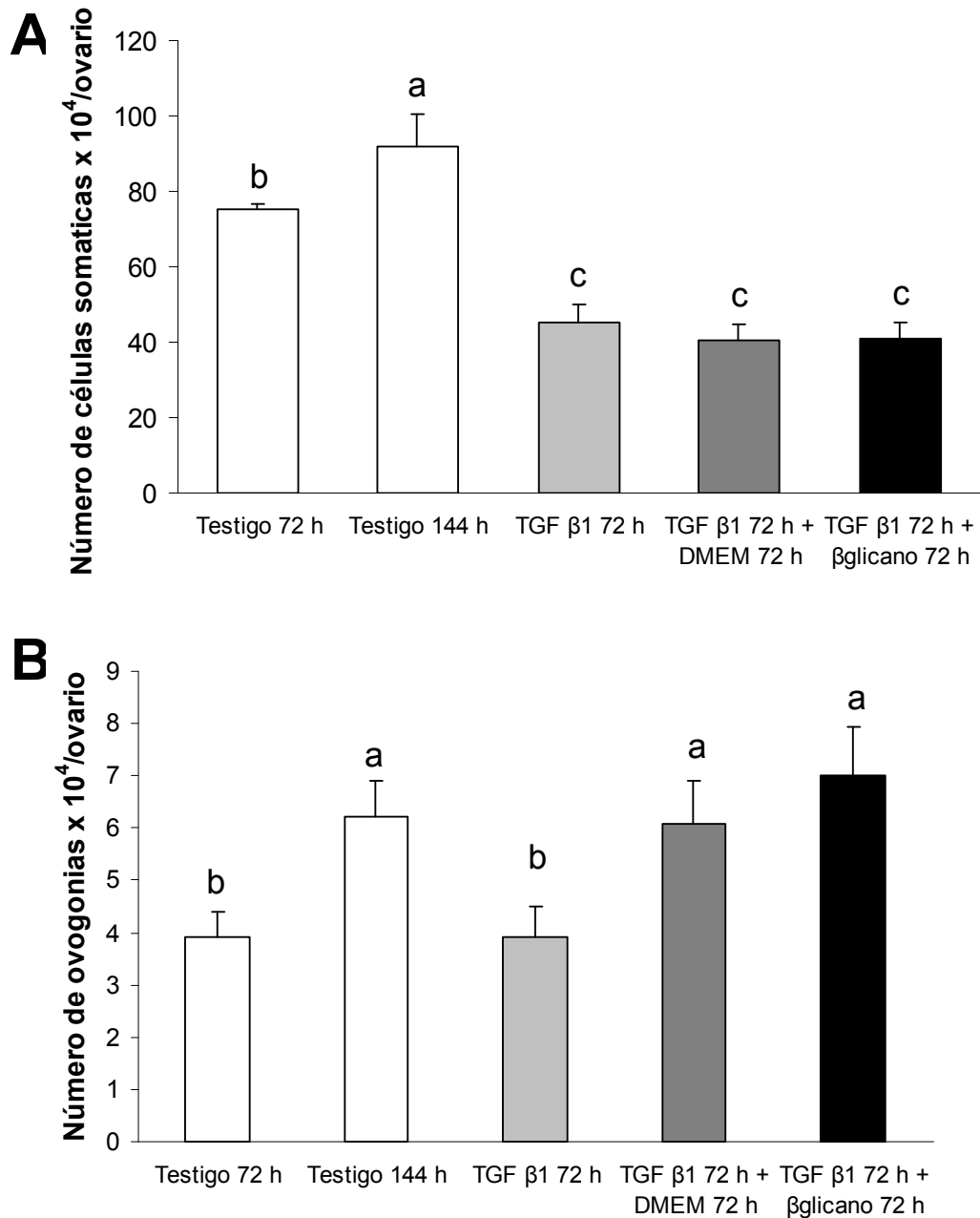


Fig. 1. Número total de células somáticas (A) y germinales (B) en ovarios testigo y tratados con TGF-β1 cultivados durante 72 y 144 h. Las barras representan la media más SEM. n=6-7. p < 0.05, análisis de varianza seguido por una prueba de Tukey. Barras marcadas con la misma letra no presentan una diferencia estadísticamente significativa entre si.

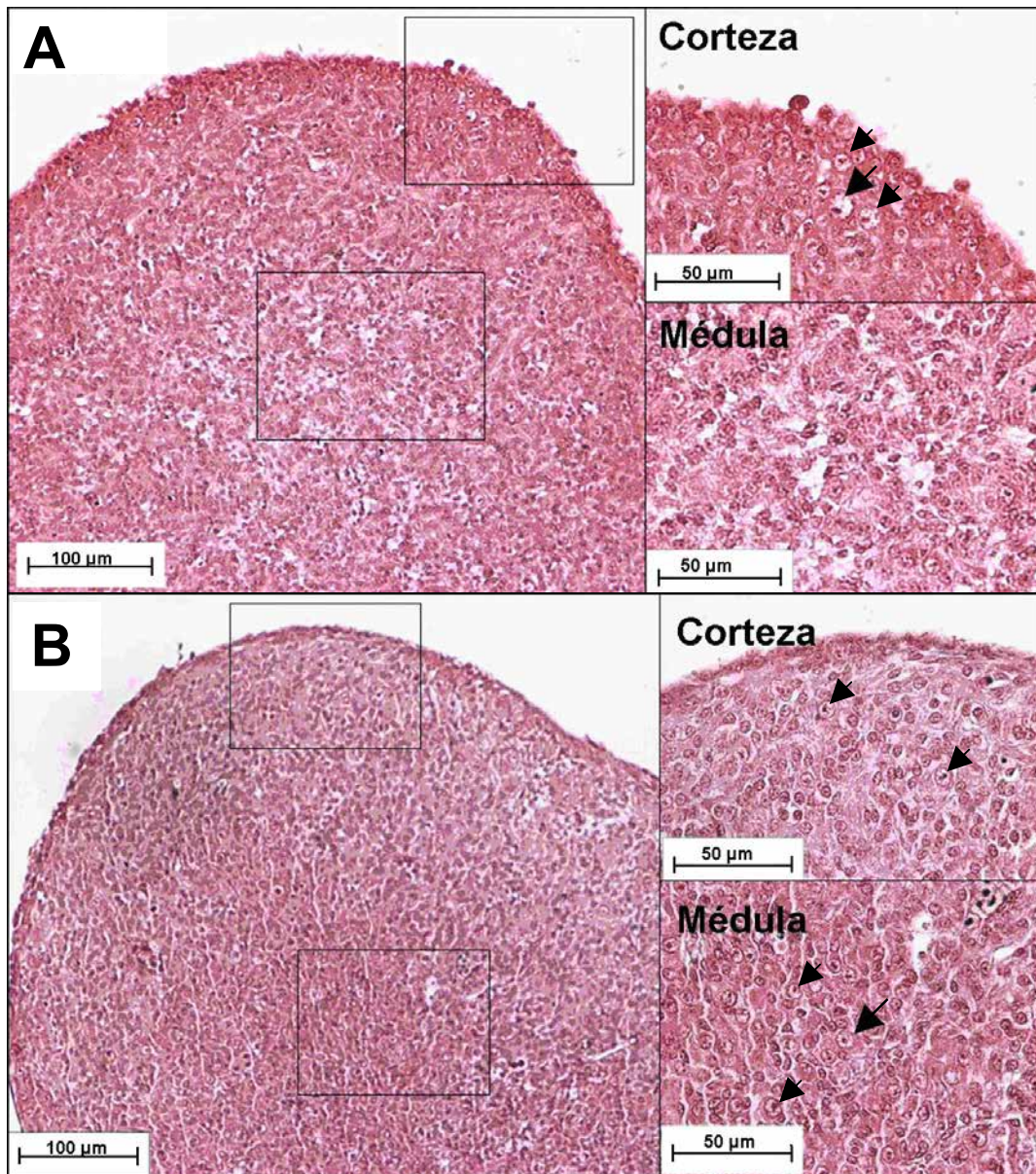


Fig. 2. Cortes histológicos de ovario de embrión de pollo de 9 d.i. teñidos con la tinción tricrómica de Masson. Ovarios testigo (A) y tratado con TGF-β1 (B), ambos cultivados por 72 h. El tratamiento con TGF-β1 altera la distribución de las ovogonias en el ovario embrionario; su densidad disminuye en la corteza mientras que aumenta en la médula. Se muestran acercamientos de zonas representativas tanto de corteza como de médula. Las ovogonias (flecha) se distinguen de otros tipos celulares por su tamaño y morfología característica.

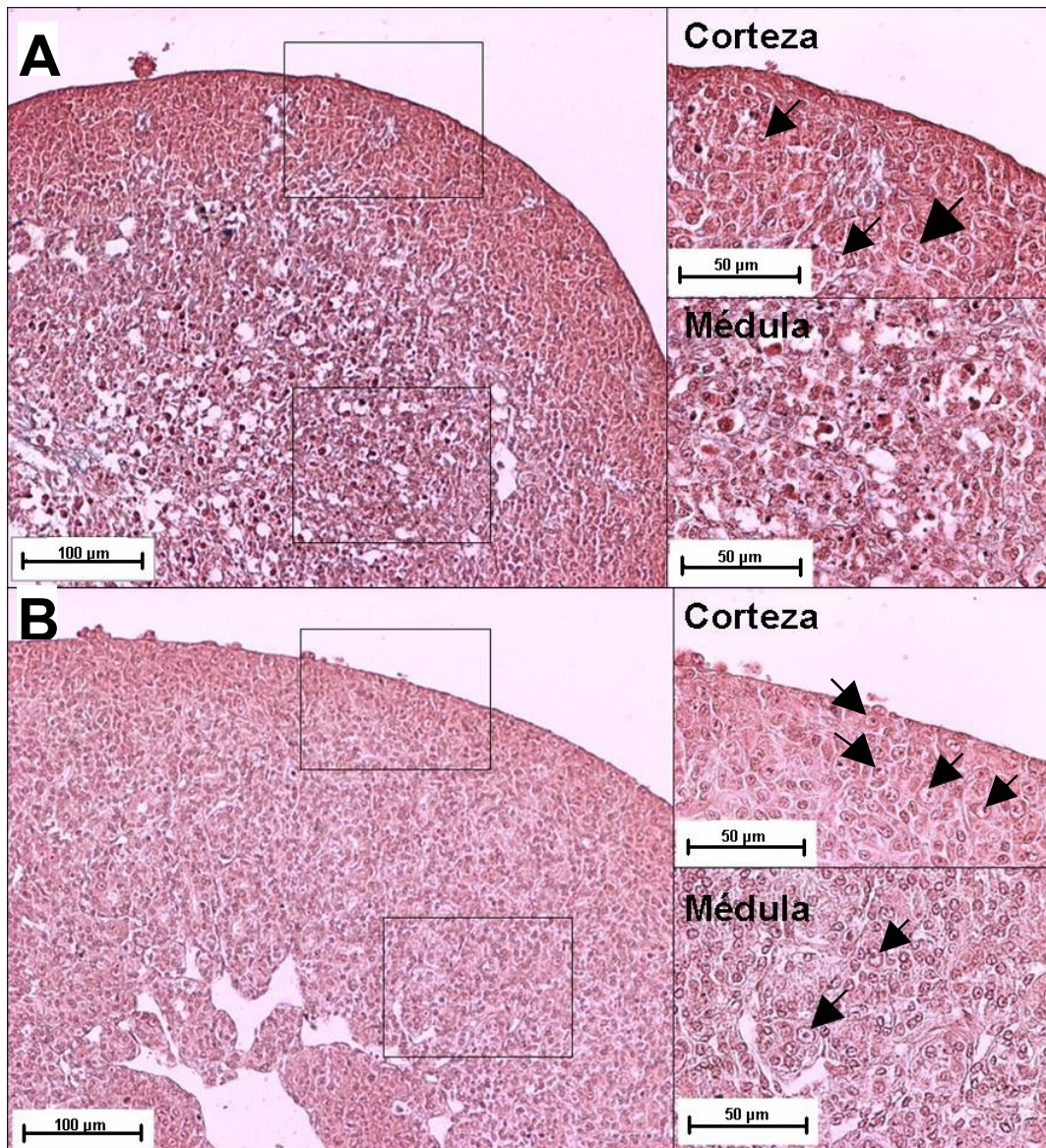


Fig. 3. Cortes histológicos del ovario de embrión de pollo de 9 d.i. con la tinción tricrómica de Masson. Ovario tratado 72 h con TGF- β 1 + 72 h en medio libre de TGF- β 1 (A) y ovario tratado 72 h con TGF- β 1 + 72 h en medio de cultivo suplementado con betaglicano (B). Los cambios en la morfología inducidos por TGF- β 1 son revertidos en el ovario, ya que estos ovarios presentan una morfología similar a la de ovarios testigo (Fig. 2a). Se muestran acercamientos de zonas representativas tanto de corteza como de médula. Las ovogonias (flechas) se distinguen de los otros tipos celulares por su tamaño y morfología.

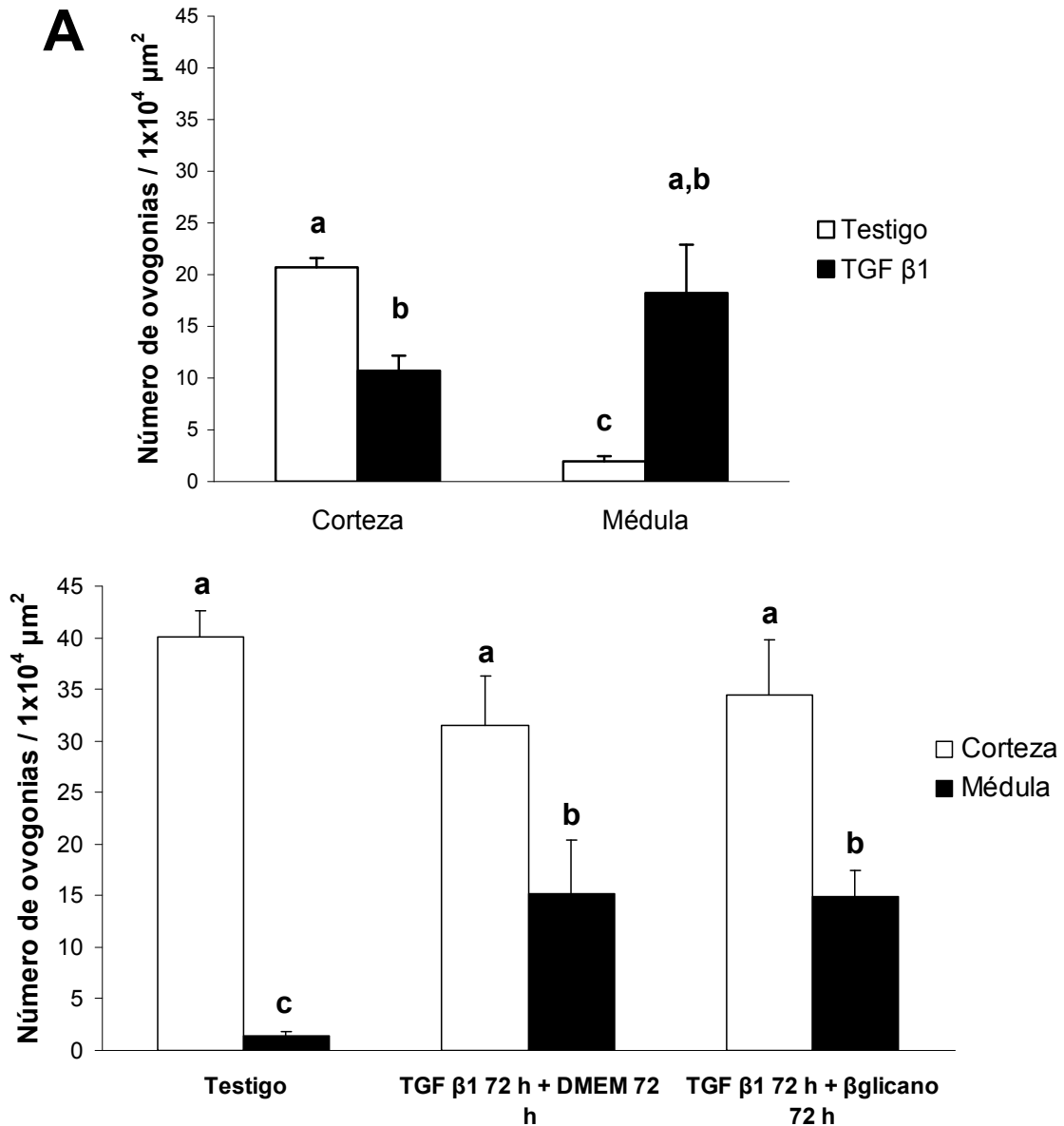


Fig. 4. Densidad de ovogonias (células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) en ovarios testigo y tratados con TGF- β 1 cultivados durante 72 h (A); y en ovarios testigo cultivados por 144 h y tratados con TGF- β 1 (B). La densidad de células germinales disminuye en la corteza mientras que aumenta en la médula en ovarios tratados con TGF- β 1, y este efecto se revierte al eliminar al TGF- β del medio de cultivo. Se consideraron 3 regiones representativas de cada zona. Las barras representan la media más SEM. $n=6-8$. $p < 0.05$. Se realizó un análisis de varianza seguido por una prueba de Tukey. Barras marcadas con la misma letra no presentan una diferencia estadísticamente significativa entre si.

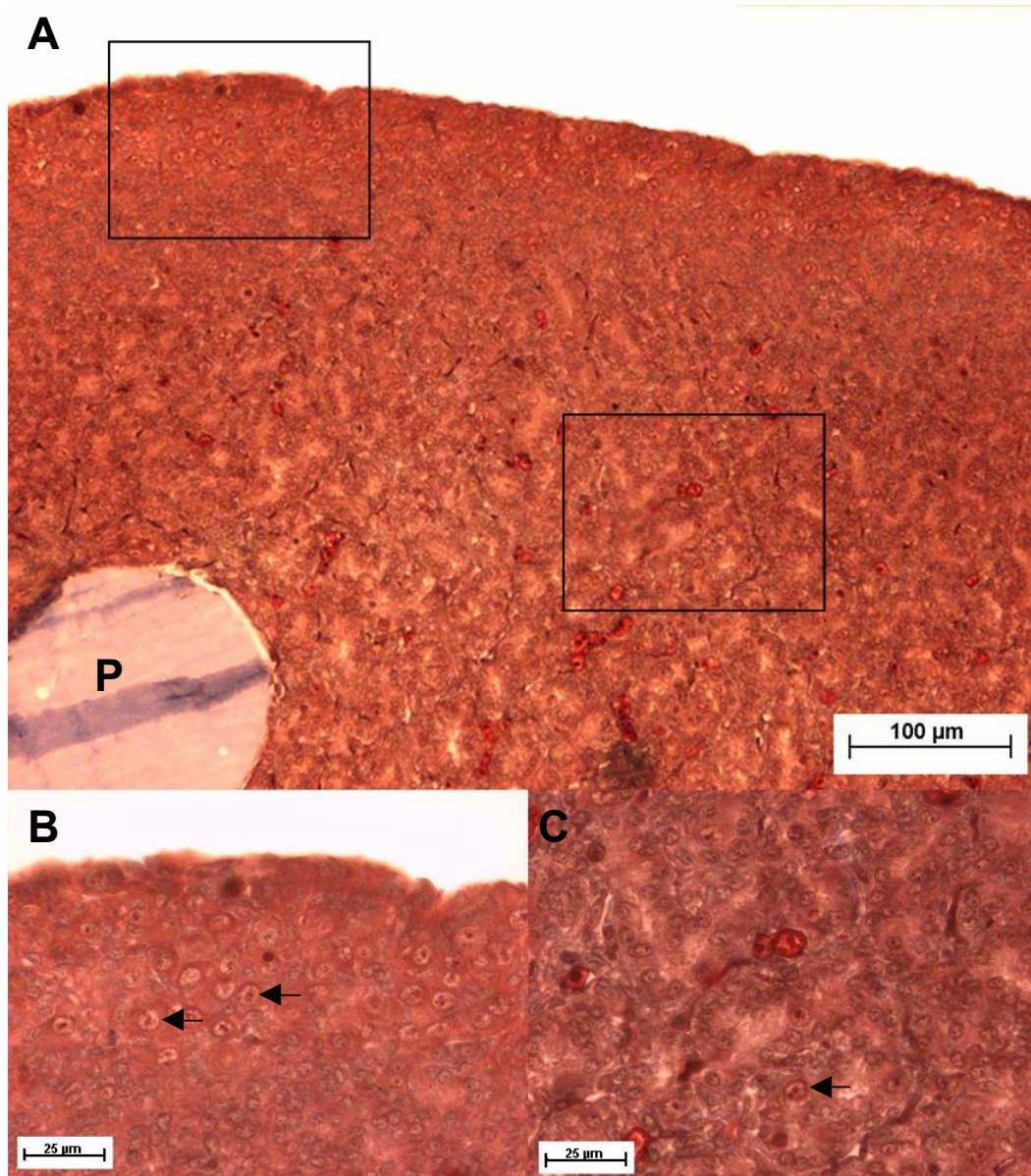


Fig. 5. Cortes histológicas de ovario de embrión de pollo de 9 d.i., cultivados por 72 h con una perla de acrílico/heparina con PBS (P). El uso de una perla impregnada con PBS no afecta la morfología del ovario (A). Se muestran acercamientos de zonas representativas tanto de corteza (B) como de médula (C). Las ovogonias están marcadas con flechas.

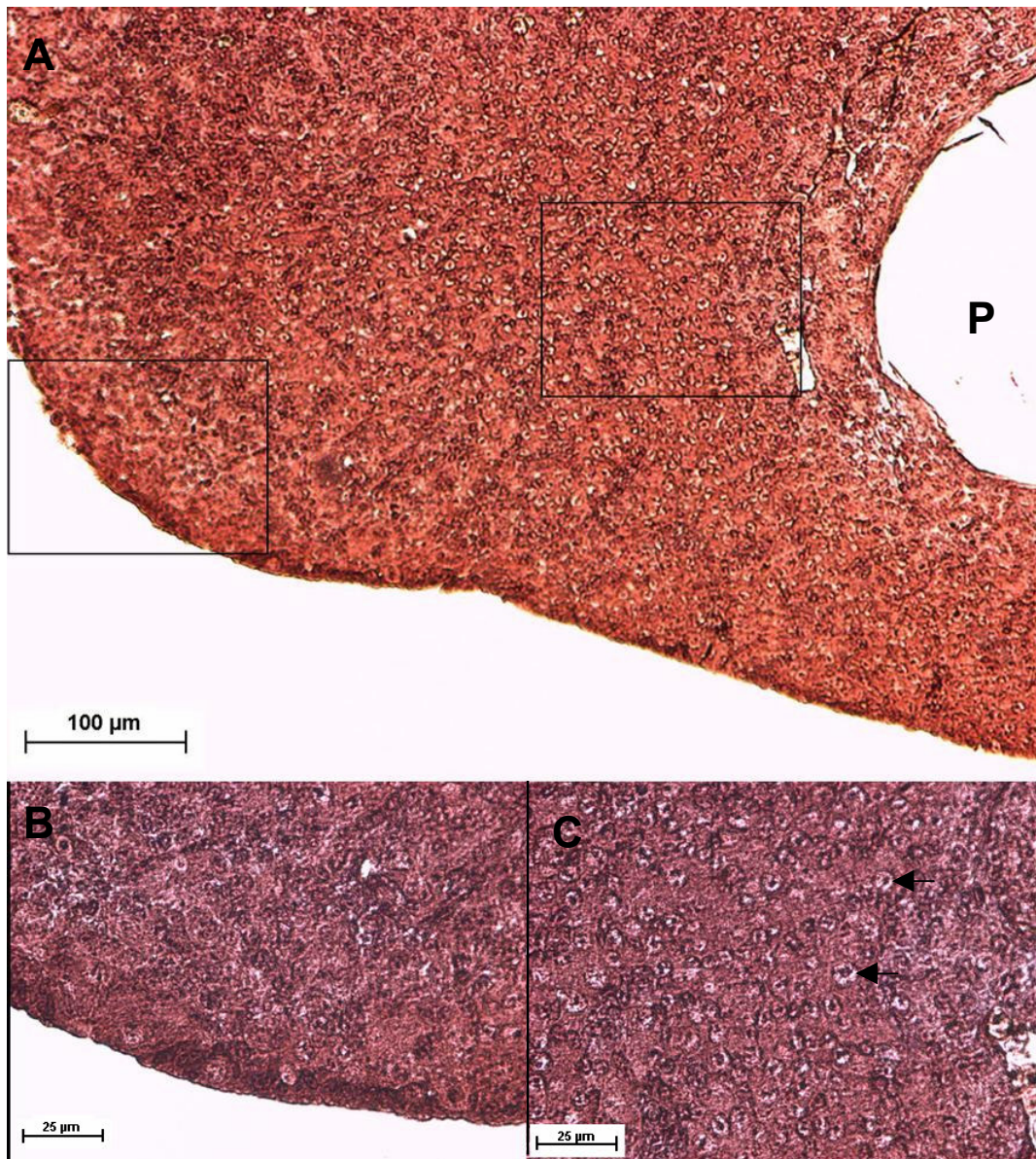


Fig. 6. Cortes histológicos de ovario de embrión de pollo de 9 d.i., cultivados por 72 h con una perla de acrílico/heparina impregnada con TGF- β 1 (P). El uso de una perla impregnada con TGF- β 1 produce cambios en la morfología del ovario, se aprecia una migración de las ovogonias hacia la perla (A). Se muestran acercamientos de zonas representativas tanto de corteza (B) como de médula (C). Las ovogonias están marcadas con flechas.

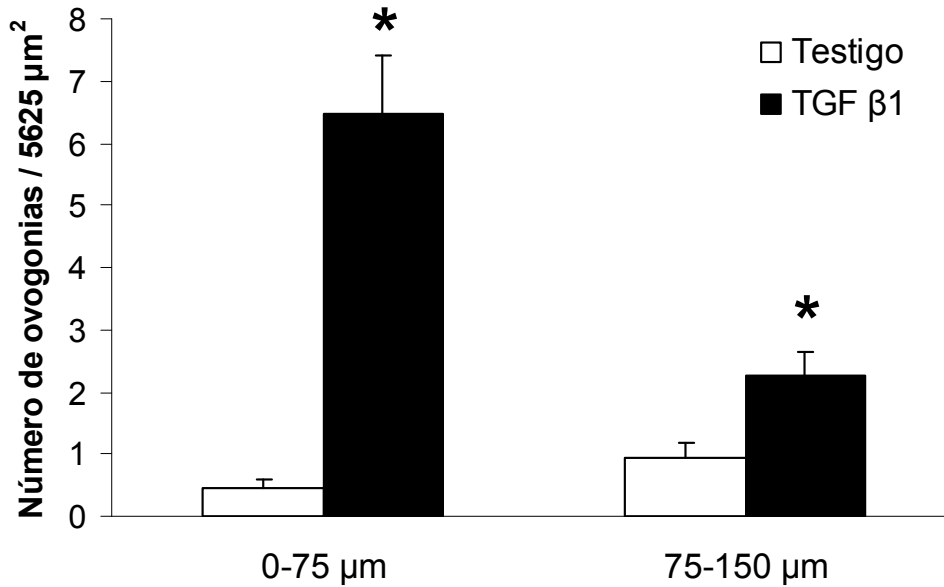


Fig. 7. Número de ovogonias en áreas equivalentes ($5625 \mu\text{m}^2$), a dos distancias de la perla (0-75 μm y 75-150 μm) en ovarios cultivados con perlas impregnadas de PBS (testigo) y con TGF- β 1. Las barras muestran la media \pm SEM. $n=6-8$ ovarios. $p < 0.05$. Se realizo la prueba de t Student.

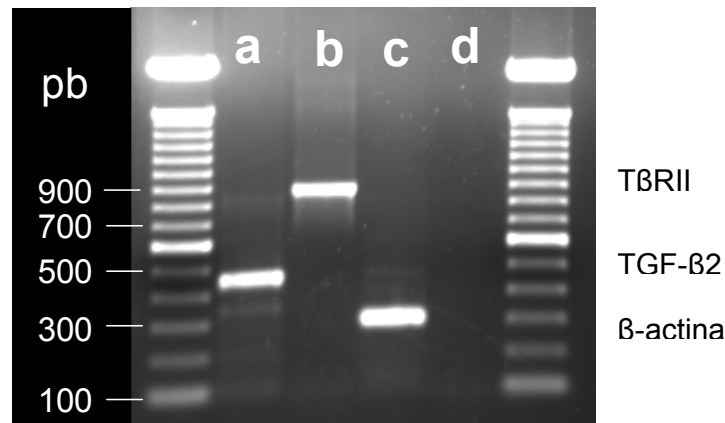


Fig. 8. Productos de PCR amplificados a partir de cDNA de ovarios completos; se amplificaron fragmentos de los mensajeros de TGF- β 2 (451 pb) (a), T β R II (879 pb) (b) y β -actina (296pb) (c) como control positivo; el control negativo fue un reacción de PCR para β -actina cDNA sin transcriptasa reversa (d).

Discusión

En el presente estudio, se evaluó el efecto del TGF- β 1 sobre la distribución de las ovogonias en el ovario de embrión de pollo de 9 d.i., utilizando un sistema de cultivo de órgano completo en medio libre de suero. El ovario de embrión de pollo de 9 d.i. esta organizado en tres compartimentos básicos: el epitelio superficial, la corteza y la médula. La distribución de las células germinales es cortical, y es en esta zona donde se diferencian hacia ovogonias y comienzan el desarrollo folicular. En el modelo de cultivo usado en el presente estudio, el ovario mantiene una estructura similar a la del ovario sin cultivar, la cual se mantiene hasta por seis días de cultivo; además el empleo de medio libre de suero permite evaluar el efecto del TGF- β sin la influencia de otros factores de crecimiento u hormonas presentes en el.

El tratamiento con TGF- β 1 resulta en una disminución del número de células somáticas del ovario, este resultado es similar a lo observado en otros tipos celulares como las células epiteliales o endoteliales después de ser tratadas con TGF- β (Tanigawa et al., 2005). En contraste el número de células germinales no se ve afectado, lo cual concuerda con lo observado en ratones carentes del receptor I para TGF- β (de Sousa Lopes et al., 2005). Sin embargo, otro estudio muestra que el TGF- β 1 tiene un efecto antiproliferativo sobre las células germinales en un modelo murino (Godin & Wylie, 1991); mientras en el embrión de pollo se ha mostrado que el TGF- β 2 es un inhibidor de la proliferación de las células germinales cultivadas en medio libre de suero (Fujioka et al., 2004); esta discrepancia parcial puede deberse a variaciones en el modelo de cultivo usado (suspensión de células vs. cultivo organotípico), o bien al estadio de desarrollo usado (6 d.i. vs. 9 d.i.).

En el ovario de embrión de pollo de 9 d.i., el ovario se encuentra diferenciado y contiene ovogonias en proliferación en su corteza. Este trabajo aporta evidencias de que las ovogonias mantienen la capacidad migratoria característica de las CGP el modelo experimental usado. Las propiedades migratorias de las CGP, han sido previamente descritas (Bendel-Stenzel et al., 1998); además, las CGP presentan un citoesqueleto polarizado y responden a

sustancias quimioatrayentes como el SDF-1 durante etapas tempranas de desarrollo (Molyneaux et al., 2003).

El cambio en la distribución de las ovogonias y su desplazamiento de la corteza hacia la médula del ovario, alrededor de la perla impregnada con TGF- β sugiere un efecto quimiotáctico más que sólo un aumento en la motilidad celular. Un efecto similar ha sido observado en células germinales de ratón (Godin et al., 1990; Godin & Wylie., 1991).

Cabe señalar que a partir de un trabajo previo en el laboratorio se ha determinado que tanto el TGF- β 1 como el TGF- β 2 ejercen el mismo efecto sobre las células germinales y somáticas del ovario (Méndez et al. 2006). La acción del TGF- β fue suprimida con la adición de betaglicano soluble; el cual se une al TGF- β con gran afinidad y actúa como un antagonista (López-Casillas et al., 1993). Para este estudio se usó betaglicano soluble producido por mecanismos recombinantes (Vilchis-Landeros et al, 2001). Es importante mencionar que el tratamiento con betaglicano no afecta la morfología del ovario ni tampoco el número de células en el ovario de manera significativa (Méndez et al., 2006).

Mediante la eliminación o neutralización del TGF- β 1 del medio de cultivo, se determinó que el cambio en la distribución de las ovogonias dentro del ovario es reversible, lo cual se observó como un aumento en la densidad de ovogonias en la región cortical del ovario. Este fenómeno puede sugerir que la distribución normal de las células germinales en la gónada es un proceso activo; el cual podría estar mediado por el TGF- β de manera directa o por alguna molécula que ve alterado su patrón de expresión en respuesta al tratamiento con TGF- β . Por otro lado, cabe la posibilidad de que el aumento de las ovogonias en la región cortical sea debido a que el microambiente de la corteza es favorable para su proliferación a diferencia de la médula del ovario; lo cual sería prueba de la importancia de una distribución adecuada de las células germinales dentro del ovario.

La distribución diferencial de las células germinales en las gónadas de ambos sexos (medular en machos y cortical en hembras) está conservada en varias especies como: anfibios (Hayes. 1998), reptiles (Morrish et al. 2002), aves (Smith & Sinclair. 2004) y mamíferos (Yao. 2005). Lo cual puede implicar que sea necesaria una distribución específica de las células germinales para lograr un desarrollo adecuado de los gametos, así como un adecuado desarrollo y mantenimiento de la función de una gónada normal. La mejor comprensión de los agentes que regulan estos procesos y las vías por las cuales actúan, será de gran utilidad en el estudio del desarrollo gonadal, tanto a nivel del órgano (ovario), como en su unidad funcional (folículo).

Resultan interesantes las diferentes respuestas generadas por el mismo estímulo con TGF- β 1 sobre los diversos tipos celulares del ovario. Es posible que esta diferencia en la respuesta se deba que esta depende del contexto celular; lo cual es de esperarse dado la naturaleza multifactorial del TGF- β , el cual es capaz de generar respuestas antagónicas en diversos tipos celulares (Massagué. 1998). La vía de señalización clásica del TGF- β es a través de receptores de membrana con actividad de cinasa de serinas-treoninas, que fosforila a las proteínas Smad, las cuales en forma de trímero son transportadas al núcleo donde regulan la transcripción de genes (Massagué. 1998). Es a través de esta vía por la cual el TGF- β ejerce su efecto antiproliferativo en algunos tipos celulares; y podría ser a través de esta vía mediante la cual el TGF- β disminuye el número de células somáticas en el ovario. Se ha reportado que el TGF- β regula la migración celular o induce fenotipo migratorio en diversas líneas celulares, mediante una señalización a través de las GTPasas Rho (Edlund et al. 2002); por lo tanto, es posible que la migración que presentan las ovogonias se deba a una señalización a través de esta vía.

Determinamos que el ovario de 9 d.i. expresa el RNA mensajero del receptor II de TGF- β ; y además se ha reportado la expresión de la isoforma 2 de TGF- β a los 6 d.i. (Fujioka et al. 2004; Hattori et al. 2002); por lo cual es probable que el TGF- β participe durante el desarrollo del ovario regulando la distribución de las ovogonias. Existen dos posibles vías por las cuales el TGF- β podría ejercer

estos efectos sobre el ovario. En primera instancia podría deberse a un efecto directo sobre las ovogonias, en el cual las ovogonias expresan los receptores para el TGF- β y sean capaces de responder a un gradiente de la señal a través del reclutamiento de componentes del citoesqueleto, de manera tal que la célula se polarice y migre en un gradiente de la señal. Por otro lado podría tratarse de un efecto indirecto, en el cual son las células somáticas quienes expresan los receptores para el TGF- β , el cual induce la secreción de algún otro factor de crecimiento o de componentes de matriz extracelular, los cuales ejercerían los efectos migratorios sobre las ovogonias. Se sabe que el TGF- β incrementa la síntesis de fibronectina a través un aumento en su RNAm, así como otros componentes de matriz extracelular (Boland et al., 1996). De esta manera, las células germinales responderían a un aumento de estas moléculas con un aumento en su tasa de migración. Sin embargo, no podemos descartar la posibilidad de que ambos mecanismos ocurran *in vivo* durante el desarrollo así como en los experimentos *in vitro*.

El determinar qué poblaciones celulares en el ovario embrionario son las que expresan los receptores para el TGF- β revelará más datos acerca del mecanismo por el cual ejerce su efecto lo cual será objeto de un estudio posterior.

Conclusiones

- Se demostró que el modelo de cultivo de órgano *in vitro* puede ser usado para estudiar la morfología del ovario embrionario.
- El TGF- β 1 reduce el número de células somáticas sin afectar a las ovogonias en el ovario cultivado.
- El TGF- β 1 reduce la densidad de ovogonias en la corteza del ovario, mientras que la aumenta en la médula.
- El cambio en la distribución de las ovogonias en el ovario inducido por el TGF- β 1 es reversible al ser eliminado del medio.
- El ovario de embrión de pollo de 9 d.i. expresa el RNAm del receptor II del TGF- β .

Perspectivas

- Determinar que población celular en el ovario expresa el RNAm para los receptores del TGF- β .
- Determinar que factores regulan el regreso de las ovogonias a la corteza del ovario.
- Llevar a cabo un estudio comparativo entre machos y hembras, sobre el papel del TGF- β 1 en la distribución de las células germinales.
- Estudiar la importancia de componentes de la matriz extracelular sobre la distribución de las células germinales.
- Estudiar los efectos del TGF- β sobre el citoesqueleto de las células germinales.

Bibliografía

Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P (2002) Molecular biology of the cell. 4^a ed. New York , NY. Garland Science. 1463 pp

Anderson R, Fassler R, Georges-Labouesse E, Hynes RO, Bader BL, Kreidberg JA, Schaible K, Heasman J, Wylie C (1999) Mouse primordial germ cells lacking beta1 integrins enter the germline but fail to migrate normally to the gonads. *Development* 126: 1655-1664

Andrews JE, Smith CA, Sinclair AH (1997) Sites of estrogen receptor and aromatase expression in the chicken embryo. *Gen Comp Endocrinol.* 108: 182-190

Barnett JV, Moustakas A, Lin W, Wang XF, Lin HY, Galper JB, Maas RL(1994) Cloning and developmental expression of the chick type II and type III TGF beta receptors. *Dev Dyn* 199: 12-27

Bendel-Stenzel M, Anderson R, Heasman J, Wylie C (1998) The origin and migration of primordial germ cells in the mouse. *Semin Cell Dev Biol* 9: 393-400

Bhowmick NA, Ghiassi M, Bakin A, Aakre M, Lundquist CA, Engel ME, Arteaga CL, Moses HL (2001) Transforming growth factor-beta1 mediates epithelial to mesenchymal transdifferentiation through a RhoA-dependent mechanism. *Mol Biol Cell* 12: 27-36

Bishop AL, Hall A (2000) Rho GTPases and their effector proteins. *Biochem J* 348: 241-255

Boland S, Boisvieux-Ulrich E, Houcine O, Baeza-Squiban A, Pouchelet M, Schoevaert D, Marano F (1996) TGF beta 1 promotes actin cytoskeleton reorganization and migratory phenotype in epithelial tracheal cells in primary culture. *J Cell Sci* 109: 2207-2219

Burt DW, Paton IR (1991) Molecular cloning and primary structure of the chicken transforming growth factor-beta 2 gene. *DNA Cell Biol* 10: 723-734

Carlson N, Stahl A (1985) Origin of the somatic components in chick embryonic gonads. *Arch Anat Microsc Morphol Exp* 74: 52-59

Cheifetz S, Weatherbee JA, Tsang ML, Anderson JK, Mole JE, Lucas R, Massagué J (1987) The transforming growth factor-beta system, a complex pattern of cross-reactive ligands and receptors. *Cell* 48: 409-415

Clinton M (1998) Sex determination and gonadal development: a bird's eye view. *J Exp Zool* 281: 457-465

Dallas SL, Park-Snyder S, Miyazono K, Twardzik D, Mundy GR, Bonewald LF (1994) Characterization and autoregulation of latent transforming growth factor beta (TGF beta) complexes in osteoblast-like cell lines. Production of a latent complex lacking the latent TGF beta-binding protein. *J Biol Chem* 269: 6815-6821

De Miguel MP, Cheng L, Holland EC, Federspiel MJ, Donovan PJ (2002) Dissection of the c-Kit signaling pathway in mouse primordial germ cells by retroviral-mediated gene transfer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 10458-10463

de Sousa Lopes SM, van den Driesche S, Carvalho RL, Larsson J, Eggen B, Surani MA, Mummery CL (2005) Altered primordial germ cell migration in the absence of transforming growth factor beta signaling via ALK5. *Dev Biol* 284: 194-203

Derynck R, Zhang YE (2003) Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signalling. *Nature* 425: 577-584

Edlund S, Landstrom M, Heldin CH, Aspenstrom P (2002) Transforming growth factor-beta-induced mobilization of actin cytoskeleton requires signaling by small GTPases Cdc42 and RhoA. *Mol Biol Cell* 13: 902-914

Engel ME, McDonnell MA, Law BK, Moses HL (1999) Interdependent SMAD and JNK signaling in transforming growth factor-beta-mediated transcription. *J Biol Chem* 274: 37413-37420

Etienne-Manneville S, Hall A (2002) Rho GTPases in cell biology. *Nature* 420: 629-635

Eusebe D, di Clemente N, Rey R, Pieau C, Vigier B, Josso N, Picard JY (1996) Cloning and expression of the chick anti-Mullerian hormone gene. *J Biol Chem* 271: 4798-4804

Franitza S, Kollet O, Brill A, Vaday GG, Petit I, Lapidot T, Alon R, Lider O (2002) TGF-beta1 enhances SDF-1alpha-induced chemotaxis and homing of naive T cells by up-regulating CXCR4 expression and downstream cytoskeletal effector molecules. *Eur J Immunol* 32: 193-202

Franz CM, Jones GE, Ridley AJ (2002) Cell migration in development and disease. *Dev Cell* 2: 153-158

Freeman B (2003) The active migration of germ cells in the embryos of mice and men is a myth. *Reproduction* 125: 635-643

Fujioka T, Soh T, Fujihara N, Hattori MA (2004) Function of TGF-beta2 in the growth of chicken primordial germ cells and germinal ridge stroma cells during embryonic development. *J Exp Zool A Comp Exp Biol* 301: 290-296

Geiger B, Bershadsky A, Pankov R, Yamada KM (2001) Transmembrane crosstalk between the extracellular matrix-cytoskeleton crosstalk. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2: 793-805

Gentry LE, Lioubin MN, Purchio AF, Marquardt H (1988) Molecular events in the processing of recombinant type 1 pre-pro-transforming growth factor beta to the mature polypeptide. *Mol Cell Biol* 10: 4162-4168

Gilbert, Scott F (2003) *Developmental Biology* 7^a ed. Sinauer, MA. Sinauer Associates. 838 pp

Gobel U, Schneider D, Calaminus G, Haas R, Schimdt P, Harás D (2000) Germ cell tumors in childhood and adolescence. *Ann. Onco* 11: 263 -271

Godin I, Wylie C, Heasman J (1990) Genital ridges exert long-range effects on mouse primordial germ cell numbers and direction of migration in culture. *Development* 108: 357-363

Godin I, Wylie C (1991) TGF beta 1 inhibits proliferation and has a chemotropic effect on mouse primordial germ cells in culture. *Development* 113: 1451-1457

Haines L, McBride D, Clinton M (1996) Analysis of gene expression in the developing ovary and testis of the chick embryo. *Int J Dev Biol Suppl* 1: 99S-100S

Halper J, Burt DW, Romanov MN (2004) On reassessment of the chicken TGFβ4 gene as TGFβ1. *Growth Factors* 22: 121-122

Hamburger V, Hamilton HL (1992) A series of normal stages in the development of the chick embryo. *Dev Dyn* 195: 231-272

Hart PJ, Deep S, Taylor AB, Shu Z, Hinck CS, Hinck AP (2002) Crystal structure of the human TbetaR2 ectodomain -TGF-beta3 complex. *Nat Struct Biol* 9: 203-208

Hattori MA, Furuta H, Hiyama Y, Kato Y, Fujihara N (2002) Prominent expression of transforming growth factor beta2 gene in the chicken embryonic gonad as revealed by suppressive subtraction cloning. *Gen Comp Endocrinol* 125: 311-316.

Hayes TB (1998) Sex determination and primary sex differentiation in amphibians: genetic and developmental mechanisms. *J Exp Zool* 281:373-99

Hynes RO (1980) The role of fibronectin in cellular behavior. *Results Probl Cell Differ* 11: 112-123

Kent J, Wheatley SC, Andrews JE, Sinclair AH, Koopman P (1996) A male-specific role for SOX9 in vertebrate sex determination. *Development* 122: 2813-2822

Kost TA, Theodorakis N, Hughes SH (1983) The nucleotide sequence of the chick cytoplasmic beta-actin gene. *Nucleic Acids Res* 11: 8287-8301

Kraynov VS, Chamberlain C, Bokoch GM, Schwartz MA, Slabaugh S, Hahn KM (2000) Localized Rac activation dynamics visualized in living cells. *Science* 290: 333-337

Kuwana T, Rogulska T (1999) Migratory mechanisms of chick primordial germ cells toward gonadal anlage. *Cell Mol Biol* 45: 725-736

Lewis KA, Gray PC, Blount AL, MacConell LA, Wiater E, Bilezikjian LM, Vale W (2000) Betaglycan binds inhibin and can mediate functional antagonism of activin signalling. *Nature* 404: 411-414

Lopez-Casillas F, Wrana JL, Massagué J (1993) Betaglycan presents ligand to the TGF beta signaling receptor. *Cell* 73: 1435-1444

Massagué J (1998) TGF- β signal transduction. *Annual Review of Biochemistry* 67: 753-791

McBride D, Sang H, Clinton M (1997) Expression of Sry-related genes in the developing genital ridge/mesonephros of the chick embryo. *J Reprod Fertil* 109: 59-63

Méndez C, Alcántara L, Escalona R, López-Casillas F, Pedernera E (2006) Transforming growth factor beta inhibits proliferation of somatic cells without

influencing germ cell number in the chicken embryonic ovary. *Cell and tissue Research*. En prensa.

Molyneaux KA, Zinszner H, Kunwar PS, Schaible K, Stebler J, Sunshine MJ, O'Brien W, Raz E, Littman D, Wylie C, Lehmann R (2003) The chemokine SDF1/CXCL12 and its receptor CXCR4 regulate mouse germ cell migration and survival. *Development* 130: 4279-4286

Moon SY, Zheng Y (2003) Rho GTPase-activating proteins in cell regulation. *Trends Cell Biol* 13: 13-22

Morrish BC, Sinclair AH (2002) Vertebrate sex determination: many means to an end. *Reproduction* 124: 447-457

Nobes CD, Hall A (1995) Rho, rac and cdc42 GTPases: regulators of actin structures, cell adhesion and motility. *Biochem Soc Trans* 23: 456-459

Olsson N, Piek E, ten Dijke P, Nilsson G (2000) Human mast cell migration in response to members of the transforming growth factor-beta family. *J Leukoc Biol* 67: 350-356

Pollard TD, Borisy GG (2003) Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments. *Cell* 112: 453-465

Raftopoulou M, Hall A (2004) Cell migration: Rho GTPases lead the way. *Dev Biol* 265: 23-32

Ridley AJ, Hall A (1992) The small GTP-binding protein rho regulates the assembly of focal adhesions and actin stress fibers in response to growth factors. *Cell* 70: 389-399

Ridley AJ, Schwartz MA, Burridge K, Firtel RA, Ginsberg MH, Borisy G, Parsons JT, Horwitz AR (2003) Cell migration: integrating signals from front to back. *Science* 302: 1704-1709

Ridley AJ (2001) Rho family proteins: coordinating cell responses. *Trends Cell Biol* 11: 471-477

Romanoff AL (1960) *The Avian Embryo: Structural and Functional Development*. New York, NY. Macmillan Company. 1305 pp.

Saitoh Y, Saitoh H, Ohtomo K, Mizuno S (1991) Occupancy of the majority of DNA in the chicken W chromosome by bent-repetitive sequences. *Cromosoma* 101: 32-40

Schneider DT, Schuster AE, Fritsch MK, Hu J, Olson T, Lauer S, Gobel U, Perlman EJ (2001) Multipoint imprinting analysis indicates a common precursor cell for gonadal and nongonadal pediatric germ cell tumors. *Cancer Res.* 19: 7268-7276

Shi Y, Massagué J (2003) Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell* 113: 685-700

Small JV, Kaverina I (2003) Microtubules meet substrate adhesions to arrange cell polarity. *Curr Opin Cell Biol* 15: 40-47

Smith CA, Andrews JE, Sinclair AH (1997) Gonadal sex differentiation in chicken embryos: expression of estrogen receptor and aromatase genes. *J Steroid Biochem Mol Biol* 60: 295-302

Smith CA, Sinclair AH (2001) Sex determination in the chicken embryo. *J Exp Zool* 290: 691-699

Smith CA, Sinclair AH (2004) Sex determination: insights from the chicken. *Bioessays* 26: 120-132

Stebler J, Spieler D, Slanchev K, Molyneaux KA, Richter U, Cojocaru V, Tarabykin V, Wylie C, Kessel M, Raz E (2004) Primordial germ cell migration in the chick and mouse embryo: the role of the chemokine SDF-1/CXCL12. *Dev Biol* 272: 351-361

Sternlicht MD, Werb Z (2001) How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Annu Rev Cell Dev Biol* 17: 463-516

Sun PD, Davies DR (1995) The cystine-knot growth-factor superfamily. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 24: 269-291

Tanigawa T, Pai R, Arakawa T, Higuchi K, Tarnawski AS (2005) TGF-beta signaling pathway: its role in gastrointestinal pathophysiology and modulation of ulcer healing. *J Physiol Pharmacol* 1: 3-13

Tsunekawa N, Naito M, Sakai Y, Nishida T, Noce T (2000) Isolation of chicken vasa homolog gene and tracing the origin of primordial germ cells. *Development* 127: 2741-2750

Ueno T, Tanaka YO, Nagata M, Tsunoda H, Anno I, Ishikawa S, Kawai K, Itai Y (2004) Spectrum of germ cell tumors: from head to toe. *Radiographics*. 2: 387-404

Ukeshima A, Yoshinaga K, Fujimoto T (1991) Scanning and transmission electron microscopic observations of chick primordial germ cells with special reference to the extravasation in their migration course. *J Electron Microsc* 40: 124-128

Vilchis-Landeros MM, Montiel JL, Mendoza V, Mendoza-Hernandez G, Lopez-Casillas F (2001) Recombinant soluble betaglycan is a potent and isoform-selective transforming growth factor-beta neutralizing agent. *Biochem J* 355: 215-222

Villalpando I, Sanchez-Bringas G, Sanchez-Vargas I, Pedernera E, Villafan-Monroy H (2000) The P450 aromatase (P450 arom) gene is asymmetrically expressed in a critical period for gonadal sexual differentiation in the chick. *Gen Comp Endocrinol* 117:325-334.

Wylie C (1999) Germ cells. *Cell* 96: 165-174

Yao HH, Capel B (2005) Temperature, genes, and sex: a comparative view of sex determination in *Trachemys scripta* and *Mus musculus*. *J Biochem (Tokyo)* 138: 5-12

Yamaguchi K, Nagai S, Ninomiya-Tsuji J, Nishita M, Tamai K, Irie K, Ueno N, Nishida E, Shibuya H, Matsumoto K (1999) XIAP, a cellular member of the inhibitor of apoptosis protein family, links the receptors to TAB1-TAK1 in the BMP signaling pathway. *EMBO J* 18: 179-187

Yoshida K, Shimada K, Saito N (1996) Expression of P450 (17 alpha) hydroxylase and P450 aromatase genes in the chicken gonad before and after sexual differentiation *Gen Comp Endocrinol* 102: 233-240

Yue J, Mulder KM (2001) Transforming growth factor-beta signal transduction in epithelial cells. *Pharmacol Ther* 1: 1-34

Zicha D, Genot E, Dunn GA, Kramer IM (1999) TGFbeta1 induces a cell-cycle-dependent increase in motility of epithelial cells. *J Cell Sci* 112: 447-454

Abreviaturas

ALK5	Receptor con cinasa tipo activina 5
BMP	Proteína morfogénica del hueso
CGP	Células germinales primordiales
cDNA	DNA complementario
CXCR4	Receptor para SDF-1
d.i.	Días de incubación
DEPC	Dietil pirocarbonato
DMEM	Dulbeco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimetil sulfoxido
DNA	Acido desoxiribonucleico
dNTP's	Desoxirribonucleótidos trifosfato
GAP	Proteínas activadoras de la actividad GTPasa
GDF	Factor de crecimiento y diferenciación
GEF	Factores de intercambio de nucleótidos de guanina
GPI	Inhibidor de la disociación de nucleótidos de guanina
GTP	Guanidin trifosfato
HH	Estadio Hamburger & Hamilton
LAP	Proteína asociada a la latencia
LTBP	Proteína asociada al TGF- β latente
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
RE α	Receptor a estrógenos alfa
RNA	Acido ribonucleico
RNA _m	RNA mensajero
rpm	Revoluciones por minuto
SDF-1	Factor derivado de células estromales
TA	Temperatura ambiente
TGF- β	Factor de crecimiento transformante beta
UV	Luz ultravioleta

Apéndice I

- Solución salina balanceada libre de calcio y magnesio

NaCl 8.09g.

KCl 0.2g.

Na₂HPO₄ 1.15g.

KH₂PO₄ 0.2g.

Aforar a 1litro de agua destilada y agregar 6-8 gotas de rojo de fenol como marcador de pH.

- Agua DEPC

Agregar a un litro de agua destilada 1ml de dietilpirocarbonato (DEPC) y agitar hasta que se disuelva, dejar en reposo toda la noche y esterilizar en autoclave.

- Buffer de carga para DNA 5X

Azul de bromofenol 0.025g.

Xileno cianol 0.025g.

Glicerol 1.5 ml

TAE 10X 1 ml.

Aforar con agua destilada hasta 10 ml.

- Buffer TAE 10X

Tris base 48.4g.

Acido acético glacial 11.42ml.

EDTA 500mM pH 8.0 20 ml.

Aforar a un litro

- Solución Bouin

Solución saturada de ácido pícrico	750ml.
Formol 37-40%	250ml.
Ácido acético glacial	50ml.

- Hematoxilina de Weigert:

a) Hematoxilina 0.5 gr.

Etanol 100% 50 ml.

Dejar madurar naturalmente durante 4 semanas.

b) Cloruro férrico (20% P/V) 2 ml.

Agua destilada 47.5 ml.

Ácido Clorhídrico concentrado. 0,5 ml

Mezclar ambas soluciones antes de usar. El color debe ser azul/violeta.

Descartar si es marrón.

- Rojo Masson

Fucsina 0.4 gr.

Orange G 1,6 gr.

Agua destilada 100 ml.

Ácido acético glacial 0.8 ml

- Verde Luz (Solución Acuosa. Duración ilimitada)

Verde Luz 0.3 gr

Acético Glacial 0.3 ml

Agua destilada 99,7 ml

- Ácido fosfomolibdico o fosfotúngstico

Ácido fosfomolibdico o fosfotúngstico 1 gr. Agua destilada 100 ml.

Apéndice II

- Histología

Los ovarios de embrión de pollo de 9 d.i. cultivados, se fijaron en solución de Bouin por 2 h a temperatura ambiente. Se lavaron con etanol al 30% varias veces hasta que dejó de salir el color amarillo. Se deshidrataron con cambios progresivos de etanol de 10 min cada uno (30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% , 90% y 100% dos veces), posteriormente se hicieron dos cambios con Xilol de 10 min cada uno. Se sumergieron en dos cambios de parafina líquida a 56° C de 1 h cada uno. Finalmente se colocaron en moldes para su solidificación, se realizaron cortes de 5 µm, que se colocaron en portaobjetos tratados con polilisina.

- Tinción tricrómica de Masson

- 1) Lavar con agua destilada 5 min
- 2) Hematoxilina férrica de Weigert 10 min.
- 3) Lavar en flujo de agua corriente hasta que el agua salga clara
- 4) Rojo Masson 5-10 min.
- 5) Lavar en flujo de agua corriente hasta que el agua salga clara
- 6) Diferenciar con ácido fosfotúngstico 10 min.
- 7) Lavar en flujo de agua corriente
- 8) Contrateñir con verde luz 2-5 min.
- 9) Lavar en flujo de agua corriente hasta que el agua salga clara.

- Extracción de RNA de tejido

- 1) Homogenizar ovario en 500 µl de Trizol, en un tubo eppendorf con pistilo eléctrico. Al finalizar agregar otros 500 µl.
- 2) Incubar a temperatura ambiente (TA) 5 min.
- 3) Agregar 200 µl de cloroformo, tapar y agitar vigorosamente.
- 4) Incubar 3min a TA.

- 5) Centrifugar 11,500 rpm. a 4° por 15min.
- 6) Pasar la fase acuosa a un tubo limpio.
- 7) Agregar 500 µl de isopropanol e incubar 10 min a TA.
- 8) Centrifugar a 11,500 rpm a 4° C por 10 min y apartar el sobrenadante.
- 9) Lavar con etanol 75% en agua DEPC dos veces y retirar el exceso.
- 10) Secar al aire 10 min a TA. No dejar que seque completamente.
- 11) Disolver en 20-50 µl de agua DEPC e incubar a 60° C por 7 min.
- 12) Medir la absorbancia a 260 nm y 280nm para determinar la concentración y pureza respectivamente. (1 OD_{260nm} RNA= 40 µg/µl).

- Síntesis de cDNA

Para la síntesis de cDNA se uso el kit 1st strand cDNA síntesis para RT-PCR de Roche, se preparó la siguiente reacción:

2 µg RNA total
2 µl Oligo-p(dT)₁₅ (1.6 µg)
2 µl Buffer 10X
4 µl MgCl 25mM
2 µl dNTP's 10mM c/u
1 µg inhibidor de RNAsas (50 unidades)
0.8 µl de enzima reversa transcriptasa
Agua DEPC hasta 20 µl

Se incubó la reacción en un termociclador a 25° C por 10min, 42° C 60 min, 99° C 5 min y 4° C min. El cDNA se guarda a -20° C hasta usarse.

- PCR

Se preparó una reacción de PCR usando el cDNA de ovario como templado, con la siguiente reacción:

2 µl cDNA
2.5 µl Buffer 10X

- 1.5 μ l Mezcla de dNTP's 10mM c/u
- 1 μ l Oligos sintéticos 20 μ M (1 μ l c/u)
- 1 μ l DMSO
- 1.5 μ l MgCl 25 mM
- 14 μ l Agua destilada
- 0.5 μ l Taq polimerasa (Roche)

Los ciclos de la reacción de PCR fueron los siguientes:

- 1) 95° C 5 min desnaturalización
 - 2) 95° C 45 s desnaturalización
 - 3) 45 s alineación
 - 4) 72° C 45 s extensión
 - 5) 72° C 5 min extensión final
 - 6) 4° C ∞
- } 30 ciclos

Las temperaturas de alineación fueron diferentes para cada par de oligonucleótidos, dependiendo de la T_M de cada uno:

- TGF- β 2 = 54° C
- T β RII = 52° C
- β -actina= 59° C

- Electroforesis

Se preparó un gel de agarosa 0.8% en buffer TAE 1X con 2 μ l de bromuro de etidio 10 μ g/ μ l, se cargaron 5 μ l de cada uno de los reacciones de PCR con el buffer de carga 5X. El gel se sumergió en una cámara de electroforesis con buffer TAE 1X y se corrió a 90 V.

El gel se visualizó con UV y fue fotografiado con el sistema Epi Chemi II darkroom (UVP laboratory systems).