



# **UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

FACULTAD DE MEDICINA

ANÁLISIS DE LA DISTRIBUCIÓN DEL FACTOR DE CRECIMIENTO  
TRANSFORMANTE BETA ( $TGF\beta$ ) EN EL OVARIO DE EMBRIÓN DE  
POLLO

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:

JOSE RENE ESCALONA MUGICA

DIRECTOR DE TESIS:

DR. ENRIQUE PEDERNERA ASTEGIANO

FACULTAD DE MEDICINA

COMITE TUTOR:

DR. HORACIO MERCHANT LARIOS

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMEDICAS

DRA. MARINA MACIAS SILVA

INSTITUTO DE FISILOGIA CELULAR, UNAM

MÉXICO, D. F. FEBRERO DE 2012

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Dr. Enrique Pedernera por darme la oportunidad de trabajar con él todos estos años, por la paciencia que me tuvo y por la libertad que me otorgó a lo largo del proyecto. A todos los miembros de su laboratorio; a la Dra. Carmen Méndez, a la CD María José Gómora Herrera por su ayuda técnica y a la Q.F.B. Carmen Mondragón.

A la Dra. Verónica Díaz Hernández por su invaluable ayuda en la terminación del artículo y corrección del mismo. Al M. en C. Alejandro Marmolejo Valencia del IIB por su valiosa ayuda técnica en la preparación del artículo.

A Verónica Rodríguez Mata de la FM, a la Dra. Annie Pardo y su técnico Remedios Ramírez de la FC y por su colaboración en técnicas histológicas.

A mi comité Tutoral, al Dr. Horacio Merchant Larios del IIB, la Dra. Marina Macías Silva del IFC y a la Dra. Irma Villalpando del IIB. Por sus valiosos comentarios y observaciones a lo largo de mi programa de doctorado; así como por ser un gran ejemplo a seguir. En especial a la Dra. Marina Macías Silva y los miembros de su grupo de trabajo por la ayuda material, técnica y académica prestada.

A los miembros de mi jurado de tesis la Dra. Norma Moreno M. del IBB, el Dr. Gerardo Vázquez Nin de FC, el Dr. Fernando López Casillas del IFC y al Dr. Marco Juárez O. de la FM. Por sus agudas y precisas observaciones y comentarios prestados al presente trabajo.

Al Dr. Steve Stricker de la Universidad de Nuevo México por abrirme las puertas de su laboratorio y haberme dado la oportunidad de trabajar a su lado como colaborador. Pero sobre todo por la confianza y amistad que me brindó todo el tiempo que trabajé con él.

A la Dra. Catherine Krull de la Universidad de Michigan por haberme permitido aprender tantas nuevas técnicas en su laboratorio; así como por haberme dado absoluta libertad y acceso a todos los recursos de los cuales dispone. Además por el compromiso que mostró de apoyarme con materiales y técnicas a mi regreso a México.

Este proyecto fue apoyado por CONACyT proyecto número 60346, PAPIIT-UNAM IN206810 y IACOD-UNAM IB200111. Asimismo agradezco a la UNAM, al Posgrado en Ciencias Biomédicas y al CONACyT por el apoyo académico y económico que me otorgaron durante toda mi licenciatura y posgrado.

## DEDICATORIAS

### A mi familia

Mi padre, por ser un modelo de persona a seguir y la fortaleza que ha mostrado estos últimos años. No se que haría sin el.

Mi madre, por su paciencia y amor que me ha dado toda mi vida; y por cuidar de toda la familia.

Mis hermanos, Margarita y Alonso; por su compañía, apoyo incondicional y sobre todo por tolerarme. En especial agradezco el apoyo técnico con las imágenes al mejor diseñador industrial del mundo; mi hermanito.

### A mis amigos

Genaro, por la gran amistad a lo largo de estos años y espero que podamos llevar a cabo todos esos planes que se nos fueron ocurriendo todo este tiempo.

Georgina, gracias por todo el apoyo y confianza brindados esos momentos difíciles del doctorado.

Libertad, mi eterna confidente y terapeuta.

Paola, Julio, Esteban, José Miguel, José y Valeria; por su compañía y amistad en este difícil camino.

### A la Dra. Ana Ceballos, excelente tutora y modelo a seguir

Finalmente y no menos importante, con especial énfasis, a Jessica Téllez por acompañarme y apoyarme en esta recta final. Sin importar que es lo que siga, espero experimentarlo a su lado.

## Índice

|   |    |
|---|----|
| 1. Resumen .....  | 1  |
| 2. Abstract .....   | 2  |
| 3. Introducción.....  | 3  |
| 3.1 Morfogénesis del ovario de pollo.....   | 3  |
| 3.2 Control genético del desarrollo gonadal en aves.....                              | 6  |
| 3.3 Mecanismos del desarrollo asimétrico del ovario.....                              | 9  |
| 3.4 Desarrollo de las células germinales en la gónada embrionaria de pollo.....       | 10 |
| 3.5 Desarrollo de la función endocrina del ovario.....                                | 11 |
| 3.6 La superfamilia del factor de crecimiento transformante beta (TGF- $\beta$ )..... | 11 |
| 3.7 Estructura, síntesis y activación del TGF- $\beta$ .....                          | 12 |
| 3.8 Receptores para TGF- $\beta$ y su activación por ligando.....                     | 14 |
| 3.9 Receptores accesorios para TGF- $\beta$ .....                                     | 15 |
| 3.10 Señalización canónica de TGF- $\beta$ .....                                      | 15 |
| 3.11 Señalización por TGF- $\beta$ independiente de Smads.....                        | 16 |
| 3.12 Papel del TGF- $\beta$ durante el desarrollo embrionario.....                    | 17 |
| 3.13 TGF- $\beta$ en el desarrollo gonadal.....                                       | 20 |
| 3.14 TGF- $\beta$ como regulador de la función ovárica.....                           | 22 |
| 4. Planteamiento del problema.....  | 24 |
| 5. Hipótesis.....   | 25 |

|                              |    |
|------------------------------|----|
| 6. Objetivos.....            | 25 |
| 7. Materiales y métodos..... | 26 |
| 8. Resultados.....           | 30 |
| 9. Discusión.....            | 42 |
| 10. Conclusiones.....        | 47 |
| 11. Perspectivas.....        | 48 |
| 12. Referencias.....         | 49 |
| 13. Apéndice.....            | 56 |

## **Resumen**

El factor de crecimiento transformante  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) es una citocina que participa en la regulación de diversos procesos celulares como son la proliferación, adhesión, migración y diferenciación. En el presente trabajo se estudió el patrón de expresión del TGF- $\beta$  en gónadas de embrión de pollo desde los seis hasta los diez días de incubación (di). Se analizó la expresión del ARNm y la proteína de TGF- $\beta$ ; así como la fosforilación de sus moléculas de transducción, las proteínas Smad. Finalmente se determinó el efecto que el TGF- $\beta$  ejerce sobre el ovario de embrión de pollo en un modelo de cultivo de órgano. Se encontró que el ARNm TGF- $\beta$ 2 es expresado predominantemente en la corteza del ovario izquierdo a partir de 8 di. De igual manera, la inmunofluorescencia para la proteína de TGF- $\beta$  reveló que ésta se encontraba distribuida en el espacio extracelular de la médula de ambos ovarios de embriones de pollo a partir de los 9 di. La presencia de Smad2 fosforilada en el núcleo de células del ovario sugiere que la señalización por TGF- $\beta$  se encuentra activa en este periodo del desarrollo. Por medio del cultivo de ovarios en un medio suplementado con TGF- $\beta$ , se observó que el TGF- $\beta$  es capaz de modificar la estructura del ovario mediante un desplazamiento de células de la corteza hacia la médula. Estos resultados corroboran la presencia de TGF- $\beta$  funcional, así como de sus receptores en el ovario embrionario de pollo. Estos resultados abren la posibilidad de que el TGF- $\beta$  participe en el desarrollo de las gónadas de pollo.

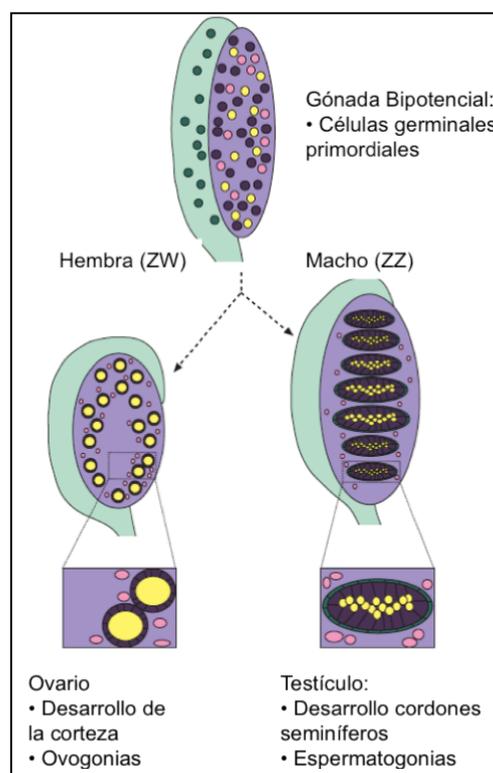
## **Abstract**

Transforming growth factor  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) is a cytokine that controls diverse cellular processes such as cell proliferation, adhesion, migration and proliferation. In the present work the expression patterns of TGF- $\beta$  were studied in the chicken embryo gonad at 6-10 days of incubation (di). The expression of TGF- $\beta$ 's mRNA and protein, as well as the phosphorylation state of the Smad proteins were studied. Finally, the effects TGF- $\beta$  exerted over the ovary in an organ culture system were assessed. TGF- $\beta$ 2 mRNA was predominantly expressed in the left ovarian cortex at 8 di. In the same manner, immunofluorescence for TGF- $\beta$  protein showed that it was located in the extracellular space in the cortex of both ovaries. The presence of phosphorylated Smad2 in the nucleus of ovarian cells suggests that TGF- $\beta$  signaling is most likely active at this developmental stage. Culturing ovaries in a TGF- $\beta$  supplemented medium revealed that TGF- $\beta$  induces a change in ovarian morphology; a shift of cortical cells towards the medulla was observed. These results demonstrate the presence of active TGF- $\beta$  and its receptors in the developing avian gonad. In addition, these findings suggest a role of TGF- $\beta$  during gonad morphogenesis in the chicken embryo.

## Introducción

### Determinación sexual y desarrollo gonadal en aves

El desarrollo de la gónada es notable en el sentido de que es el único ejemplo que existe dentro del embrión, en el que el primordio de un órgano tiene dos posibles destinos (ovario o testículo); dependiendo de el componente genético del organismo (Fig. 1). Al igual que en mamíferos, en aves el mecanismo de determinación sexual es cromosómico. Sin embargo, a diferencia de lo que sucede en embriones de ratón, en embriones de pollo las hembras son heterogaméticas y los machos son homogaméticos. Las hembras poseen un cromosoma Z y uno W; mientras que los machos tienen dos cromosomas Z. Los pares de cromosomas sexuales en la mayoría de aves y mamíferos no comparten genes entre si. A pesar de las diferencias en secuencias, el cromosoma Z (rico en genes) y el cromosoma W (condensado y con pocos genes) tienen ciertos paralelos a nivel estructural con los cromosomas X y Y de mamíferos (Clinton, 1998).



**Fig 1.** Esquema de la diferenciación sexual en aves.

### Morfogénesis del ovario en pollo

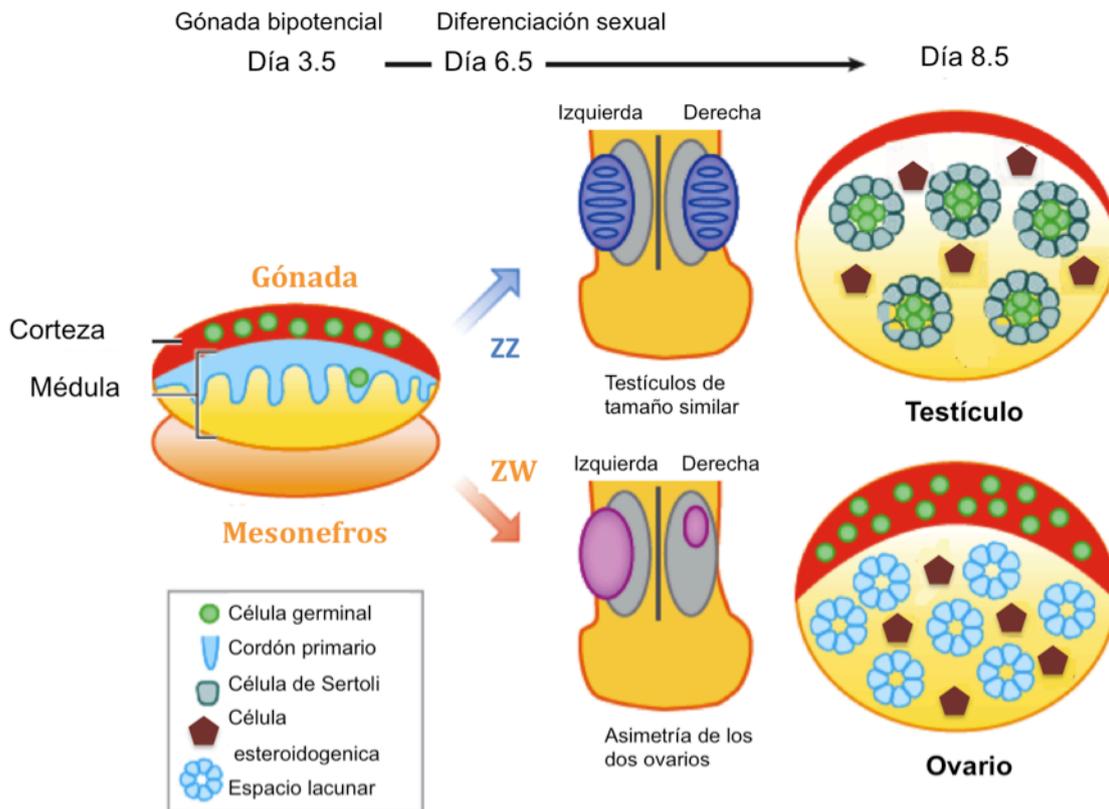
Durante la morfogénesis gonadal, la mayor diferencia entre la mayoría de las aves y otras clases de vertebrados es el desarrollo asimétrico de las gónadas. En hembras, solamente el ovario izquierdo se desarrolla

completamente y es funcional. Mientras que en machos, ambos testículos se desarrollan siendo el izquierdo ligeramente mayor que el derecho.

Al igual que en mamíferos, el primordio gonadal en el embrión de pollo se origina a partir del mesodermo intermedio sobre la superficie ventral del mesonefros, el segundo primordio del riñón en el embrión. La gónada surge en un estado bipotencial, en el cual las gónadas masculinas y femeninas son morfológicamente indistinguibles (DeFalco & Capel, 2009).

A partir de 3.5 días de desarrollo embrionario, las gónadas son órganos discretos los cuales se expanden hacia la cavidad celómica. La gónada indiferenciada está compuesta por una capa epitelial externa, derivada del epitelio celómico. Debajo de esta capa externa, se encuentra la médula, formada por cordones. Los cordones medulares derivan de la proliferación de células del epitelio superficial, entre los cordones se encuentra mesénquima proveniente del blastema urogenital.

En el embrión de pollo, la gónada bipotencial comienza el proceso de diferenciación sexual a los 6.5 días de desarrollo. La dirección que tomará este proceso depende esencialmente de que compartimiento, la médula o la corteza, proliferará y albergará a las células germinales. En machos, en ambos testículos es la médula la que prolifera, los cordones medulares se engrosan dando lugar a los cordones seminíferos (Smith & Sinclair, 2004). En hembras ambos ovarios son significativamente diferentes. En el ovario izquierdo la corteza se engrosa considerablemente, por la proliferación de células somáticas y germinales. En la médula, los cordones medulares forman cavidades conocidas como espacios lacunares (Carlson & Stahl, 1985). En ovario adulto, estos espacios en parte median la reabsorción del vitelo de folículos que pasan por atresia en lugar de ser ovulados (Nili & Kelly, 1996). Por otro lado, en el ovario derecho la corteza falla en desarrollarse y está compuesto esencialmente por la médula (Fig. 2).



**Fig. 2** Morfogenesis gonadal en pollo. La gónada bipotencial está dividida en dos compartimentos: en una corteza y unamédula. Los cordones primarios se convierten en cordones testiculares en machos (ZZ) y en espacios lacunares en hembras (ZW). Las hembras solo desarrollan un ovario funcional (el izquierdo), adaptado de DeFalco & Capel, 2009.

A los 9 días de desarrollo se observa un marcado desarrollo de los cordones corticales. A partir de este estadio de desarrollo en el ovario izquierdo la corteza presenta un importante crecimiento por el proceso previamente mencionado. La corteza contiene un gran número de células germinales, estas células se caracterizan por la presencia en su citoplasma de agregados de organelos membranosos (mitocondrias, retículo endoplasmático y aparato de Golgi, principalmente), conocidos como cuerpo de Balbiani. Además, en ambos ovarios la médula desarrolla cúmulos de células productoras de hormonas esteroideas (Alvarez-Fernández *et al.*, 1995), así como prominentes espacios lacunares (Carlson & Stahl, 1985).

Para el día 14 de desarrollo embrionario las células germinales en la corteza entran en profase meiótica. Las células de la granulosa probablemente derivan de células somáticas corticales que rodean a las células germinales; una alternativa es que deriven a partir de células medulares que migran hacia la corteza (Smith & Sinclair, 2004). En ambos ovarios se pueden encontrar células germinales en la región medular; sin embargo, estas células fallan en entrar a meiosis y posteriormente degeneran (Ukeshima & Fujimoto, 1991).

La morfología ovárica caracterizada por un predominio de la corteza sobre la médula, contrasta con la gónada masculina. En testículos, ambas medulas desarrollan cordones sexuales con células germinales, los cuales están rodeados por estroma. Por otro lado, su corteza no presenta desarrollo; el epitelio superficial derivado del epitelio celómico experimenta regresión, quedando como remanente un epitelio simple (Narbaitz & Adler, 1966; Carlon & Stahl, 1985; DeFalco & Capel, 2009). Recientemente, en el ovario de embrión de pollo, se ha mostrado la presencia de las moléculas de adhesión celular de la superfamilia de las Cadherinas. En particular las Cadherinas E y N, las cuales se expresan en los cordones corticales y en células germinales respectivamente. Su presencia en la corteza ovárica sugiere que estas moléculas de adhesión están involucradas en la morfogénesis del ovario de embrión de pollo (Günter et al., 2011).

### **Control genético del desarrollo gonadal en aves**

En la mayoría de los mamíferos, la determinación sexual es controlada genéticamente por la presencia o ausencia del cromosoma Y. El desarrollo de los caracteres sexuales secundarios; así como el sistema de conductos sexuales depende del destino que adquiere la gónada. El inicio del desarrollo testicular inicia con la expresión del gen *Sry* (región determinante del sexo en el cromosoma Y). Por otro lado, embriones sin cromosoma Y o con una delección del gen *Sry* desarrollan ovarios (Brennan & Capel, 2004).

Hasta la fecha no se ha encontrado un homólogo en aves del gen *Sry*. Por lo que se han postulado dos hipótesis para explicar el mecanismo de la determinación sexual en aves. En la primera, el sexo es determinado por la dosis de uno o más genes en el cromosoma Z (mayor en machos). La segunda propone que el sexo es determinado por un gen o genes determinante(s) de ovario en el cromosoma W. Aunque ninguno de estos mecanismos ha sido probado definitivamente, la mayoría de la evidencia apunta hacia la hipótesis de la dosis del cromosoma Z (Chue & Smith, 2011); en particular el gen *DMRT1* localizado en el cromosoma Z es el principal candidato al gen determinante del sexo en aves (Smith, et al. 2009).

El gen *DMRT1* codifica para una proteína rica en cisteínas, que en vertebrados funciona como factor de transcripción. Este gen es transcrito en mayor cantidad en testículos y su expresión es activa en ambos cromosomas Z. Esto sugiere que el gen *DMRT1* podría funcionar por un mecanismo dependiente de dosis; en el cual es necesario que este gen alcance un umbral de dosis a partir del cual se inicia el desarrollo hacia testículo. Este umbral podría ser únicamente alcanzado por embriones ZZ; mientras que en hembras con un complemento cromosómico ZW la gónada se desarrolla por la vía de ovario (Graves 2009).

Experimentos de knock-down de *DMRT1* usando vectores retrovirales han mostrado resultados que apoyan esta hipótesis. Gónadas ZZ en las que la expresión de *DMRT1* fue reducida adoptaron una morfología más parecida a la de un ovario que la de un testículo. Además de la diferencia morfológica, estas gónadas presentaban una expresión de genes marcadores de ovario (Smith et al. 2009).

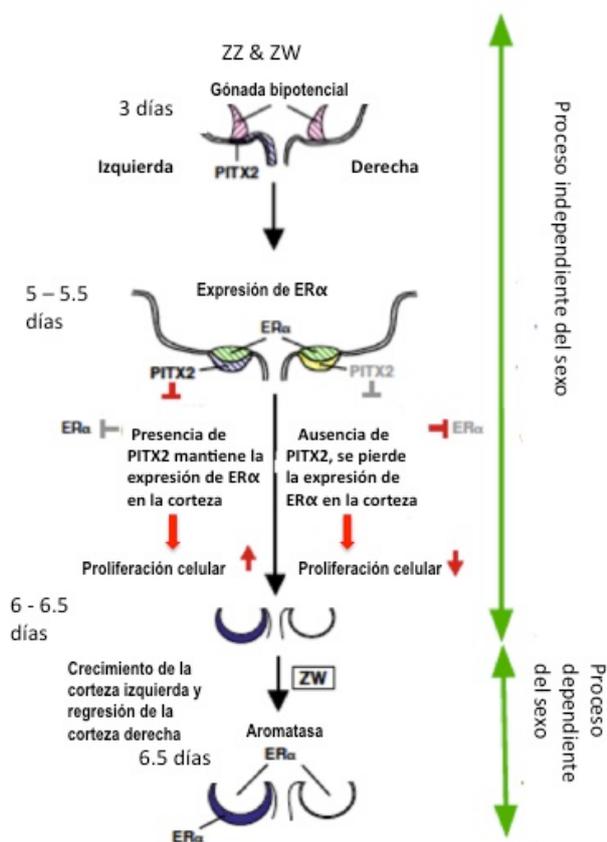
Además del gen *DMRT1* se ha descrito una variedad de genes que presentan una expresión dimórfica en ambas gónadas en desarrollo. Estos genes probablemente funcionen como efectores río abajo de *DMRT1*. El gen que codifica para la hormona anti Mülleriana (AMH) se expresa en la gónada de

ambos sexos antes y durante la diferenciación gonadal, con una expresión mayor en machos que en hembras. El gen Sox9 es específico de machos y su expresión inicia después de la aparición de los ARN de *AMH*. El gen del tumor de Wilm (*WT1*) se expresa altamente en ambas gónadas. Por otro lado, el gen para *SF1* presenta una expresión mayor en ovarios en desarrollo. De igual manera, transcritos del gen *DAX1* se observan en ambos sexos, pero su expresión en hembras es significativamente mayor (Smith *et al.* 1999).

Finalmente, existe evidencia que señala que en el desarrollo del ovario hay una participación activa de los estrógenos. La enzima P-450 aromatasa, la cual participa en el último paso en la producción de  $17\beta$  estradiol es expresada en la médula de ambos ovarios (Villalpando *et al.*, 2000). Por otro lado, el gen para el receptor a estrógenos (ER) es expresado por la corteza del ovario izquierdo únicamente (Andrews *et al.* 1997). Esta expresión asimétrica del ER podría explicar el desarrollo de la corteza ovárica izquierda (Andrews *et al.* 1997; Nakabayashi *et al.* 1998; Shimada 1998; ). Vaillant *et al.* 2001, demostraron la reversión sexual de embriones de pollo ZW tratados con Fadrozol, un inhibidor de la aromatasa. Estos embriones presentaban un desarrollo de ambas gónadas; la gónada derecha se transformó en un testículo y la izquierda en un ovotestis. Estos resultados apoyan la noción de que los estrógenos por medio del ER participan en el desarrollo de la corteza ovárica.

## Mecanismos del desarrollo asimétrico del ovario.

Como ya se mencionó previamente, en embriones de pollo las hembras presentan un desarrollo asimétrico de los ovarios. Este desarrollo asimétrico de las gónadas de embrión de pollo está regulado por el factor de transcripción Pitx2, éste se localiza de manera asimétrica en la gónada izquierda. La inducción de su expresión en la gónada derecha es suficiente para rescatarla de degenerar (Guiolli & Lovell-Badge, 2007). El mecanismo de la asimetría inducida por Pitx2 es mediado por ácido retinoico (AR). El AR es producido únicamente en la corteza de la gónada derecha, donde reprime la expresión de SF-1 y del receptor a estrógenos alfa ( $ER\alpha$ ). En la gónada izquierda (carente de AR), la ciclina D1 es sobrerregulada y estimula la proliferación de las células corticales (Ishimaru *et al.*, 2008) (Fig. 3).



**Fig. 3** Mecanismo del desarrollo asimétrico del ovario de embrión de pollo, adaptado de Ishimaru *et al.*, 2008.

Los estrógenos han sido ligados al desarrollo de la corteza en el ovario izquierdo. La gónada derecha falla en desarrollar una corteza funcional, debido a su falta de receptor de estrógenos (ER). La proteína de ER se encuentra únicamente en la corteza izquierda de hembras (Andrews *et al.* 1997; Smith *et al.* 1997). Finalmente, también se ha descrito una expresión asimétrica de la proteína morfogenética de hueso 7 (BMP7) en la médula del ovario izquierdo; sin embargo, su posible función durante la morfogénesis no ha sido determinada (Hoshino *et al.* 2005).

## **Desarrollo de las células germinales en la gónada embrionaria de pollo**

En el embrión de pollo las células germinales primordiales (CGP) se originan a partir de células del epiblasto y se desarrollan fuera del embrión en una región conocida como creciente germinal (Eyal-Giladi *et al.*, 1976). Posteriormente migran hacia la gónada en desarrollo por medio del sistema vascular (Swift, 1914; Ando y Fujimoto, 1983; Kuwana, 1993). Una vez que han llegado a la gónada las células germinales (CG) adquieren un patrón de distribución diferente para cada sexo. Una vez que comienza el desarrollo del ovario, las CG se distribuyen en ambos compartimientos del mismo (corteza y médula). Al inicio del desarrollo del ovario, las CG se distribuyen simétricamente en ambas gónadas. Conforme se va llevando a cabo la morfogénesis ovárica y la asimetría de la gónada izquierda y derecha se hace evidente, las CG adquieren una distribución también asimétrica; existiendo una mayor densidad en la gónada izquierda (Zaccanti *et al.*, 1990).

En el ovario izquierdo después de la diferenciación sexual las CG comienzan a proliferar rápidamente en la corteza. Las CG corticales comienzan a agregarse en pequeños grupos y forman uniones intercelulares y se encuentran en íntima asociación con las células somáticas. Por otro lado, las CG medulares presentan una menor proliferación. Además, en esta región se observó un mayor número de CG en apoptosis comparado con la corteza. En el ovario derecho, dada la ausencia de una corteza todas las CG tienen una distribución medular. Estas CG presentan una mayor incidencia de muerte celular así como una falta de asociación con las células somáticas (Ukeshuima & Fujimoto, 1991). Las CG medulares de ambos ovarios son desplazadas hacia los espacios lacunares. Una vez ubicadas en los espacios lacunares las CG experimentan apoptosis (Ukeshuima, 1994).

McCarrey y Abbot (1982), demostraron que en las aves, las CG no son indispensables para la diferenciación gonadal; lo cual contradecía el modelo previo donde se especulaba sobre un posible papel inductor de estas sobre la

gónada. Estos autores mostraron que reduciendo el número de las CG previo a su migración hacia la gónada (por resección de la creciente germinal), no se impedía el desarrollo de la gónada indiferenciada hacia ovario o testículo. Ovarios con un número menor de CG presentaban una morfología similar a los controles así como producción de  $17\beta$  estradiol.

### **Desarrollo de la función endocrina del ovario**

La conversión de colesterol en hormonas esteroideas involucra varias enzimas; la expresión de estas enzimas es regulada de manera temporal y sexo específica. La diferenciación morfológica de las gónadas masculina y femenina inicia alrededor de los 6.5 días de incubación. Al mismo tiempo los ARNm de varias enzimas esteroidogénicas se pueden observar en las gónadas. Los ARNm para las enzimas P450<sub>scc</sub>, 3 $\beta$ -HSD, P450<sub>c17</sub> y 17 $\beta$ -HSD se pueden detectar en la gónada izquierda y derecha de ambos sexos previo a la diferenciación sexual (Bruggeman *et al.* 2002). Como ya se había mencionado previamente la expresión de la enzima P450 aromatasa; que convierte testosterona en  $17\beta$ -estradiol está limitada a las hembras. Una consecuencia de esta expresión de P450 aromatasa es que los niveles plasmáticos de hormonas esteroideas comienzan a diferir en ambos sexos. Los niveles de testosterona son mayores en machos, mientras que los niveles de estradiol son mayores en hembras.

### **La superfamilia del factor de crecimiento transformante beta (TGF- $\beta$ )**

La superfamilia del TGF- $\beta$ , consta de un grupo de proteínas estructuralmente conservadas pero funcionalmente diversas. Estas proteínas se encuentran ampliamente distribuidas dentro del cuerpo y funcionan como ligandos extracelulares; los cuales están involucrados en numerosos procesos fisiológicos durante el desarrollo embrionario y el periodo postnatal. Esta superfamilia está compuesta por varias familias de citocinas entre las que se

incluyen: los TGF- $\beta$ s, activina, inhibina, hormona anti-mulleriana (AMH), proteínas morfogenéticas de hueso (BMPs) y miostatina (Piek *et al.*, 1999).

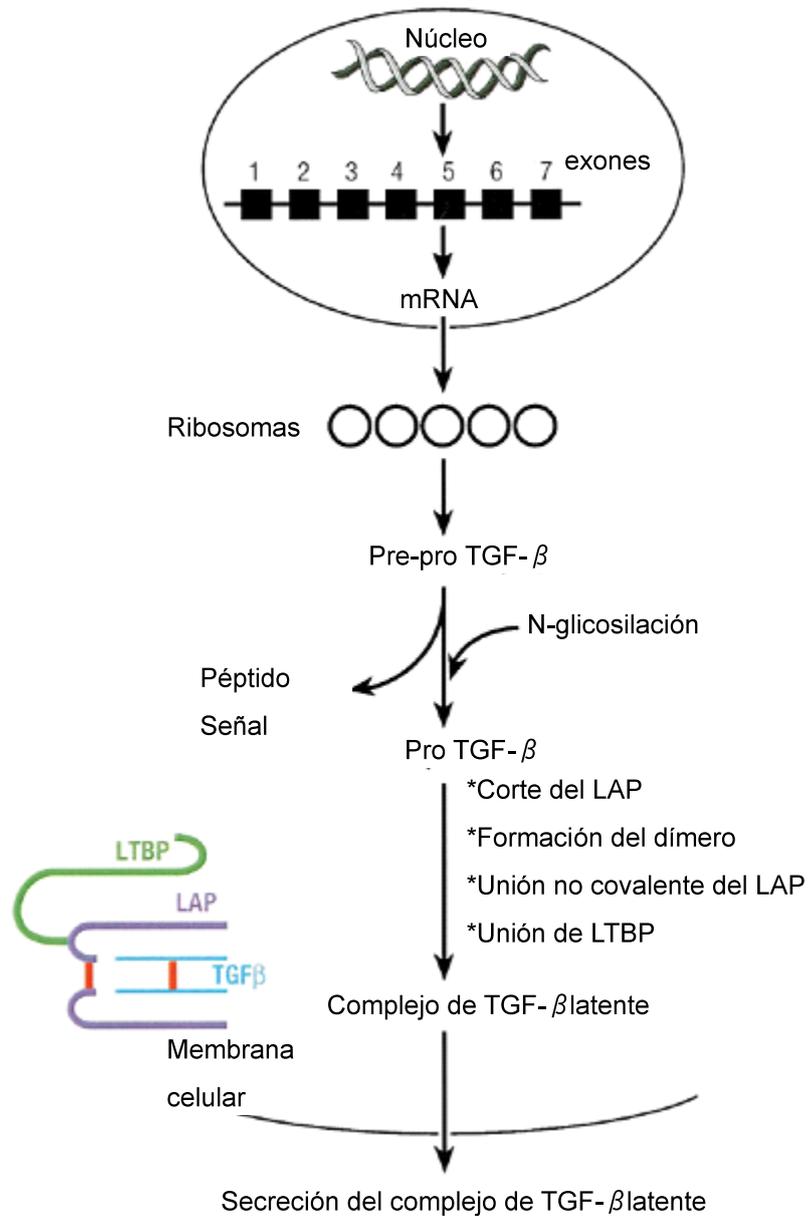
En mamíferos existen tres isoformas de TGF- $\beta$ : TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2 y TGF- $\beta$ 3. Las 3 isoformas son altamente similares a nivel de secuencia y su actividad *in vitro*; sin embargo, difieren en sus patrones de expresión así como en su función. Por otro lado, además de las isoformas previamente mencionadas, se han encontrado TGF- $\beta$ 4 en aves (Pan & Halper, 2003) y TGF- $\beta$ 5 en anfibios (Kondaiah *et al.*, 1990). Sin embargo, existen reportes que señalan que TGF- $\beta$ 4 es el ortólogo en aves de TGF- $\beta$ 1 (Halper *et al.* 2004).

### **Estructura, síntesis y activación del TGF- $\beta$**

La forma bioactiva de la molécula es la de un homodímero de dos péptidos de 12.5 kDa unidos por un enlace disulfuro, para formar una molécula de 25 kDa (TGF-  $\beta$  1.1, -  $\beta$  2.2 o -  $\beta$  3.3). También es posible la formación de heterodímeros (TGF-  $\beta$  1.2 y -  $\beta$  2.3) (Clark & Cocker, 1998). Cada monómero consta de varias cadenas  $\beta$  entrelazadas por tres puentes disulfuro conservados, estos forman una estructura conocida como el nudo de cisteínas (Sun & Davies, 1995).

Los miembros de la familia del TGF- $\beta$  son sintetizados como moléculas precursoras, las cuales son procesadas proteolíticamente en el aparato de Golgi por endoproteasas de la familia convertasa. Estas cortan el precursor en dos, el TGF- $\beta$  maduro y una proteína asociada a latencia (LAP). El LAP permanece unido al TGF- $\beta$  maduro de manera no covalente, de esta manera inhibiendo su unión a sus receptores. Dentro del aparato de Golgi el LAP interactúa con proteínas de unión a TGF- $\beta$  latente (LTBP), para formar un complejo de latencia. Existen cuatro isoformas de LTBP, incluyendo diversas variantes de "splicing". Las LTBP tienen la función de aumentar la secreción y estabilidad del complejo TGF- $\beta$ /LAP, permitir el plegamiento correcto del

TGF- $\beta$  y dirigir el complejo de latencia hacia componentes de matriz extracelular de ciertos tejidos para su almacenamiento y subsecuente activación (Piek *et al.*, 1999; Annes *et al.*, 2003) (Fig. 4).



**TGF $\beta$**  - Factor de crecimiento transformante  $\beta$

**LAP** - Proteína asociada a latencia

**LTBP** - Proteína de unión a TGF- $\beta$  latente

**I** - Puente disulfuro

**Fig. 4** Esquema de la síntesis, procesamiento y secreción de TGF- $\beta$ , adaptado de Cocker R. & Clark D., 1998.

Diversas proteasas han sido identificadas *in vitro* como activadores de TGF- $\beta$  latente; entre estas se incluyen proteasas de la familia de proteasas de serina como la plasmina y miembros de la familia de metaloproteasas como MMP-2 y MMP-9 (Annes *et al.*, 2003).

### **Receptores para TGF- $\beta$ y su activación por el ligando**

Los miembros de la superfamilia del TGF- $\beta$  señalizan a través de una familia de receptores de membrana con actividad de cinasas de serinas y treoninas, conocidos como la familia de receptores a TGF- $\beta$ . Basado en las propiedades estructurales y funcionales de los receptores esta familia se ha dividido en 2 subfamilias: receptores tipo I y tipo II. Los receptores tipo I siguen la siguiente nomenclatura: se les denomina cinasas parecidas a activina (Alk), TGF- $\beta$  se puede unir tanto a Alk1 como Alk5. Los receptores tipo II se les nombra dependiendo del ligando con el que interaccionan, por ejemplo TGF $\beta$ RII para el TGF- $\beta$  (Caestecker M, 2004).

Los receptores tipo I y II son glicoproteínas de entre 500 y 570 aminoácidos, con un peso molecular de aproximadamente 55 kDa y 70 kDa respectivamente. Su región extracelular es relativamente corta (150 aminoácidos), la cual contiene 10 o más cisteínas y es N-glicosilada. Tanto la región transmembrana como la región citoplásmica adyacente a la membrana de ambos tipos de receptores no poseen características estructurales notables (Massagué, 1998). En el extremo C-terminal de la región citoplasmática de ambos receptores se encuentra un dominio de cinasa de serinas y treoninas. Una característica notable de los receptores tipo I es una región de 30 aminoácidos conservados en la porción anterior al dominio de cinasa. Esta secuencia de aminoácidos es conocida como el dominio GS por su secuencia característica de SGS $\beta$ GSG; este dominio es blanco de fosforilación por parte del TGF $\beta$ RII (Massagué, 1998) (Fig.5).

Tanto TGF- $\beta$  como activina muestran alta afinidad por receptores de tipo II y no interactúan con receptores de tipo I aislados. El ligando se une primero al dominio extracelular del receptor tipo II; este complejo receptor/ligando se une de manera cooperativa a el receptor tipo I. La unión del dominio extracelular de ambos receptores induce un acercamiento entre los dominios de cinasa de ambos tipos de receptores; permitiendo que los receptores tipo II fosforilen a los receptores tipo I en el dominio GS. Una vez activados, los receptores tipo I fosforilan a las proteínas Smad en residuos serina; las cuales son los efectores intracelulares de la señalización por TGF- $\beta$  (Shi & Massagué, 2003; Groppe et al., 2008) (Fig. 5).

### **Receptores accesorios para TGF- $\beta$**

TGF- $\beta$  además de unirse a los receptores tipo I y II es capaz de interactuar con receptores de membrana sin actividad de cinasa. El primero en ser descrito fue TGF $\beta$ RIII o betaglicano. Este receptor está altamente glicosilado, posee un gran dominio extracelular que se une a TGF- $\beta$  y un pequeño dominio intracelular. Una de sus funciones es la de fijar TGF- $\beta$  en la membrana, de esta manera promoviendo su unión a los receptores tipo I y II (Bilandzic et al., 2011).

La endoglina es una proteína dimérica de membrana; ésta es capaz de unirse con diversos ligandos de la superfamilia del TGF- $\beta$  como BMP's, activina y el mismo TGF- $\beta$ . Al igual que betaglicano el papel de endoglina es el de regular el ensamblaje del complejo de TGF- $\beta$  con los receptores tipo I y II, mediante la fijación de TGF- $\beta$  en la membrana celular (Caestecker M, 2004).

### **Señalización canónica de TGF- $\beta$**

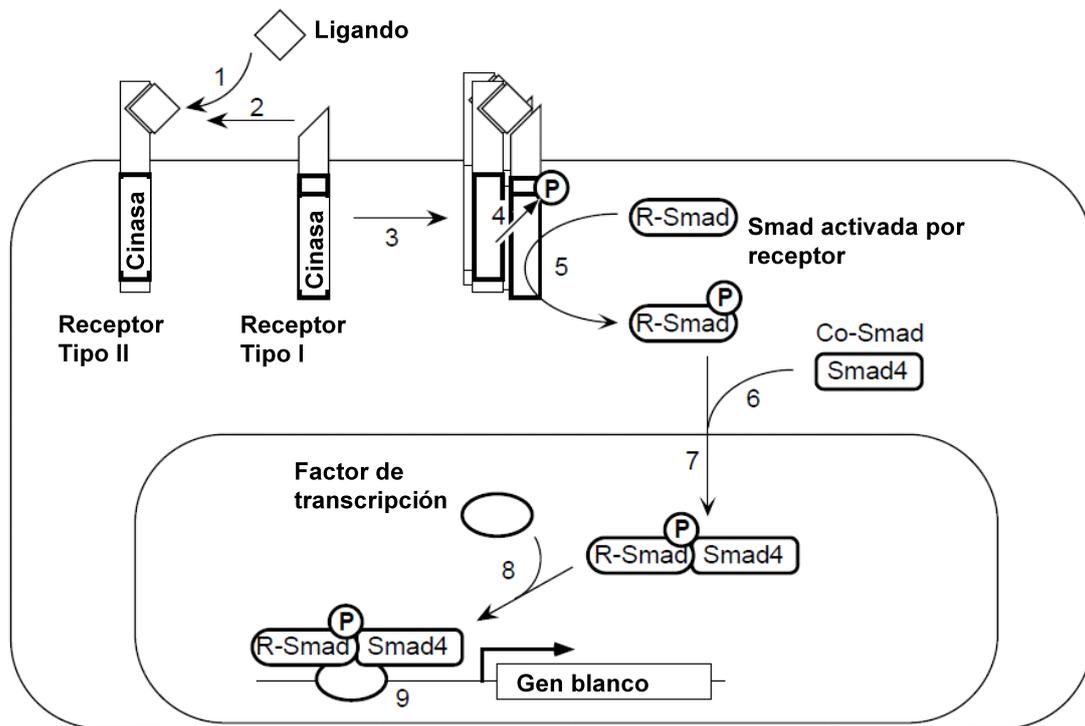
Las proteínas Smad son las reguladoras centrales en la vía canónica del TGF- $\beta$ , estas fueron identificadas inicialmente como intermediarios de la vía

de señalización de decapentaplegic (dpp) en *D. melanogaster*. Hasta la fecha se han caracterizado ocho proteínas Smad y están divididas en 3 subgrupos funcionales: Smads activadas por receptor (R-Smads), una Smad común (Co-Smad) y las Smads inhibitorias (I-Smads). Las R-Smads activadas en respuesta a TGF- $\beta$  y activina son Smad2 y Smad3. La única Co-Smad identificada hasta ahora es Smad4, la cual asiste la transducción de señales mediante su oligomerización con R-Smads activadas. Las I-Smads son Smad6 y Smad7, estas actúan como retroalimentación negativa para inhibir la activación de R-Smads mediante la inducción de la degradación de los receptores o compitiendo con las R-Smads por el receptor (Chaudhury & Howe, 2009).

El receptor tipo I activo fosforila a las R-Smads en su porción C-terminal, esta fosforilación les permite formar un complejo con Smad4. El complejo resultante de R-Smad y Co-Smad pasa al núcleo e interactúa con factores de transcripción para inducir o inhibir la expresión de genes blanco (Chaudhury & Howe, 2009) (Fig.5).

### **Señalización por TGF- $\beta$ independiente de Smads**

Para modular diversas funciones celulares TGF- $\beta$  es capaz de activar además de las proteínas Smad a diversas vías de señalización intracelular. Los receptores de TGF- $\beta$  son capaces de regular la función de vías que incluyen a algunas ramas de las cinasas activadas por mitógenos (MAPK), las GTPasas de la familia Rho y la vía de la cinasa del fosfatidil inositol-3 fosfato (PI3K) (Zhang Y, 2009).



**Fig. 5** Mecanismo de señalización de TGF- $\beta$  mediada por Smads. El ligando se une al dominio extracelular del receptor tipo II (1); esto ocasiona un cambio conformacional que permite la unión del receptor tipo I (2). Esto permite la formación del complejo ligando/receptores (3), esto permite la fosforilación y activación del receptor tipo I (4). Una vez activo, el receptor tipo I fosforila a la Smad activada por receptor (5), permitiéndole a esta asociarse con Smad4 (6) y ser trasladada al núcleo (7). Una vez dentro del núcleo el complejo de Smads se asocia con factores de transcripción (8) y este complejo se une a promotores en genes blanco (9); de esta manera regulando la transcripción. Modificado de Massagué, 1998.

## Papel del TGF- $\beta$ durante el desarrollo embrionario

En vertebrados, los ligandos de la superfamilia del TGF- $\beta$  juegan un papel importante en la morfogénesis de la mayoría de los órganos, defectos en su señalización pueden ocasionar alteraciones congénitas. Los miembros de la familia del TGF- $\beta$  son conocidos por su capacidad de inducir la transición epitelio mesénquimal (EMT). Este proceso permite a células de una capa epitelial delaminarse, asumir una conformación mesénquimal, migrar de su sitio de origen e invadir tejido circundante. La EMT es esencial para diversos procesos del desarrollo, un ejemplo de esto es la invasión de los cojinetes cardíacos por parte de células del endocardio provenientes de los canales

atrioventriculares; estos cojinetes eventualmente dan lugar a las válvulas cardiacas (Wu & Hill, 2009) (Tabla 1).

Debido al vasto número de funciones atribuidas a los miembros de la familia del TGF- $\beta$ , ha resultado difícil predecir los fenotipos resultantes por la disrupción de una isoforma específica. El estudio de ratones knockout para cada una de las isoformas han brindado información referente a la función y la importancia de las fuentes maternas de estas proteínas. Es de especial interés la existencia de efectos dependientes de la dosis génica; los cuales han sido revelados mediante el uso de ratones heterocigotos para dichas mutaciones.

**Tabla 1.** Fenotipos causados por la ausencia total o parcial de algunos componentes de la vía canónica de señalización de TGF- $\beta$  en ratones transgénicos; adaptado de Kulkarni *et al.*, 2002.

| <b>Gen</b>      | <b>Fenotipos del knockout</b>  |
|-----------------|--|
| TGF $\beta$ RII | Defectos en la hematopoyesis y vasculogénesis, letal para el día 10.5 de desarrollo embrionario.   |
| Endoglin        | Letal al día 11.5 de desarrollo debido a un desarrollo defectuoso de la vasculatura. Presentan un pobre desarrollo del músculo liso.   |
| Smad2           | Letal durante la gastrulación. Defectos en la formación/inducción del mesodermo y ectodermo extraembrionarios. Alteraciones del eje anterior-posterior.  |
| Smad3           | Muerte en los primeros 10 meses de vida. Los linfocitos presentan defectos en la respuesta al TGF- $\beta$ . Defectos óseos.   |
| Smad4           | Letal durante la gastrulación. Defectos en la formación/inducción del mesodermo y ectodermo extraembrionarios. Alteraciones del eje anterior-posterior. Falta de proliferación del ectodermo   |
| TGF- $\beta$ 1  | En algunas cepas ocasiona la muerte durante la gestación debido a una vasculogénesis defectuosa en el saco vitelino, inflamación y procesos autoinmunes dependientes de células T. Aumento espontáneo en la producción de óxido nítrico, disminución de la masa ósea, falta de células B productoras de IgA, niveles elevados de IgE, hepatocitos con números elevados de mitocondrias y un aparato de Golgi hipertrofiado, cáncer de colon. |
| TGF- $\beta$ 2  | Múltiples alteraciones durante el desarrollo; incluyendo defectos en extremidades, cardíacos, pulmonares, craneofaciales, columna vertebral, ojo, oído interno y urogenitales.   |
| TGF- $\beta$ 3  | Defectos en la fusión del paladar, retraso en el desarrollo pulmonar y muerte dentro de las 20 h de nacimiento.  |
|                 | <b>Fenotipos de la haploinsuficiencia</b>  |
| TGF $\beta$ RII | Aumento de la tumorigénesis inducida por estrógeno en la pituitaria.   |
| TGF- $\beta$ 1  | Arterioesclerosis aumentada en aloinjertos cardíacos en ratones receptores TGF- $\beta$ 1 <sup>+/-</sup> , aumento en la tumorigénesis inducida por carcinógenos.  |

## TGF- $\beta$ en el desarrollo gonadal

Dado los diversos roles de TGF- $\beta$  en la regulación de la diferenciación y proliferación celular, es de esperar que los miembros de la familia del TGF- $\beta$  contribuyan a regular el desarrollo gonadal así como eventos reproductivos. Múltiples estudios implican a TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2 y TGF- $\beta$ 3 en la mayoría de los aspectos reproductivos. Se han generado ratones knockout para cada isoforma de TGF- $\beta$ . Dado el hecho de que estos ratones mueren durante el desarrollo embrionario o durante el periodo postnatal, estos no son un modelo para investigar la función gonadal adulta; sin embargo, pueden ser usados para estudiar el desarrollo gonadal.

Estudios en estos ratones han demostrado que TGF- $\beta$ 2 y TGF- $\beta$ 3 son expresados tanto en ovarios como en testículos durante el desarrollo embrionario; la expresión de TGF- $\beta$ 1 durante el desarrollo embrionario es mínima y queda restringida al periodo postnatal en ambos sexos. Análisis en los ratones TGF- $\beta$ <sup>-/-</sup> no mostraron alteraciones morfológicas significativas en ambos sexos, únicamente se observó un número reducido de cordones testiculares en ratones TGF- $\beta$ 2<sup>-/-</sup> y TGF- $\beta$ 2<sup>+/-</sup>, este fenómeno se le atribuyó a un aumento en la apoptosis de células intersticiales. Testículos de ratones TGF- $\beta$ 2<sup>-/-</sup> como TGF- $\beta$ 3<sup>-/-</sup> no mostraron algún efecto sobre el número de CG; mientras que en ratones TGF- $\beta$ 1<sup>-/-</sup> se observó un ligero aumento en el número de células germinales en el periodo embrionario mientras que en la etapa postnatal estas disminuyeron. En ovarios sólo se observó un ligero aumento en el número de CG en la etapa postnatal en ratones TGF- $\beta$ 2<sup>-/-</sup> (Memon *et al.*, 2008).

Por otro lado se ha reportado la presencia del sistema TGF- $\beta$  en el ovario humano fetal, el patrón de expresión para las isoformas TGF- $\beta$ 1 y TGF- $\beta$ 2, así como de Alk5 es diferente entre el primer y segundo trimestre de gestación. Durante el primer trimestre los ovocitos son positivos para las 3 isoformas así como para ambos receptores; el tejido adyacente a estos es

positivo únicamente para TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2 y Alk5. Durante el segundo trimestre el patrón de tinción es más intenso y predomina en los ovocitos; además de los ovocitos, la monocapa de células de la granulosa que cubre al ovocito es positiva para ambos receptores. Estos resultados sugieren la importancia del sistema TGF- $\beta$  para el desarrollo de los ovocitos y la granulosa durante la embriogénesis (Schilling & Yeh, 1999).

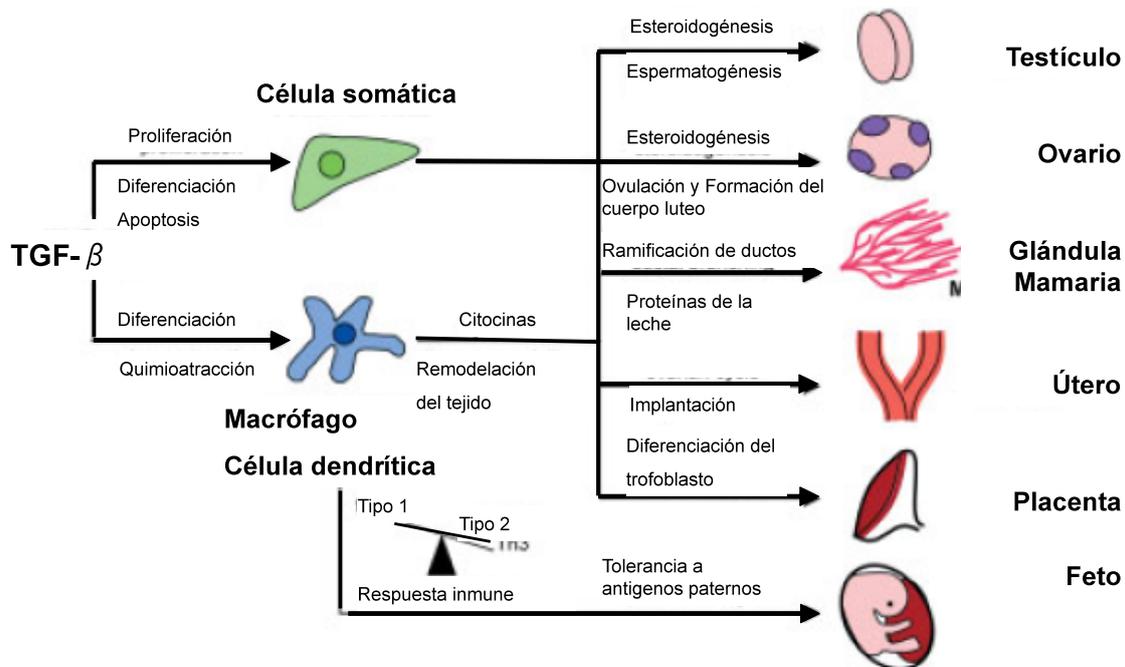
En el caso de aves, se ha descrito en pollo que el gen de TGF- $\beta$ 2 es expresado en gónadas de embrión de pollo de ambos sexos, antes y después de la diferenciación sexual (Hattori *et al.*, 2002). Estudios posteriores de este grupo mostraron que en embriones en un estadio previo a la diferenciación sexual (6 di.); el TGF- $\beta$ 2 inducía una disminución del número de células germinales primordiales y células somáticas de la gónada. Esta reducción fue observada en un co-cultivo con células estromales de la cresta germinal. Este efecto fue observado en muestras tanto de hembras como de machos, lo que sugirió que el TGF- $\beta$ 2 es un regulador de la proliferación de células germinales primordiales y somáticas en la gónada de en ambos sexos (Fujioka *et al.*, 2004)

En un estudio posterior se mostró en un modelo de cultivo organotípico, que TGF- $\beta$ 1 y TGF- $\beta$ 2 regulan negativamente la proliferación de células somáticas sin afectar el número de ovogonias de ovarios de embrión de pollo de 9 di. (Mendez *et al.*, 2006). Por otro lado, TGF- $\beta$ 1 indujo un cambio en la morfología del ovario; las CG pasaron de tener una localización mayoritariamente cortical a encontrarse distribuidas a lo largo de médula y corteza (Méndez *et al.*, 2006). Estas observaciones junto a los resultados obtenidos por Hatttori *et al* (2002) y Fujioka *et al* (2004), sugieren que la familia del TGF- $\beta$  es un regulador de la morfogénesis ovárica. Además, se ha mostrado que TGF $\beta$ RII se encuentra sobreexpresado en el ovario de embrión de pollo (Carré *et al.*, 2011). Por otro lado, los ovarios de gallinas expresan el co-receptor para TGF $\beta$ , el betaglicano (Lovell *et al.*, 2006).

## TGF- $\beta$ como regulador de la función ovárica

### Mamíferos

Los procesos de foliculogénesis y maduración del ovocito involucran complejas redes de interacciones entre células; diversos factores de crecimiento y hormonas actúan como mensajeros para regular la proliferación y diferenciación de los diferentes tipos celulares dentro del ovario. En ratas la isoforma 2 y 3 de TGF- $\beta$  son detectadas en células de la teca y granulosa, su localización cambia durante las diferentes etapas de maduración de los folículos (Levacher *et al.*, 1996). Durante este periodo existe una interacción entre hormonas sexuales, gonadotropinas y TGF- $\beta$ .



**Fig. 6** Representación grafica de los roles postulados para TGF- $\beta$  en tejido reproductivo de mamíferos. TGF- $\beta$  ejerce sus efectos directamente sobre las células somáticas o indirectamente a través de la infiltración de macrófagos y células dendríticas, adaptado de Ingman & Robertson, 2002

El TGF- $\beta$  aumenta varios de los efectos de la hormona folículo estimulante (FSH) como la inducción de la actividad de aromatasa en la granulosa, mediante el aumento de la expresión de receptores para FSH (Adashi *et al.*, 1996). TGF- $\beta$  también regula el proceso de ovulación de manera negativa, previniendo de esta manera una ruptura folicular temprana (Juneja *et al.*, 1996). Después de la ovulación TGF- $\beta$  está involucrado en regular la formación y función del cuerpo lúteo (Ingman & Robertson, 2002) (Fig. 6).

### Aves

En pollo se ha reportado la expresión de las tres isoformas de TGF- $\beta$  en el ovario adulto; tanto en la teca como en la granulosa de folículos en desarrollo (Law *et al.*, 1995). Se observó que la teca expresa más TGF- $\beta$ 2 y TGF- $\beta$ 3 que la granulosa; por otro lado, ambas poblaciones celulares expresan niveles similares de TGF- $\beta$ 1. Estudios recientes en codorniz revelaron la inmunolocalización de TGF- $\beta$ 1 y TGF- $\beta$ 2 en folículos preovulatorios, la tinción predomina en la teca con niveles menores en la granulosa y en el ovocito. La distribución temporal indica que TGF- $\beta$ 1 disminuye en la granulosa conforme el folículo madura (Van Nassauw *et al.*, 1996). Sundaresan *et al.* (2007) mostraron que el TGF- $\beta$ 2 se expresa en el ovario y oviductos de gallinas adultas. Esta expresión de TGF $\beta$  se ve aumentada durante el proceso de regresión de las tubas uterinas durante la remodelación del tracto reproductor.

## **Planteamiento del problema**

El TGF- $\beta$  es una citocina que participa en la regulación de diversos procesos celulares como lo son la proliferación, adhesión, migración y diferenciación; tanto en la vida adulta como durante el desarrollo embrionario. Existen algunos reportes tanto en ratones como en humanos; que muestran que el TGF- $\beta$  es expresado en la gónada durante su desarrollo. Más allá de su presencia en el ovario embrionario, se sabe poco acerca de la función que desempeña en este periodo. La mayor parte de reportes sobre la función del TGF- $\beta$  en el ovario son sobre organismos adultos; donde el TGF- $\beta$  participa en la regulación de la foliculogénesis y secreción de hormonas.

Por otro lado, en aves existen pocos indicios sobre su patrón de expresión, así como el posible papel que desempeña en la morfogénesis del ovario embrionario. Al igual que en mamíferos, la mayoría de la información sobre la expresión y función del TGF- $\beta$  en el ovario de pollo se centra en la etapa postnatal. Dado el papel que el TGF- $\beta$  desempeña en los procesos celulares previamente mencionados; en este trabajo buscamos obtener información sobre la expresión y función del TGF- $\beta$  en el ovario embrionario de pollo.

## **Hipótesis**

Durante el desarrollo de la gónada de embrión de pollo el TGF- $\beta$  es expresado diferencialmente los dos compartimientos de la gónada. En el ovario del embrión de pollo, el TGF- $\beta$  así como sus receptores son biológicamente activos y la señalización por esta citocina está encargada de mediar aspectos del desarrollo ovárico.

## **Objetivos**

Objetivo general:

Determinar la expresión y distribución del TGF- $\beta$  en el ovario embrionario de pollo; así como el efecto que éste ejerce “*in vitro*” sobre el ovario.

Objetivos específicos:

- Analizar la expresión del ARNm de TGF- $\beta$  en la gónada embrionaria de embrión de pollo.
- Determinar si el ARNm está siendo traducido a proteína durante el desarrollo embrionario de la gónada.
- Estudiar la distribución de la proteína Smad2 fosforilada, efector intracelular del TGF- $\beta$ , durante este periodo.
- Analizar los efectos que tiene el TGF- $\beta$  sobre la morfología del ovario en un modelo *in vitro*.

## **Materiales y métodos**

### **Animales**

Se obtuvieron huevos fertilizados de pollo de la cepa White Leghorn (*Gallus gallus*) de Aves Libres de Patógenos Específicos S.A de C.V en Tehuacan, Puebla. Los huevos fueron incubados en un incubador con corriente de aire forzada (Jamesway, Canada) a 37.8° C y 80% de humedad relativa. Los estadios de desarrollo fueron definidos de acuerdo a Hamburger & Hamilton, 1951 (HH). Los procedimientos fueron aprobados por el comité de bioética de la Facultad de Medicina.

### **Síntesis de las sondas para hibridación *in situ***

Los plásmidos que contienen las clonas de cDNA de pollo para TGF- $\beta$ 2 (número de acceso NM\_001031045.1) y TGF- $\beta$ 3 (número de acceso NM\_205454.1) fueron amablemente proporcionados por la Dra. Elisa Martí (Instituto de Biología Molecular de Barcelona, España). Los plásmidos fueron linearizados por digestión con enzimas de restricción y fueron usados como templado para transcripción con las ARN polimerasas T3 o T7 (Promega, EU). Las reacciones *in vitro* generaron las ribosondas sentido (control negativo) y antisentido. Las sondas fueron marcadas con mezcla de digoxigenina-UTP (Boehringer-Ingelheim, Alemania). La identidad del fragmento de cDNA fue verificada mediante secuenciación.

### **Hibridación *in situ* en montaje completo (mCHIS)**

Los complejos urogenitales (gónadas, con su respectivo mesonefros) de embriones de pollo de embriones de 6 a 9 días de incubación (di) fueron fijados en paraformaldehído al 4% (PFA 4%) en solución amortiguada de fosfatos (PBS) a 4° C toda la noche. El tejido fue entonces deshidratado en series de metanol al 25%. 50% 75% y 100% (v/v) en PBS/0.1% Tween 20 (PBST). En este punto las muestras se almacenaron hasta 7 días a -20° C. Antes de la hibridación las muestras fueron rehidratadas con metanol/PBST

75%, 50%, 25% y finalmente PBST 5 min cada uno a temperatura ambiente (TA). Para permeabilizar el tejido las muestras fueron tratadas con proteinasa K (10 mg/ml) durante 9 min a TA. Para detener la digestión con proteinasa K el tejido fue pos-fijado en PFA 4%/PBST durante 20 min. Después de este, tratamiento, el tejido fue lavado en PBST y prehibridado a 65° C por al menos 6 h; posteriormente se hibridó con las sondas sentido y antisentido (1 mg/ml) toda la noche.

Al siguiente día, las muestras fueron lavadas 4 veces en mezcla de hibridación durante 30 min y después en amortiguador de ácido maleico con 0.1% de Tween20 (MABT). El tejido fue bloqueado en solución de bloqueo (Roche, Alemania) 4 h y posteriormente fue incubado con el anticuerpo anti-digoxigenina (Roche, Alemania) a 4° C una noche. Al día siguiente, el tejido fue lavado en amortiguador para fosfatasa alcalina (NTMT) 2 veces durante 10 min c/u; para después revelar la reacción con el sustrato para la fosfatasa alcalina, BM Purple (Roche, Alemania). Al alcanzar la tinción óptima, la reacción se detuvo con PBST; para reducir el fondo las muestras se deshidrataron/hidrataron con metanol/PBST. El tejido fue observado y fotografiado con un microscopio estereoscópico Nikon SMZ1500 acoplado a una cámara digital. Los controles negativos (sonda sentido) se realizaron en paralelo para demostrar la especificidad de la reacción.

### **Hibridación *in situ* en cortes por congelación (cCHIS)**

Los complejos urogenitales de hembras de 9 di. (HH35) fueron fijados en PFA 4% a 4° C una noche. Posteriormente fueron lavados en concentraciones ascendentes de sacarosa (10%, 20% y 30%), compuesto OCT/30% sacarosa (1:1). Las muestras fueron incluidas en compuesto OCT, congeladas en hielo seco y almacenadas a -70° C. Previo a la hibridación el tejido fue cortado en secciones de 12 µm y después prehibridado en mezcla de hibridación durante 1 h a 55° C. Las muestras fueron entonces hibridadas con las sondas marcadas a 58° C una noche, lavadas y bloqueadas con 15% suero de cabra, 2% BSA en PBS. Las sondas fueron detectadas usando el

anticuerpo anti-digoxigenina (Roche, Alemania) y revelado con el compuesto BM Purple (Roche, Alemania) . Los controles negativos (sonda sentido) se realizaron en paralelo para demostrar la especificidad de la reacción.

### **Inmunofluorescencia**

Complejos urogenitales de hembras fueron fijados y procesados para cortes de congelación como se describió previamente. Secciones de 12  $\mu\text{m}$  fueron lavadas con series ascendentes y descendentes de etanol/PBS para remover lípidos. Se realizó recuperación de antígenos hirviendo las laminillas en el amortiguador Diva (BiocareMedical, USA) por 45 min. Las laminillas fueron permeabilizadas con PBS/ Triton100X durante 10 min. Para bloquear marcaje inespecífico, las laminillas fueron tratadas con suero de caballo 5% en PBT durante 30 min a TA; posteriormente fueron incubados con el anticuerpo primario una noche a 4° C. Para la detección de Smad2 fosforilada se usó el anticuerpo anti-Smad phospho-specific (Ser 465/467) (AB3849; Millipore, EU) diluido 1:250. Posteriormente las laminillas fueron incubadas en anticuerpo secundario Cy3 anti-conejo de cabra (Chemicon, EU) 1 h a TA en una dilución 1:250. El anticuerpo secundario fue lavado y posteriormente se bloqueo en suero de caballo 1%/PBS 1 h e incubado una noche con el anticuerpo anti-N-cadherin de ratón (Invitrogen, Mexico). Las laminillas fueron lavadas e incubadas con el anticuerpo secundario Alexa fluor anti-ratón de burro (Molecular probes) diluido 1:100 1 h a TA.

Las imágenes fueron adquiridas usando un microscopio confocal TCS SP5 de Leica microsystems (Alemania); con la ayuda del software Advanced Fluorescence Lite. Para la detección de TGF- $\beta$  se usó un anti-TGF $\beta$  policlonal de conejo (SC-146; Santa Cruz Biotechnology, EU) en una dilución 1:200. Las citoqueratinas fueron detectadas usando un anticuerpo pan-citoqueratina (AE1/AE3) (CM011C; Biocare Medical, EU) en una dilución 1:200

### **Cultivo de ovarios de embrión de pollo**

Los ovarios de embriones de pollo de 9 di. (HH35) fueron colectados bajo un microscopio estereoscópico en condiciones estériles. Los ovarios fueron cultivados sobre membranas de policarbonato (Nucleopore, Reino Unido), flotando en medio DMEM libre de suero suplementado con: 0.1% Albumax, 100 U/ml de penicilina, 50mg/ml de estreptomicina (Gibco-BRL, México). Se suplementó el medio con TGF- $\beta$ 1 humano recombinante (R&D Systems, México) a una concentración de 10 ng/ml. Después del cultivo, los ovarios fueron lavados en PBS y fijados en PFA 4%/PBS una noche a 4° C. Posteriormente el tejido se incubó y fue infiltrado con sacarosa 30%/OCT (1:1). Finalmente las muestras fueron incluidas en OCT, congeladas y procesadas para inmunofluorescencia.

## Resultados

La expresión de las tres isoformas de TGF- $\beta$  presentes en pollo (TGF-  $\beta$ 1, 2 y 3) se estudió por medio hibridación *in situ*. Mediante secuenciación se determinó la identidad de cada una de las sondas; se pudo corroborar la identidad de TGF- $\beta$ 2 y TGF-3 (Fig. 7a). Se realizó la transcripción *in vitro* de las sondas sentido (control negativo) y antisentido para ambas isoformas.

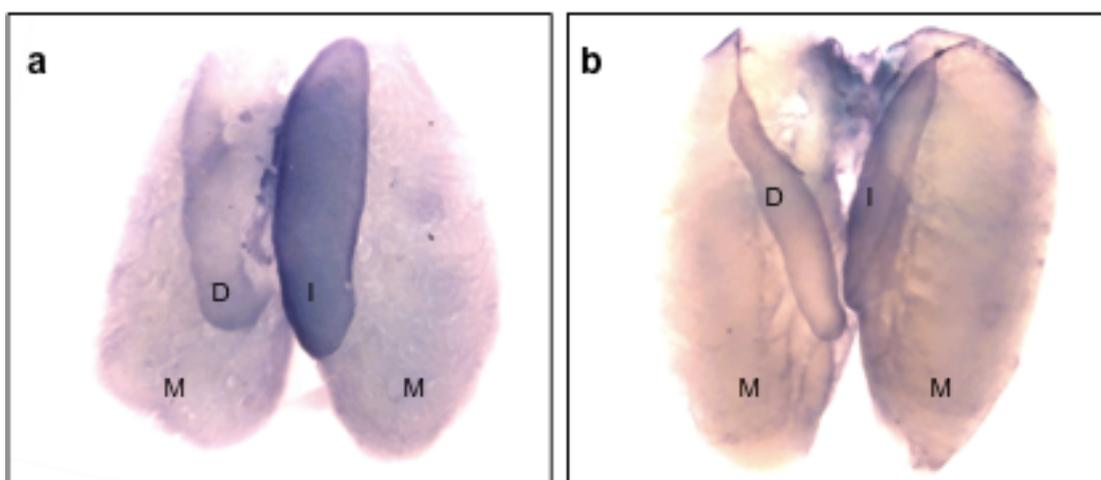
```

Seq_1 961 CCCACCGTTGTCGTTTCGGTTAAAGTCACTCTTTTTTCGGGGGGCGCTGTATTTAAGCA 1020
Seq_2 66 -----GGTTAAAGTCACTCTTTTTTCGGGGGGCGCTGTATTTAAGCA 107
      |||
Seq_1 1021 CTTAAGATGCACTGTCTATCTCCTGAGCGTGTTCCTCACCCCTGGATCTGGCCGCCGTGGCT 1080
Seq_2 108 CTTAAGATGCACTGTCTATCTCCTGAGCGTGTTCCTCACCCCTGGATCTGGCCGCCGTGGCT 167
      |||
Seq_1 1081 CTCAGCCTGTCTACCTGCAGCACCCCTCGACATGGATCAGTTCATGCGCAAGAGGATCGAG 1140
Seq_2 168 CTCAGCCTGTCTACCTGCAGCACCCCTCGACATGGATCAGTTCATGCGCAAGAGGATCGAG 227
      |||
Seq_1 1141 GCGATCCGGGGGAGATCCTGAGCAAGCTGAAGCTCACCAGCCCCCGGACGAGTACCCC 1200
Seq_2 228 GCGATCCGGGGGAGATCCTGAGCAAGCTGAAGCTCACCAGCCCCCGGACGAGTACCCC 287
      |||
Seq_1 1201 GAGCCCGAGGAGGTGCCCGGAGGTCATCTCCATCTACAACAGCACCAGGGACCTGCTG 1260
Seq_2 288 GAGCCCGAGGAGGTGCCCGGAGGTCATCTCCATCTACAACAGCACCAGGGACCTGCTG 347
      |||
Seq_1 1261 CAGGAGAAAGCCAAACCACAGAGCTGCCACTTGCAGAGGGAGCGGAGCGACGAGGAGTAC 1320
Seq_2 348 CAGGAGAAAGCCAAACCACAGAGCTGCCACTTGCAGAGGGAGCGGAGCGACGAGGAGTAC 407
      |||
Seq_1 1321 TACGCCAAAGAAGTTTACAAAATAGACATGCAGCCTTTTTACCCCGAAAATGCCATCCCA 1380
Seq_2 408 TACGCCAAAGAAGTTTACAAAATAGACATGCAGCCTTTTTACCCCGAAAATGCCATCCCA 467
      |||
Seq_1 1381 CCAAGCTATTACAGCCTTTACTTCAGAATTGTTAGATTTGACGTCCTCGGCGATGGAGAAA 1440
Seq_2 468 CCAAGCTATTACAGCCTTTACTTCAGAATTGTTAGATTTGACGTCCTCGGCGATGGAGAAA 527
      |||
Seq_1 1441 AATGCGTCCAACCTTGGTGAAGGCTGAGTTCAGGGTCTTCCGCCTGCAGAACTCAAAGGCG 1500
Seq_2 528 AATGCGTCCAACCTTGGTGAAGGCTGAGTTCAGGGTCTTCCGCCTGCAGAACTCAAAGGCG 587
      |||
Seq_1 1501 CGGGTCTCGGAGCAGCGGATAGAGCTGTACCAGGTTCTGAAATCCAAAGAATTATCATCA 1560
Seq_2 588 CGGGTCTCGGAGCAGCGGATAGAGCTGTACCAGGTTCTGAAATCCAAAGAATTATCATCA 647
      |||
Seq_1 1561 CCAGGACAGCGTTACATTGACAGCAAAGTGGTTAAAAACAAGAGCTGAAGGAGAATGGTTG 1620
Seq_2 648 C----- 648
  
```

**Fig. 7.** Alineamiento local de secuencia que confirma la identidad de la identidad de la sonda (secuencia inferior) con la secuencia de TGF- $\beta$ 2 NM\_001031045.1 (secuencia superior).

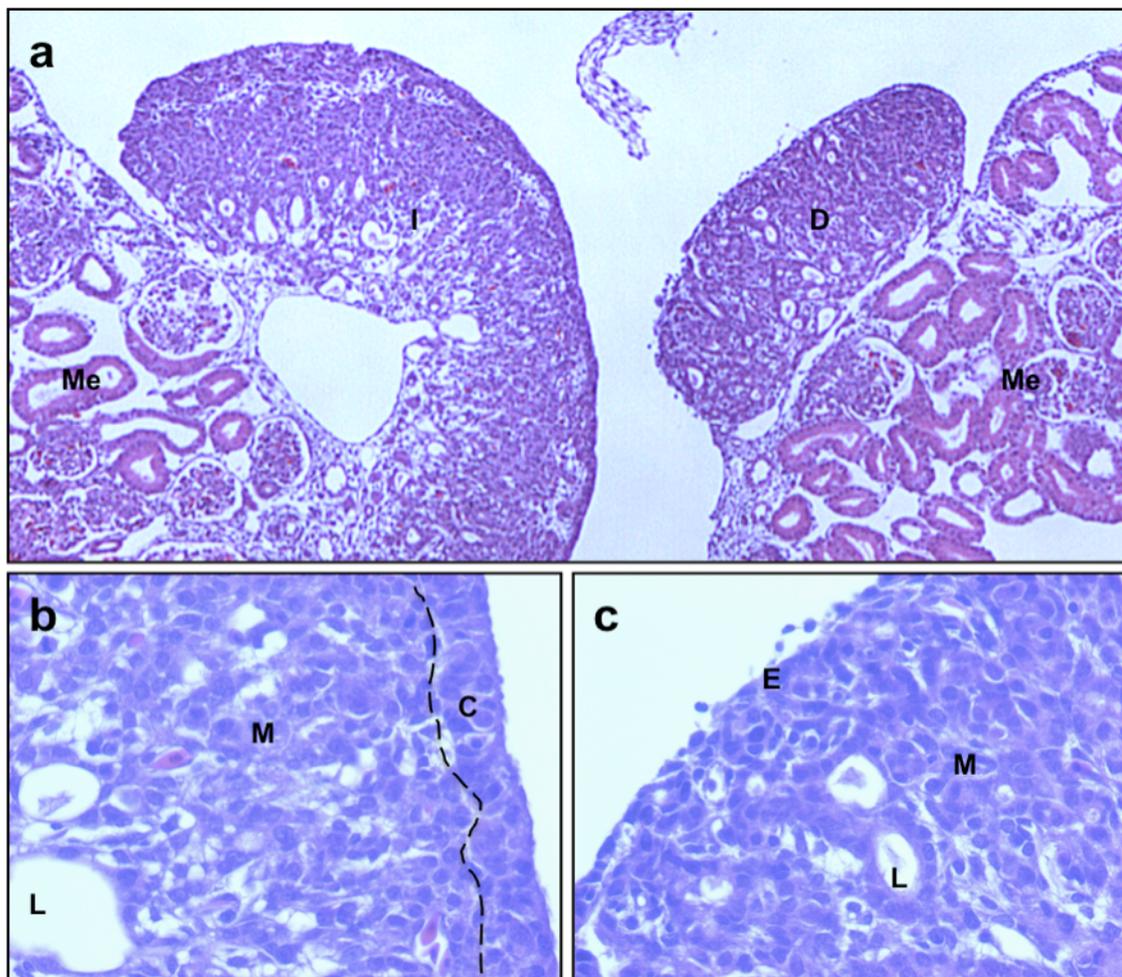
Para determinar los patrones de expresión de TGF- $\beta$ 2 y TGF-3, se realizaron hibridaciones *in situ* de montaje completo (mCHIS) en complejos urogenitales (gónadas con su respectivo mesonefros). Se estudiaron embriones desde los 6 di., durante la etapa de gónada indiferenciada hasta los 9 di, cuando el proceso de diferenciación sexual se ha llevado a cabo. La expresión de TGF- $\beta$ 2 se detectó en complejos urogenitales a partir de los 8 di (HH34) en hembras (Fig. 8a); mientras que su expresión en machos fue comparativamente menor (Fig. 8b). En hembras la tinción para TGF- $\beta$ 2 fue mayor en el ovario izquierdo, comparado con el derecho (Fig. 8a).

A partir de los 8 di (HH34), comienzan a ser evidentes las diferencias morfológicas entre machos y hembras; en particular por la marcada asimetría entre los dos ovarios (Fig. 8a). Para el resto de los experimentos se emplearon embriones de 9 di (HH 35). En este estadio de desarrollo la gónada comienza a mostrar las características definitivas de machos y hembras; además, la determinación del sexo de los embriones fue posible mediante la asimetría de ambas gónadas.



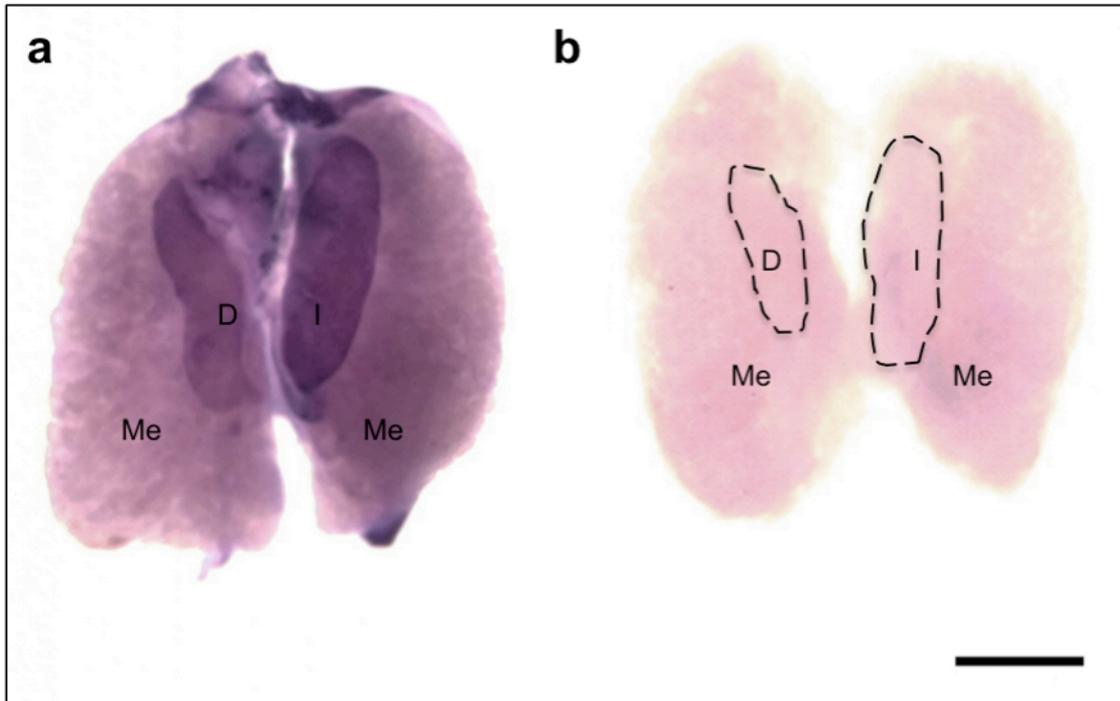
**Fig 8.** mCHIS para TGF- $\beta$ 2 en complejos urogenitales de hembras (a) y machos (b). Mesonefros (M), gónada izquierda (I), gónada derecha (D).

Se estudió la morfología de los ovarios de embrión de pollo a los 9 di (HH35); en este periodo del desarrollo la asimetría de los dos ovarios es clara (Fig. 9a). El ovario izquierdo ha iniciado su diferenciación hacia un ovario funcional (Fig. 9b). Presenta una corteza derivada del epitelio germinal, se observa un crecimiento de los cordones corticales, los cuales contienen cúmulos de células germinales rodeadas de células somáticas. El ovario derecho comienza a involucionar quedando como un vestigio; carece de una corteza definida (Fig. 9c). Está constituido por una médula cubierta con un epitelio cúbico simple. En ambos ovarios la porción interior de la gónada (la médula) presenta espacios lacunares y vasos sanguíneos (Fig. 9b, c).



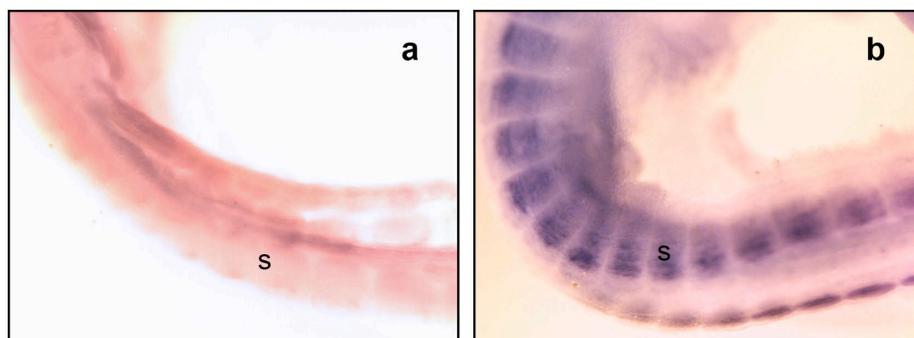
**Fig. 9.** Tinción HE de un complejo urogenital de un embrión hembra de 9di. Comparación del desarrollo del ovario izquierdo (I) y derecho (D) (10X) (a). Acercamiento del ovario izquierdo (b) (20X). Acercamiento del ovario derecho (c) (20X). Mesonefros (Me), corteza (C), médula (M), epitelio superficial (E), espacios lacunares (L). La línea punteada delimita la corteza de la médula.

Por medio de mCHIS se determinó que TGF- $\beta$ 2 es expresado por embriones de 9 di (Fig. 10a); dicha expresión es específica y no se debe a artefactos de la técnica tal como lo muestra la hibridación con la sonda sentido (Fig. 10b). TGF- $\beta$ 2 se encuentra presente a lo largo de ambos ovarios siendo ligeramente mayor su expresión en el ovario izquierdo (Fig. 10a).



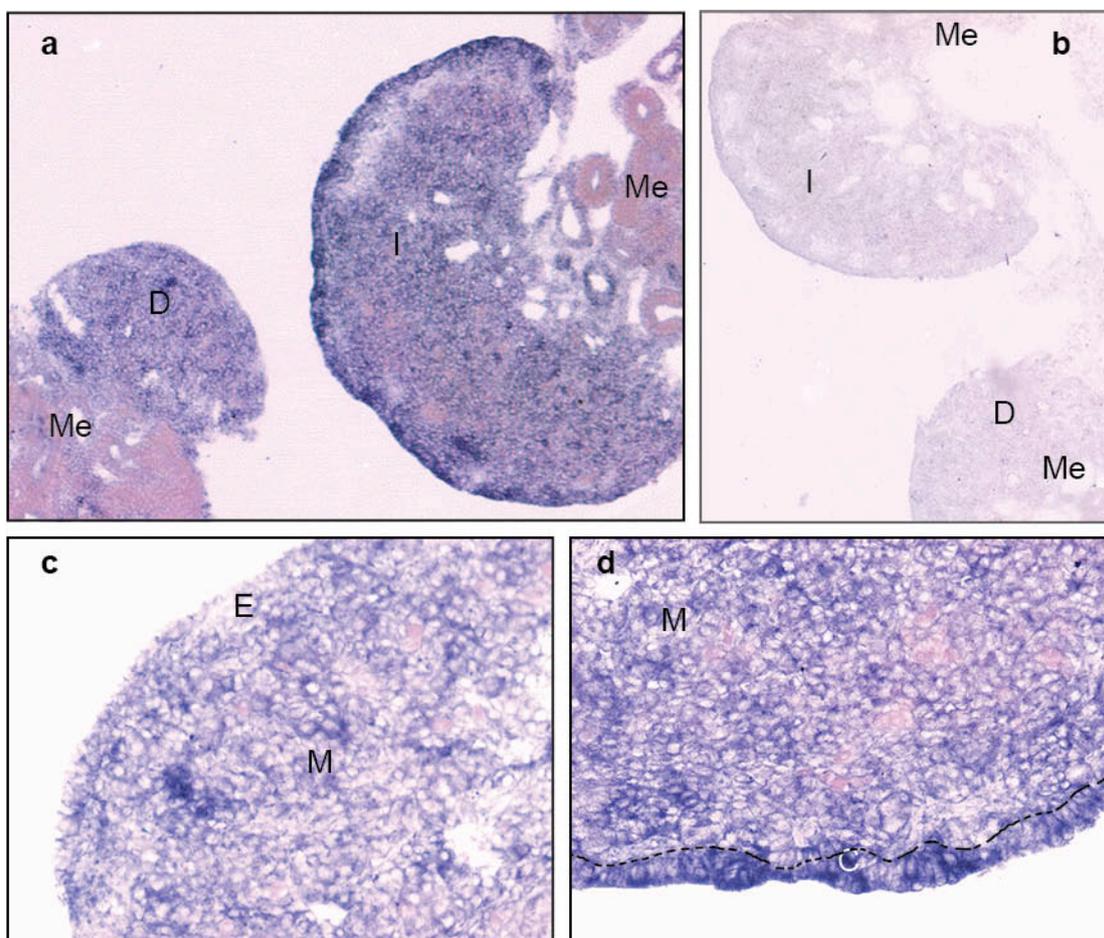
**Fig. 10.** mCHIS para TGF- $\beta$ 2 del complejo urogenital de un embrión hembra de 9di. La reacción con la sonda antisentido muestra marcaje de TGF- $\beta$ 2 en ambos ovarios (a). El control negativo realizado con la sonda sentido no muestra marcaje (b). Ovario izquierdo (I), ovario derecho (D), mesonefros (me). La línea punteada indica la posición de ambos ovarios en el control negativo. La barra negra representa 100  $\mu$ m.

Para ninguno de los estadios estudiados, se observó expresión de TGF- $\beta$ 3 (no mostrado); como control positivo para esta reacción se usó un embrión de pollo de 84 h, en estos embriones TGF- $\beta$ 3 es expresado en los somitas (Fig. 11).



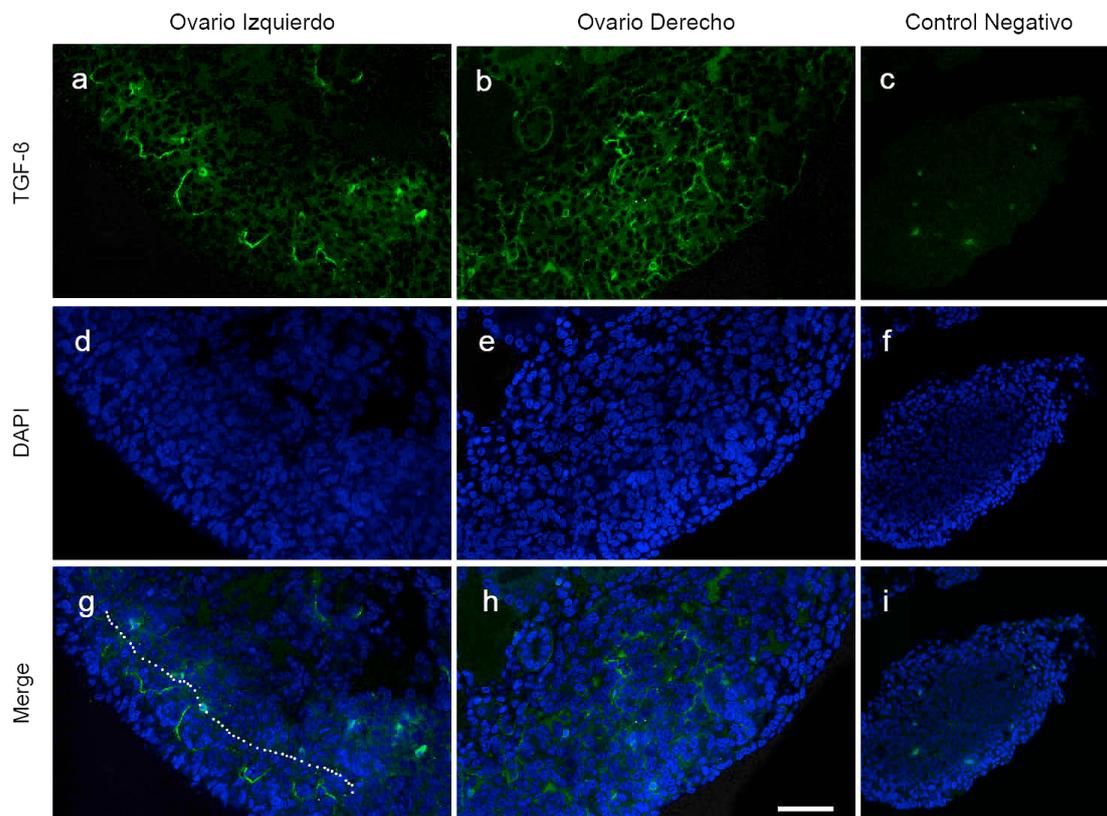
**Fig. 11.** mCHIS para TGF- $\beta$ 3 en embriones de 84 h. La reacción con la sonda antisentido muestra marcaje de TGF- $\beta$ 3 en los somitas (b). El control negativo realizado con la sonda sentido no muestra marcaje (a). Somitas (S).

Para un análisis histológico más detallado de la distribución del ARNm de TGF- $\beta$ 2 y para eliminar posibles artefactos por la falta de penetración de la sonda se realizaron hibridaciones *in situ* en cortes por congelación (ccHIS). Se encontró marcaje positivo para TGF- $\beta$ 2 a lo largo de la medula de ambas gónadas (Fig. 12a). En el ovario izquierdo, el cual presenta una corteza bien formada se presentaba un marcaje de mayor intensidad (Fig. 12d) comparado con el epitelio superficial del ovario derecho (Fig. 12c). La expresión de TGF- $\beta$ 2 en la corteza del ovario izquierdo aparentemente se da tanto en células somáticas como germinales (Fig. 12d). La hibridación con la sonda sentido indicó la especificidad de la reacción (Fig. 12 b).



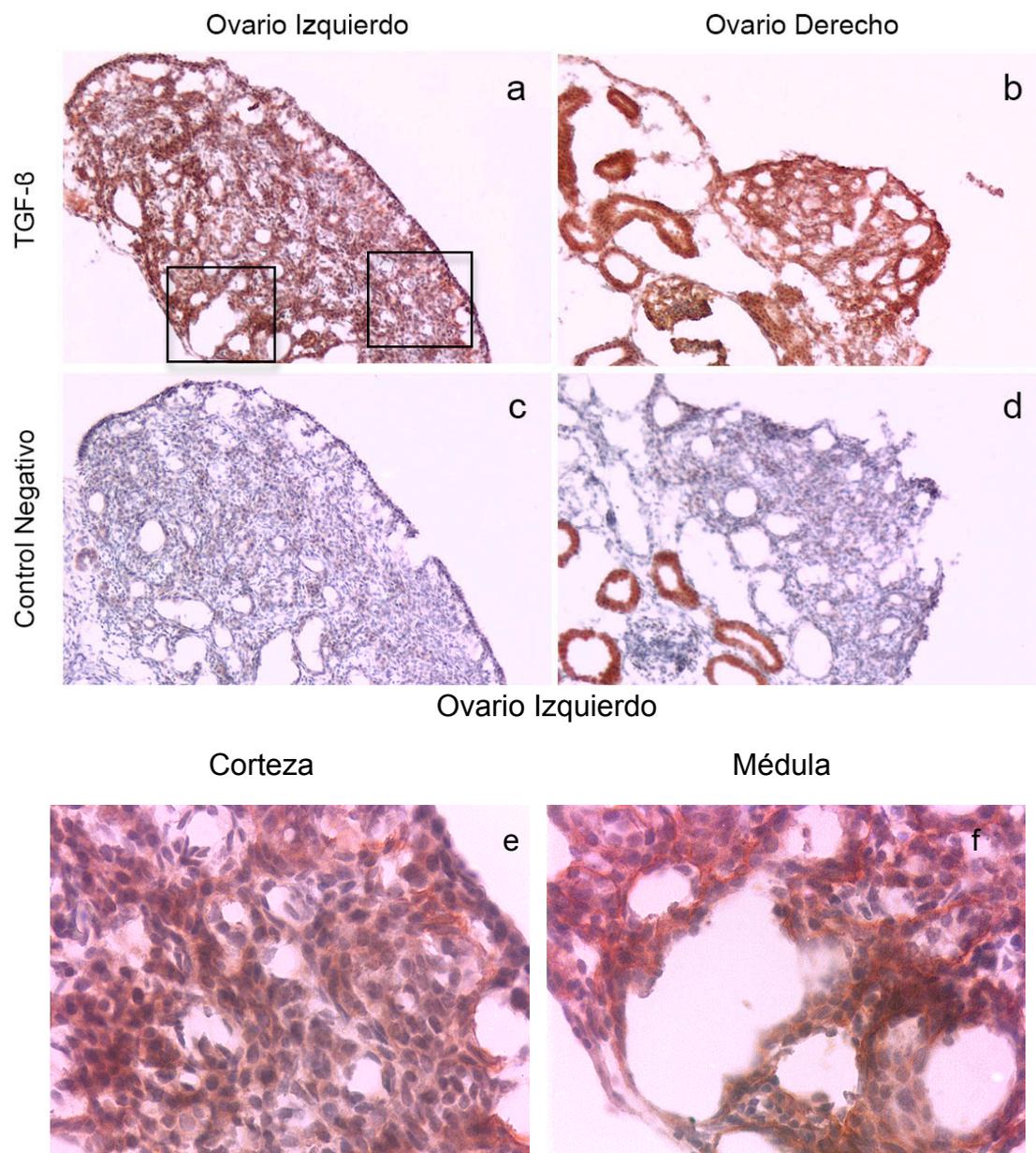
**Fig. 12.** ccHIS para TGF- $\beta$ 2 del complejo urogenital de un embrión hembra de 9 di. Vista panorámica del marcaje de TGF- $\beta$ 2 en ambos ovarios (a). Hibridación con la sonda sentido (b). Acercamiento del ovario derecho (c). Acercamiento del ovario izquierdo (d). Ovario izquierdo (I), ovario derecho (D), mesonefros (me), corteza (c), epitelio (E), médula (M). La línea punteada en (d) indica el límite de la corteza y la médula.

Para determinar si el ARNm de TGF- $\beta$  está siendo traducido y si la proteína tenía una distribución similar a la de su mensajero; se llevó a cabo una reacción de inmunofluorescencia en cortes por congelación de ovarios de 9 di. La proteína de TGF- $\beta$  se identificó usando un anticuerpo que detecta a las isoformas TGF- $\beta$ 1 y TGF- $\beta$ 2, tanto el precursor como la forma madura. En el ovario izquierdo el TGF- $\beta$  se encontró en la periferia de los cordones sexuales en la corteza; además, se detectaron pequeñas cantidades en la médula profunda (Fig. 12a, g). En el ovario derecho, el cual está compuesto esencialmente por una médula, el TGF- $\beta$  se encontró a lo largo de la gónada (Fig. 13 b, h).



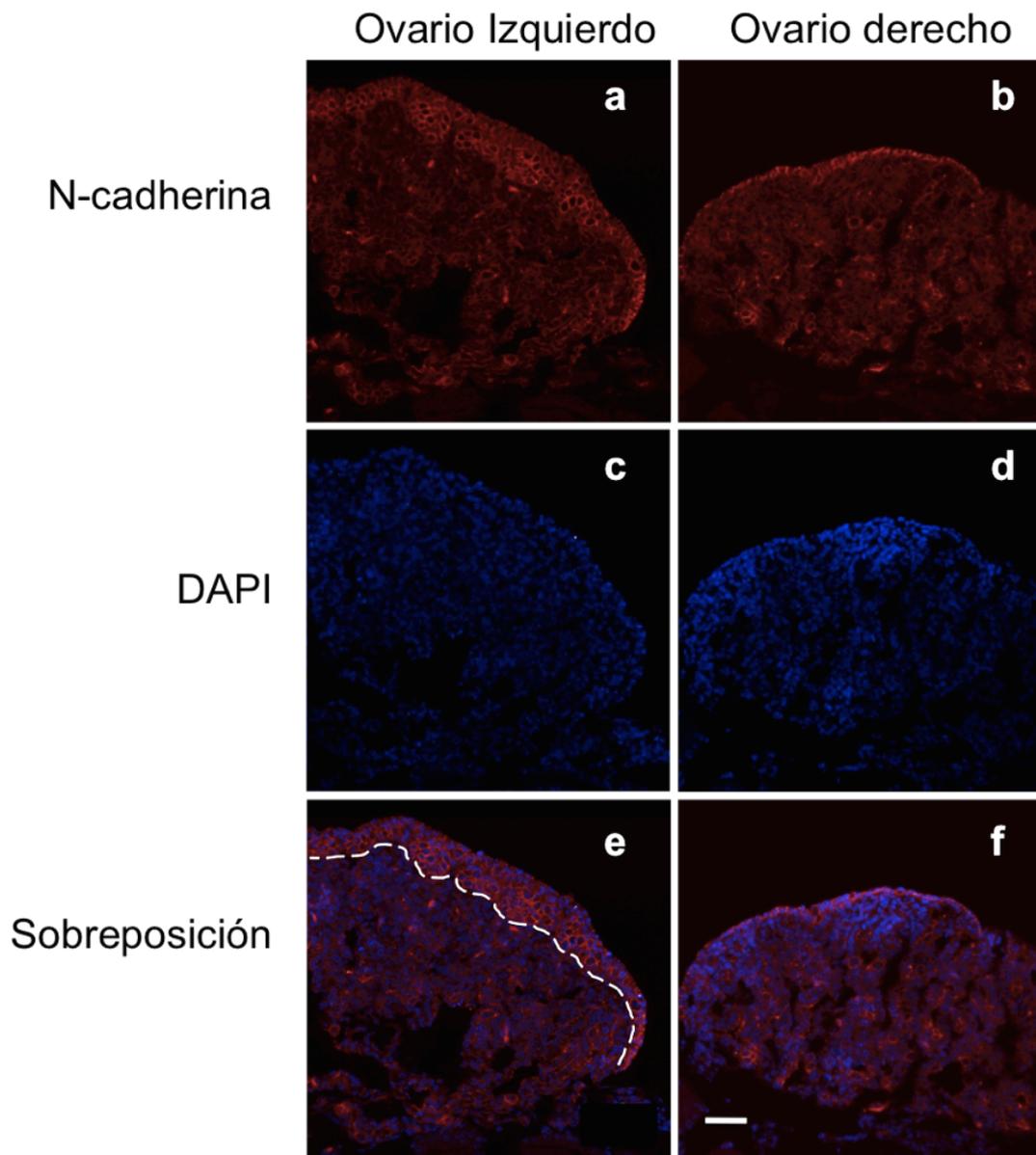
**Fig. 13.** Inmunodetección de la proteína TGF- $\beta$  en ovarios de 9 di. Inmunofluorescencia en cortes por congelación con un anticuerpo anti-TGF- $\beta$  (verde) y DAPI (azul). La línea punteada indica el límite entre la corteza y la médula. La barra de escala representa 50  $\mu$ m.

La inmunofluorescencia fue complementada con una inmunohistoquímica (Fig. 14). Esta técnica fue hecha en una colaboración con la Dra. Annie Pardo de la Facultad de Ciencias. Se observó un marcaje a lo largo de ambos ovarios (Fig. 14 a, b). Al igual que en las inmunofluorescencias, se obtuvo una tinción tenue alrededor de los cordones corticales (Fig. 14e); así como a lo largo de la médula profunda al rededor de los espacios lacunares (Fig. 14f).



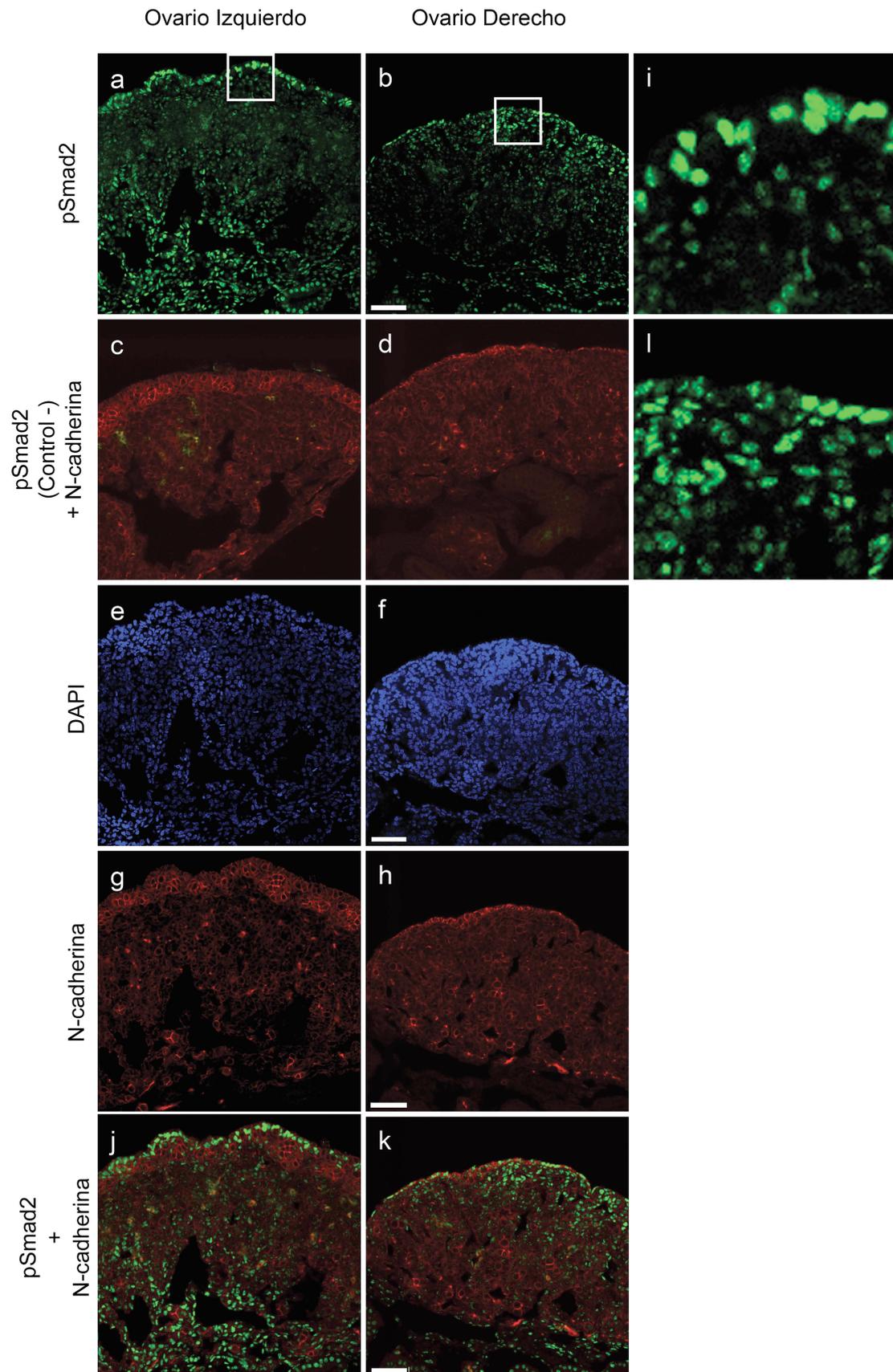
**Fig. 14.** Inmunohistoquímica de la proteína TGF- $\beta$  en ovarios de 9 di. Los recuadros indican los acercamientos en (e) y (f).

Para identificar la corteza con mayor precisión en ambos ovarios, se usó un marcaje contra la proteína de adhesión celular N-cadherina, sobre la cual se ha mostrado que se localiza en la corteza ovárica. La inmunofluorescencia para N-cadherina reveló tinción alrededor de las células del epitelio superficial; así como de los cordones corticales entre las células germinales y somáticas (Fig. 15a, b). Se observó una corteza desarrollada en el ovario izquierdo (Fig. 15a, e) comparada con la ausencia de la misma en el ovario derecho (Fig. 15b, f).



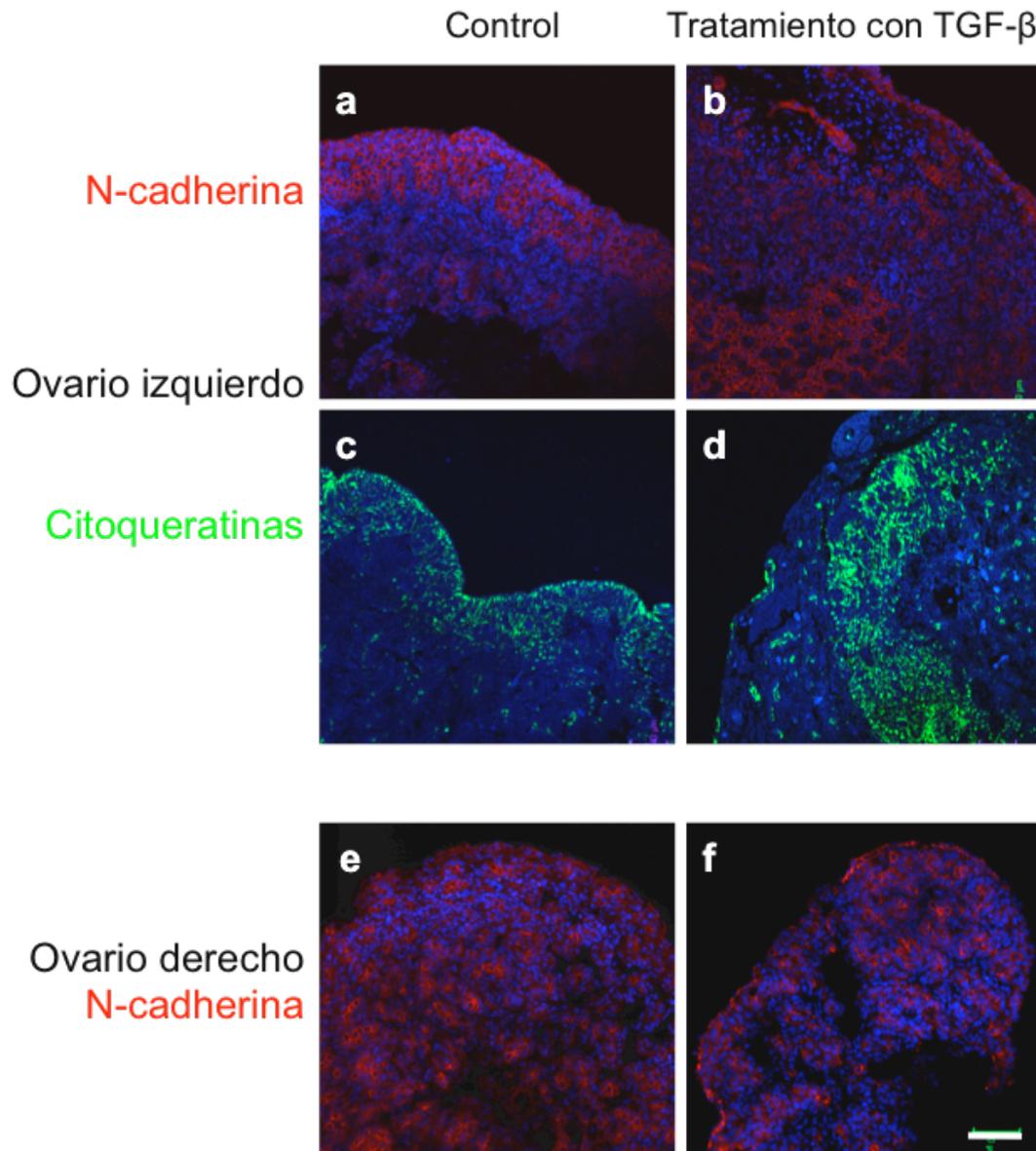
**Fig. 15.** Inmunofluorescencia para N-cadherina en ovarios de embriones de 9 di. Se observó marcaje positivo (rojo) en la superficie (corteza) del ovario izquierdo (a, e). Por otro lado, en el ovario derecho se observó un marcaje más disperso y una ausencia de corteza (b, f). La línea punteada indica el límite entre la corteza y la médula, la barra de escala representa 50  $\mu\text{m}$ .

Dado que la señalización por TGF- $\beta$  depende de la fosforilación de las proteínas Smad por medio de los receptores activados. El estado de la vía de señalización se evaluó por medio de la detección de la proteína Smad2 fosforilada (pSmad2) en el núcleo de las células del ovario. En estas preparaciones se realizó el marcaje con N-cadherina para distinguir entre la corteza de la médula (Fig. 16g, h). En ambos ovarios la marca de pSmad2 se detectó en los núcleos (Fig. 16a, b). En el ovario izquierdo se detectó un fuerte marcaje para pSmad2 en el núcleo de las células del epitelio superficial al igual que en la médula profunda (Fig. 16i, j). En el ovario derecho, pSmad2 también se encontró presente a lo largo del epitelio superficial y de la médula (Fig. 16k, l).



**Fig. 16.** Detección de Smad2 fosforilada en embriones de pollo de 9 di. Inmunofluorescencia de pSmad2 (verde), N-cadherina (rojo) y DAPI (azul). Los paneles (i) y (l) son ampliificaciones (2.5X) de regiones marcadas con el recuadro de (a) y (b) respectivamente. La barra de escala representa 50  $\mu$ m.

El efecto que el TGF- $\beta$  ejerce sobre el ovario fue evaluado en un modelo de cultivo de  $\acute{o}$ rgano, en un medio libre de suero suplementado con TGF- $\beta$ . Posteriormente se realiz $\acute{o}$  la inmunofluorescencia para N-cadherina y citoqueratinas. La detecci $\acute{o}$ n de ambas prote $\acute{i}$ nas permiti $\acute{o}$  identificar a las estructuras corticales. Despu $\acute{e}$ s de 72 h de cultivo en un medio libre de suero, el ovario izquierdo de un embri $\acute{o}$ n de 9 di mantiene una estructura similar al de un ovario sin cultivar (Fig. 17 a, c). Es decir, mantiene la presencia de N-cadherina (Fig. 17a) y citoqueratinas (Fig. 17c) en la corteza. Por otro lado, ovarios tratados con TGF- $\beta$  por 72 h fueron m $\acute{a}$ s peque $\acute{n}$ os que los controles. Adem $\acute{a}$ s de esta diferencia de tama $\acute{n}$ o, estos ovarios no ten $\acute{i}$ an una corteza bien estructurada. El marcaje de N-cadherina (Fig. 17b) y citoqueratinas (Fig. 17d) mostr $\acute{o}$  que las estructuras corticales ahora se encontraban en el interior del ovario. En el ovario derecho, el tratamiento con TGF- $\beta$  no caus $\acute{o}$  cambios morfol $\acute{o}$ gicos significativos (Fig. 17f) comparado con el control (Fig. 17e) m $\acute{a}$ s all $\acute{a}$  de la reducci $\acute{o}$ n de tama $\acute{n}$ o.



**Fig. 17.** Efecto del TGF- $\beta$  sobre la morfología del ovario cultivado. Inmunofluorescencia para N-cadherina (rojo) y citoqueratinas (verde) y DAPI en azul. Ovarios izquierdos sin tratamiento (a & c) mantienen una corteza mientras que en los tratados con TGF- $\beta$  la corteza se desplaza al interior de la gónada (b & d). Los ovarios derechos no mostraban una corteza bien desarrollada (e) mientras que el tratamiento con TGF- $\beta$  (f) no alteró de manera significativa la morfología. La barra de escala representa 50  $\mu$ m.

## **Discusión**

En el presente estudio, por medio de HIS se describió la expresión del ARNm de TGF- $\beta$ 2 en el ovario de embrión de pollo. La presencia de la proteína de TGF- $\beta$  y de Smad2 fosforilada (pSmad2) fue evaluada por medio de inmunofluorescencia. Finalmente se determinó el efecto que el TGF- $\beta$  induce en el ovario en un sistema *in vitro*.

Por medio de HIS se detectó el TGF- $\beta$ 2 en el ovario embrionario a los 8 y 9 di (HH34, 35). Por medio de esta técnica, no se pudo detectar una expresión más temprana de este ARNm. Estos resultados concuerdan con lo previamente reportado por medio de PCR de punto final (Hattori *et al.*, 2002). Este reporte muestra una “prominente expresión” de TGF- $\beta$ 2 en tejido gonadal (ovario y testículo) en estadios tan tempranos como 7 di. Esta discrepancia de un día, puede atribuírsele a la mayor sensibilidad del PCR comparado a HIS. En dicho trabajo no detectan una diferencia en la expresión de TGF- $\beta$ 2 entre la gónada derecha e izquierda; contrario a lo observado en nuestros resultados, donde se detecta una mayor tinción en la corteza de la gónada izquierda comparada con la derecha. Esta simetría en la expresión que ellos reportan, puede ser un artefacto de la técnica usada; el uso de una técnica más exacta como PCR en tiempo real revelaría de manera más precisa cualquier diferencia en la expresión de TGF- $\beta$ 2 entre ambos ovarios. Esta isoforma del TGF- $\beta$  también ha sido descrita en etapa embrionaria en ovario humano (Schilling & Yeh., 1999), ovario de rata (Levacher *et al.*, 1996) y en testículo de rata (Cupp *et al.*, 1999). Es importante notar que la expresión del TGF- $\beta$ 2 comienza después del inicio de la diferenciación gonadal (a los 6 di.). Esto sugiere que más que participar en el proceso de diferenciación sexual, el TGF- $\beta$  intervendría en el desarrollo y maduración del ovario.

En nuestros experimentos no se detectó por HIS a la isoforma TGF- $\beta$ 3 en ninguno de los estadios estudiados (6-10 di); se usó como control positivo un embrión de 72 h de incubación, el cual se ha demostrado la expresión de esta isoforma (Aramaki et al., 2005; Mecha et al., 2008). En el caso de la sonda obtenida para TGF- $\beta$ 1, no se pudo corroborar su identidad por medio de secuenciación por lo que no se estudió su patrón de expresión.

Las observaciones de inmunofluorescencia demostraron que la proteína, al igual que el ARNm, es expresada en ambos ovarios. El anticuerpo que se usó detecta tanto el precursor como la forma madura del TGF- $\beta$ . De igual manera, este anticuerpo detecta a las isoformas TGF- $\beta$ 1 y TGF- $\beta$ 2 en una amplia variedad de especies; por lo que no fue posible discernir entre ambas isoformas. En el ovario izquierdo, el TGF- $\beta$  se localiza tanto en la médula interna como en el espacio que rodea a los cordones corticales. En el ovario derecho, el cual esta esencialmente formado por la médula, el TGF- $\beta$  se encuentra a lo largo de todo el órgano. Estos resultados indican que el ARNm de TGF- $\beta$  está siendo traducido. Existen antecedentes que muestran que la proteína de TGF- $\beta$ 1 y TGF- $\beta$ 2 están presentes en células epiteliales del estroma del ovario en embriones de rata de 14.5 días (Levacher et al., 1996). De igual manera, la proteína de TGF- $\beta$ 2 también está presente en ovarios embrionarios de humano. A diferencia de lo reportado en ratas, en el ovario de humano la proteína de TGF- $\beta$ 1 y 2 se localiza en las células germinales en lugar de las células somáticas (Schilling & Yeh., 1999).

El TGF- $\beta$  ocupa como efectores intracelulares a las proteínas Smad, las cuales son fosforiladas por el receptor unido al TGF- $\beta$ . Para determinar si la proteína de TGF- $\beta$  tiene una función biológica se buscó la presencia de pSmad2 en ovarios de embrión de pollo. La presencia de pSmad en el núcleo de las células ya ha sido usada para evaluar el estado de la vía de señalización de la familia del TGF- $\beta$  en pollos (Schmierer et al., 2003). La presencia de Smad2 fosforilada en los núcleos de células del ovario sugiere que *in vivo* la vía de señalización se encuentra activa en este estadio de desarrollo. Esta conclusión es apoyada por el hecho de previamente ha sido

descrito que el receptor II para TGF- $\beta$  (TGF $\beta$ RII) está sobreexpresado en el ovario de embrión de pollo (Carré *et al.*, 2011).

En un modelo de cultivo de órgano *in vitro*, se determinó que el TGF- $\beta$  inducía una reducción del tamaño de los explantes. Este resultado es similar al observado en testículos de embrión de rata; testículos cultivados en un medio suplementado con TGF- $\beta$ 1 durante 3 días mostraron una reducción de tamaño (Cupp *et al.*, 1999). Estudios previos mostraron que en el mismo modelo de cultivo de órgano TGF- $\beta$ 1 y TGF- $\beta$ 2 reducen el número de células somáticas sin afectar el número de células germinales en ovarios de embrión de pollo (Méndez *et al.*, 2006). Este efecto se debe a una reducción en la proliferación más que a un aumento en la apoptosis, evaluados por la incorporación de BrdU y la técnica de TUNEL, respectivamente. Esta inhibición sobre la proliferación de células del ovario embrionario de pollo inducida por el TGF- $\beta$ 2, también ha sido observada en un modelo de cultivo celular (Fujioka *et al.*, 2004). Estas evidencias sugieren que TGF- $\beta$ 1 y TGF- $\beta$ 2 podrían controlar la proliferación de las células somáticas, durante el desarrollo de la gónada en mamíferos y aves.

Otros autores han descrito un efecto del TGF- $\beta$  sobre el número de células germinales. En modelo murino se ha observado que el TGF- $\beta$  tiene la capacidad de inhibir la proliferación de las células germinales primordiales (Godin & Wylie., 1991). Fujioka, *et al* (2004) observaron que TGF- $\beta$  puede reducir el número de células germinales en muestras de embriones de 6di. En trabajos previos de nuestro grupo, se observó que en ovarios de embrión de pollo de 9 di., TGF- $\beta$ 1 disminuye el número de células somáticas sin afectar el número de ovogonias. Esta discrepancia puede ser atribuida a el uso de células germinales en estadios más tempranos de desarrollo; asimismo, a una concentración mayor de TGF- $\beta$ 1 en el medio de cultivo 25 ng/ $\mu$ l (Godin & Wylie., 1991) y 100 ng/  $\mu$ l (Fujioka *et al.*, 2004).

Además de una reducción en el tamaño del ovario, el TGF- $\beta$  alteró la morfología del ovario izquierdo. Mediante la inmunodetección de citoqueratinas y N-cadherina, se observó un desplazamiento de estructuras de la corteza (cordones corticales y células germinales) de la región más externa del ovario hacia la médula. Ambas proteínas, citoqueratinas (Ishimaru *et al.*, 2008) y N-cadherina (Günter *et al.*, 2011) han sido utilizadas para el marcaje de la corteza del ovario en desarrollo. Una posible explicación al efecto del TGF- $\beta$  observado en cultivo es el de una quimiotaxis inducida por el tratamiento. Existen estudios previos que han demostrado que el TGF- $\beta$  es capaz de inducir una quimiotaxis sobre las células germinales primordiales de ratón *in vitro* (Godin & Wylie, 1991). La posibilidad de una quimiotaxis inducida por TGF- $\beta$  sobre las células germinales de embrión de pollo fue evaluada mediante el uso de una cámara de Boyden; sin embargo, estos experimentos resultaron negativos. Es posible que este cambio en la morfología del ovario no sea debido a un efecto directo del TGF- $\beta$ ; sino que esos cambios se deban a proteínas de matriz extracelular secretados en respuesta al TGF- $\beta$ . Experimentos en ratón, han mostrado que en embriones deficientes para ALK5 (TGF $\beta$ RI) sus células germinales presentan una migración deficiente hacia la gónada (Chuva de Sousa Lopez *et al.*, 2005). Este efecto observado, no es debido a una quimiotaxis sino a cambios en la deposición de moléculas de matriz extracelular; en particular colágena-I y fibronectina. Es posible que el desplazamiento observado de estructuras corticales hacia la médula sea debido a un efecto del TGF- $\beta$  sobre estos componentes de matriz extracelular.

Cabe destacar que este efecto sobre la morfología del ovario no fue observado en el ovario derecho. En ambos ovarios se observó la presencia de pSmad2 en el núcleo. Sin embargo, ambos ovarios presentan morfologías claramente distintas y tienen diferentes respuestas al tratamiento con TGF- $\beta$ . Esta diferencia en respuesta al TGF- $\beta$ 1 puede atribuirse a las diferencias en tipos celulares presentes en cada ovario. En específico, el ovario izquierdo a diferencia una corteza formada por células foliculares originadas por proliferación del epitelio celómico. En los experimentos de cultivo de órgano,

es esta población celular la que se desplaza al interior del ovario en respuesta al estímulo de TGF- $\beta$ 1. El ovario derecho al carecer de esta estructura no produce el mismo cambio morfológico. Alternativamente, existen antecedentes que señalan que la función *in vivo* de TGF- $\beta$ 1 puede ser modulada localmente por medio de las integrinas (Munger *et al.*, 1999). De igual manera la presencia de los co-receptores para TGF- $\beta$ , endoglina y  $\beta$  glicano, es capaz de modificar la respuesta celular al TGF- $\beta$  (Letamendia *et al.*, 1998).

Law *et al.* (1995) han demostrado que tanto TGF- $\beta$ 1 como TGF- $\beta$ 2 son expresados en las células de la teca y de la granulosa en gallinas. Siendo las células de teca los principales productores de TGF- $\beta$ 2 en el ovario. En células de la granulosa en cultivo, el TGF- $\beta$  induce la expresión del receptor para la hormona luteinizante. Además, en combinación con la hormona estimulante del folículo el TGF- $\beta$  promueve la síntesis de las enzimas P450<sub>scc</sub> y StAR (Johnson *et al.*, 2004); ambas enzimas participan en la biosíntesis de estradiol. El ovario embrionario de pollo es activo en la producción y secreción de hormonas esteroideas (Tanabe *et al.*, 1986; Villalpando *et al.*, 2000). Estas enzimas son necesarias para el desarrollo del ovario en el embrión de pollo; en particular en permitir el desarrollo de la corteza del ovario izquierdo y establecer el crecimiento asimétrico de la gónada. Un posible papel del TGF- $\beta$  en regular la producción y la secreción de hormonas esteroideas durante el desarrollo embrionario no puede ser descartado.

En resumen, este trabajo ha demostrado por primera vez la expresión del ARNm y proteína del TGF- $\beta$  en el ovario de embrión de pollo a los 9 di. El TGF- $\beta$ 2 comienza su expresión en la gónada después de la diferenciación sexual. Los resultados obtenidos en este estudio en conjunto con lo observado en otros estudios, sugieren que el TGF- $\beta$ 2 está involucrado en el desarrollo del ovario mediante la regulación de la proliferación celular y el modelado de la gónada.

## **Conclusiones**

En el presente trabajo observamos:

- El ARNm de TGF- $\beta$ 2 es expresado en el ovario de embrión de pollo a partir de los 8 di; es decir, después de la diferenciación sexual. El ARNm se encuentra localizado en la médula de ambos ovarios y predominantemente en la corteza del ovario izquierdo.
- La proteína de TGF- $\beta$  tiene una distribución similar a la de su ARNm. Se encuentra en la médula de ambos ovarios y alrededor de los cordones corticales en el ovario izquierdo.
- La presencia de Smad2 fosforilada en el núcleo de células del ovario indica que la señalización por TGF- $\beta$  se encuentra activa en este periodo del desarrollo.
- El marcaje de N-cadherina y citoqueratinas indica que en el ovario izquierdo, el tratamiento con TGF- $\beta$  induce un desplazamiento de estructuras de la corteza ovárica hacia la médula. Este fenómeno no se observa en el ovario derecho.

## Perspectivas

- El TGF- $\beta$ 2 se expresa en ambos ovarios a partir de los 8 di. Sin embargo, la posibilidad de detectarlo en estadios anteriores por técnicas más sensibles abriría la posibilidad de su participación en la diferenciación gonadal. De igual manera el uso de métodos cuantitativos (PCR en tiempo real) permitirá evaluar las diferencias en la expresión de TGF- $\beta$  entre el ovario izquierdo y derecho; lo cual podría relacionar la asimetría de los ovarios con una expresión asimétrica de TGF- $\beta$ 2.
- Se asume la presencia de los receptores para TGF- $\beta$  en el ovario embrionario; sin embargo, se desconocen sus niveles de expresión así como su distribución. Conocer la expresión de los receptores y co-receptores para TGF- $\beta$  revelará más información sobre su participación en la morfogénesis del ovario.
- El conocer el mecanismo mediante el cual TGF- $\beta$  induce el cambio en la morfología del ovario *in vitro*, aportará información sobre el papel que el TGF- $\beta$  juega en el desarrollo del ovario. En este sentido, se buscaría estudiar los cambios en la expresión de componentes de matriz extracelular en el ovario en respuesta a un estímulo por TGF- $\beta$ . De particular importancia sería estudiar la expresión de colágena-I, fibronectina y laminina; junto con las moléculas usadas para identificar a la corteza, N-cadherina y citoqueratina.

## **Referencias**

**Adashi EY, Resnick CE, Hernandez ER, May JV, Purchio AF, Twardzik DR.** Ovarian transforming growth factor-beta (TGF beta): cellular site(s), and mechanism(s) of action. *Mol Cell Endocrinol.* 1989, 61:247-256.

**Ando Y, Fujimoto T.** Ultrastructural evidence that chick primordial germ cells leave the blood-vascular System prior to migration to the gonadal anlagen. *Develop. Growth & Differ.* 1983, 25:345-352.

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

**Annes JP, Munger JS, Rifkin DB.** Making sense of latent TGFbeta activation. *J Cell Sci.* 2003, 116:217-224.

**Aramaki S, Sato F, Soh T, Yamauchi N, Sakai T, Hattori MA.** Temporal and spatial expression of TGF-beta2 in chicken somites during early embryonic development. *J Exp Zool A Comp Exp Biol.* 2005, 303:323-330.

**Bilandzic M, Stenvers KL.** Reprint of: Betaglycan: a multifunctional accessory. *Mol Cell Endocrinol.* 2012, 359:13-22.

**Brennan J, Capel B.** One tissue, two fates: molecular genetic events that underlie testis versus ovary development. *Nat Rev Genet.* 2004, 5:509-521.

**Bruggeman V, Van As P, Decuypere E.** Developmental endocrinology of the reproductive axis in the chicken embryo. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol.* 2002, 131:839-846.

**Caestecker M.** The transforming growth factor-beta superfamily of receptors. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2004, 15:1-11.

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

**Carré GA, Couty I, Hennequet-Antier C, Govoroun MS.** Gene expression profiling reveals new potential players of gonad differentiation in the chicken embryo. *PLoS One.* 2011, 6:e23959.

**Chaudhury A, Howe PH.** The tale of transforming growth factor-beta (TGFbeta) signaling: a

soigné enigma. *IUBMB Life*. 2009, 61:929-939.

**Chue J, Smith CA.** Sex determination and sexual differentiation in the avian model. *FEBS J*. 2011, 278:1027-1034.

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

**Clark DA, Coker R.** Transforming growth factor-beta (TGF-beta). *Int J Biochem Cell Biol*. 1998, 30:293-298.

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

**Cupp AS, Kim G, Skinner MK.** Expression and action of transforming growth factor beta (TGFbeta1, TGFbeta2, and TGFbeta3) during embryonic rat testis development. *Biol Reprod*. 1999, 60:1304-1313.

**DeFalco T, Capel B.** Gonad morphogenesis in vertebrates: divergent means to a convergent end. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2009, 25:457-482.

**Eyal-Giladi H, Kochav S, Menashi MK.** On the origin of primordial germ cells in the chick embryo. *Differentiation*. 1976, 6:13-16.

**Fujioka T, Soh T, Fujihara N, Hattori MA.** 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*. 2004, 301:290-296.

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

**Graves JA.** Sex determination: Birds do it with a Z gene. *Nature*. 2009, 461:177-178.

**Groppe J, Hinck CS, Samavarchi-Tehrani P, Zubieta C, Schuermann JP, Taylor AB, Schwarz PM, Wrana JL, Hinck AP.** Cooperative assembly of TGF-beta superfamily signaling complexes is mediated by two disparate mechanisms and distinct modes of receptor binding. *Mol Cell*. 2008, 29:157-168.

**Guioli S, Lovell-Badge R.** PITX2 controls asymmetric gonadal development in both sexes of

the chick and can rescue the degeneration of the right ovary. *Development*. 2007, 134:4199-4208.

**Günther J, Díaz V, Pedernera E, Méndez C.** Gonadotropins regulate cadherin expression in the ovary of the chicken embryo (*Gallus gallus*). *Gen Comp Endocrinol*. 2011, 174:344-347.

**Halper J, Burt DW, Romanov MN.** On reassessment of the chicken TGFB4 gene as TGFB1. *Growth Factors*. 2004, 22:121-122.

**Hamburger V, Hamilton HL.** A series of normal stages in the development of the chick embryo. 1951. *Dev Dyn*. 195:231-272.

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

**Hoshino A, Koide M, Ono T, Yasugi S.** Sex-specific and left-right asymmetric expression pattern of *Bmp7* in the gonad of normal and sex-reversed chicken embryos. *Dev Growth Differ*. 2005, 47:65-74.

**Ingman WV, Robertson SA.** Defining the actions of transforming growth factor beta in reproduction. *Bioessays*. 2002, 24:904-914.

**Ishimaru Y, Komatsu T, Kasahara M, Katoh-Fukui Y, Ogawa H, Toyama Y, Maekawa M, Toshimori K, Chandraratna RA, Morohashi K, Yoshioka H.** Mechanism of asymmetric ovarian development in chick embryos. *Development*. 2008, 135:677-685.

**Johnson AL, Bridgham JT, Woods DC.** Cellular mechanisms and modulation of activin A- and transforming growth factor beta-mediated differentiation in cultured hen granulosa cells. *Biol Reprod*. 2004, 71:1844-1851.

**Juneja SC, Chegini N, Williams RS, Ksander GA.** Ovarian intrabursal administration of transforming growth factor beta 1 inhibits follicle rupture in gonadotropin-primed mice. *Biol Reprod*. 1996, 55:1444-1451.

**Kondaiah P, Sands MJ, Smith JM, Fields A, Roberts AB, Sporn MB, Melton DA.** Identification of a novel transforming growth factor-beta (TGF-beta 5) mRNA in *Xenopus laevis*. *J Biol Chem*. 1990, 265:1089-1093.

**Kulkarni A, Thyagarajan T, Letterio J.** Function of cytokines within the TGF-beta

superfamily as determined from transgenic and gene knockout studies in mice. *Curr Mol Med.* 2002, 2:303-327.

**Kuwana T.** Migration of Avian Primordial Germ Cells toward the Gonadal Anlage. *Develop. Growth & Differ.* 1993, 35:237-243.

**Law AS, Burt DW, Armstrong DG.** Expression of transforming growth factor-beta mRNA in chicken ovarian follicular tissue. *Gen Comp Endocrinol.* 1995, 98:227-233.

**Letamendía A, Lastres P, Botella LM, Raab U, Langa C, Velasco B, Attisano L, Bernabeu C.** Role of endoglin in cellular responses to transforming growth factor-beta. A comparative study with betaglycan. *J Biol Chem.* 1998, 273:33011-33019.

**Levacher C, Gautier C, Saez JM, Habert R.** Immunohistochemical localization of transforming growth factor beta 1 and beta 2 in the fetal and neonatal rat ovary. *Differentiation.* 1996, 61:45-51.

**Lovell TM, Knight PG, Gladwell RT.** Differential expression of mRNAs encoding the putative inhibin co-receptor (betaglycan) and activin type-I and type-II receptors in preovulatory and prehierarchical follicles of the laying hen ovary. *J Endocrinol.* 2006, 188:241-249.

**Massagué J.** TGF-beta signal transduction. *Annu Rev Biochem.* 1998, 67:753-791.

**McCarrey JR, Abbott UK.** Functional differentiation of chick gonads following depletion of primordial germ cells. *J Embryol Exp Morphol.* 1982, 68:161-174.

**Mecha M, Rabadán MA, Peña-Melián A, Valencia M, Mondéjar T, Blanco MJ.** Expression of TGF-betas in the embryonic nervous system: analysis of interbalance between isoforms. *Dev Dyn.* 2008, 237:1709-1717.

**Memon MA, Anway MD, Covert TR, Uzumcu M, Skinner MK.** Transforming growth factor beta (TGFbeta1, TGFbeta2 and TGFbeta3) null-mutant phenotypes in embryonic gonadal development. *Mol Cell Endocrinol.* 2008, 294:70-80.

**Méndez C, Alcántara L, Escalona R, López-Casillas F, Pedernera E.** Transforming growth factor beta inhibits proliferation of somatic cells without influencing germ cell number in the chicken embryonic ovary. *Cell Tissue Res.* 2006, 325:143-149.

**Munger JS, Huang X, Kawakatsu H, Griffiths MJ, Dalton SL, Wu J, Pittet JF, Kaminski N, Garat C, Matthay MA, Rifkin DB, Sheppard D.** The integrin alpha v beta 6 binds and

activates latent TGF beta 1: a mechanism for regulating pulmonary inflammation and fibrosis. *Cell*. 1999, 96:319-328.

**Nakabayashi O, Kikuchi H, Kikuchi T, Mizuno S.** Differential expression of genes for aromatase and estrogen receptor during the gonadal development in chicken embryos. *J Mol Endocrinol*. 1998, 20:193-202.

**Narbaitz R, Adler R.** Submicroscopical observations on the differentiation of chick gonads. *J Embryol Exp Morphol*. 1966, 16:41-47.

**Nili H, Kelly WR.** Form and function of lacunae in the ovary of the laying hen. *Anat Rec*. 1996, 244:165-174.

**Pan H, Halper J.** Cloning, expression, and characterization of chicken transforming growth factor beta 4. *Biochem Biophys Res Commun*. 2003, 303:24-30.

**Piek E, Heldin CH, Ten Dijke P.** Specificity, diversity, and regulation in TGF-beta superfamily signaling. *FASEB J*. 1999, 13:2105-2124.

**Schmierer B, Schuster MK, Shkumatava A, Kuchler K.** Activin a signaling induces Smad2, but not Smad3, requiring protein kinase a activity in granulosa cells from the avian ovary. *J Biol Chem*. 2003, 278:21197-21203.

**Schilling B, Yeh J.** Expression of transforming growth factor (TGF)-beta1, TGF-beta2, and TGF-beta3 and of type I and II TGF-beta receptors during the development of the human fetal ovary. *Fertil Steril*. 1999, 72:147-153.

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

**Shimada K.** Gene expression of steroidogenic enzymes in chicken embryonic gonads. *J Exp Zool*. 1998, 281:450-456.

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

**Smith CA, Roeszler KN, Ohnesorg T, Cummins DM, Farlie PG, Doran TJ, Sinclair AH.** The avian Z-linked gene DMRT1 is required for male sex determination in the chicken. *Nature*. 2009, 461:267-271.

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

**Smith CA, Smith MJ, Sinclair AH.** Gene expression during gonadogenesis in the chicken embryo. *Gene*. 1999, 234:395-402.

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

**Sundaresan NR, Anish D, Sastry KV, Saxena VK, Mohan J, Ahmed KA.** Cytokines in reproductive remodeling of molting White Leghorn hens. *J Reprod Immunol*. 2007, 73:39-50.

**Swift C.** Origin and early history of the primordial germ cells in the chick. *Am. J. Anat*. 1914, 15:483-516.

**Tanabe Y, Saito N, Nakamura T.** Ontogenetic steroidogenesis by testes, ovary, and adrenals of embryonic and postembryonic chickens (*Gallus domesticus*). *Gen Comp Endocrinol*. 1986, 63:456-463.

**Ukeshima A.** Abandonment of germ cells in the embryonic chick ovary: TEM and SEM studies. *Anat Rec*. 1994, 240:261-266.

**Ukeshima A, Fujimoto T.** A fine morphological study of germ cells in asymmetrically developing right and left ovaries of the chick. *Anat Rec*. 1991, 230:378-386.

**Vaillant S, Dorizzi M, Pieau C, Richard-Mercier N.** Sex reversal and aromatase in chicken. *J Exp Zool*. 2001, 290:727-740.

**Van Nassauw L, Schrevens A, Harrisson F, Callebaut M.** Immunohistochemical localization of transforming growth factor-beta 1 beta 2 during folliculogenesis in the quail ovary. *Histochem J*. 1996, 28:859-865.

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

**Wu MY, Hill CS.** Tgf-beta superfamily signaling in embryonic development and homeostasis. *Dev Cell*. 2009, 16:329-343.

**Zaccanti F, Vallisneri M, Quaglia A.** Early aspects of sex differentiation in the gonads of chick embryos. *Differentiation*. 1990, 43:71-80.

**Zhang YE.** Non-Smad pathways in TGF-beta signaling. *Cell Res*. 2009, 19:128-139.

## Transforming growth factor $\beta$ mRNA and protein expression in the ovary of the chicken embryo

RENE ESCALONA, VERÓNICA DIAZ, ENRIQUE PEDERNEIRA, & CARMEN MÉNDEZ

*Departamento de Embriología, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, Mexico DF 04510, Mexico*

*(Received 26 April 2012; revised 8 June 2012; accepted 13 June 2012)*

### Abstract

The expression pattern of *transforming growth factor beta* ( $TGF\beta$ ) isoforms in chicken embryo gonads was studied at 6–10 days of incubation.  $TGF\beta 2$  mRNA was expressed predominantly in the cortex of the left ovary from day 8 of incubation onwards.  $TGF\beta 3$  mRNA was not detected at any of the stages studied. Similarly, immunofluorescence for the  $TGF\beta$  protein revealed that at day 9 it was located throughout the cortex of the left ovary and in the medulla of both the left and right ovaries. The presence of phosphorylated Smad2 in the nuclei of these regions suggests that  $TGF\beta$  signaling is most likely active at this developmental stage. Culturing the left ovary in a  $TGF\beta 1$ -supplemented medium induced a shift of cortical structures toward the medulla, suggesting a role for  $TGF\beta$  in the morphogenesis of the female gonad in chickens.

**Keywords:** *Chicken embryo gonad, ovarian morphogenesis, transforming growth factor  $\beta$*

### Introduction

In birds, as in mammals, the gonad arises as a bipotential organ whose ultimate fate is determined by ZZ sex chromosomes in males versus ZW in females (Smith and Sinclair 2001). In chicken embryos, the gonad originates as a thickening on the ventral face of the mesonephros at 3.5 days of incubation (E3.5). Before sexual differentiation, prospective male and female gonads are morphologically indistinguishable. During this bipotential phase, the gonads are composed of a cortex of somatic and germ cells and a medulla of primitive sex cords and mesenchymal cells (Smith and Sinclair 2004).

In chicken embryos, gonadal differentiation can be recognized by E6.5 (HH30) (Carlson and Stahl 1985). In most birds, the development of the ovary is characterized by asymmetric growth; only the left gonad develops into a functional ovary. The left ovary is characterized by an extensive growth of the cortex.

The innermost region of the ovary, the medulla, consists of medullary cords, lacunae, and steroidogenic cells (Narbaitz and Adler 1966; DeFalco and Capel 2009). In contrast, the right ovary is significantly smaller and is formed by a medulla surrounded by a simple squamous epithelium (Ukeshima and Fujimoto 1991). Aside from these morphological differences, the ovaries display an asymmetric distribution of germ cells that are more abundant in the left gonad (Zaccanti et al. 1990). Estrogens have been linked to the development of the cortex in the left ovary. Due to the lack of estrogen receptors, the right gonad fails to develop a proper cortex and hence comprises only a medulla (Andrews et al. 1997; Smith et al. 1997).

Transforming growth factor beta ( $TGF\beta$ ) is a member of the  $TGF\beta$  superfamily of growth factors. To date, five isoforms have been identified.  $TGF\beta 1$ ,  $TGF\beta 2$ , and  $TGF\beta 3$  are present in mammals, whereas  $TGF\beta 5$  is found only in amphibians (Vempati

Correspondence: C. Méndez, Departamento de Embriología, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, Mexico DF 04510, Mexico. Tel: + 52 (55) 56232265. Fax: + 52 (55) 56232156. E-mail: mendezmc@unam.mx

and Kondaiah 1998). TGF $\beta$ 4 is found only in birds (Pan and Halper 2003), although there are reports that TGF $\beta$ 4 is actually the ortholog for TGF $\beta$ 1 in birds (Halper et al. 2004). The TGF $\beta$  family of growth factors activates its signaling pathway by binding to membrane receptors. This binding triggers the serine/threonine kinase activity in the receptor's cytoplasmic domain. The active receptors phosphorylate Smad proteins. This phosphorylation mediates the translocation of Smad proteins to the nucleus, where they control the transcription of target genes (Shi and Massagué 2003). TGF $\beta$  signaling regulates several activities in cells such as apoptosis, proliferation, differentiation, migration, and adhesion (Wu and Hill 2009). In rodents, gonads from TGF $\beta$ -null embryos do not exhibit any major morphological defects, probably due to compensations from other TGF $\beta$  isoforms (Memon et al. 2008).

However, TGF $\beta$  participates in the process of folliculogenesis in the chicken ovary, either alone or through interaction with gonadotropic hormones (Johnson et al. 2004; Woods and Johnson 2005). TGF $\beta$ 2 is prominently expressed in the embryonic gonad of both sexes (Hattori et al. 2002). Moreover, it has been demonstrated that in cultured ovaries of E9 chicken embryos, TGF $\beta$ 1 and TGF $\beta$ 2 reduce the number of somatic cells without affecting the number of germ cells (Méndez et al. 2006). There is little evidence for TGF $\beta$  being involved in the embryonic development of the avian gonad. In the present study, the expression pattern of TGF $\beta$  isoforms during the morphogenesis of the female gonad in chicken embryos was evaluated. In addition, the effect that TGF $\beta$  exerts *in vitro* over the morphology of the embryonic ovary in culture was assessed.

## Materials and methods

### Animals

Fertilized eggs of White Leghorn chicken (*Gallus gallus*) were obtained from a local farm. The eggs were incubated in a forced-draft incubator (Jamesway, Cambridge, ON, Canada) at 37.8°C and 80% relative humidity. The developmental stages of the chicken embryos were defined according to Hamburger and Hamilton (1951). All procedures were approved by the Animal Care Committee of the School of Medicine at UNAM and were in accordance to NIH guidelines.

### Probe synthesis

Plasmids containing cDNA clones of chicken TGF $\beta$ 2 and TGF $\beta$ 3 were kindly provided by Dr. E. Martí (Instituto de Biología Molecular de Barcelona, CSIC, Barcelona, Spain). Plasmids containing the chicken probes were linearized by restriction digestion and used as templates for either T3 or T7 RNA polymerase

(Promega, Madison, WI, USA). *In vitro* reactions generated antisense and sense riboprobes, and these were labeled with digoxigenin-UTP DIG RNA labeling mix (Boehringer, Ingelheim, Germany). Fragment identity and insertion orientation were verified by sequencing. A 56-h chicken embryo was used as a positive control for TGF $\beta$ 3.

### Whole-mount *in situ* hybridization

Whole-mount *in situ* hybridization (ISH) was performed as follows. Both left and right gonads with accompanying mesonephros from 160 chicken embryos (E6–E9) were fixed in 4% paraformaldehyde (PFA) in phosphate-buffered solution (PBS) at 4°C overnight. The tissue was dehydrated with 25%, 50%, 75%, and 100% methanol [*v/v* in PBS with 0.1% Tween 20 (PBST)]. Before hybridization, the samples were rehydrated with 75%, 50%, 25% methanol/PBST, and twice in PBST, each for 5 min at room temperature (RT). Subsequently, the samples were treated with proteinase K digestion (10  $\mu$ g/ml in PBST) for 9 min at RT. After proteinase K treatment, the tissue was post-fixed in 4% PFA/PBST. Following fixation, the samples were washed with PBST, prehybridized at 65°C for at least 6 h, and then hybridized with the corresponding RNA probes overnight. On the second day, the samples were washed four times in hybridization mix for 30 min and twice in maleic acid buffer containing 0.1% Tween 20 (MABT) for 15 min. The tissue was then blocked for 4 h and incubated with anti-digoxigenin antibody coupled with alkaline phosphatase (Roche, Mexico City, Mexico) at 4°C overnight. On the third day, the samples were thoroughly washed in MABT four times during 1 h at RT and then were kept overnight at 4°C. On the fourth day, the samples were washed in NTMT buffer twice for 10 min and then developed with BM Purple AP Substrate precipitating (Roche). After optimal staining was reached, development was stopped with PBST, and the stained samples were subjected to graded dehydration–hydration steps in methanol/PBST to reduce background. The stained tissue was observed and photographed with a stereomicroscope (SMZ1500, Nikon Instruments Inc., Mexico City, Mexico) coupled with a digital camera. Negative controls for each gene were carried out using the sense probe at an equal concentration.

### Frozen section ISH

Urogenital systems from eight female chicken embryos at E9 (HH35) were fixed overnight in cold 4% PFA in PBS, washed in increasing sucrose concentrations (10%, 20%, and 30%) and in Optimal Cutting Temperature (OCT) compound/30% sucrose 1:1 at 4°C. Samples were embedded in OCT, frozen in dry ice, and stored at –70°C. ISH was performed as

previously reported (Díaz-Hernández et al. 2008). Briefly, 12- $\mu$ m frozen sections were washed and prehybridized for 1 h at 55°C in hybridization solution (50% formamide, 1.3% SSC, pH 7, 5 mM EDTA, pH 8, 0.2% Tween 20, 0.5% CHAPS, 100  $\mu$ g/ml heparin, and 50  $\mu$ g/ml yeast RNA). Test or control samples were hybridized with antisense or sense riboprobes, respectively. Riboprobes were added and hybridized overnight at 55°C, washed and blocked with 15% goat serum, 2% BSA in PBS. The signal was immunologically detected using preabsorbed antibody anti-digoxigenin-AP Fab fragment (Boehringer Mannheim, Mexico City, Mexico) and stained with BM Purple AP Substrate precipitating (Roche, Mexico City, Mexico). Samples were photographed using a Nikon E600 microscope.

### Immunofluorescence

Fixed urogenital complexes from eight female chicken embryos at E9 (HH35) were washed in PBS and immersed in 30% sucrose overnight followed by 1:1 30% sucrose:OCT compound (Tissue Tek, Torrance, CA, USA). To remove lipids, slides were washed with ascending and descending series of ethanol in PBS. Antigens were retrieved by boiling slides in Buffer Diva 1  $\times$  (Biocare Medical, Concord, CA, USA) for 45 min. Slides were washed with PBS and then permeabilized with 0.5% Triton 100  $\times$  /PBS for 10 min. To block unspecific staining, the sections were treated with 5% horse serum in PBT (0.5% Triton 100  $\times$  /PBS) for 30 min at RT and subsequently incubated overnight with primary rabbit anti-Smad, phospho-specific (Ser 465/467) antibody (AB3849 Millipore, Billerica, MA, USA), diluted 1:250 at RT. The sections were incubated in secondary goat Cy3 anti-rabbit antibody (Chemicon International Inc., Billerica, MA, USA), diluted 1:250 for 1 h at RT and washed with PBS, sequentially blocked with 1% horse serum in PBS for 1 h and incubated overnight with mouse anti-N-cadherin (Invitrogen, Mexico city, Mexico). The slides were washed and incubated in Alexa fluor 647 donkey anti-mouse secondary antibody (Molecular Probes, Invitrogen), diluted 1:100 for 1 h at RT.

Images were acquired with a confocal microscope (TCS SP5, Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) with the aid of Advanced Fluorescence Lite (Leica Microsystems) imaging software. For TGF $\beta$  detection, a rabbit polyclonal antibody was used (1:200, SC-146 Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), diluted 1:200; cytokeratins were detected using a pan cytokeratin (AE1/AE3) antibody (CM011C, Biocare Medical), diluted 1:200.

### Organ culture of embryonic ovaries

Ovaries from 80 chicken embryos at E9 (HH35) were dissected under a stereoscopic microscope.

The ovaries were cultured on polycarbonate membranes (Nuclepore, Whatman, Maidstone, UK) floating on serum-free culture medium (Dulbecco's Modified Eagle Medium, DMEM supplemented with 0.1% Albumax, 100 U/ml penicillin, 50  $\mu$ g/ml streptomycin, Gibco-BRL, Mexico City, Mexico). Recombinant human TGF $\beta$ 1 (R&D Systems, Mexico City, Mexico) was added to the medium at the beginning of the culture at a final concentration of 10 ng/ml. The ovaries were cultured for 72 h to assess the effect of TGF $\beta$ . After culture, the ovaries were washed in PBS and fixed in 4% PFA/PBS overnight, before being incubated in 30% sucrose overnight. The tissue was then infiltrated with 1:1 30% sucrose:OCT compound, embedded in OCT compound, frozen, and processed for histological analysis.

## Results

### Expression of TGF $\beta$ 2 mRNA during early gonad development

TGF $\beta$ 2 mRNA was detected by ISH in the differentiated ovary as early as E8 (HH34)

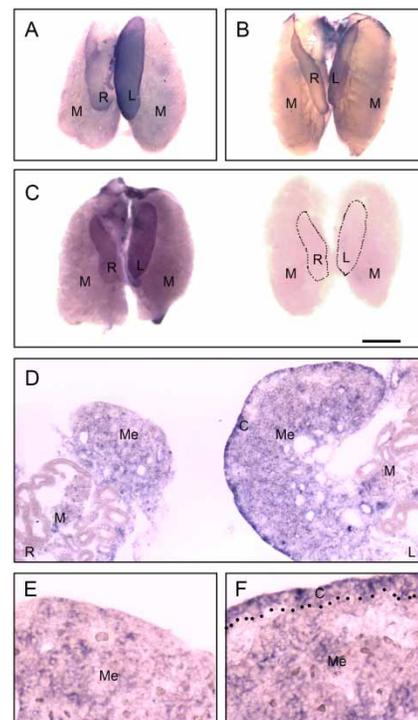


Figure 1. Whole-mount ISH of embryonic gonads for TGF $\beta$ 2 (A)–(C). TGF $\beta$ 2 begins to be expressed at HH34, predominantly in the left ovary while in the right ovary it was not detected (A). At HH35, TGF $\beta$ 2 is also expressed in the male gonad (B). At HH35, the left and right ovaries continue to express TGF $\beta$ 2 (C, left). The negative control with the sense probe is displayed (C, right). ISH in the frozen sections shows that TGF $\beta$ 2 is expressed in both the ovaries (D). Amplifications of the right (E) and left (F) ovaries are shown. Dotted line indicates the cortex–medulla boundary; L, left side; R, right side; M, mesonephros; C, cortex; Me, medulla. Bar represents 1 mm.

(Figure 1A); earlier expression (E6 and E7) was not detected by ISH. *TGFβ2* was also expressed in testes of E9 (HH35) embryos (Figure 1B). *TGFβ2* expression was maintained in the embryonic ovary at E9 (Figure 1C) and E10 (not shown). In the female gonad, *TGFβ2* was present throughout the gonad, but predominantly in the left ovarian cortex (Figure 1D), whereas on the male gonads *TGFβ2* was observed in the sex cords (not shown). *TGFβ3* was not found by ISH in either the male or female gonad at any of the stages examined (not shown).

In chickens, development of the ovary is characterized by the asymmetric growth of the left ovary. This anatomical asymmetry became evident at E8 (HH34) (Figure 1A), at which point female gonads could be distinguished from male gonads by their size. At E9 (HH35), the surface of the left ovary displayed a well-developed cortex that comprised a thick surface epithelium and clusters of germ cells surrounded by somatic cells. The expression of *TGFβ2* in this region apparently occurred in germ cells, somatic cells, or both. The subcortical medulla directly underneath the cortex contained small lacunae and epithelial medullary cords (Figure 1D,F). The innermost medulla was composed of large veins and lacunae lined by a squamous epithelium. The structure of the right ovary was similar to that of the inner medulla of the left gonad, in that it lacked a cortex and was covered by a squamous epithelium (Figure 1D,E). *TGFβ2* was detected in the medulla of right and left ovaries, although, at lower levels compared with those seen in the cortex of the left ovary (Figure 1D).

#### Ovarian expression of *TGFβ* protein

To determine if the *TGFβ* protein had a similar distribution as its mRNA, immunostaining was

carried out on frozen sections of E9 (HH35) gonads. *TGFβ* was identified by immunofluorescence with an antibody that detects precursor and mature *TGFβ1* and *TGFβ2*. *TGFβ* protein occurred in extracellular space. In the left ovary, *TGFβ* surrounded the sex cords in the cortex (Figure 2A,C), and small amounts were observed in the inner medulla. In the right gonad that contains only a medulla, *TGFβ* was present in the entire organ (Figure 2D,F).

#### Phosphorylated *Smad2* in the developing avian ovary

As *TGFβ* signaling relies on the phosphorylation of *Smad* proteins by activated receptors, *TGFβ* activation was assessed by the presence of phospho-*Smad2* in nuclei. In such preparations, the cortical region of the developing gonad was also visualized with an anti-N-cadherin antibody, which revealed a significantly thicker cortex in the left versus right ovary (Figure 3B,F). In the left ovary, strong phospho-*Smad2* (p-*Smad2*) staining occurred in the nuclei cortical cells as well as in the inner medulla (Figure 3A). This pattern was similar to that of *TGFβ* protein. In the right gonad, p-*Smad2* was also present in the nuclei of the surface epithelium and the medulla (Figure 3E).

#### Exogenous *TGFβ1* induces a shift of cortical structures on cultured ovaries

The effect *TGFβ* exerts over the left ovary was assessed in organ culture, followed by immunofluorescence of N-cadherin and cytokeratin to highlight the ovarian cortex. After 72 h of culture in a serum-free medium, the left ovary retained staining for N-cadherin (Figure 4A) and cytokeratin

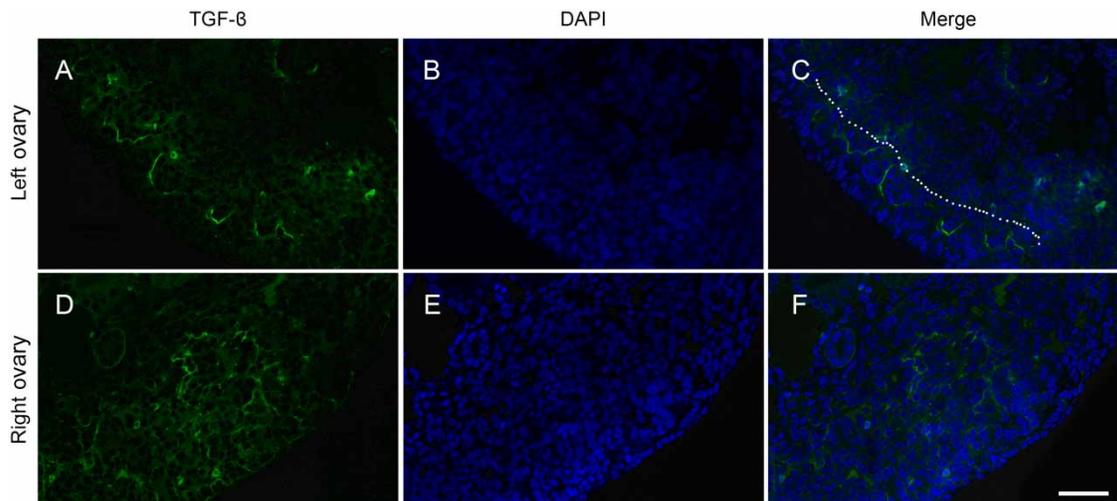


Figure 2. Presence of *TGFβ* protein in E9 (HH35) chicken embryo ovary. Immunofluorescence in ovary cryosections with anti-*TGFβ* antibody (green) and 4',6-diamidino-2-phenylindole nuclear stain DAPI (blue). Dotted line indicates the cortex–medulla boundary. Bar represents 50  $\mu$ m.

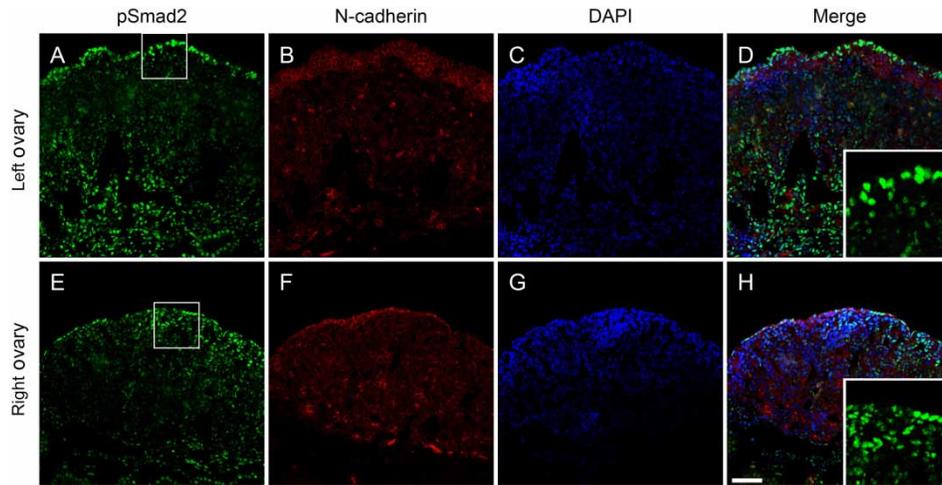


Figure 3. Phosphorylated Smad2 in E9 (HH35) chicken embryo ovary. Immunofluorescence in ovary cryosections, phosphorylated Smad2 (green), N-cadherin (red), and DAPI (blue). Inserts were  $2.5 \times$ . Bar represents  $50 \mu\text{m}$ .

in the cortex (Figure 4D). However, ovaries treated for 72 h with TGFβ1 showed a shift of cortical structures toward the medulla of the gonad (Figure 4B,E). In addition, TGFβ-treated ovaries were smaller than those in controls. Unlike the left ovary, the right ovary did not have a proper cortex as shown by staining for N-cadherin (Figure 4C). In the right ovary, TGFβ treatment did not cause any significant morphological changes compared with the controls (Figure 4C,F), other than a reduction in ovary size.

### Discussion

In this study, the expression of *TGFβ2* mRNA and its protein in the chicken embryo ovary was described by *ISH*. The presence of TGFβ protein was assessed by immunofluorescence, and the state of TGFβ signaling was determined by the detection of phosphorylated Smad2. Moreover, TGFβ treatment in cultured ovaries reduced the size of both the left and the right ovaries. Besides the change in size, this treatment induced a displacement of cortical cells to the medulla.

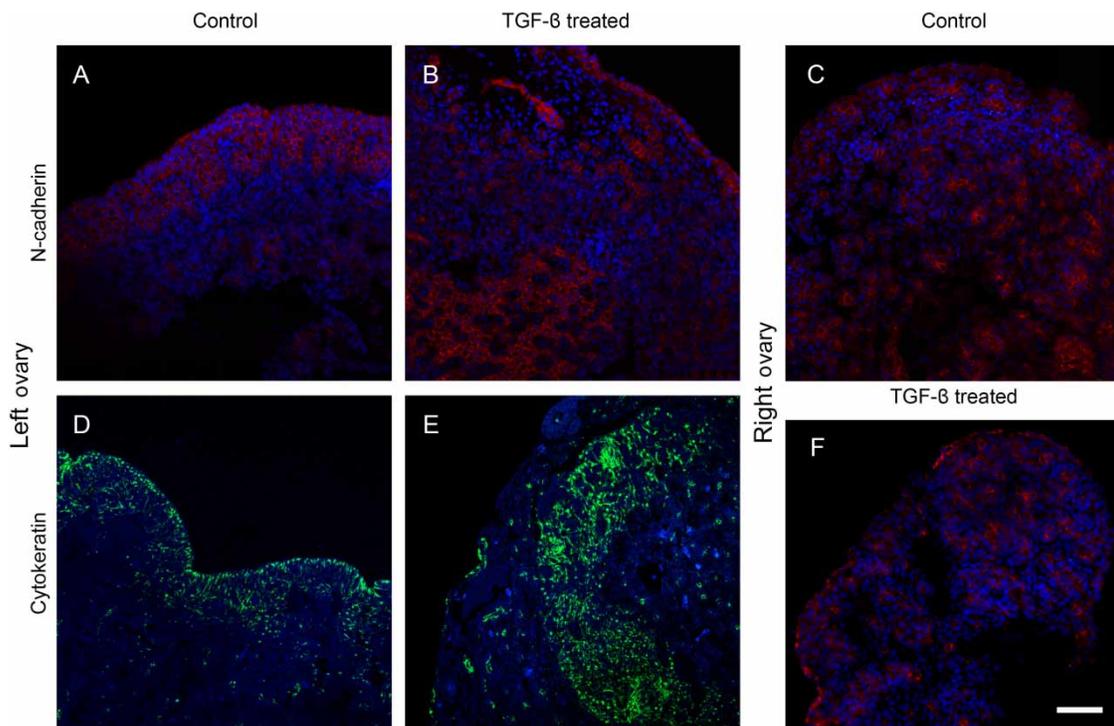


Figure 4. Effect of TGFβ over the ovarian cortex. Immunofluorescence in ovary cryosections, cytokeratin (green), N-cadherin (red), and DAPI (blue). A left ovary cultured for 72 h in a growth factor-free medium (control) displays a thick cortex positive for N-cadherin (A) and cytokeratin (D). Upon TGFβ1 treatment, cortical structures were shifted toward the medulla (B and E). Right ovaries in control medium (C) do not display a well-developed cortex; this morphology was not altered by TGFβ1 treatment (F). Bar represents  $50 \mu\text{m}$ .

*TGFβ2* mRNA was expressed in the differentiated ovaries at E8 (HH34) and E9 (HH35). *TGFβ* expression could not be detected at earlier stages by ISH. These findings are in accordance with previous evidence obtained by RT-PCR (Hattori et al. 2002), which showed *TGFβ2* expression in the embryonic gonads in both males and females after sex differentiation as early as E7 (HH33). The higher sensitivity of RT-PCR than that of ISH could account for an earlier detection of *TGFβ2* mRNA. Given the fact that the testis is morphologically distinguishable from the ovary at E6.5 (HH30) (Carlson and Stahl 1985) and that *TGFβ2* is expressed only after this stage, TGFβ may not be involved in early aspects of gonad differentiation but rather might participate in morphogenesis of the differentiated gonad.

As revealed by immunofluorescence, TGFβ protein is present in both the ovaries. The antibody used in the present work detects precursor and mature TGFβ1 and TGFβ2. Therefore, a distinction between the two isoforms could not be made. In the left ovary, TGFβ is localized in the inner medulla and around the cortical cords. In the right ovary, TGFβ is found in the entire organ. The presence of phosphorylated Smad2 suggests that TGFβ signaling is active in cells at this developmental stage.

In response to exogenous TGFβ1, ovaries show a reduction in the size of the explants and an altered morphology. Cortical structures (cortical cords and germ cells) are shifted from the outermost layer toward the medulla. This change in morphology was evidenced by the immunolocalization of cytokeratins and N-cadherin, two proteins known to be present in the ovarian cortex (Ishimaru et al. 2008; Günther et al. 2011). Previous studies have demonstrated that in organ culture both TGFβ1 and TGFβ2 reduced the number of ovarian somatic cells without affecting the number of germ cells. This effect was due to a reduction in cell proliferation rather than increasing apoptosis, assessed by BrdU incorporation and TUNEL, respectively (Méndez et al. 2006). The inhibitory effect of TGFβ2 over somatic cells in the chicken embryo ovary has also been reported by Fujioka et al. (2004). This effect over somatic cells may account for the reduced size observed in the explants. Therefore, TGFβ might play a role in controlling cell proliferation during embryonic development of the chicken embryo.

The shift of cortical structures induced by TGFβ could be due to changes in the deposition of extracellular matrix or an induced migration, both of which are known effects of TGFβ (Wu and Hill 2009). We hypothesize that TGFβ may participate in the compartmentalization of the ovary during development. The fact that the cultured ovaries respond to exogenous TGFβ suggests that the receptors for TGFβ (TGFβR) are expressed at this developmental stage. In addition, TGFβRII has been shown to be

upregulated in the chicken embryo ovary (Carré et al. 2011).

Law et al. (1995) has demonstrated the expression of *TGFβ2* and *TGFβ1* in the granulosa and theca of adult hens. In particular, thecal cells are the main producers of *TGFβ2* in the ovary. In cultured hen granulosa cells, TGFβ induces the expression of luteinizing hormone receptor (LHR). In addition, when combined with follicle stimulating hormone (FSH), TGFβ promotes P450<sub>scc</sub> and StAR expression plus progesterone production following LHR induction (Johnson et al. 2004). The chicken embryonic ovary is active in the production and secretion of steroid hormones (Tanabe et al. 1986; Villalpando et al. 2000), which are required for the development of the chicken embryo ovary (Andrews et al. 1997). A possible role of TGFβ in regulating hormone secretion during embryonic development cannot be excluded and requires further research.

### Acknowledgments

This project was supported by the Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas (PDCB), UNAM, and Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) (to RE). The authors would like to thank María José Gómora, Verónica Rodríguez-Mata, Alejandro Marmolejo, and Remedios Ramirez for technical assistance; Michael S. White for proof-reading the paper; Steve Stricker (University of New Mexico) for helpful comments; Joel Escalona for help with image editing. The project was funded by CONACyT, Grant 60346 (to CM), PAPIIT-UNAM IN206810, and IACOD-UNAM IB200111.

**Declaration of interest:** The authors report no conflicts of interest. The authors alone are responsible for the content and writing of the paper.

### References

- Andrews JE, Smith CA, Sinclair AH. 1997. Sites of estrogen receptor and aromatase expression in the chicken embryo. *Gen Comp Endocrinol* 108:182–190.
- Carlson N, Stahl A. 1985. Origin of the somatic components in chick embryonic gonads. *Arch Anat Microsc Morphol Exp* 74:52–59.
- Carré GA, Couty I, Hennequet-Antier C, Govoroun MS. 2011. Gene expression profiling reveals new potential players of gonad differentiation in the chicken embryo. *PLoS One* 6:e23959.
- DeFalco T, Capel B. 2009. Gonad morphogenesis in vertebrates: Divergent means to a convergent end. *Annu Rev Cell Dev Biol* 25:457–482.
- Díaz-Hernández V, León del Río A, Zamora M, Merchant-Larios H. 2008. Expression profiles of SRY and SOX9 in rabbit gonads: The classical model of mammalian sex differentiation. *Sex Dev* 2:152–166.
- 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.
- Günther J, Díaz V, Pedernera E, Méndez C. 2011. Gonadotropins regulate cadherin expression in the ovary of the chicken embryo (*Gallus gallus*). *Gen Comp Endocrinol* 174:344–347.
- Halper J, Burt DW, Romanov MN. 2004. On reassessment of the chicken TGFB4 gene as TGFB1. *Growth Factors* 22: 121–122.
- Hamburger V, Hamilton HL. 1951. A series of normal stages in the development of the chick embryo. *J Morphol* 88:49–92.
- 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.
- Ishimaru Y, Komatsu T, Kasahara M, Katoh-Fukui Y, Ogawa H, Toyama Y, Maekawa M, Toshimori K, Chandraratna RA, Morohashi K, Yoshioka H. 2008. Mechanism of asymmetric ovarian development in chick embryos. *Development* 135: 677–685.
- Johnson AL, Bridgham JT, Woods DC. 2004. Cellular mechanisms and modulation of activin A- and transforming growth factor beta-mediated differentiation in cultured hen granulosa cells. *Biol Reprod* 71:1844–1851.
- Law AS, Burt DW, Armstrong DG. 1995. Expression of transforming growth factor-beta mRNA in chicken ovarian follicular tissue. *Gen Comp Endocrinol* 98:227–233.
- Memon MA, Anway MD, Covert TR, Uzumcu M, Skinner MK. 2008. Transforming growth factor beta (TGFbeta1, TGFbeta2 and TGFbeta3) null-mutant phenotypes in embryonic gonadal development. *Mol Cell Endocrinol* 294:70–80.
- 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 Tissue Res* 325:143–149.
- Narbaitz R, Adler R. 1966. Submicroscopical observations on the differentiation of chick gonads. *J Embryol Exp Morphol* 16: 41–47.
- Pan H, Halper J. 2003. Cloning, expression, and characterization of chicken transforming growth factor beta 4. *Biochem Biophys Res Commun* 303:24–30.
- Shi Y, Massagué J. 2003. Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell* 113:685–700.
- 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.
- 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.
- Tanabe Y, Saito N, Nakamura T. 1986. Ontogenetic steroidogenesis by testes, ovary, and adrenals of embryonic and postembryonic chickens (*Gallus domesticus*). *Gen Comp Endocrinol* 63: 456–463.
- Ukeshima A, Fujimoto T. 1991. A fine morphological study of germ cells in asymmetrically developing right and left ovaries of the chick. *Anat Rec* 230:378–386.
- Vempati U, Kondaiah P. 1998. Molecular organization of the gene encoding *Xenopus laevis* transforming growth factor-beta 5. *Biochem Mol Biol Int* 45:997–1003.
- Villalpando I, Sánchez-Bringas G, Sánchez-Vargas I, Pedernera E, Villafán-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.
- Woods D, Johnson A. 2005. Regulation of follicle-stimulating hormone-receptor messenger RNA in hen granulosa cells relative to follicle selection. *Biol Reprod* 72:643–650.
- Wu MY, Hill CS. 2009. Tgf-beta superfamily signaling in embryonic development and homeostasis. *Dev Cell* 16: 329–343.
- Zaccanti F, Vallisneri M, Quaglia A. 1990. Early aspects of sex differentiation in the gonads of chick embryos. *Differentiation* 43:71–80.