



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

“EFECTO DE LA HORMONA LUTEINIZANTE SOBRE LAS CÉLULAS GERMINALES DEL OVARIO DE POLLO RECIÉN NACIDO”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

B I O L O G A

P R E S E N T A:

HURTADO ANDRADE DELIA

DIRECTORA DE TESIS: DRA. MARIA GENOVEVA GONZALEZ MORAN

MEXICO, D. F.



FACULTAD DE CIENCIAS SECCION ESCOLAR

206016



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MEXICO

MAT. MARGARITA ELVIRA CHÁVEZ CANO
Jefa de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo de Tesis: Efecto de la Hormona Luteinizante sobre las células germinales del ovario de pollo recién nacido.

realizado por : Delia Hurtado Andrade

con número de cuenta 7844050-8 , pasante de la carrera de Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis

Propietario Dra. María Genoveva González Morán *Genoveva*

Propietario Dra. Marcela Esperanza Aguilar Morales *Marcela*

Propietario M. en C. María Teresa Benitez Rodríguez *María Teresa Benitez Rodríguez*

Suplente Biol. Virginia Esmeralda Urbietta Ubilla *Virginia Esmeralda Urbietta Ubilla*

Suplente Biol. Teresa Sosa Rodríguez *Teresa Sosa*

FACULTAD DE CIENCIAS
U.N.A.M.

Consejo Departamental de Biología

Edna María Suárez Díaz

DRA. EDNA MARIA SUAREZ DIAZ,



DEPARTAMENTO
DE BIOLOGIA

A mis padres, hermanos y primos
Que con su ayuda logré concluir esta etapa de mi vida

A mi directora de tesis
Que me apoyó amablemente y con paciencia en todo mi trabajo

Y al P. Martín
Que con su apoyo y estímulo veo culminado un gran esfuerzo

ÍNDICE

RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	2
1. El Ovario de las Aves.....	2
1.1. Localización anatómica	2
1.2. Desarrollo Embrionario.....	3
1.2.1. Ovario Maduro	4
1.3. Fisiología y control hormonal reproductivo.....	6
2. Ovogénesis	12
2.1. La ovogénesis: formación y desarrollo del huevo.....	14
2.2. Comienzo de la primera división meiótica	16
2.3. Segunda división meiótica.....	21
2.4. Morfología de las células germinales primordiales, ovogonias y ovocitos.....	24
2.5. Ovocitos.....	25
2.5.1. Desarrollo Folicular	28
2.5.2. Estructura Folicular.....	30
3. Hormona Luteinizante.....	34
3.1. Estructura	34
3.2. Acción biológica.....	37
ANTECEDENTES.....	39
OBJETIVO	45
MATERIALES Y MÉTODOS	46

RESULTADOS	49
DISCUSIÓN.....	56
CONCLUSIÓN.....	59
BIBLIOGRAFIA.....	60

RESUMEN

Existen pocos reportes relacionados con las funciones de la hormona luteinizante en el ovario de pollo embrionario, en contraste con los que se refieren al ovario adulto. Sin embargo, existen trabajos relacionados con las funciones de la hormona foliculo estimulante y algunos otros sobre la morfología de las células germinales durante el desarrollo embrionario del pollo que apoyan la línea de investigación de este trabajo.

En el presente trabajo se estudió el efecto de la hormona luteinizante sobre la ovogénesis de las células germinales del ovario izquierdo de pollos recién nacidos, tratados en la última semana de desarrollo embrionario.

Se utilizaron huevos fértiles de pollo, de la raza White Leghorn, y se incubaron a 38°C, con humedad y ventilación constantes. Se aplicaron tres dosis de LH, en los días 13, 15 y 17 del desarrollo embrionario. Dentro de las 24 horas después de la eclosión, los animales se sacrificaron por decapitación, se disecó el ovario izquierdo, disgregándolo y se procedió a realizar preparaciones por squash, para cuantificar el número de células germinales normales y en degeneración. Dentro de las células germinales normales se cuantificaron el número de ovogonias y ovocitos en las distintas fases de la profase meiótica.

Los resultados demostraron un mayor porcentaje de ovocitos en los ovarios tratados con LH que en los controles, siendo menor el número de ovogonias y el índice mitótico de éstas en los ovarios tratados en contraste con los controles, donde el número es mayor. La degeneración de células germinales disminuyó en los ovarios tratados con LH. Al aplicar la prueba de "T", de Student, a los resultados obtenidos, se encontraron diferencias significativas en las distintas fases de la meiosis, observándose que el tratamiento con LH favorece que las células germinales entren en la profase meiótica.

Por lo anterior podemos concluir que la Hormona Luteinizante crea un microambiente adecuado para disparar la profase meiótica.

INTRODUCCIÓN

1. EL OVARIO DE LAS AVES

1.1. Localización anatómica.

En la gallina, el ovario está situado en la parte superior izquierda de la cavidad abdominal, debajo de la arteria aorta y de la vena cava posterior. Se apoya sobre el riñón y pulmón izquierdos, y por la parte inferior, sobre el saco aéreo abdominal izquierdo (Sturkie.1965; Gilbert.1971; Lofts y Murton.1973; Ede.1975; Alamargot.1982). La glándula suprarrenal izquierda está estrechamente enlazada al ovario y todo el conjunto descrito se halla suspendido de la pared dorsal del peritoneo gracias a un pliegue del mismo, que contiene fibras musculares lisas, vasos sanguíneos y nervios (Sturkie.1965; Gilbert.1971). Durante el desarrollo embrionario se forman un ovario y un oviducto derechos, pero usualmente degeneran y sólo persisten unos rudimentos cuando nace el polluelo (Sturkie.1965) (Fig. 1).

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

1.2. Desarrollo Embrionario

A partir del tercer día de incubación los acontecimientos embrionarios se hacen cada vez más numerosos, observándose los cambios morfológicos en el embrión (Sauveur.1992), hasta el tercer día de la vida embrionaria (desarrollo de las crestas genitales), las células germinales primordiales y las células mesenquimatosas se incorporan al epitelio germinal (Cole y Cupps, 1959; Gilbert, 1971; Sauveur, 1992) acumulándose de forma asimétrica de derecha a izquierda del embrión. A medida que el embrión se va desarrollando, el incremento de dichas células es de 2 a 5 veces más rápido en el ovario izquierdo que en el derecho (Huettner, 1958; Gilbert, 1969; Jhones 1978; Merchant, 1991; Sauveur, 1992). Normalmente en el momento de la eclosión el ovario derecho no es más que un resto de tejido medular ubicado encima de la vena cava caudal (Sauveur.1992).

En el cuarto día de incubación, la gónada primordial se reconoce claramente en la superficie media de los órganos de Wolffian. Las células germinales están presentes en el mesenterio dorsal, en el ángulo celómico y en la cresta genital. El gran tamaño de las células germinales las distingue de las pequeñas células somáticas; sin embargo, el núcleo de las células germinales es grande, unos u otros son redondos y ovalados,

La proliferación medular y cortical aparecen en el quinto y sexto, hasta el séptimo día, respectivamente. En el ovario izquierdo las células germinales son más numerosas en la corteza que en el médula. Unas pocas células germinales se dividen mitóticamente entre el cuarto y octavo día de incubación. La ovogonia es más pequeña que la célula germinal primordial, y la cual se encuentra usualmente en interfase conteniendo dos grandes masas de cromatina dentro de su núcleo. La mitosis ovogonial es distinta de aquella de las células somáticas por su gran tamaño. Las células germinales en la corteza del ovario izquierdo están arregladas en pequeños grupos o "nidos", cada uno de los cuales está rodeado por una capa de tejido conectivo, la primera túnica albugínea (Hughes, 1963).

En el 14avo día de incubación se forma la segunda túnica albugínea, formándose dos zonas bien definidas que son la corteza y la médula del ovario. Entonces se forma el ovario inmaduro que es amarillento, plano y de forma irregular. La médula está formada de cordones sexuales primarios, derivados del epitelio germinal, tejido conjuntivo, nervios, músculo liso y principalmente vasos sanguíneos. La corteza contiene ovogonias y ovocitos (Gilbert.1971; Crawford.1990). En la médula ovárica se observa un tipo de células que probablemente están relacionadas con el metabolismo de las hormonas esteroideas, llamadas células intersticiales. Antes del día 13 de desarrollo, el control del desarrollo gonadal es extrahipofisial (Fugo.1940; Voguel.1957). Realizando una hipofisectomía, se observa que la inhibición gonadal sólo ocurre el día 13 de desarrollo en adelante y las células gonadotrópicas no aparecen en la hipófisis, sino hasta el día 14 del desarrollo, con estos experimentos se demuestra que antes del día 13 de desarrollo el eje hipotálamo - hipófisis - gónada, aún no se forma sugiriéndose que durante este tiempo la regulación de las hormonas esteroideas producidas por el ovario, es autónoma (Gilbert.1971; Woods et al,1977).

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

1.2.1. Ovario maduro.

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

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

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

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

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

1.3. Fisiología y control hormonal reproductivo.

El ovario es el lugar donde, bajo el control de la hipófisis, tiene lugar la síntesis de las hormonas esteroides y la ovogénesis. La hipófisis anterior es absolutamente indispensable para el desarrollo y el mantenimiento de la actividad ovárica.

Las funciones reproductoras están bajo el control de la regulación neuroendócrino, es decir, están controladas por la correlación fisiológica de los sistemas nervioso y endócrino. Este control está ejercido por sistemas reguladores internos, genéticamente fijados, que bajo el influjo, casi siempre, de circunstancias temporales correlacionadas con factores externos, son responsables del transcurso individual y de especie de los fenómenos de la reproducción. La función sexual está determinada en gran parte por la actividad de la hormona gonadotrópica de la hipófisis. La hipófisis está sometida a control por medio de hormonas liberadoras del hipotálamo, el cual a su vez, depende del influjo de determinadas regiones del encéfalo que reciben informaciones sensoriales del organismo y del ambiente, los procesan y los transmiten (Smidt. y Ellendorff.1972; Ruíz.1988).

El hipotálamo es la zona más ventral del diencéfalo y queda situado por encima de la hipófisis. El hipotálamo está considerado como un órgano final de integración de las informaciones del encéfalo y sus misiones son múltiples. Constituye un centro regulador del hambre, sed y temperatura. Produce neurosecreciones y, con la ayuda de 'hormonas liberadoras' o 'inhibidoras' controla la secreción de las hormonas adenohipofisarias, entre las que se encuentran las hormonas gonadotrópicas (Smidt. y Ellendorff.1972; Cunningham.1992).

La hipófisis es un órgano endócrino principal, ya que elabora un número de hormonas que estimulan a otras glándulas para que segreguen hormonas. La hipófisis

está situada en la silla turca, una concavidad del hueso esfenoides y envuelta por una extensión de la duramadre (Austin y Short.1982; McDonald y Pineda. 1991), compacta y bien vascularizada que forma una cubierta hacia la parte dorsal, atravesada solamente por el pedúnculo hipofisario y los vasos sanguíneos, inmediatamente por detrás del quiasma óptico (Smidt y Ellendorff. 1972; Cunningham. 1992).

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

La neurohipófisis está dividida en lóbulo neural distal, tallo neural y eminencia media, estas dos últimas regiones forman el infundíbulo. La eminencia media contiene un sistema de vasos portales por donde la sangre llega a la hipófisis para transportar hormonas y nutrientes (Thommes y Russo. 1959; Pearson. 1972). En la adenohipófisis, los vasos sanguíneos contactan capilares esenciales para el transporte de las hormonas secretadas, como la hormona folículo estimulante (FSH), la luteinizante (LH), la adenocorticotropina (ACTH), la tirotrópina (TSH) y otras, siendo las dos primeras gonadotropinas, las que actúan sobre las gónadas (Sturkie. 1965; Austin y Short. 1982).

El hipotálamo y la hipófisis forman parte del eje hipotálamo - hipófisis - gónada, los cuales en estadios tempranos de desarrollo embrionario, son autónomas en crecimiento, diferenciación y actividad (Willer. 1955; Woods. 1987). Se sabe que la hipófisis es autónoma en estado inicial de desarrollo al sintetizar hormonas gonadotrópicas antes de su comunicación vascular con el hipotálamo. Esto se demostró por medio de la técnica de

inmunohistoquímica en la hipófisis, alrededor del día 4 de incubación, donde se encontró tanto LH (Gasc y Sar, 1981; Woods et al. 1985) como FSH (Woods. 1987; Woods. 1985) antes de la formación del plexo porta vascular entre el hipotálamo y la hipófisis, que inicia el día 12 de desarrollo (Thommes y Russo. 1959; Daskocil. 1970; Daikoku et al. 1974; Stritesky y Rychter. 1977; Woods. 1987; Calderon, 1998).

Fugo (1949) y Vogel (1956) realizaron experimentos con embriones de pollo hipofisectomizados y observaron que el eje hipotálamo-hipófisis-gónada, es funcional desde el día 13 de desarrollo, observando en los embriones hipofisectomizados un desarrollo normal de las gónadas hasta el día 13, pero después las gónadas no incrementan su peso, talla, grado de diferenciación histológica, ni contenido de colesterol. Una vez establecido el eje hipotálamo - hipófisis - gónada (día 13 - 13.5 en machos y día 14 en hembras), se observa que se producen hormonas liberadoras de gonadotropinas en las neuronas del hipotálamo, sólo si existen estímulos externos. Las hormonas liberadoras de gonadotropinas entran en circulación portahipofisial, regulando la síntesis y la liberación de las gonadotropinas de la hipófisis, la LH y la FSH, las cuales estimulan el crecimiento gonadal y la esteroidogénesis (Woods. 1987).

Los cambios en el ovario se producen por la secreción de hormonas gonadotrópicas, provocando cambios en las células efectoras a éstas hormonas. Usando métodos de radioinmunoensayo, Teng y Teng (1979), han detectado un incremento en la producción de esteroides por las células intersticiales, del ovario de pollo embrionario, en presencia de hormona gonadotropina coriónica, en el medio de cultivo. Sin embargo, se sabe que la localización de células efectoras a LH cambian durante el desarrollo del embrión. En el período de 5.5 a 13 días del desarrollo, se observa que las células que responden a esta hormona, son las células intersticiales, en el día 13.5 los niveles de LH en el plasma son elevados, realizando una reacción inicial de las células intersticiales corticales y de los cordones de células corticales, provocando la síntesis inicial de estrona y estradiol por estas células (Woods et al. 1989).

Los ovarios producen dos clases de hormonas: los estrógenos y los progestágenos, que se clasifican como esteroides y tienen como precursor común al colesterol.

Los estrógenos representan un grupo de esteroides con actividad fisiológica similar. El estrógeno de mayor importancia, cuantitativa y fisiológicamente, es el estradiol. Otros importantes son el estriol y la estrona. Las principales acciones de los estrógenos son: la manifestación del comportamiento de la cópula durante el estro, los cambios cíclicos en el sistema femenino, el desarrollo de conductos en la glándula mamaria, el desarrollo de características sexuales secundarias. A los estrógenos se les ha llamado "hormonas sexuales femeninas". Los estrógenos son sintetizados por las células intersticiales de las tecas foliculares y la progesterona proviene de las células de la granulosa del folículo preovulatorio.

Tanto los estrógenos como los progestágenos, ayudan a regular la liberación de gonadotropinas, actuando tanto a nivel del hipotálamo como de la hipófisis anterior. Niveles elevados de progesterona o una combinación de progesterona y estrógenos inhiben la liberación de FSH y LH de la hipófisis anterior por retroalimentación negativa. Es necesario una acción recíproca entre las gonadotropinas y las hormonas esteroides para el mantenimiento del equilibrio hormonal, esencial para la reproducción normal (Bearden y Fucuy . 1981).

La FSH aumenta sus propios sitios receptores en el folículo ovárico y esta acción es acelerada a medida que se aumentan los niveles de estrógenos. Previa acción del estradiol, la FSH también incrementa los receptores de LH en el folículo. El estradiol incrementa sus propios receptores. La LH causa una reducción de receptores de FSH, estradiol y LH, pero incrementa los receptores de prolactina. Durante la formación del cuerpo luteo, la prolactina incrementa los receptores de LH .

La mayor parte de la regulación de los procesos reproductores, se lleva a cabo por el eje hipotálamo - hipófisis - gónada. Hormonas liberadoras del hipotálamo controlan la función de la hipófisis anterior. Hormonas gonadotrópicas de la hipófisis anterior, controlan la función de las gónadas, tanto de producción de gametos como de hormonas. A su vez, las hormonas esteroideas y proteínicas gonadales regulan la liberación de gonadotropinas a través de un mecanismo de retroalimentación que incluye al hipotálamo (Bearden y Fuquay. 1982).

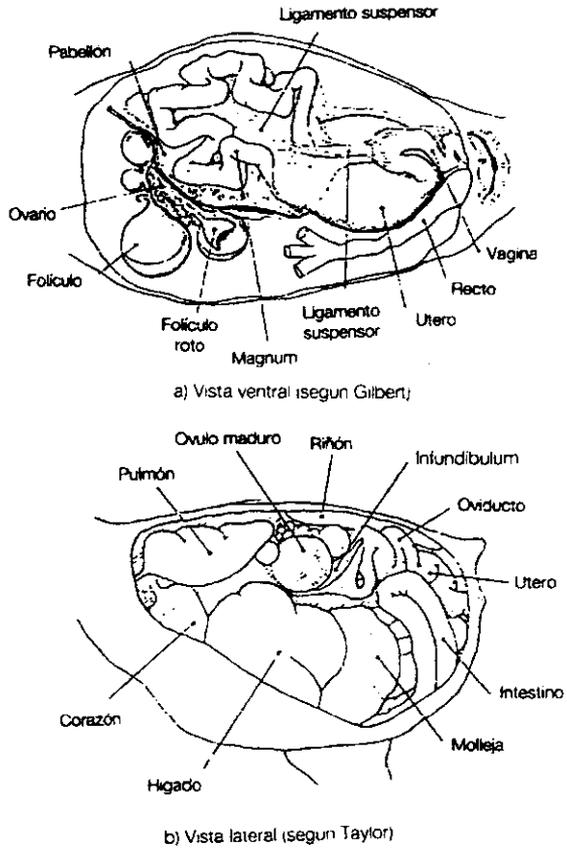


Figura 1

Ubicación del aparato reproductor de la hembra (pollo) en la cavidad abdominal
 Tomado de Sauveur, B. 1992.Reproducción de las Aves

2. OVOGÉNESIS

La ovogénesis se define como la formación, desarrollo y maduración del gameto femenino. Este proceso empieza en la vida embrionaria y continúa hasta el momento de la ovulación (Austin y Short, 1982).

Refiriéndose a la morfología del ovario, estos procesos implican: multiplicación de las ovogonias, formación de ovocitos y folículos primarios, foliculogénesis, crecimiento y maduración del ovocito y ovulación. El conjunto de todas estas etapas, constituyen la ovogénesis; el término "período ovogenético" se aplica a la formación del ovocito en fase de diplóteno. El período siguiente es de particular importancia para el folículo y se llama foliculogénesis (Cole y Copps, 1984).

La primera etapa de la gametogénesis, implica que las células germinales primordiales llegan al interior de la cresta genital a medida que se forma la gónada (Gilbert, 1988)

Las células germinales primordiales se localizan en el endodermo, durante los cambios morfogénéticos del embrión (gastrulación) y de ahí migran a las gónadas que se encuentran en desarrollo. Si las células germinales primordiales no llegan a las crestas gonadales, o si son destruidas por extirpación quirúrgica o por radiaciones ionizantes en el curso de su migración, los ovarios adultos serán estériles, ya que no tendrán células sexuales.

Se propone que las crestas genitales de la pared dorsal del embrión, producen una sustancia quimiotáctica, que atrae a las células germinales primordiales. Puede ser que las crestas genitales produzcan diferentes cantidades de sustancias quimiotácticas, ya que en las aves llegan más células germinales primordiales a la gónada izquierda que

a la derecha. En caso de que exista una sustancia quimiotáctica no debe ser específica para una sola especie, ya que las gónadas en desarrollo del pollo, atraen tanto a las células germinales primordiales de pollo como las de ratón (Austin y Short, 1982).

En las aves las células germinales primordiales, se derivan de las células del epiblasto que migran a una zona en forma de media luna de la capa endodérmica del borde anterior a la zona pelúcida. Esta región se denomina la media luna germinal, y las células germinales primordiales se multiplican en esta región. La ruta primaria para la migración de las células germinales en las aves es a través de la sangre. Las células germinales primordiales entran en los vasos sanguíneos por diapédesis, un tipo de movimiento que capacita a las células para deslizarse hacia dentro o hacia fuera de pequeños vasos sanguíneos. Las células germinales primordiales llegan al embrión siendo transportadas por la sangre (Pasteels, 1953; Dubois, 1968).

Cada una de las futuras gónadas, consta de una capa de epitelio celómico delgado que recubre un "nudo" de tejido mesenquimatoso (mesodermo embrionario). Hacia el final de la migración las células germinales primordiales se mueven de los riñones que se encuentran en desarrollo (mesonefros) hacia las crestas gonadales y toman una colocación, ya sea cortical o medular. En términos morfológicos, las células germinales primordiales permanecen en la corteza de la gónada cuando esta va a ser un ovario, mientras que el paso de las células a la médula (mesénquima) se asocia con el desarrollo de un testículo.

La gónada indiferenciada contiene todos los componentes celulares necesarios para su diferenciación en testículo o en ovario, es decir: 1. Tejido medular que forma los cordones medulares del testículo, 2. Tejido cortical, formado a partir del epitelio celómico, que puede formar los cordones sexuales secundarios, o sea, el sustrato del ovario, 3. Mesénquima, que forma el resto de la gónadas en los dos sexos, incluyendo la teca y el tejido intersticial, 4. Células germinales primordiales, que tienen su origen fuera de las

gónadas y que forman las ovogonias o las espermatogonias, de acuerdo con su constitución genética.

Las células germinales primordiales ováricas se transforman rápidamente en ovogonias. El número de ovogonias aumenta mucho en un período relativamente corto. Tras un período de proliferación mitótica, las ovogonias se transforman en ovocitos en el momento en el que entran en la profase de la primera división meiótica. En la mayoría de las especies, el número de células germinales sólo puede disminuir con el paso del tiempo, que ocurre por el proceso de atresia y de ovulación (Austin y Short, 1982).

2.1. La ovogénesis: formación y desarrollo del huevo.

La diferenciación del óvulo se presenta en dos estadios parecidos al desarrollo de los gametos masculinos: estadio de mitosis y estadio de meiosis. Durante la mitosis o multiplicación, la ovogonia prolifera a partir de las células germinales primordiales que han migrado a los cordones terminales desde el saco de la yema del endodermo. La ovogonia se divide dando origen a varias generaciones de células idénticas. En algunas especies, la diferenciación y multiplicación de la ovogonia aparece junto con el desarrollo del feto y aún antes de que se lleve a cabo el parto (hombre, rumiantes, roedores, cerdo). En otros (carnívoros y lagomorfos), la diferenciación se prolonga hasta el periodo postnatal inmediato. La ovogonia entra a la profase de la primera división meiótica y se convierte en ovocito primario antes o poco después del nacimiento, en la mayor parte de las especies. Los ovocitos primarios se detienen en la fase de diploteno de la profase meiótica hasta la madurez sexual. El incremento posterior de los ovocitos se sincroniza con el desarrollo y maduración de los folículos. La primera división meiótica (división reduccional), con la consecuente conversión del ovocito primario en ovocito secundario, aparece justo antes de la ovulación en la mayor parte de las especies y se acompaña de la formación y expulsión del primer cuerpo polar (Banks., 1986). Si el ovocito secundario es fecundado por un espermatozoide, se convierte en un óvulo fecundado diploide. (Fig. 2).

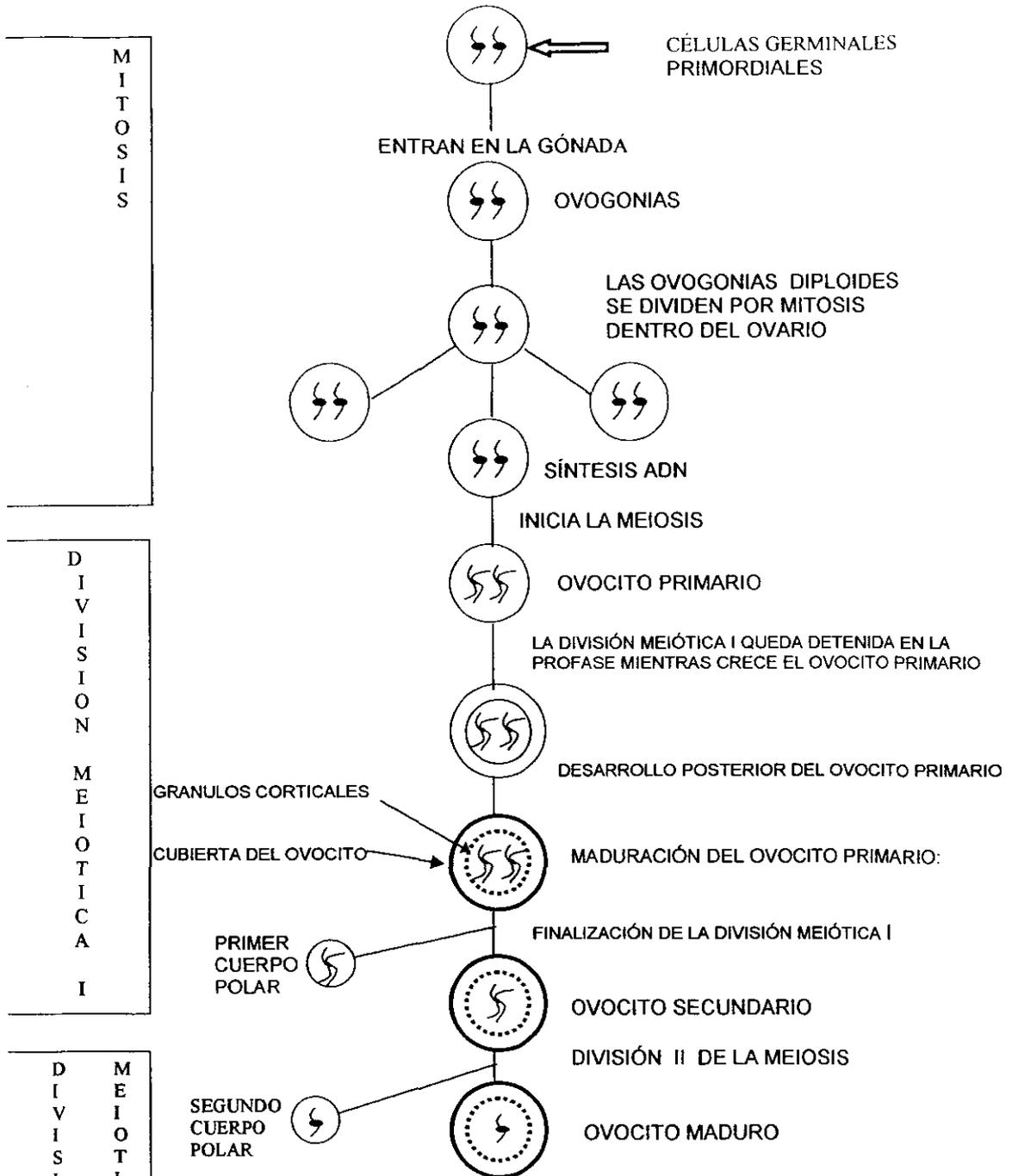


Figura 2

Se describen los distintos estadios de la Ovogénesis

2.2 Comienzo de la primera división meiótica

Durante la interfase que precede a la meiosis, el núcleo de la célula pasa por una secuencia típica de fases G_1 , S y G_2 . Una vez que se completa la interfase, el núcleo meiótico pasa por una secuencia de etapas que constituyen la primera división meiótica o meiosis I. Los procesos continuos de profase, metafase, anafase y telofase difieren en ciertas características de las etapas análogas de la mitosis. La profase de la meiosis I es un intervalo más complejo, prolongado y genéticamente significativo. La profase I se ha dividido en las subetapas siguientes:

1. Estadio de Leptóteno. Los cromosomas aparecen en forma de largos filamentos muy finos, ondulados y muy separados unos de otros
2. Estadio de Zigoteno. Los cromosomas efectúan un alineamiento paralelo, lo cual quiere decir que se aparean o se unen de acuerdo con su longitud, lado a lado por pares de homólogos de manera tan precisa que sus cromómeros se corresponden perfectamente unos con otros. De este modo se observan cuatro pares de cromosomas, lo que siempre resulta ser equivalente a "2n" cromosomas. El nucleolo desaparece.
3. Estadio de Paquíteno. Los cromosomas reducen su longitud y se engruesan. Cada uno de ellos sufre una fisuración longitudinal en un plano perpendicular al del apareamiento, pero al ocurrir esto, el centromero no se segmenta. Cada cromosoma se encuentra entonces constituido por dos filamentos unidos que reciben el nombre de cromátides, hermanas.
4. Estadio de Diplóteno. En cada pareja de cromosomas estos se separan uno de otro en parte de su longitud, pero mantienen contacto en uno o varios puntos de donde se produce la aparición de formas en "x", en 8, en rombos, en anillos, etc. Los cruzamientos que corresponden a lugares en donde los cromosomas pueden efectivamente entrecruzarse, reciben el nombre de quiasmas.

Hasta la fase de diplóteno, un homólogo de cada bivalente proviene de la madre, y el otro del padre; sin embargo, durante la fase de diplóteno hay intercambio de genes entre los dos cromosomas mediante el mecanismo siguiente: parte de una cromátide que pertenece a un cromosoma del complejo bivalente, queda en sentido transversal de la cromátide del otro cromosoma de dicho complejo, de manera que se constituye un quiasma, es decir, una estructura en forma de "X". Al parecer, el quiasma predispone a la ruptura de ambas cromátides en el sitio en que se cruzan. Los extremos separados se vuelven a unir, pero al tener lugar tal fenómeno, cada cromátida rota se recombina con la equivalente del otro homólogo del complejo bivalente, en vez de reconstituir la disposición original (parental). Este proceso de entrecruzamiento o "*crossing over*" entre los homólogos, culmina en el intercambio mutuo de partes de sus cromátidas y, con ello, intercambio de algunos de los genes derivados de la madre y los correspondientes del padre, con la cual se recombinan y pasan a las células germinativas. Por tal motivo, desde la etapa de diplóteno en adelante, los dos cromosomas del complejo bivalente poseen genes que provienen de los dos progenitores (Ham, 1988).

Los bivalentes que contienen cuatro cromátidas (Albert, 1996), se mueven de un lugar a otro durante la prometáfase, pero pronto se alinean sobre el huso indicando el inicio de la metafase I. Los extremos de los brazos de los cromosomas están ubicados en el ecuador, pero los centrómeros de cada bivalente están tan separados como es posible. Los centrómeros de las cromátidas hermanas de un bivalente permanecen estrechamente asociados en el mismo lado del huso y, por tanto, frente al mismo polo. El otro bivalente está orientado de modo que sus centrómeros señalan hacia el polo opuesto del huso. Durante la anafase I, los cromosomas homólogos se desplazan hacia los polos opuestos de la célula, reduciendo el número de cromosomas a la mitad del número diploide. Con base en el número cromosómico, la haploidía se obtiene durante la anafase I. Sin embargo, contienen una cantidad doble de ADN (Avers, 1991), porque cuando la célula meiótica se divide, cada célula hija recibe dos copias de uno de los dos homólogos (Albert, 1996). La reducción a la mitad del número de cromosomas y del contenido de ADN se lleva a cabo hasta que se completa la segunda división meiótica. En algunas especies los núcleos en anafase pueden empezar la segunda división casi

inmediatamente mientras que otras especies pasan por una etapa de reorganización nuclear en la telofase I, antes de empezar la meiosis II. Si ocurre la telofase, los cromosomas se desdoblán y alargan, reaparecen los nucleolos y las membranas nucleares y los núcleos hijos se hacen evidentes. Los núcleos reorganizados pueden entrar en interfase (de duración variable) y luego experimentar la profase y etapas posteriores de la meiosis II. En algunos casos los núcleos en telofase pueden continuar directamente a la metafase II. Además de la variabilidad de eventos entre la telofase I y la metafase II, la citocinesis (división del citoplasma) puede ocurrir en seguida de la meiosis I o aplazarse hasta el final de la meiosis II (Avers, 1991)(Fig. 3).

La profase de la meiosis I en aves termina en la etapa de diplóteno que es muy larga y los ovocitos de aves no pasan al estado de diacinesis como en muchos mamíferos. En todo el período de reposo o diplóteno que se observa sólo en la ovogénesis, los dos cromosomas en cada complejo bivalente adquieren una posición parcialmente extendida, y de ello resulta que el núcleo que aún está en profase, tiene un aspecto microscópico similar al de la interfase (Ham, 1988).

Bajo la influencia de las gonadotropinas hipofisarias, la meiosis se reanuda en forma individual en los ovocitos primarios, que están a punto de formar un ovocito secundario, como preparación para la ovulación. Sin embargo, se advierte una diferencia esencial entre la meiosis I y la mitosis, Los centrómeros de las dos cromátides que pertenecen a cada homólogo permanecen asociados. Por lo expuesto los homólogos se segregan y pasan a diferentes células hijas, permaneciendo intactos en forma de un par de cromátides que aún están unidos entre sí por medio de centrómeros.

El resultado neto es la primera división de maduración, en la que cada célula hija del ovocito primario recibe un cromosoma intacto que representa un par de cromátides. De este modo el ovocito primario es diploide, pero el secundario es haploide. Es importante destacar que los términos haploide y diploide describen el número total de cromosomas en la célula, sean dobles o sencillos. Los cromosomas de origen paterno o

materno, tienen igual posibilidad de segregarse y pasar a una u otra células hijas, Otra característica poco común de la primera división de maduración, es que las dos células resultantes son desiguales. En una el ovocito secundario es grande, y en otra, el primer cuerpo polar es pequeño (Ham, 1988).

PROFASE I

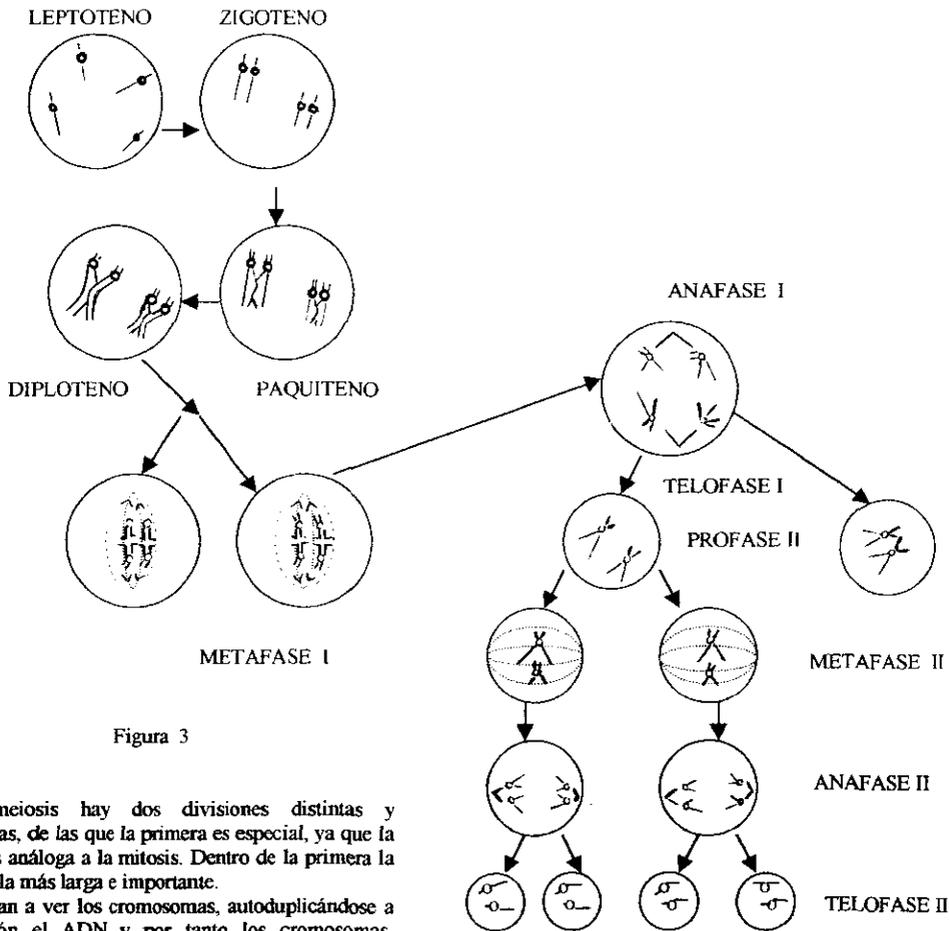


Figura 3

En la meiosis hay dos divisiones distintas y consecutivas, de las que la primera es especial, ya que la segunda es análoga a la mitosis. Dentro de la primera la profase es la más larga e importante.

Se empiezan a ver los cromosomas, autoduplicándose a continuación el ADN y por tanto los cromosomas, siguen entrelazados; se forma el huso acromático y desaparecen la membrana nuclear y los nucleolos.

Los cromosomas entrelazados dos a dos se colocan en la zona central del huso.

Se separan los cromosomas que estaban entrelazados, dirigiéndose la mitad hacia un polo y la otra mitad al otro polo; el centriolo se divide en dos; al final habrá dos cromosomas en cada polo y dos centriolos, estos dos cromosomas habrán intercambiado material genético entre sí.

Aparecen la membrana nuclear; los nucleolos y desaparece el huso. Los cromosomas siguen aparentes ya que a continuación viene la segunda división, que es análoga a una mitosis.

Al terminar esta segunda división se habrán formado cuatro células; con dos cromosomas cada uno, es decir, con la mitad de los de la célula de partida (Castelló et al, 1989).

PRODUCTO DE LA DIVISIÓN MEIOTICA

Existen, como mínimo, dos diferencias fundamentales entre los procesos de separación de los cromosomas en la división meiótica I y en la mitosis. (1) A lo largo de la mitosis (y en la división meiótica II, la cual se parece a una mitosis), las cromátidas hermanas se mantienen unidas únicamente en el centrómero: los cinetocoros de cada cromátida hermana presentan las fibras cinetocóricas dirigidas hacia direcciones opuestas, de forma que durante la anafase las cromátidas son estiradas hacia células hijas diferentes. En la metafase I de la meiosis, por el contrario, los cinetocoros de ambas cromátidas hermanas permanecen fusionados de manera que sus fibras presentan la misma orientación y los brazos de las cromátidas hermanas se hallan estrechamente unidos; además, los cromosomas homólogos paterno y materno se mantienen unidos entre sí a través del quiasma. (2) Durante la mitosis (y la división meiótica II) el desplazamiento de las cromátidas hacia los polos está mediado por un mecanismo que separa entre sí los dos cinetocoros hermanos (iniciándose la anafase), lo cual permite a las cromátidas hermanas segregarse en células hijas diferentes. En la anafase I de la meiosis, sin embargo, este desplazamiento hacia los polos está iniciado por la ruptura de las fuerzas, poco conocidas, que han permitido mantenerse unidos entre sí los brazos de las cromátidas hermanas, así como por la disolución de los quiasmas que unían los cromosomas homólogos paterno y materno; consecuentemente, las cromátidas hermanas permanecen emparejadas pero los homólogos paterno y materno se segregan en células hijas diferentes (Albert, 1996).

2.3. Segunda división meiótica

Después de finalizada la división meiótica I, las membranas nucleares se forman de nuevo alrededor de los dos núcleos hijos, iniciándose una breve interfase. Durante este período, los cromosomas pueden descondensarse un poco, pero normalmente se condensan de nuevo y empiezan la profase II. Durante este intervalo no se produce síntesis de ADN, por lo que en algunos organismos parece que los cromosomas pasan casi directamente de una fase de división a la siguiente. En todos los organismos la

profase II es breve: la envoltura nuclear se rompe cuando se forma el nuevo huso, tras lo cual se suceden rápidamente la metafase II, la anafase II y la telofase II (Albert, 1996). La metafase II, donde los cromosomas del ovocito secundario haploide se alinean en el plano ecuatorial. En la anafase II los cromosomas se segmentan a nivel de sus centrómeros, las dos cromátides que los constituyen se separan de sus cinetocoros durante la anafase (Ham, 1988). Así, y a diferencia de la división I, la división II se parece mucho a una mitosis. La única diferencia importante estriba en que en ella existen una sola copia de cada cromosoma, y no dos. Una vez formadas las envolturas nucleares se forman los gametos maduros (ovocitos o espermatozoides) durante la Telofase II, finalizando la meiosis (Albert, 1996)(Fig. 3).

Ahora, se puede producir la formación de los verdaderos núcleos de los gametos de manera bastante sencilla, a través de una segunda división celular, la división II de la meiosis sin que se produzca otra replicación del ADN. Así pues, la meiosis consta de dos divisiones celulares sucesivas que se producen tras una sola fase de replicación de ADN, por lo que a partir de cada célula que sufre la meiosis, se producen cuatro células haploides (Albert, 1996).(Fig. 3).

Pero la división de reducción del material nuclear para formar ovocitos secundarios no tienen lugar sino hasta 1 ó 2 horas antes de la ovulación. El que es objeto de ovulación es el ovocito secundario y, si después de aquella no es fecundada, el huevo es puesto como un ovocito secundario.

En la gallina madura sexualmente la parte del huevo que se conoce como yema, es una sola célula, la célula sexual femenina o el óvulo. Su enorme tamaño, en comparación con el de otras células, se debe al material alimenticio que contiene. Los demás componentes del huevo (la clara, la membrana del cascarón y el propio cascarón) son secreciones no celulares que dotan al óvulo de capas para protegerlo en su recorrido descendente por el oviducto de la gallina.

El óvulo temprano mide unas 50 μm de diámetro y crece de manera paulatina hasta alcanzar los 6 mm. Después se acelera enormemente el índice de crecimiento, aumentando el diámetro en cerca de 2.5 mm diarios, de modo que cuando ocurre la ovulación, el óvulo puede llegar a tener un diámetro de 35 mm. Este cuantioso aumento en tamaño se debe sobre todo a la acumulación de los materiales de reserva para formar la yema (Bellairs, 1964, 1965). Cuando se observa al microscopio, la yema fresca presenta aspecto de líquido viscoso donde están suspendidos gránulos y glóbulos de diversos tamaños.

Los óvulos jóvenes están incrustados muy profundo en la corteza del ovario y a medida que se acumula cada vez más yema, se apiñan hacia la superficie para proyectarse por último de ella, conservándose conectados a través de un tallo constreñido de tejido ovárico. La mayor parte del óvulo maduro está constituido por vitelo. Con excepción de la vecindad del núcleo, el citoplasma activo no es más que una película delgada que esta en contacto con el vitelo. La zona del óvulo en la que se hayan el núcleo y la mayor parte del citoplasma activo recibe el nombre de polo animal, y es el sitio donde se lleva a cabo la fecundación, la región opuesta al polo animal se conoce como polo vegetativo, el sitio donde se acumula el vitelo.

Así como los óvulos de muchas clases de vertebrados, los huevos de las aves exhiben una membrana plasmática de gran irregularidad que con frecuencia se designa membrana vitelina. Este término se utiliza para describirla por las delicadas estrías radiadas que presenta al observarse bajo un microscopio de luz. Gracias a los estudios realizados con microscopio electrónico, en la actualidad se sabe que las estrías deben su aspecto a microvellosidades estrechamente apiñadas.

Tanto en aves como en mamíferos, el óvulo está rodeado por una región de células foliculares que a su vez está circundado por una teca externa de tejido conectivo

vascular de dos capas. La asombrosa diferencia es que, mientras el óvulo grande cargado de vitelo ocupa por completo el folículo en aves, el pequeño huevo de mamíferos apenas lo llena. La zona desocupada al interior del folículo de mamífero es el antro, en cuyo interior se encuentran el líquido folicular.

Al acumularse totalmente el vitelo que requiere el óvulo del ave, se lleva a cabo la ovulación a través de la rotura de una banda vascular (el estigma) que rodea al folículo. Las bandas de músculo liso que se extienden del tallo hacia el interior del folículo, se contraen, para así liberar el óvulo fuera del folículo. Como sucede con el óvulo de mamíferos, la finalización de la primera división de maduración coincide casi exactamente con la ovulación, en tanto que la segunda división no se realiza, a menos que una célula espermática penetre en el huevo (Patten, 1990).

2.4. Morfología de las células germinales primordiales, ovogonias y ovocitos.

Las células germinales primordiales tienen un núcleo grande y redondo con un nucleolo fragmentado, y relativamente menos citoplasma, incluyendo aparato de Golgi, ribosomas libres y gotas de lípidos (Ukeshima y Fijimoto, 1991). El diámetro de las células germinales primordiales en aves, tiene un rango entre 10 y 18 μm . El núcleo de las células germinales primordiales extragonadales tienen una posición excéntrica y éste está especialmente marcado en el caso de las células germinales de aves. Generalmente están presentes uno o dos nucleolos prominentes. El retículo endoplásmico está pobremente desarrollado en los primeros estadios, hasta ser más conspicuo en el embrión de 4 a 8 días. El aparato de Golgi está moderadamente desarrollado; abundantes mitocondrias y escasos polirribosomas. Los centriolos yuxtannucleares se han descrito en las células germinales primordiales de todos los grupos de vertebrados, pero especialmente una centrófera prominente se ha considerado como característica de las células germinales primordiales de aves (Matsumoto, 1932; Fritts – Williams y Meyer, 1972). De acuerdo con Swift (1914) esta estructura en el pollo puede medir hasta 2 – 3

μm . de diámetro y 6 μm . de largo (Jones, 1978). El citoplasma contiene abundantes partículas de glucógeno, gotas lipídicas y variable cantidad de vitelo (Van Blerkom , 1984)

Las ovogonias se reconocen como una gran célula redonda con una gran proporción nucleocitoplásmica(relación núcleo-citoplasma 1-1). El núcleo es esférico con un gran nucleolo. El arreglo de la cromatina es uniforme y finamente granular (Jones, 1978). El citoplasma tiene un número limitado de organelos, incluyendo mitocondrias dispersas, unas cuantas cisternas alargadas de retículo endoplásmico y ocasionalmente un pequeño complejo de Golgi. Los ribosomas están distribuidos uniformemente por el citoplasma, en su mayor parte en un arreglo polisomal, pequeñas gotas lipídicas (Van Blerkom , 1984).

2.5. Ovocitos.

La ultraestructura del ovocito prefolicular meiótico en varios mamíferos, es similar a aquellos ovocitos y espermatocitos de vertebrados en general e invertebrados, indicando una estructura básica común para el primer fenómeno meiótico.

Los ovocitos de la mayoría de los animales son células gigantes, con una gran cantidad de reservas de todos los materiales necesarios para que el desarrollo inicial del embrión consiga alcanzar el estadio de un nuevo individuo capaz de alimentarse por sí mismo. Típicamente, los ovocitos tienen una forma esférica u ovoide, de un diámetro de unos 100 μm en humanos y en erizos de mar, de 1 a 2 mm en anfibios y peces, y de muchos centímetros en aves y reptiles.

Durante todo el estadio de la profase meiótica, el núcleo se mantiene grande y redondo y la envoltura nuclear, generalmente lisa. El nucleolo se mantiene pequeño y

relativamente compacto hasta el diplóteno, cuando se convierte en una gran estructura reticular o compacta, el complejo sinaptonémico es el sello ultraestructural del estado meiótico de la célula germinal. El diplóteno está caracterizado por la reaparición de una sola hebra rodeada por una compleja vaina fibrilar organizada en proyección lateral y enlazada con gránulos asociados. El citoplasma contiene: mitocondrias redondas y ribosomas dispersos, difusamente arreglados en rosetas; pequeños elementos de Golgi encerrados. Centriolos, retículo endoplásmico tubular o arreglado en cisternas, raramente visto hasta el diplóteno. La apariencia general del citoplasma en diplóteno empieza a parecerse a aquel del ovocito folicular (Van Blerkom , 1984; Muniesa y Dominguez, 1990; Ukeshima y Fujimoto, 1991).

Al inicio de la fase de crecimiento o fase previtelogenica, se presenta el "núcleo vitelino" o "núcleo vitelino de Balbiani". En las primeras fases, el corpúsculo está al lado del núcleo, pero en las etapas posteriores se escinde y sus fragmentos se distribuyen por la periferia del ovocito. Dado que es en la periferia del ovocito donde aparecen primeramente los globulos vitelinos, se ha llegado a la conclusión de que la vitelogénesis (producción de vitelo) es iniciada por los componentes del "núcleo vitelino" (Balinsky, 1983).

El citoplasma del ovocito contiene reservas nutritivas en forma de vitelo, que es rico en lípidos, proteínas y polisacáridos y que habitualmente se halla en estructuras discretas denominadas *glóbulos vitelinos*. En algunas especies cada plaqueta está rodeada por una membrana mientras que en otras no lo está. En los óvulos que darán lugar a grandes animales que se desarrollan fuera de la madre, el vitelo puede representar más del 95% del volumen celular mientras que en los mamíferos, cuyos embriones son alimentados por la madre, constituye mucho menos, si es que existe.

Las cubiertas ovocitarias constituyen otra peculiaridad de los ovocitos. Son una especialización de la matriz extracelular y están formadas fundamentalmente por glucoproteínas, algunas de las cuales están segregadas por el ovocito y otras por células acompañantes. En muchas especies la cubierta principal es una capa adyacente a la

acompañantes. En muchas especies la cubierta principal es una capa adyacente a la membrana plasmática del ovocito; en los ovocitos de los no mamíferos, tales como los erizos de mar o los pollos, se denominan *cubiertas vitelinas* mientras que en los ovocitos de los mamíferos constituyen la *zona pelúcida*. Esta capa protege al ovocito de agresiones mecánicas, y en algunos casos actúa como una barrera específica para los espermatozoides, admitiendo únicamente los de la misma especie o de especies estrechamente relacionadas. Análogamente, la "clara" (albúmina) y la cáscara de los huevos de gallina se añaden (después de la fecundación, si no la hay no se segrega) a medida que los huevos pasan por el oviducto. En algunos casos la cubierta vitelina de los óvulos de los insectos está rodeada de una capa gruesa y resistente denominada *corion*, segregada por *células foliculares* que rodean cada óvulo en el ovario.

Un ovocito es un óvulo en desarrollo; su diferenciación en un óvulo maduro (u *ovum*) supone series de cambios que se producen en momentos que están coordinados con las etapas de la meiosis mediante las que las células germinales atraviesan sus dos divisiones finales, altamente especializadas.

Esto se realiza en la profase de la meiosis durante un período de tiempo que varía, desde algunos días hasta varios años, según las especies. Durante este largo período, los ovocitos primarios sintetizan la cubierta y los gránulos corticales y en el caso de los grandes ovocitos de los no mamíferos, acumulan ribosomas, vitelo, glucógeno, lípidos y el ARNm que posteriormente dirigirá la síntesis de las proteínas necesarias para el crecimiento embrionario inicial y para la puesta en marcha del programa de desarrollo.

La fase siguiente del desarrollo de los ovocitos se denomina *maduración ovocitaria* y generalmente no tiene lugar hasta la madurez sexual, cuando es estimulada por hormonas. Bajo esta influencia hormonal la célula recupera su progresión a través de la división I de la meiosis: una de ellas es la formación de un pequeño *corpúsculo polar*, y un gran ovocito secundario, el precursor del óvulo. En esta etapa, cada cromosoma está todavía compuesto por dos cromátidas hermanas. Estas cromátidas no se separan hasta

la división II de la meiosis, cuando se distribuyen en dos células mediante un proceso que es idéntico a la mitosis, tal como hemos descrito anteriormente. Después de esta separación final de los cromosomas, en la anafase II, el citoplasma del gran ovocito secundario se divide nuevamente de forma asimétrica produciendo un óvulo maduro (u ovum) y un segundo pequeño corpúsculo polar, cada uno de los cuales contiene una dotación haploide de cromosomas. Debido a estas divisiones asimétricas de citoplasma, los óvulos conservan su gran tamaño a pesar de sufrir dos divisiones meióticas. Ambos corpúsculos polares son pequeños y generalmente degeneran.

En la mayoría de los vertebrados la maduración ovocitaria sigue hasta la metafase de la meiosis II, momento en el que se detiene hasta la fecundación. En la ovocitación el ovocito secundario detenido es liberado del ovario y, si tiene lugar la fecundación, el ovocito es estimulado a completar la meiosis y transformarse en óvulo (Albert, 1996).

2.5.1. Desarrollo folicular

La foliculogénesis en el pollo empieza después del nacimiento, donde muchos ovocitos están en la fase de diplóteno de la profase meiótica. Está implícito que la foliculogénesis está unida a el tiempo de la ovogénesis (Jones , 1978).

En el tiempo de nacimiento, el ovario contiene un millón o más ovocitos. Los ovocitos están localizados principalmente en la corteza ovárica, pero unos pocos se quedan en la médula ovárica. Las células de la granulosa, derivadas de las células somáticas del epitelio superficial del ovario, llegan a asociarse con el ovocito a los pocos días después del nacimiento, y forman una capa continua alrededor del ovocito entre los días 4 a 7; algo más tarde, la célula intersticial originada del tejido medular rodea al folículo hasta formar la capa tecal. La capa tecal está diferenciada en capa tecal interna y capa tecal externa; por el mismo tiempo el folículo alcanza el tamaño de 2 mm.

El desarrollo del folículo hasta el estado preovulatorio se divide en tres grandes fases (Marza y Marza, 1935):

- Primer estado, un pequeño período de crecimiento de los folículos hasta 2 mm de diámetro que continúa durante meses o hasta años, y durante el cual la composición del vitelo, consiste principalmente de lípidos neutros.
- Segundo estado, una fase intermedia que dura cerca de 60 días, cuando se agregan unas proteínas al vitelo y el diámetro del folículo aumenta desde 2 a 6 mm.
- Tercer estado, una fase de crecimiento rápido que dura de 7 a 11 días, donde el folículo crece hasta alcanzar 35 mm de diámetro. Durante este tiempo la mayor parte del vitelo amarillo se agrega y la masa del folículo típico aumenta de 0.5 gr a 18 gr. (Zakaria et al, 1984).

Los folículos preovulatorios de la hembra para la puesta están arreglados en una jerarquía de tal modo que los grandes folículos (F_1) están destinados a ser próximamente ovulados, el segundo gran folículo (F_2) al día siguiente, el tercer gran folículo (F_3) dos días después, etc. Típicamente, el ovario contiene de 5 a 7 grandes yemas foliculares, y folículos de 10 a 4 mm. de diámetro, junto con un gran número de pequeños folículos amarillos de 2 a 10 mm., con numerosos folículos pequeños (menores a 2 mm.), en el estroma ovárico.

2.5.2. Estructura folicular

El folículo está formado de capas concéntricas de células que rodean el ovocito y el vitelo incluyendo:

- a) La membrana plasmática del ovocito.
- b) La membrana vitelina
- c) Células de la granulosa
- d) La lámina basal
- e) La teca (interna y externa).

Durante el desarrollo folicular, las células de la granulosa forman una capa cuboidal en que las células están interconectadas por desmosomas (Rothwell y Solomon, 1977). Las microvellosidades, se extienden desde la célula de la granulosa a la superficie del ovocito, sirviendo al grosor de esa capa. Además allí parece tener una diferenciación regional con respecto a la morfología para la célula de la granulosa, especialmente en el gran folículo preovulatorio (Bakst, 1979; Perry et al, 1978). El número de células de la granulosa aumentan aproximadamente 5 veces el doble es como el diámetro folicular aumenta de 5 a 35 mm (Gilbert et al, 1980), de cualquier modo, la población de células mitóticas parece estar limitada a la región del disco germinal (Bakst, 1979; Perry et al, 1978). En el periodo inmediato preovulatorio, la célula de la granulosa queda separada espacialmente, presumiblemente facilitando el aumento de difusión de líquidos y sueros.

Ultraestructuralmente las células de la granulosa de ave son células típicas secretoras de esteroides y se caracterizan por la presencia de mitocondrias con crestas tubulares, un claro complejo de Golgi, algunos gránulos de lisosomas y una gran cantidad de retículo endoplásmico liso y rugoso. En los folículos más grandes de 15 mm de diámetro, hay un aumento aparente en la cantidad de retículo endoplásmico rugoso por célula, y hay una acumulación importante de poliribosomas. Durante el estado final de maduración, el aparato de Golgi llega a ser cada vez más notable (Rothwell y Solomon, 1977).

La membrana basal es una hoja laminar que crece desde aproximadamente 0.2 μm hasta 1 μm de grosor durante el segundo estado del desarrollo folicular. Esta membrana sirve como un substrato para la célula de la granulosa y separa la granulosa y la capa tecal interna (Rothwell y Solomon, 1977; Perry et al, 1978). En orden a la acomodación, la acumulación de vitelo aumenta durante la fase final de crecimiento, la membrana basal aumenta en el área superficial y está formada presumiblemente de productos metabólicos secretados por las células de la granulosa y/o células de la teca.

La capa tecal interna está situada adyacente a la membrana basal y está caracterizada por la presencia de una capa discontinua de células fibroblásticas y células de la teca. En folículos pequeños (menores a 5 mm), las células tecales pueden estar unidas en grupos llamados "glándulas tecales" (Dahl, 1970). Mientras que el folículo crece, de cualquier modo las células tecales se hacen todavía más dispersas por toda la capa tecal interna. Otra característica notable de las células de la teca es la abundancia de gotas lipídicas citoplásmicas (Dahl, 1970).

La capa tecal externa representa la mayor proporción de la pared del folículo y se compone de láminas de células semejantes a fibroblastos, numerosos microfilamentos, fibras de colágeno y actina, pero relativamente pocas células de la teca (Perry et al, 1978; Dahl, 1970).

La pared externa folicular está cubierta por el epitelio ovárico y una capa de tejido conectivo libre conteniendo una envoltura de músculo liso (Yoshimura et al, 1983) que contribuye a la expulsión del ovocito en la ovulación. El folículo no desarrollado está implantado en la corteza altamente vascularizada del ovario. Cuando el folículo se desarrolla y aumenta en tamaño forma un discreto sistema arterial venoso y adquiere acceso al tejido folicular vía el pedúnculo folicular (Oribe, 1968). La pared del gran folículo y del folículo preovulatorio es altamente vascularizada, excepto a lo largo del estigma. El

estigma (sitio de ovulación) contiene un sistema microcapilar localizado en la porción intermedia de la pared del foliculo.

La vascularización está ausente en la capa de la granulosa. En contraste, la capa tecal está altamente vascularizada y consiste de:

1. Una capa venosa exterior compuesta de unas cuantas venas grandes que drenan el foliculo vía el pedúnculo.
2. Un medio arterial complejo y una capa venosa.
3. Una red interior capilar (Nalbandov y James, 1949; Oribe, 1968; Gilbert, 1971).

Hay una extensa inervación de la corteza ovárica un día después del nacimiento (Bennett y Malmfors, 1970). Esta inervación está asociada con vasos sanguíneos y foliculos inmaduros (Gilbert, 1965; Bennet y Malmfors, 1970). Las fibras nerviosas inervan los foliculos en el estado 2 y 3, vía el pedúnculo y penetran por todas las capas tecales, pero pocas fibras llegan a la capa de la granulosa. La inervación del foliculo consiste de fibras colinérgicas y adrenérgicas, ganglio celular y estructuras parecidas a nervios sensorios terminales (Gilbert, 1965; Dahl, 1970; Benner y Malmfors, 1970; Gilbert, 1969). Muchas, si no todas la células tecales, están directamente conectadas por axones o fibras nerviosas catecolaminérgicas, sugiriendo un potencial nervioso y/o control neuroendócrino de secreción de esteroides (Johnson, 1990).

El ovario de ave inmadura consiste de una masa de pequeños foliculos; de los cuales, al menos, 2000 son visibles a simple vista, pero sólo una cantidad relativamente pequeña de éstos (200 – 500), alcanzarán la madurez y son ovulados (Sturkie, 1986). La vida fértil de una gallina empieza a los 7 meses, hasta los 4 años de vida. La masa folicular de la hembra puede ser clasificada en relación a su tamaño y proximidad para la ovulación como F1 (grandes foliculos) hasta F5 – F7 (pequeño foliculos). Los foliculos que entran en esta jerarquía se obtienen de una gran "reunión" de pequeños foliculos amarillos o blancos que van desde 1-2 mm (Gilbert et al, 1983; Perry et al, 1983), hasta 6-8 mm de diámetro (Zakaria et al, 1984; Robinson, et al, 1986).

3. HORMONA LUTEINIZANTE

3.1. Estructura

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

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

La hormona luteinizante (LH) se ha demostrado inmunocitoquímicamente en el saco de Rathkes o ducto craneofaríngeo, ya en el día 4.0 de incubación (LH, Gascy Sar, 1981; Woods et al, 1985; F.S.H., Woods et al, 1985), lo cual es antes de la formación del definitivo plexus porta vascular hipotálamo – hipófisis en el día 12.0 (Thommes y Russo, 1959; Doskocil, 1970; Daikoku et al, 1974; Stritesky y Rychter, 1977). Así la pituitaria es capaz de sintetizar hormonas gonadotrópicas antes de que se establezca la comunicación entre ésta y el hipotálamo. El hipotálamo también es autónomo en su desarrollo inicial (Mikami et al, 1973; Daikoku et al, 1974) y la primera síntesis de la hormona liberadora (LHRH) (Woods et al, 1985), se ha demostrado

inmunocitoquímicamente que las neuronas LHRH se observan en el infundíbulo (presunto hipotálamo) en el día 5.5 (Woods et al, 1985) y por el día 7.8 – 8.0 la eminencia media anterior, está inervada por nervios terminales (Mikami et al, 1973; Daikoku et al, 1974), conteniendo LHRH inmunorreactivo (Woods et al, 1985). Además los primeros eventos de maduración en la gónada, son autónomos, por ejemplo, la diferenciación gonadal (Fugo, 1940; Vogel, 1956; Woods y Weeks, 1969) y la síntesis de hormonas esteroides (Woods y Weeks, 1969; Woods et al, 1977).

Así, las dos gonadotropinas (LH y FSH), pueden ser detectadas inmunohistoquímicamente, después del día 4.5 del desarrollo (Woods et al. 1981). Al nivel del ovario, la esteroidogénesis específicamente de estrógenos y progesterona, es posible desde la primera semana del desarrollo en adelante (Galli y Wasseexman, 1972; Guichard et al, 1973, 1977 b; 1979; Woods y Erton, 1978) mientras que el ovario de embriones de 7.5 hasta 9.5 días de edad, también aumenta la secreción de 17- β -estradiol, dentro de la circulación embrionica cuando se aplica LH equina exógena (Woods et al, 1981).

Muchas otras evidencias sugieren no obstante que el eje completo llega a funcionar sólo alrededor del día 13 de incubación (Woods y Thommes, 1984). Las mediciones de 17- β -estradiol plasmático también muestran una elevación constante desde el día 7.5, hasta el día 17.5 de incubación (Woods y Brazill, 1981; González et al, 1987).

El efecto de la LH o la hormona gonadotropina coriónica humana (hCG), en la secreción de esteroides en el ovario de embrión de pollo, ha sido estudiada por varios autores. La incorporación de precursores radioactivos en estrona y estradiol aumentó en los días 10 hasta 18 en el ovario del embrión de pollo, después del tratamiento con LH o hCG (Cedrad et al 1968; Akram y Weniger, 1974); la secreción de estradiol y testosterona aumentó después del tratamiento con hCG, en los ovarios de 8, hasta 18 días de edad en los embriones de pollo conservados *in vitro* (Teng y Teng, 1979). Después del tratamiento

con LH, el nivel plasmático de estradiol aumentó en los embriones de pollo de 7.5 – 9.5 días de edad (Woods et al, 1981; González Morán et al, 1985).

Por el uso de precursores radioactivos se demostró *in vitro* que el ovario del embrión de pollo puede producir 17- β -estradiol y estrona desde el día 7 del desarrollo (Haffen y Cedrad, 1968; Weniger y Zois, 1977; Galli y Wassermann, 1973; Guichard et al, 1973). El nivel de secreción de estas hormonas también se demostró por radioinmunoensayo (Guichard et al, 1977 a, b). Usando métodos citoquímicos inmunofluorescentes, la presencia de 17- β -estradiol y estrona en gónadas indiferenciadas de embriones de pollo se describió en el día 3.5 del desarrollo (Woods y Erton, 1978).

Estudios *in vitro* mostraron que los ovarios de embriones de pollo de 8.0 – 18.0 días de edad (Teng y Teng 1977) y los ovarios y testículos de embriones de 18.0 días de edad (Cedrad et al, 1968; Guichard et al, 1979) responden a la gonadotropina coriónica humana añadida a el medio de cultivo. También estudios *in vivo* con la adición de LH en el día 4.5 en la membrana corioalantóica normal de embriones de pollo machos y hembras, incrementa los niveles de testosterona plasmal por el día 7.5 (Wood y Rutherford 1977; 1981). Esta última observación indica que los testículos y ovarios de embriones jóvenes son capaces de responder, a gonadotropinas exógenas en el día 6.0 anterior al tiempo (día 13) en que aparecen las gonadotropinas endógenas para ejercer su inicial efecto regulatorio (Woods et al, 1981).

El control hipotalámico de la secreción de LH en aves está regulado por un sistema porta vascular hipofisiario que transporta neuropéptidos reguladores y neurotransmisores de liberación de la eminencia media a la glándula pituitaria anterior (Follet, 1984). En aves, la secreción de la hormona luteinizante está controlada por la liberación de la hormona I gonadotrópica (GnRH – I). Existen 2 formas de GnRH en aves, GnRH-I de pollo (pGlu-His-Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu-Gln-Pro-Gly-NH₂) y GnRH-II de pollo (pGlu-His-Prp-Ser-His-Gly-Trp-Tyr-Pro-Gly-NH₂). Las dos formas estimulan la liberación de LH *in vivo* e *in vitro* y la GnRH-II es más potente que la GnRH-I (Guémené,

D. Williams, 1992; Sharp et al, 1987; Sharp et al 1990). Las dos GnRH se producen en sistemas neuronales diferentes, para la GnRH-I, los cuerpos celulares están en la región anterior del hipotálamo mientras que la GnRH-II, los cuerpos celulares están en la región posterior dorsal del hipotálamo y en la región adyacente inmediata al núcleo del nervio oculomotor (Mikami et al, 1988; Millam et al. 1993; Sharp et al, 1998).

3.2. Acción Biológica

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

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

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

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

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

La localización intraovárica, además de la concentración de receptores positivos a LH de las células intersticiales, cambia durante el desarrollo (Woods, 1987). Desde el día 5.5 hasta el día 13.0, los receptores a LH están presentes en membranas de las células intersticiales medulares, que sintetizan testosterona (Woods y Podczaski, 1974) y estradiol (Woods y Erton, 1978). En el día 13.5, los receptores complejos a LH, aparecen primero en membranas de los cordones celulares corticales y en las células intersticiales corticales, la corteza restante es el principal sitio de receptores celulares positivos a LH durante el período embrionario (días 13.5 – 19.5) (Woods, 1987)

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

ANTECEDENTES

Existen pocas investigaciones sobre las funciones de la hormona luteinizante en el ovario de pollo durante el desarrollo embrionario, a diferencia de las realizadas en el animal adulto.

El proceso de ovogénesis (la formación de nuevas células germinales por divisiones mitóticas de las ovogonias) y los cambios citológicos subsecuentes en ovocitos asociados con la profase meiótica se han descrito con detalle para muchas especies de mamíferos. No así para el ovario de aves. El estudio cuidadoso de D'Hollander (1904) del ovario izquierdo de pollo, confirma la tesis de Waldeyer's (1870) de que el proceso de la ovogénesis es terminado por el tiempo de nacimiento y que el ovario de aves se parece a aquellos de los mamíferos uterianos en que no genera nuevas células germinales después de la madurez sexual. En contraste, en todos los anfibios, la mayoría de los peces (particularmente teleosteos) y probablemente muchos reptiles, la fase proliferativa de la ovogénesis ocurre continuamente durante la vida reproductiva del adulto (Franchi, Mandl y Suckerman, 1962). Es de interés mencionar que en *Sphenodon*, un reptil primitivo, las células germinales primordiales entran en la fase de la meiosis brevemente después de su migración en la cresta genital (Tribe y Brambell, 1932). No se sabe si "todas" las ovogonias llegan a transformarse en ovocitos en este estadio, o si algunas persisten y se dividen más tarde.

D'Hollander (1904) observó en aves que desde el 14avo día de incubación en adelante, la diferenciación de células germinales está más avanzada en la porción central de la corteza ovárica que en los extremos coticales. Lo mismo sucede en los anfibios, en donde los ovocitos del área central de la corteza coexisten con ovogonias de la periferia (Witschi, 1914). Una tendencia similar ha sido reportada para algunos mamíferos, conejo: Winiwater, 1901; ratón: Borum, 1961; y en el hombre: Baker, 1963,

observándose el inicio de la profase meiótica con muchos ovocitos en leptóteno, zigóteno y paquíteno. Entre el día 16avo, 18avo, D'Hollander también observó que en el pollo, y en otros animales, la fase de diploteno es muy larga, única y caracterizada por la presencia de cromosomas *lampbrush* (Loyes, 1906; King, 1908; Van Durme, 1914; Koltzoff, 1938; Dodson, 1948; Duryee, 1950; Gall, 1952, 1954; Callan y Lloyd, 1960).

Más tarde Goldsmith (1928) cuestionó las observaciones citológicas de D'Hollander (1904), quien afirmó que los cambios nucleares ocurridos en el ovocito del embrión de pollo entre el 14avo y 18avo día de incubación representa principalmente síntesis en fase de leptóteno. Él también propone que ocurre una gran fase de "descanso" entre el tiempo de nacimiento y la edad de 65 – 69 días (Hughes, 1963).

Ohno, en 1961, describió en el pollo numerosas células en el estadio de paquíteno al 19avo día de incubación; en el día 20avo, el ovario contiene ovocitos en los estadios: paquíteno y diploteno. Ohno consideró, sin embargo, que en el tiempo de nacimiento, muchos ovocitos están en una interfase parecida al estado "dictióteno", usualmente considerado ovocito típico de mamíferos (Hughes, 1963).

Después, González-Morán y colaboradores en 1985, realizaron estudios morfológicos, en el ovario embrionario de pollo en el cual inyectaron *in vivo* hGC, en embriones de pollo de 13, 15 y 17 días de edad. Encontrando que hay una reducción en el número de células germinales en el estroma del ovario, indicando que el ovario de pollo responde a la hGC.

Por otra parte, Firket en 1914, observó que muchas células germinales degeneran entre el 13avo y 15avo día de incubación, y propuso que la mayoría, si no todos los ovocitos, originalmente presentes degeneran, hasta ser remplazados más tarde por la proliferación "definitiva" de células germinales del epitelio germinal. La misma afirmación se hizo para especies de mamíferos (rata: Butcher, 1927; Swezy, 1929; ratón: Kingery,

1917; Allen, 1923; gato: Sneider, 1940; hombre: Swezy y Evans, 1930)(citadas en Hughes, 1963).

La información disponible sugiere, que las gonadotropinas y quizá los esteroides gonadales incrementan la división ovogonial y el número de ovogonias en algunos peces adultos o anfibios y reptiles. El control hormonal de la división ovogonial puede servir para sincronizar el número ovogonial con la época del ciclo reproductivo de estos vertebrados. Por otro lado, ninguna de las gonadotropinas, ni tampoco los esteroides gonadales han mostrado la influencia en la mitosis ovogonial en larvas de lampreas o embriones de aves. De cualquier modo, las gonadotropinas o los esteroides gonadales incrementan el número de ovogonias y así más ovogonias están disponibles para la diferenciación de ovocitos primarios con la llegada de la ovogénesis. La cuestión de si el ovocito primario en la fase de crecimiento es dependiente de las gonadotropinas, aún no se ha resuelto. La dificultad en resolver este problema puede quizá ser explicado por: 1) Diferencias en las especies, 2) Pequeños cambios relativos al diámetro de los ovocitos durante la primera fase de crecimiento, comparada con la segunda fase de crecimiento, y 3) bajo niveles de gonadotropina requeridos para iniciar y mantener el crecimiento del ovocito primario. Sin embargo, el ovocito primario parece ser que crece independientemente de la gonadotropina en ciclóstomos y dependen de la gonadotropina en anfibios y reptiles. Las gonadotropinas también evitan la atresia de ovocitos primarios en algunos anfibios y reptiles hipofisectomizados (Tokarz, 1978).

Hay muy poco conocimiento sobre el mecanismo de acción de las gonadotropinas en embriones de pollo. Teng et al, (1982) han demostrado que en el día 15 de edad embrionaria, los ovarios de pollo responden a las gonadotropinas con un aumento en los niveles de AMPc, y producción de testosterona y estradiol. Sin embargo, trabajos posteriores han indicado que la LH estimula el AMPc y la producción de progesterona (González et al, 1987; González et al, 1990; González et al, 1994).

En el trabajo realizado por Teng y colaboradores (1982), observaron que los ovarios embrionarios de 15 días tratados con LH, estimula la producción de estradiol y de testosterona. Mientras que los tratados con FSH presentaron un efecto estimulador más bajo. El ovario izquierdo fue mucho más sensible a la LH y FSH que el ovario derecho.

La diferencia en la respuesta hormonal del ovario en crecimiento y el de regresión puede ser debido a una diferencia en el número de receptores hormonales necesarios para una sensibilidad óptima de las células blanco y quizás también por otros factores como: la afinidad de los receptores hormonales, el acoplamiento de los receptores a la actividad de la adenilato ciclasa, y a los cambios cuantitativos de las enzimas presentes en las rutas esteroidogénicas, los cuales pueden contribuir a la sensibilidad óptima de las células blanco a las gonadotropinas.

González Morán (1998) estudió el efecto de la hormona foliculo estimulante (FSH), en el ovario de pollos recién nacidos, tratados *in vivo* durante el desarrollo embrionario. Encontró que las células esteroidogénicas y las células pobremente diferenciadas responden al tratamiento con FSH al aumentar su número. Probablemente ambos tipos celulares tengan receptores para FSH. También observó un aumento en el número de ovogonias, las cuales son responsables de un marcado aumento en la población total de las células germinales en los ovarios de pollo tratados con FSH. Es posible que el tratamiento con FSH durante el desarrollo embrionario favorezca un adecuado microambiente para la proliferación ovogonial y un retraso en el inicio de la profase meiótica.

González, M., y Calderón en el 2000 reporta que la LH tiene un efecto contrario a la FSH en el ovario de pollo recién nacido tratado con LH en etapa embrionaria. Los ovarios de los animales tratados con LH no incrementan el número celular de ninguna de sus poblaciones celulares, pero hay un aumento en su esteroidogénesis.

En algunos peces, anfibios y reptiles se ha reportado que las gonadotropinas y, quizá los esteroides gonadales, aumentan la división y el número de ovogonias. (Yamazaki, 1963; Pisano y Burgos, 1971; Licht et al., 1977; Torkaz, 1978). Byskov (1978, 1979) se ha estudiado la regulación de la meiosis en mamíferos y sugieren que el estradiol retrasa el inicio de la meiosis, proponen que la diferenciación ovárica puede presentar dos patrones diferentes: las células germinales experimentan inmediatamente la meiosis sin previa producción de esteroides, y si hay síntesis de estradiol se retrasa la meiosis.

La respuesta del ovario de pollo a la hCG aparece primero en el desarrollo de estos órganos que en el ovario de ratas y conejos, debido a que no están dotados con receptores específicos para LH/hCG en el ovario durante el desarrollo fetal y primer desarrollo postnatal (Miller et al, 1979; Siebers et al, 1977; George et al, 1979; González-Morán et al, 1985). Como lo muestran los resultados de Teng y Teng en 1982, los cuales indican que el ovario embrionario de pollo es más sensible a la LH que a la FSH. Además, hay muchas evidencias que nos indican que la gonadotropina más importante en la estimulación y producción de andrógenos en aves es la LH (Maung y Follett, 1977).

Las gónadas, testículos y ovarios, son capaces de responder *in vivo* la LH exógena al menos por el día 7.5, como lo prueba el aumento de testosterona en el plasma (Rutherford, 1977; Woods y Rutherford, 1977) y las concentraciones de 17β estradiol (Woods et al, 1981; Woods et al, 1989).

En el trabajo realizado por González y colaboradores en 1994, en el ovario de pollo inmaduro, encontraron que el *Forskolin* aumenta el nivel del AMPc. También que las catecolaminas estimulan la actividad de la adenilato ciclasa y promueven la producción del AMPc y la acumulación de progesterona. Además el isoproterenol tiene un efecto estimulador en el AMPc y en la producción de progesterona tan significativamente alta como el de la LH, lo cual se debe a la presencia simultánea de ambos inductores.

Especulando que las catecolaminas juegan un papel importante en la regulación o esteroidogénesis en el ovario de pollo inmaduro.

OBJETIVO GENERAL

Conociendo que el ovario embrionario de pollo responde al estímulo de la hormona luteinizante, con cambios morfológicos e incremento de hormonas esteroides, nos propusimos estudiar el efecto de la hormona luteinizante sobre la ovogénesis del ovario de pollo recién nacido tratado en etapa embrionaria.

Objetivos Particulares:

- Analizar la influencia de la LH en la división ovogonial.
- Analizar la acción de la LH en el inicio de la Profase Meiótica.
- Analizar la acción de la LH en la variación de las distintas fases de la profase meiótica.
- Analizar la acción de la LH en la degeneración de células germinales

MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizaron huevos fértiles de pollo, de la raza White Leghorn. Los huevos se incubaron a 38°C con humedad y ventilación constantes, hasta la eclosión.

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

Los embriones que se encontraron viables y en buenas condiciones de desarrollo se colocaron, con el eje mayor de manera horizontal, en bases de cartón que previamente se limpiaron con una gasa humedecida con alcohol al 70%. Los huevos se trasladaron a un cuarto estéril (esterilizado una hora antes con calor seco, donde se limpiaron con una gasa estéril humedecida con alcohol al 70%, una vez limpios los huevos, se perforaron con una aguja de disección en la cámara de aire, después se hizo un orificio triangular en la parte superior del huevo, encontrándose en posición horizontal, este orificio se realizó con una segueta de metal, cuidando de perforar sólo el cascarón y no dañar las membranas internas. Una vez perforado, se retiró el cascarón y se agregó suero fisiológico (Solución de NaCl al 0.9%) sobre la membrana externa, dejándolo reposar un momento. Con la ayuda de una aguja de disección se hizo un pequeño orificio en la membrana externa y, con la ayuda de un bulbo, se succionó a través del orificio hecho a la cámara de aire, para que se separara de la membrana externa y bajara la membrana corioalantoidea, junto con el embrión, y evitar así un derrame sanguíneo que provocara la muerte del embrión. Una vez separada la membrana corioalantoidea de la membrana externa, se retiró ésta con la ayuda de unas pinzas, al quedar el orificio completamente libre de residuos de membrana externa, se cubrió con cinta adhesiva, igual que el orificio hecho a la cámara de aire. Los huevos se colocaron nuevamente en la incubadora y se dejaron transcurrir dos días. Al día 13 de incubación los huevos del lote control se les añadió NaCl (0.9%) y al lote experimental se les agregó una dosis de

hormona luteinizante (eLH -Sigma Chemical Co. St. Louis, Mo.-) en una concentración de 1 $\mu\text{g}/100 \mu\text{l}$, agregándose la hormona sobre la membrana corioalantoidea. Las dosis de hormonas se agregaron en los días 13, 15 y 17 de incubación de los embriones. Durante el desarrollo de los embriones se cuidó que la temperatura, humedad y ventilación de la incubadora fueran constantes.

Una vez concluido el desarrollo de los pollitos, dentro de las 24 horas, después de la eclosión (21 días), se sacrificaron por decapitación. Enseguida, se extrajo el ovario izquierdo, el cual se colocó en una solución libre de Ca^{++} y Mg^{++} , para limpiarlo y después poner cada ovario en un vial con 1.5 ml., de tripsina a 37°C , agitándose durante 40 minutos; disgregándose con pipeta Pasteur.

Se añadieron 2.5 ml., de inhibidor de tripsina a cada vial y se agitó. Posteriormente se tomó una alícuota para contar el número total de células germinales por ovario, para posteriormente hacer las observaciones histológicas. Se procedió a filtrar con doble gasa en los tubos de vidrio para centrifuga y se centrifugó a 1200 rpm, durante 5 minutos. Se eliminó el sobrenadante; al botón se le añadió Citrato de Sodio al 1%, agitándose 40 minutos a 37°C .

Se centrifugó a 1200 rpm, durante 5 minutos, se eliminó el sobrenadante, se añadió al botón 5 ml de fijador frío (metanol-ácido-acético 3:1), se dejó 24 horas en frío. Después de este tiempo se lavó dos veces centrifugando durante 5 minutos a 1200 rpm, se descartó el sobrenadante, se resuspendió el botón con fijador frío, se agregaron de 5 a 6 gotas sobre los portaobjetos (técnica de goteo); dichas laminillas ya estaban marcadas. Se dejaron secar y se tñeron con el colorante Giemsa, de 5 a 9 minutos; lavándose con agua destilada para ponerse a secar.

Una vez hechas las laminillas se hicieron las observaciones histológicas en el microscopio óptico, se contaron las células germinales: ovogonias (interfase y mitosis) y

ovocitos, en las distintas fases de la profase meiótica (preleptóteno, leptóteno, cigóteno, paquíteno y diploteno), así como las células en degeneración. Haciéndose tres repeticiones de cada conteo celular.

A partir de los datos obtenidos del conteo de las células germinales en cada una de las fases, se sumaron, por un lado ovogonias y por el otro los ovocitos, se obtuvo la relación porcentual, ya que se consideró el número total de células contadas al 100%, entonces, el número obtenido por cada grupo celular tuvo un porcentaje determinado, tanto en el lote control, como en el tratado con LH. Se contaron 10 ovarios controles y 10 ovarios tratados.

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

RESULTADOS

Las células germinales se distinguieron claramente por su gran tamaño, de las pequeñas células somáticas, además, el núcleo de las células germinales es grande y puede ser redondo u ovalado, y contiene proporcionalmente menos cromatina que la de las células somáticas.

Las ovogonias son más grandes que los ovocitos y cuando están en mitosis se distinguen de las células somáticas por su gran tamaño. Y contienen grandes masas de cromatina dentro del núcleo. En las ovogonias en metafase de la mitosis se observaron los cromosomas. Los cambios nucleares indican el inicio de la primera profase meiótica, apareciendo así los ovocitos, de los cuales se distinguieron diferentes fases de la profase meiótica:

Preleptóteno: Contienen gránulos de cromatina los cuales están estrechamente empaquetados en todo el núcleo. Un retículo fino que sostiene un número de pequeños gránulos de cromatina brillante entre la masa central de cromatina y la membrana nuclear. El núcleo muestra el inicio de formación de hebras.

Leptóteno: El núcleo contiene una masa enrollada de largos y finos cromosomas.

Zigóteno: Los cromosomas se polarizan hasta formar un "ramillete", la hebra de cromosomas se hace gruesa, probablemente debido a la sinápsis.

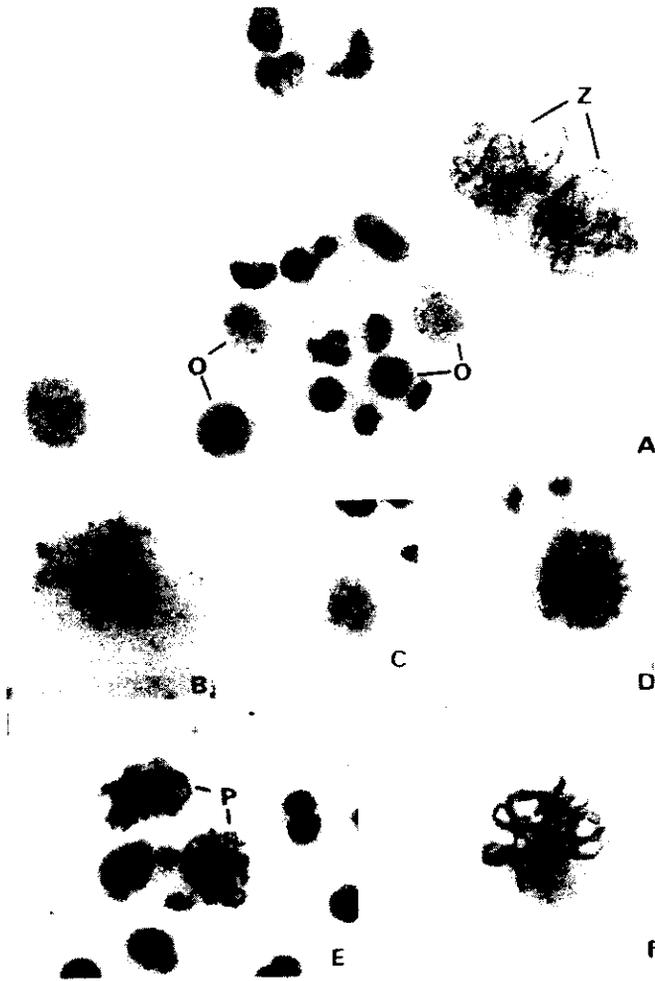
Paquíteno: Los hilos cromosomales individuales son cortos y gruesos, y los bivalentes se extienden hasta ocupar todo el núcleo.

Diplóteno: Los cromosomas homólogos se separan y se pueden ver muy bien los quiasmas.

El conteo celular demostró que los ovarios control y tratado con LH, presentan el mismo número de células germinales (fig. 1), pero el conteo de las células germinales por Squash indica que en el ovario control hay un 31% de ovogonias a diferencia del tratado con LH, el cual mostró sólo un 8%. Por consecuencia el porcentaje de ovocitos para el ovario tratado con LH fue mayor encontrándose un 92% en contraste con el ovario control cuyo porcentaje fue de 69%. En cuanto a las ovogonias en interfase fue mayor la cantidad de células en el ovario control, mostrando un 28% y para el tratado un 7.5%, lo mismo sucede para las ovogonias en metafase indicando un 2.7% para el control y un 0.5% para el tratado con LH. Tanto el ovario control como el tratado con LH presentan el mismo número de células germinales, es decir, no hubo significancia estadística (fig. 2), (Tabla 1).

Dentro del porcentaje de ovocitos se observa en el ovario control un mayor porcentaje de ovocitos en preleptóteno y una menor cantidad en la fase de leptóteno para disminuir considerablemente en la fase de zigóteno, con un ligero aumento en paquíteno y finalmente disminuye en la fase de diplóteno. En contraste con el ovario tratado con la hormona luteinizante. Como se puede observar, hay una menor incidencia en el porcentaje de ovocitos en preleptóteno y un gran aumento en la fase de leptóteno para disminuir en zigóteno, coincidiendo en esta fase con el ovario control, después se incrementa el porcentaje de células germinales a partir de la fase de paquíteno y diplóteno de la profase meiótica (Fig. 3).

Por otra parte, las células en degeneración se reconocieron porque presentaban trozos de cromatina dentro del núcleo picnotico y por lo plegado de la membrana nuclear. En el ovario control encontramos el mayor porcentaje de células germinales en degeneración en relación al ovario tratado con LH (tabla 1), (Fig. 4)..



OBSERVAMOS OVOGONIAS EN INTERFASE Y OVOCITOS EN ZIGOTENO(A), OVOGONIAS EN METAFASE (B), OVOCITOS EN PRELEPTOTENO (C),LEPTOTENO (D), PAQUITENO (E), Y DIPLOTENO (F).

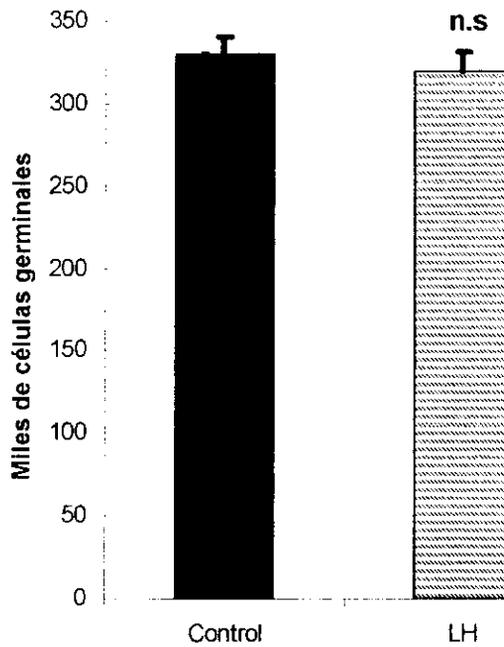


Figura 1

Total de células germinales por ovario de pollo recién nacidos, tratados con LH: Los datos están representados como la media \pm D.E., n.s. = no hay significancia.

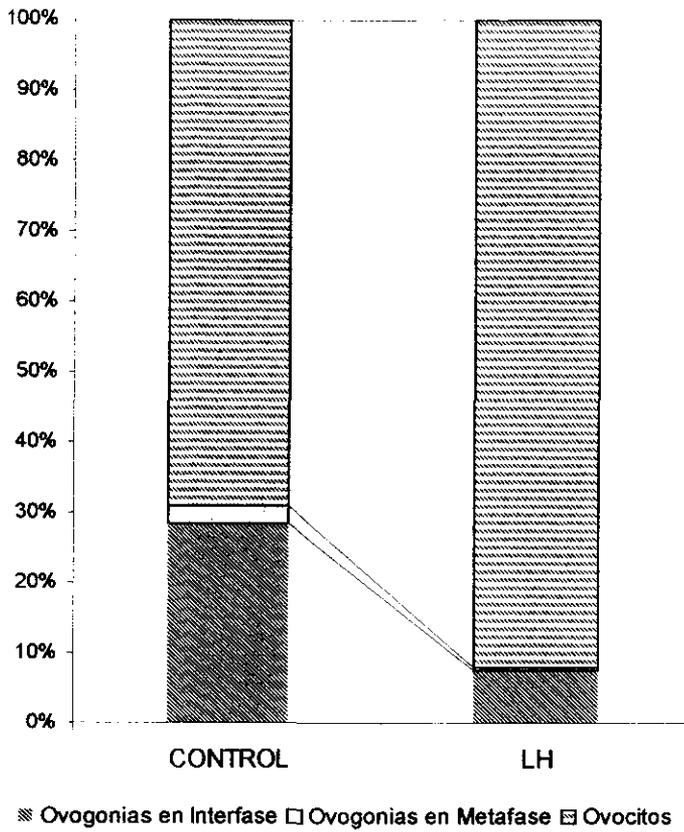


Figura 2

Media porcentual de las células germinales (ovogonias y ovocitos) en el ovario de pollo recién nacido, tratado con L.H.

Tabla 1

Efecto de la Hormona Luteinizante sobre las células germinales de la corteza ovárica de pollos recién nacidos

	OVOGONIAS	OVOCITOS	OVOGONIAS		OVOCITOS					ATRESIA
			INTERFAS E	METAFASE	PRELETÓ- TENO	LEPTÓTE- NO	ZIGÓTENO	PAQUÍTE- NO	DIPLÓ- TENO	
CONTROL	31.0±3.0 e=0.95	69.0±3.4 e=1.07	28.3±3.2 e=1.01	2.7±0.6 e=0.18	39±4.8 e=1.5	15.6±3.6 e=1.1	4.4±0.9 e=0.28 n.s.	5.4±0.8 e=0.25	4.6±0.5 e=0.15	12.4±2.2 e=0.69
LH	8±0.8 e=0.25***	92±0.76 e=0.24***	7.5±0.8 e=0.25***	0.50±0.18 e=0.056***	12±2.7 e=0.85***	37±5 e=1.58***	4.6±1.5 e=0.47 n.s.	16.2±3 e=0.95***	22.2±4.2 e=1.3***	5.7±1.1 e=0.34

Los valores son expresados con la media ± error estándar. Significancia estadística: control vs LH, *** P < 0.001; n.s. = no significancia; n = 10 animales por grupo.

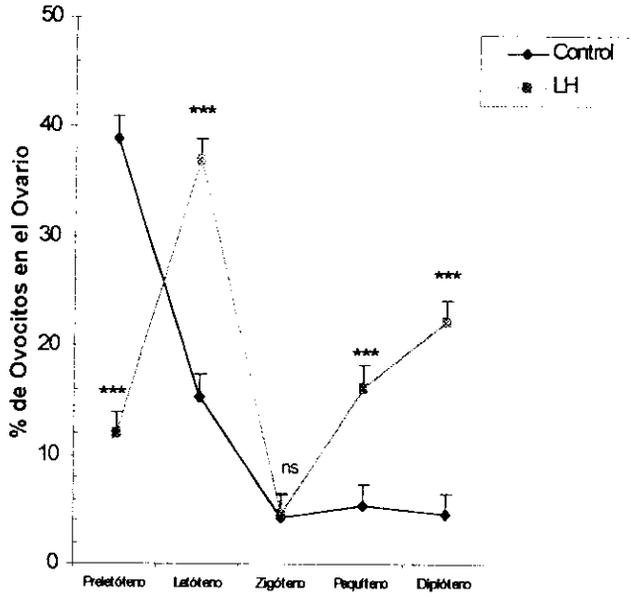


Figura 3

Porcentaje del número total de ovocitos en las distintas fases de la profase meiótica en el ovario de pollos recién nacidos tratados con LH.

Los datos representan la media \pm E. S. Significancia estadística: Control vs LH, *** $P < 0.001$, n. s. = no significativo

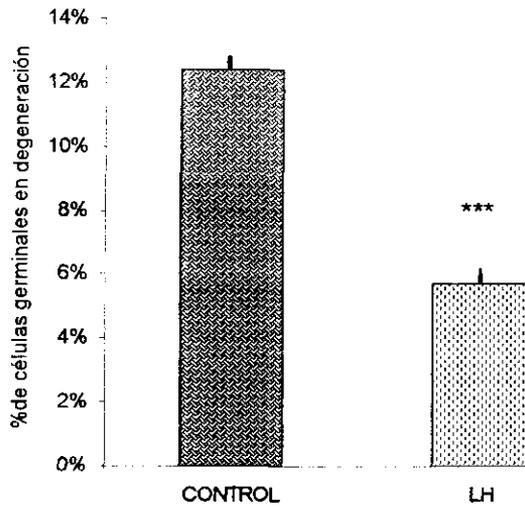


Figura 4

Porcentaje del número de células germinales en degeneración en el ovario de pollos recién nacidos tratados con L. H. Significancia estadística: Control vs L.H., *** $P < 0.001$.

DISCUSIÓN

Existen pocas evidencias sobre el mecanismo por el cual las hormonas regulan la proliferación ovogonial y la regulación de la profase meiótica en las aves, debido a que estos eventos se realizan durante el desarrollo embrionario (González Morán, 1998).

Algunos trabajos como los de Scaba y colaboradores en 1980, en los que reportaron un aumento de ovocitos en los ovarios tratados con la combinación de LH + FSH y González Morán en 1998 encontró que la FSH propicia la proliferación ovogonial y el retraso de la profase meiótica en las células germinales del ovario de pollo recién nacido, tratado en etapa embrionaria, basándose en estos resultados nos propusimos estudiar el efecto de la Hormona Luteinizante sobre la ovogénesis.

La dosis de LH se administró en los días 13, 15 y 17 de edad embrionaria, ya que en esta etapa del embrión de pollo se forma el eje Hipotálamo-Hipófisis-Gónada (día 13.5 machos y día 14.5 hembras), (Woods, 1987).

Se confirma que la ovogénesis en las aves es asincrónica, se observa en el centro de la corteza más ovocitos mientras que en la periferia coexisten con ovogonias. Se obtuvieron diferencias en el conteo de ovogonias y ovocitos en las distintas fases de la profase meiótica en comparación con los resultados de Hughes (1963), estas diferencias pueden deberse a que Hughes utilizó híbridos F_1 de dos cepas y el método de conteo fue diferente.

Hay evidencias de que el ovario de pollo responde *in vivo* a la LH desde el día 7 de incubación con un incremento de testosterona (Rutherford, 1977; Woods y Rutherford, 1977) y la concentración de 17- β -estradiol en el plasma (Woods et al, 1981). Teng y colaboradores (1982), demostraron que el ovario de pollo de 15 días de edad embrionaria tratado con LH estimuló la producción de estradiol y de Testosterona. Mientras que los tratados con FSH presentaron un efecto más bajo, siendo el ovario izquierdo más sensible a la LH y FSH que el ovario derecho. Estos resultados indican que el ovario embrionario responde a la LH.

Se ha reportado que las gonadotropinas y los esteroides gonadales incrementan la división ovogonial en algunos peces, anfibios y reptiles (Jones, 1978). González Morán en 1998, demostró que la FSH incrementa la división ovogonial en aves, y los resultados actuales demostraron que la LH detiene la división ovogonial, disparando la profase meiótica. Ambos resultados indican que aunque la LH y la FSH son hormonas gonadotropicas, presentan efectos distintos sobre la ovogénesis.

Algunos trabajos histomorfométricos sobre el ovario de pollo recién nacido, han demostrado que la FSH induce la división mitótica en las distintas subpoblaciones celulares del ovario de pollo recién nacido, a diferencia de la LH que no induce división mitótica en ninguna población celular del ovario, pero induce una mayor esteroidogénesis y desarrollo ovarico (González, M., y Calderón en 2000). Una respuesta similar se observa en las células germinales tratadas con LH ya que induce una diferenciación más rápida de las ovogonias a ovocitos primarios.

Sobre los factores que inician la profase meiótica se han trabajado principalmente en mamíferos, proponiendo que el inicio de la profase meiótica es dependiente del *rete ovarii* (Byskov, 1975) y de la acción de sustancias difundibles, secretadas por los mesonefros (MIS y MPS).

La época en que se realiza la meiosis en las hembras depende de las especies. Al estudiar la regulación de la meiosis Byskov (1993), propuso dos modelos diferentes, dependiendo de si las células germinales experimentan inmediatamente la meiosis sin la producción previa de esteroides, relacionando así los niveles de estradiol, ya que para el inicio de la meiosis se necesita un bajo contenido de estradiol, o el retraso de la meiosis acompañada por la secreción de esteroides y de las sustancias preventivas de la meiosis.

Los resultados demostraron que la LH acelera el inicio de la profase meiótica, posiblemente por cambios a nivel de hormonas esteroides y/o otros factores que pueden actuar sobre las células germinales, posiblemente se inhibe la actividad de factores mitigénicos como (EFG) y (FGF) u otros, inhibiendo la actividad ovogonial y activando la profase meiótica.

Se conoce que muchas células germinales degeneran durante el curso del desarrollo, siendo un evento normal. Gonzáles Morán en 1983, demostró que la hCG en el ovario de pollos recién nacidos induce una disminución de células en degeneración en la médula ovárica. En el presente trabajo se encontró que la LH al inducir la entrada de ovogonias a la profase meiótica, también disminuye el número de células germinales en degeneración en comparación a los ovarios controles.

Con base a estos resultados se puede afirmar que la LH y FSH presentan efectos diferenciales sobre la ovogénesis.

Conclusión

Se concluye que la administración de Hormona Luteinizante durante el desarrollo embrionario, propicia un microambiente adecuado para detener la división mitótica de las ovogonias e inducir una diferenciación más rápida de las ovogonias a ovocitos primarios, favoreciendo así, a las células germinales para entrar a la profase meiótica.

BILBIOGRAFÍA

- Alamargot, J. 1982. *Manual de Anatomía y de Necropsias de las aves*. Ed. Continental. México.
- Austin C. y Short. R. 1982. *Procesos de Reproducción en los mamíferos. Hormonas en la reproducción*. La Prensa Médica Mexicana, México.
- 1982. *Células germinales y Fertilización*. La prensa Médica Mexicana, México.
- 1982. *Hormonas en la reproducción*. La prensa Médica Mexicana, México.
- Akram, H and Weniger, J.P. 1974. *L'hypophyse est sans influence sur la synthèse d'oestrogènes chez l'embryon de Poulet*. C.R. Acad. Sci. Ser. D, 278;2669-2670.
- Albert, B. Bray, D. Lewis, J. Raff, M. Roberts, K. Watson, D. J. 1996. *Biología molecular de la célula*. Ed. Omega. Barcelona. España.
- Avers, J. C., 1991. *Biología celular*. Grupo editorial Iberoamérica, México.
- Baker, T.G. 1963. *A quantitative and cytological study of ger cells in human ovaries*. Pro. Soc. B. (IN the press).
- Balinsky, I. B., 1983. *Introducción a la embriología*. Ed. Omega, Barcelona.
- Banks, J. W., 1986. *Histología veterinaria aplicada*. Ed. El Manual Moderno, México.
- Bearden, J. H. y Fuquay, W. J., 1982. *Reproducción animal aplicada*. Ed. El Manual Moderno, México.
- Beaumont, M.H. y Mandl, M.A., 1962. *A quantitative and cytological study of oogonia and Oocytes in the foetal and neonatal rat*. In Proc. Roy. Soc. B, 155, 557-579.
- Borum Kirstine, 1961. *Oogénesis in the mouse a study of the meiotic prophase*. In Exp. Cell Res. 24, 195-507.
- Byskov, G.A. 1978. *Regulation of initiation of meiosis in fetal gonads*. Inter. J. Androl. 2:S 29-38.
- Byskov, G. A.. 1979. *Ovarian follicular. Development and function*. A.R. Midgley and W.A. Sadler. Raven Press, New York.
- Byskov, G.A. 1993. C..Molec. Reprod. Dev. 34,47-52.
- Calderon, B. S.G. 1998. *Efecto de la Hormona Gonadotropina Coriónica humana, sobre las distintas subpoblaciones celulares del ovario prefolicular de Gallus domésticus*. Tesis, UNAM.

- Castelló, L.J.A., Lleonart, Roca F. Campo, C.J.L., Orozco, P.F. 1989. *Biología de la Gallina*. Caixa, Barcelona. España.
- Cedard, L., Haffen, K and Guichard, A. 1968. *Influence de l'hormone gonadotrope chorionique sur la production d'oestrogènes á partir d'acétate de Na et de dehydroépiandrosterone radio-actifs per les gonades embryonnaires de Poulet cultivées in vitro*. C. R. Acad. Sci. Paris Ser. D 267, 118-120.
- Cole, H. y Cupps, P. 1959. *Reproduction in domestic animals II*. Academic Press, New York.
- Cole, H. y Cupps, P., 1962. *Reproducción de los animales domésticos*. Ed. Acribia, España.
- Cooke, D.; Crowe, M.; Roche, J. y Headon, D. 1996. *Gonadotrophin heterogeneity it's rol in farm animal reproduction*. Anim. Rep. Sci., 41, 77-99.
- Crawford, R. 1990. *Poultry Breeding and Genetics*. In Elsevier, Amsterdam.
- Csaba, G, Shahin, M:A: and Dobozy, O. 1980. *The overlapping effect of gonadotropins and TSH on embryonic chicken gonads*. Archives D' Anatomie, D' Histologie et D' Embryologie. Norm. Et exp. 63;31-38.
- Cunningham, J. 1992. *Fisiología veterinaria*. Interamericana - Mc Graw - Hill, México
- Daikoku, S.; Ikeuchi, C. y Nakagawa, H. 1974. *Development of the hipothalamohypophyseal unit in the chick*. In Gen. Comp. Endocrinol. 23, 256-275.
- Darnell, J.; Lodish, H. y Baltimore, D. 1991. *Biología celular y molecular*. Editorial Labor, México.
- De Alba, J. 1985. *Reproducción Animal*. Ed. La Prensa Médica Mexicana.
- D'Hollander, F. 1904. *Recherches sur l'oogenése et sur la structure et la signification du noyau vitellin de Balbianichez les oiseaux*. Arch. Anat. Mier. 7, 117-80.
- Dollander, A. y Fenart, R. 1992. *Elementos de embriología. Embriología general*. Editorial Limusa, México.
- Doskocil, M. 1970. *Development of the chick hipophysis*. In Act. Univ. Carol. (Med. Praha).
- Dubois, R. 1968. *Sur l'aspect ultrastructural et histochimique des cellules germinales de l'embryon de Poulet*. Ann. Histochim. 13: 33-50.
- Ede, D. 1975. *Anatomía de las Aves*. Acribia, Zaragoza, España.

- Firket, J. 1914. *Recherches sur l'organogenèse des glandes sexuelles chez les oiseaux*. Arch. Biol., Paris et Liège, 29, 201-351.
- Follett, B. K. 1984. Birds. In: Lamming G E, Ed. *Marshall's Physiology of Reproduction: Reproductive Cycles of Vertebrates*, New York; Churchill Livingstone, 283-350.
- Franch, L.L., Mandl, A.M & Zuckerman, S. 1962. *The development off the ovary and the process of oogenesis*. In: the Ovary, pp. 1-88. London: Academic Press, Inc.
- Fritts-Williams, M. L and Meyer, D.B. 1972. *Isolation and culture of homogeneous populations of primordial germ cells en chik*. Exp. Cell. Res. 75: 512-514.
- Fugo, N. 1940. *Effects of hypophysectomy in the chick embryo*. In J. Exp. Zool.
- Galli, F. E and Wassermann, G.F. 1973. *Steroid biosynthesis by gonads of 7 and 10 day-old chick embryos*. Gen. Com. Endocrinol. 21, 77-83.
- Gasc, J. y Sar, M. 1981. *Appearance of LH - immunoreactive cells in the Rathke's pouch of the chicken embryo*. In Differentia, 20, 77-80.
- Geneser, F. 1993. *Histología*. Editorial Médica Panamericana, México.
- George, F. W., Simpson, E. R., Milewich, L. And Wilson, L.D. 1979. *Studies on the regulation of the steroid hormone biosynthesis in fetal rabbit gonads*. Endocrinology. 105, 1100-1106.
- Gilbert, A. 1971. *The ovary*. In: Physiology an Biochemistry of the Domestic Fowl. Vol 3. D.J. Bell y B.M. Freeman. Academic Press. London.
- 1969, *Innervation of the ovary of the domestic hen*. In Q. J. Exp. Physiol. 54, 404.
- Gilbert, F.S. 1988. *Biología del desarrollo*. Omega, Barcelona
- Goldsmith, J.B. 1928. *The history of the germ cells in the domestic fowl*. J. Morph. 46, 275-315.
- González, B.C., Cantore, M.L., Lantos, C.P and Passeron, S. 1990. *Cyclic AMP as an intracellular messenger of gonadotrophin-induced steroidogenesis during the development of the embryonic chick ovary*. Com. Biochem. Physiol. 96(B): 53-57.
- González, B. C.; Cantore, L. M.; and Passeron, S., 1994. *Steroidogenesis in immature chicken ovary hormonal stimulation of adenylyl cyclase sistem by leteinizing hormone and β - Adrenergic agonists*. Cell. Biol. Int. vol, 18, No. 2
- González, B. C.; Charreau, H. E.; Aragonés, A.; Lantos, C. P. and Follett, K. B., 1987. *The Ontogenesis of Reproductive hormones in the female embryo of the domestic fowl*. Gen. Comp. Endocrinol. 68, 369-374.
- González - Morán, G. 1998. *Effect of follicle - stimulating hormone on different cell sub - populations in the ovary of newly hatched chicks treated during embryonic development*. In British Poultry Science, 39, 128-132.

- González – Morán, G.; González del Pliego, M, y Pedernera, E., 1985. *Morfological changes in the ovary of newly hatched chickens treated with chorionic gonadotropic during embryonic development.* Gen. Comp. Endocrinol 59, 162-167.
- González – Morán, G., y Calderón, B. S. G, 2000. *Effect of luteinizing hormone in vivo on ovarian cell subpopulations of newly-hatched chicks.* In British Poultry Science. *In press.*
- Guémené, D., Williams, J.B.1992. *In-vitro and in-vivo responses to chicken LHRH-I and chicken-LHRH-II in male turkeys(Melengris gallopavo).* J. Endocrinol,132:387-393.
- Guichard, A., Cedard, L and Haffen, K.1973. *Aspect comparatif de la synthèse de stéroïdes sexuels par les gonades embryonnaires de poulet á différents stades du développement(étude en culture organotypique á partir de précurseurs radioactifs).* Gen. Comp. Endocrinol. 20,16-18.
- Guichard, A., Cedard, L. Mignot, Th-M., Sheib, D and Haffen, K.1977. *Radioimmunoassay of steroids produced by cultured chick embryonic gonads: differences according to age, sex and size.* Gen. Comp. Endocrinol.32,255-265.
- Guichard,A., Haffen, K., Cedard, L., Mignot, Th-M., and Sheib, D. 1979. *Effects of hGC and of season on in-vitro steroidogenesis by 18-day chick embryo gonads.* Ann. Biol. Anim. Biochem. Biophys. 19(4B),1317-1325.
- Guichard, A., Scheib, D., Haffen, K., and Cedard, L. 1977. *Radioimmunoassay of steroid hormones produced by embryonic chick gonads during organ culture.* J. Steroid. Biochem.8,599-602.
- Ham, C., 1988. *Histología.* El Manual Moderno, México.
- Hardy, R. 1992. *Fisiología del Sistema Endócrino.* El Manual Moderno, México.
- Hughes, C. y Gillian, 1963. *The population of germ Cells in the developing female chick,* in J. Embryol. Exp. Morph., Vol. II, part. 3, 513-536.
- Huettner, A. 1958. *Fundamentals of comparative Embryology of the vertebrates.* The Mc Millan Company, New York.
- Johnson, A. 1986. *Reproduction in the female.* In: *Avian Physiology.* Ed. P. Stukie. New York
- Johnson, A. L., 1990. *Steroidogenesis and Actions of steroids in the hen ovary.* Critical. Reviews in Poultry Biology. Index, vol. 2.23-30.

- Johnson, A.; Bridgham, J.; Wagner, B., 1996. *Characterization of a chicken luteinizing hormone receptor (cLH-R) complementary deoxyribonucleic acid, and expression of cLH-R messenger ribonucleic acid in the ovary.* Biol. Reprod. 55, 304-309.
- Jones, R. 1978. *The vertebrate ovary.* Plenum Press, New York.
- Jones, R, 1979. *The vertebrate ovary.* In Comparative Biology and Evolution. Plenum Press. New York.
- King, S.A., 1984. *Birds, their structure and function.* Pitman Press. Bath Great Britain.
- Krishnan, K.; Proudman, J. y Bahr, J. 1994. *Purification and partial characterization of isoforms of luteinizing hormone from the chicken pituitary gland.* In Comp. Biochem. Physiol. Vol 108 B. 2,253-264.
- Leeson, R. C. 1987. *Histología.* Ed. Interamericana. México.
- Licht, P., Papkoff, H., Farmer, S. W., Muller, C. H., Tsui, H.W., and Crews, D. 1977. *Evolution of gonadotropin structure and function.* Rec. Prog. Horm. Res. 33, 169-243.
- Lofts, B.J.; Murton, R. 1973. *Reproduction in birds.* In: Avian Biology III. D. Farner y J. King. Academic Press. New York.
- Marza V. D. & Mrza, E. U. 1935. *The formation of the hen's egg.* Q. Jl microsc. Sci. 78, 134-189.
- Matsumoto, T. 1932. *On the early localisation and history of the so-called primordial ger cells in the chick embryo (preliminary report).* Sci. Rep. Toh. Univ. Biol. 7: 89-127.
- Maung, Z. W., and Follett, B. K. 1977. *Effects of chicken and ovine luteinizing hormone on androgen release and cyclic AMP production by isolated cells from the quail testes.* Gen. Comp. Endocrinol. 33,242-253.
- McDonald, L. y Pineda, M. 1991. *Endocrinología Veterinaria y Reproducción.* McGraw-Hill México.
- Merchant, H. 1991. *Tópicos selectos de biología de la reproducción.* Porrúa - UNAM. México.
- Mikami, S.; Hashikawa, T. y Farner, D. 1973. *Cytodifferentiation of the adenohipofysis of the domestic fowl.* In Z. Zellforsch. Midroschk, Anat.
- Millam, J. R, Faris, P.L., Youngren, O. M. El Halawani, M. E, Hartman, B. K. 1993. *Immunohistochemical localization of chicken gonadotrophin-releasing hormones I and II (cGnRH-I and II) in turkey hen brain.* J. Comp. Neurol. 333, 68-82.
- Muller, U., Engel, W., and Siebers, J. W. 1979. *LH/hCG receptors of the ovary during early postnatal development.* Ann. Biol. Anim. Biochim. Biophys. 19,1363-1367.

- Muniesa P. and Dominguez, L., 1990. *A morphological study of primordial germ cell at Pregastrular stages in the chick embryo. In Cell. Diff. Devel.* 31, 105-117.
- Nalbandov, V. A. 1969. *Fisiología de la Reproducción*. Ed. Acribia Zaragoza, España.
- Ohno, S. 1961. *Sex chromosomes and microchromosomes of Gallus domesticus. Chromosoma*, 11, 484-98.
- Pasteels, J. 1953. *Contributions à l'étude du développement des Reptiles: L'origine et migration des gonocytes chez deux Lacertiliens (Mabuiva megatura et chamaeleo bitaeniatus)*. Arch. Biol. Paris. 44; 227-245.
- Patten, W. 1990. *Embriología*. Ed. El Ateneo. Buenos Aires.
- Pearson, R. 1972. *The Avian Biology*. Academic Press. New York.
- Pisano, A., and Burgos, M. H. 1971. *Response of immature gonads of Ceratophrys ornata to FSH. Gen. Comp. Endocrinol.* 16, 176-182.
- Qichang, L.B.; Alston – Mills; and Ottinger, A.M., 1991. *Avian L.H. R.H. during Embryonic Development: measurement by competitive Elisa with a monoclonal Antibody. In Gen Comp. Endocrinol.* 82, 444-450.
- Rutherford, J. E. 1977. *Establishment of the adenohipofyseal. Testicular Axis in the chick embryo. II. Plasma testosterone levels. MS Thesis, De Paul. University, Chicago, IL.*
- Ruiz, M. 1988. *Fundamentos de embriología y fisiología de la reproducción*. Recopilación UNAM, México.
- Sauver, B. 1992. *Reproducción de las Aves*. Ediciones Mundi, Prensa, Madrid, España.
- Siebers, J. W., Peters, F., Zenzes, M. T., Schmidtke, J., and Engel, W. 1977. *Binding of human chorionic gonadotropin to rat ovary during development. J. Endocrinol.* 73, 491-496.
- Sharp, J. P., Dunn, I. C., Talbot, R. T. 1987. *Sex differences in the Lh responses to chicken LHRH-I and II in the domestic fowl. J. Endocrinol.* 115: 323-31.
- Sharp, J.P.; Dawson, A.; Lea, W.R., 1998. *Control of luteinizing hormone and prolactin secretion in birds. In Comp. Bio. Phys. Part C.* 119, 275-282.
- Sharp, J.P., Talbot, R. T., Main, G. M., Dunn, I. C. Fraser, H. M., Huskinsson, N. S. 1990. *Physiological roles of chicken LHRH-I and-II in the control of gonadotrophin release in the domestic chicken. J. Endocrinol.* 24: 291-9.

- Smidt, D. y Ellendorff, F. 1972. Endocrinología y Fisiología de la Reproducción de los animales zootécnicos. Acribia, Zaragoza, España.
- Sturkie, P. 1965. *Fisiología Aviar*. Acribia, Zaragoza, España.
- Sturkie, et al., 1986. *Avian Physiology*. Springer Verlag, New York.
- Stritesky, J. y Rychter, Z. 1977. *Contribution to the problem of the vascularization of the hypophysis cerebri in the chick embryo*. In Pros. XIXth. Morphol. Cong. Folia. Morphol. 25, 324-328.
- Swift, C. H. 1914. *Origin and early history of the primordial germ cells in the chick*. Am. J. Anat. 15, 483-516.
- Teng, C. T., and Teng, C. S. 1977. *Studies on sex organ development. The hormonal regulation of steroideogenesis and cyclic 3',5'-adenosine monophosphate in embryonic chick ovary*. Biochem. J. 162, 123-134.
- Teng, C., y Teng, C., 1979. *Studies on sex organ development: separation and culture of steoid - producing cells from growing and regressing embryonic ovaries*. In Gen. Comp. Endocrinol. 104, 1337-1343.
- Teng, C. y Teng, C.; Bousfield, G; Lui, W. y Ward, D., 1982. *Differential response of Growing and regressing chicken ovaries to gonadotropic hormones*. In Gen. Comp. Endocrinol. 48, 325-332.
- Thommes, R. y Russo, R. 1959. *Vasculogenesis in the adenohipophysus of the developing chicken embryo*. In Growth. 23, 205-219.
- Torkaz, Richard, 1978. *Oogonial proliferation, oogenesis and folliculogenesis in nonmammalian vertebrates*. In: *The vertebrate ovary*. Plenum Press, New York.
- Tribe, M. & Brambell, F. W. R. 1932. *The origen and migration of the primordial germ cells of Sphenodon punctatus*. Quart. J. Micr. Sci. 75, 251-82.
- Ukeshima, A., and Fujimoto, T. 1991. *Afine Morphological Study of Germ Cells in Asymmetrically Developing Right and Left Ovaries of the Chick*. Anat. Rec. 230, 378-386.
- Van Blerkom, J. 1984. *Ultraestructure of Reproduction: Gametogenesis, Fertilization and Embryogenesis*. Martinus Nijhoff Publilers, Boston.
- Van Tienhoven, A. 1959. *Reproduction in the domestic fowl. Physiology of the female*. In Reproduction in the domestic animals. H. Cole y P. Cupps. Academic Press. New York.
- Vogel, N. 1957. *Free tissue cholesterol and growth in chick embryos hypophysectomized by decapitation*. In Anat. Rec. 127, 382.

- Wallack, P. 1987. Fundamentals of Receptor Molecular Biology. Marcel. Dekker, New York.
- Wells, J. y Gilbert, A. 1984. *Ovarian steroid hormone reproduction*. In: Physiology and Biochemistry of the Domestic. Vol 5. B. Freeman. Academic Press. London.
- Willer B. 1955. *Ontogeny of endocrine correlation*. In: Analysis of Development. Eds. B. Willer, P. Weissy V. Hamburger. Saunders . Philadelphia .
- Winiwarter, H. De. 1901. *Recherches sur l'ovogenèse et l'organogenèse de l'ovaire des mammifères (lapin et homme)*. Arch. Biol., Paris et Liège, 17, 33-199.
- Woods, J. 1987. *Maturation of the hypothalamo - Adenohypophyseal - Gonadal (HAG) axes in the chick embryo*. In J. Exp. Zool. (Supplement), 1, 265-271.
- Woods, J. E., and Brazzill, D. M. 1981. *Plasma 17- β -estradiol levels in the chick embryo*. Gen. Comp. Endocrinol. 44, 37-43.
- Woods, J. E., and Erton, I. H. 1978. *The synthesis of estrogens in the gonads of the chick embryo*. Gen. Comp. Endocrinol. 36, 360-370.
- Woods, J.; Hopkins, W.; Caliendo, J.; Sorrentino, M.; Martens, J. y Thommes, R. 1985. *Ontogenesis pars distalis of the chick embryo*. In Current trends in comparative endocrinology. Ed. B. Lofts y W. Holmes.
- Woods, J.; Mennella, A. J. y Thommes, C. R., 1981. *The hypothalamic - Adenohypophyseal - Gonadal Axes in the developing chick embryo. I L.H. sensitivity*. In Gen. Comp. Endocrinol. 45, 66-73.
- Woods, J. E., and Podczaski, E. S. 1974. *Androgen synthesis in the gonads of the chick embryo*. Gen. Comp. Endocrinol. 24, 431-423.
- Woods, J.; Podczaski, E.; Erton, L.; Rutherford, J. y McCarter, C., 1977. *Establishment of the adenohypophyseal - testicular axis in the chick embryo. I. Testicular androgen levels*. In Gen. Comp. Endocrinol. 32, 390-394
- Woods, J. E. , and Rutherford. 1977. *Establishment of the adenohypophyseal- testicular axis in the chick embryo*. Am. Zool., 17: 229.
- Woods, J.; Scanes, C.; Seeley, M.; Cozzi, P.; Onyeise, F. y Thommes, R. 1989. *Plasma LH and gonadal LH - binding cells in normal and surgically decapitated chick embryos*. In Gen. Comp. Endocrinol. 74, 1-13.
- Woods, J. E., and Thomes, R. C. 1984. *Ontogeny of hypothalamo-adenohypophyseal-gonadal (HAG) interrelationships in the chick embryo*. J. Exp. Zool. 232, 435-441.

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

Zakaria, A. H., Sakai, H. Imai, K. 1984. Time of follicular transformation to the rapid growth phase in relation to the ovulatory cycle of laying hens. Poult. Sci. 63: 1061-63.