



Facultad de Medicina



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE MEDICINA
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS**

**“PARTICIPACIÓN DE LA HORMONA FOLÍCULO ESTIMULANTE EN LA
PROLIFERACIÓN DE LAS CÉLULAS SOMÁTICAS Y LAS CÉLULAS
GERMINALES DURANTE EL DESARROLLO DEL OVARIO EN
EL EMBRIÓN DE POLLO”**

**TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
DOCTORA EN CIENCIAS**

P R E S E N T A

M. en I.B.B. María Guadalupe Sánchez Bringas

Director de Tesis: Dr. Enrique Pedernera Astegiano

MÉXICO D.F.

2007



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

**A Luis Manuel y a Jimena por impulsar
mi crecimiento a través de la confianza,
el amor y sobre todo la paciencia**

AGRADECIMIENTOS

Esta tesis se realizó bajo la dirección del Dr. Enrique Pedernera Astegiano a quien expreso mi profundo agradecimiento por su invaluable apoyo y asesoría.

A los otros miembros del comité tutorial, la Dra. Irma Villalpando Fierro y el Dr. Marco Antonio Juárez Oropeza por sus acertadas contribuciones en esta investigación.

A los Doctores Gonzalo Martínez de la Escalera, Marco Antonio Cerbón Cervantes, Norma Moreno Mendoza y Fernando Larrea Gallo quienes gentilmente realizaron la revisión de este trabajo.

A la Dra. Carmen Méndez Herrera un agradecimiento especial por sus aportaciones en esta investigación, en especial en el desarrollo de la técnica de RT-PCR en tiempo real.

A los Doctores Bertha Chávez y Felipe Vilchis por el apoyo en la realización de los experimentos de RT-PCR en tiempo real.

A la QFB Carmen Mondragón, por su asesoría en los experimentos de inmunohistoquímica; al Méd. Cir. Ricardo Escamilla y al estudiante Oscar Salazar por el apoyo en el desarrollo de los cultivos. A la Sra. Celia Villena por su ayuda en la preparación del material biológico e instrumental.

A la Dra. Lucía Rangel, a la MC MVZ Susana Rojas Maya y a la MC MVZ Ana Delia Rodríguez Cortez por su amable asesoría, supervisión y por el apoyo con la infraestructura para los experimentos de ELISA.

A la Facultad de Medicina y en especial al Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas por todas las facilidades que me brindaron durante mi formación.

Al CONACYT por otorgarme la beca para realizar mis estudios de Doctorado y por financiar parcialmente esta investigación con fondos obtenidos del proyecto 45030.

A la D.G.A.P.A. por financiar parcialmente este trabajo con recursos obtenidos del proyecto IN214403.

INDICE

1.	RESUMEN.....	5
2.	INTRODUCCIÓN.....	7
2.1	La hormona folículo estimulante y su receptor.....	7
2.2	La hormona folículo estimulante en mamíferos.....	11
2.3	El eje hipotálamo-hipófisis-ovario.....	12
2.4	El ovario embrionario en las aves.....	13
2.5	El papel de las gonadotropinas en el desarrollo embrionario de pollo.....	14
3.	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	16
4.	HIPÓTESIS.....	17
5.	OBJETIVO GENERAL.....	17
5.1	Objetivos particulares.....	17
6.	MATERIAL Y MÉTODO.....	18
6.1	Reactivos.....	18
6.2	Material biológico.....	19
6.3	Hipofisectomía.....	19
6.4	Tratamiento de embriones hipofisectomizados.....	19
6.5	Suspensión celular.....	20
6.6	Número total de células.....	20
6.7	Incorporación de 5-Bromo-2'-deoxiuridina.....	21
6.7.1	Detección de BrdU por inmunocitoquímica.....	21

6.8	Estudio morfológico.....	22
6.8.1	Preparación de tejido para inmunohistoquímica.....	22
6.8.2	Detección de BrdU por inmunohistoquímica.....	23
6.9	Cultivo de órgano.....	25
6.10	Expresión del mRNA de la subunidad FSH β en la hipófisis de embriones de 7 a 17 días.....	25
6.10.1	Obtención del RNA total.....	25
6.10.2	Obtención del cDNA de la subunidad FSH β de pollo.....	26
6.10.3	Oligonucleótidos y sonda para PCR en tiempo real.....	26
6.10.4	Cuantificación relativa del mRNA de la subunidad FSH β por PCR en tiempo real.....	27
6.11	Actividad biológica de la hipófisis sobre las células del ovario izquierdo del embrión de pollo.....	28
6.12	Curvas de dosis-respuesta de la rhFSH y de la rhCG.....	29
6.13	Cuantificación del 17 β -estradiol.....	30
6.14	Análisis estadístico.....	30
7.	RESULTADOS.....	31
7.1	Efecto de la hipofisectomía sobre la proliferación celular del ovario embrionario de pollo.....	31
7.1.1	Incorporación de BrdU en las células del ovario de embrión de pollo testigo e hipofisectomizado evaluado de los 8 a los 11 días de incubación.....	31
7.1.2	Variaciones de la proliferación celular del ovario izquierdo de embriones de pollo de 9 días.....	31
7.1.3	Cambios en la proliferación del ovario izquierdo embrionario de 9 días en cultivo de órgano.....	35
7.1.4	Consecuencias del tratamiento con las gonadotropinas sobre la proliferación celular del ovario izquierdo de embriones de pollo de 13 días hipofisectomizados.....	37

7.2	Expresión del mRNA de la FSH β en la hipófisis del embrión de pollo.....	42
7.3	Actividad biológica de la hipófisis sobre las células del ovario izquierdo del embrión de 9 días.....	44
7.3.1	Curva de dosis-respuesta para la FSH sobre la biotransformación de 17 β -estradiol por las células del ovario izquierdo de embrión de pollo de 9 días.....	45
7.3.2	Actividad de la hipófisis embrionaria de pollo macho y hembra sobre la biosíntesis de 17 β -estradiol por las células ováricas del embrión de pollo.....	46
8.	DISCUSIÓN.....	51
9.	CONCLUSIONES.....	58
10.	REFERENCIAS.....	59

1. RESUMEN

La hormona foliculo estimulante es esencial para el desarrollo y funcionamiento del aparato reproductor en los mamíferos y las aves. En el ovario de adulto se ha determinado que es un factor fundamental en la proliferación de las células de la granulosa de los folículos antrales y preovulatorios, que regula la expresión de sus propios receptores e induce la expresión de los receptores de la hormona luteinizante y que aumenta la actividad de la p-450 aromatasas en las células de la granulosa. Su importancia en las aves ha sido poco estudiada durante el desarrollo embrionario. El objetivo de este estudio fue demostrar el papel regulador de la hormona foliculo estimulante sobre la proliferación celular del ovario de pollo en etapas tempranas del desarrollo embrionario. Inicialmente se determinó el efecto de la hipofisectomía sobre la proliferación del ovario embrionario de pollo de 8 a 11 días. Posteriormente en el modelo de embriones hipofisectomizados se realizaron dos estrategias experimentales: por un lado, se aplicó el tratamiento con la hormona foliculo estimulante humana recombinante en dosis única a los 8 días de incubación y 24 horas después se estudió la proliferación de las células del ovario, mediante el porcentaje de incorporación de 5-Bromo-2'-deoxiuridina; por otro lado, los embriones hipofisectomizados fueron tratados con la hormona foliculo estimulante humana recombinante y la gonadotropina corionica humana recombinante a los 9 días y la proliferación celular del ovario se analizó a los 13 días de incubación. Estos resultados mostraron que en ausencia de la hipófisis, existe una disminución de la proliferación celular del ovario a los 9 y a los 13 días. Esta disminución se revierte bajo el tratamiento con hormona foliculo estimulante. En embriones de 9 días el efecto de la hipofisectomía se observó en el epitelio superficial del ovario y en las células somáticas de la corteza y de la médula. A los 13 días la hipofisectomía redujo el número de células somáticas, esteroidogénicas y germinales, pero el tratamiento con hormona foliculo estimulante, recuperó la densidad de los tres tipos celulares. En otros experimentos, utilizando la misma metodología, se determinó el efecto de las dos hormonas sobre la proliferación celular del

ovario embrionario de 9 días en cultivo de órgano. Los ovarios se cultivaron por 48 horas en medio libre de suero, con la hormona foliculo estimulante humana recombinante y con la gonadotropina coriónica humana recombinante en grupos independientes; la proliferación celular aumentó bajo el tratamiento con la hormona foliculo estimulante y no con la gonadotropina corionica, comparadas con los grupos testigo. Por lo tanto, la hormona foliculo estimulante estimula la proliferación de las células somáticas en el ovario embrionario de pollo desde los 9 días. Por otro lado, mediante la reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa reversa en tiempo real se determinó la expresión del mensajero de la subunidad beta de la hormona foliculo estimulante, en la hipófisis de embriones de pollo machos y hembras de 7 a 17 días y se observó que el mensajero se expresa en niveles más altos en la hipófisis del macho que en la hembra, alcanzando su máxima expresión a los 13 y 14 días de incubación. Por otra parte, se realizó un co-cultivo de células de hipófisis embrionaria de pollo de machos y hembras, por separado, de 8 a 17 días, con células de ovario de embriones de 9 días de la misma especie. Los co-cultivos se mantuvieron por 60 horas y se cuantificó la concentración de 17 beta-estradiol en el medio por ELISA. La bioactividad de la adenohipófisis embrionaria de pollo mostró un patrón similar en ambos sexos observándose su inicio a partir de los 9 días de incubación, sin embargo, la hipófisis del macho ejerció un mayor estímulo sobre las células del ovario para la secreción de 17-beta estradiol. Estos resultados permiten proponer que la adenohipófisis comienza a secretar la hormona foliculo estimulante a partir de los nueve días de incubación y que a partir de esta edad, es uno de los factores que regulan el crecimiento del ovario en el embrión de pollo y que posiblemente participe en el inicio del crecimiento testicular que se observa a partir de los 13 días en el embrión de pollo.

2. INTRODUCCIÓN

Las gonadotropinas hipofisarias, la hormona folículo estimulante (FSH) y la hormona luteinizante (LH) son fundamentales en la maduración del folículo en el ovario. Los mecanismos fisiológicos involucrados en este proceso han sido ampliamente estudiados en mamíferos, principalmente en la etapa adulta, después del establecimiento del eje hipotálamo-hipófisis-gónada. En las aves, el desarrollo del sistema reproductor inicia con la diferenciación de las gónadas, aproximadamente a los 6.5 días de incubación (d.i.) (Villalpando y col, 2000), a los 13.5 días del desarrollo se establece el eje hipotálamo-hipófisis-gónada y hay evidencia de la regulación de la función gonadal por las hormonas gonadotropinas hipofisarias (Woods, y Thommes, 1984). El objetivo de esta tesis es analizar la participación de la FSH como la principal gonadotropina hipofisaria en regular la proliferación celular en el ovario del de pollo en etapa embrionaria.

2.1 La hormona folículo estimulante y su receptor

La FSH junto con la LH y la hormona tirotrópica (TSH) integran la familia de hormonas glicoprotéicas hipofisarias, la gonadotropina coriónica (CG) también pertenece a esta familia, sin embargo, es producida por el trofoblasto. Se encuentran constituidas por dos subunidades, α y β , asociadas de forma no covalente. La primera subunidad es común para los miembros de la familia y se ha propuesto que es codificada por un solo gen, mientras que la subunidad β se origina de genes separados y confiere la actividad específica de cada hormona, sin embargo, se requiere de las dos subunidades para entrar en contacto con el receptor (Ulloa-Aguirre y Timossi, 1998; Vassart y col, 2004). El gen de la subunidad FSH β del pollo consta de 2457 pares de bases (pb) de las cuales 44 constituyen una región no traducida (UTR) en el extremo 5'; 396 pb forman el marco de lectura abierto y 2001 pb integran el UTR en el extremo 3', seguido por una secuencia de poliadenilación. Estas regiones constituyen la molécula precursora de 131 aminoácidos, con un

péptido señal de 20 aminoácidos; la proteína madura, se encuentra constituida por 111 aminoácidos. Presenta 12 residuos de cisteína, los cuales forman puentes disulfuro hacia el interior de la molécula y dos sitios de glicosilación unidos a asparagina. Asimismo, presenta cuatro residuos de prolina aparentemente responsables de la dirección de la estructura de la proteína. La homología de la subunidad β de la FSH de pollo es de 37% con la LH y de 40% con la TSH (Shen y Yu, 2002).

La glicosilación de las subunidades de la FSH, como del resto de las glicoproteínas, ocurre como un proceso postraducciona. Los grupos de azúcares más importantes presentes en la FSH incluyen N-acetilglucosamina, manosa, galactosa, fucosa, glucosamina y ácido siálico. Estas moléculas se unen a la asparagina o con ligaduras N; cada oligosacárido se encuentra dividido en ramas bicatenarias o tricatenarias que finalizan principalmente en ácido siálico y fucosa o galactosa. La combinación de carbohidratos presentes en la hormona es fundamental para determinar la afinidad de unión al receptor y la capacidad de activarlo y dirigir de modo eficiente la señalización intracelular (Baenziger, 1996; Ulloa-Aguirre y col, 2003).

En el humano se ha demostrado que existen siete isoformas de la FSH cuya diferencia depende de la glicosilación de la hormona, lo que a su vez incide en la carga eléctrica de la molécula, en la estructura de los carbohidratos y en la actividad biológica. Las formas menos acídicas, con menos residuos de ácido siálico estimulan un aumento en la liberación de 3'5'-fosfato cíclico de adenosina (cAMP), mayor actividad de la enzima P-450 aromatasa y una mayor expresión de ácido ribonucleico mensajero (mRNA) en las células de la granulosa de rata, en cultivo. Las formas más acídicas, con mayor cantidad de ácido siálico, causan una mayor expresión de la subunidad α de la inhibina "in vivo"; además, se ha observado que las isoformas más acídicas tienen una vida media mayor que las menos acídicas (Ulloa-Aguirre y col, 2003).

La FSH tiene como células blanco a las células de la granulosa en el ovario y a las células de Sertoli en el testículo; como el resto de las hormonas glicoprotéicas, actúa a través de receptores específicos acoplados a proteínas G (GPCR's) presentes en la superficie de las membranas plasmáticas, los cuales pertenecen a la subfamilia de GPCR's con alto contenido de

repeticiones ricas en leucinas (LRR's). La disposición del receptor en la membrana da lugar a un dominio extracelular, portador del extremo amino terminal y a uno intracelular, el cual contiene al extremo carboxilo terminal. La secuencia del ácido desoxirribonucleico complementario (cDNA) para el receptor de la FSH (FSHR) de pollo muestra un marco de lectura abierto de 2079 pb, en donde se incluye un fragmento de 51 pb que codifica para el péptido señal putativo, 1047 pb que equivalen al dominio extracelular, 792 pb codifican para la región transmembranal y 189 pb corresponden a la región intracelular. La secuencia traducida codifica un total de 693 aminoácidos, de los cuales, los primeros 17 corresponden al péptido señal y la proteína madura consiste de 676 aminoácidos, la cual es similar en tamaño a las secuencias de rata y bovino (You y col, 1996). El dominio extracelular es el responsable de la especificidad y de la alta afinidad de unión al ligando (Fan y Hendrickson, 2005). En el pollo esta región consiste de 349 aminoácidos, tiene 3 sitios potenciales de glicosilación en ligadura N y un total de 11 residuos de cisteínas; se ha propuesto que los residuos de cisteínas se requieren para que se mantenga la estructura terciaria (Dohlman y col, 1991). Las repeticiones ricas en cisteínas a su vez flanquean regiones ricas en leucinas. Estudios "in vitro" del complejo FSH-receptor de humano han demostrado que las LRR's junto con las cisteínas, corresponden al dominio de unión de la hormona. Este dominio presenta una superficie interna cóncava con láminas β plegadas, y un núcleo hidrofóbico que además de leucinas, contiene otros residuos hidrofóbicos. Las repeticiones de leucinas son altamente irregulares en longitud y conformación, particularmente en la superficie externa, la cual es convexa, con una estructura regular limitada a siete hebras β , dispuestas en tres láminas. La porción carboxilo terminal del dominio de unión presenta una forma similar a una herradura, por la presencia de leucinas; mientras que la región amino terminal es plana, debido a la presencia de estructuras β plegadas, (Fan y Hendrickson, 2005).

El establecimiento del complejo consiste en la unión de la FSH a la superficie cóncava del receptor; el eje longitudinal de la FSH queda perpendicular al receptor y, por lo tanto, queda alineada y paralela a las hebras

β , siendo sólo las asas del extremo carboxilo terminal, las que entran en contacto con la hormona. El receptor envuelve la región media de la FSH y las asas α L2 y β L2 interactúan con la región N-terminal de las dos subunidades de la hormona. La orientación de la hormona lleva a que las asas β L1 y β L3 se extiendan hacia fuera desde las puntas del extremo carboxilo terminal de la hoja interna del receptor, mientras que las asas α L1 y α L3 surgen de la base (Fan y Hendrickson, 2005). De las tres regiones que constituyen al receptor de la FSH, la región transmembranal es la que presenta mayor homología con el receptor de la LH y de la TSH de pollo y de mamíferos (Vassart y col, 2004). En el pollo esta región está integrada por 264 aminoácidos; las asas intracelulares entre los segmentos transmembranales (I-II), (III-IV) y (V-VI) contienen múltiples residuos de tirosina, serina y treonina que representan sitios potenciales para la fosforilación. Se ha planteado la presencia de dos sitios dentro del dominio transmembranal, la treonina en posición 555 (Thr⁵⁵⁵) y la serina en posición 596 (Ser⁵⁹⁶), que representan sitios consenso para la fosforilación de la cinasa C de proteínas (PKC); en este dominio se localizan nueve residuos de cisteínas, y un sitio de glicosilación ligado a N en la asparagina en posición 380 (Asn³⁸⁰).

El dominio intracelular del FSHR de pollo consiste en 63 aminoácidos, incluye sitios potenciales para la fosforilación de la PKC en la Thr⁶³² y de la cinasa A de proteínas (PKA) en la Thr⁶⁵⁸ (You y col, 1996). De este dominio, las regiones más cercanas a la membrana, en particular las asas 2, 3 y algunas regiones específicas del extremo intracelular de las asas transmembranales y del extremo carboxilo cercano a la membrana, son importantes en el acoplamiento de las proteínas G (Ulloa-Aguirre y Timossi, 1998).

El FSHR se acopla de manera preferencial a las proteínas Gs, las cuales activan a la enzima adenilato ciclasa. Esta última incrementa la síntesis de cAMP, que a su vez activa a la PKA. En mamíferos, se ha visto que el FSHR se puede encontrar asociado a proteínas Gq/11. En este caso, la vía de señalización ocurre a través de la enzima fosfolipasa C β , la cual cataliza la hidrólisis del lípido fosfatidilinositol 4,5-bifosfato para formar inositol 1,4,5-trisfosfato y diacilglicerol; esta señalización activa a la PKC (Hirsch y col, 1996).

Sin embargo, el aumento en la concentración de cAMP bajo la acción de la FSH puede activar otras proteínas celulares como la cinasa B de proteínas (PKB) y la cinasa inducida por glucocorticoides y suero (SgK), y regular la sobrevivencia y proliferación de las células de la granulosa (Richards, 2001). Asimismo, se ha planteado que el modo a través de cual el FSHR se inactiva es por el acoplamiento a proteínas Gi/0, las cuales inhiben la activación de la adenilato ciclasa, lo que lleva a la desensibilización del receptor (Arey y col, 1997).

2.2 La hormona folículo estimulante en mamíferos

En mamíferos, la participación de la FSH en la foliculogénesis ha sido ampliamente documentada. En folículos antrales y preovulatorios es un factor fundamental en la diferenciación de las células de la granulosa (Hsueh y col, 1994) y es el principal factor supresor de la apoptosis en estas células, lo que le confiere un papel esencial en el reclutamiento de folículos antrales (Chun y col, 1996; Mcgee y Hsueh, 2000). Asimismo, se ha demostrado su participación en la proliferación de células de la granulosa en estos folículos incrementando los niveles del mRNA de la ciclina D2 (Robker y Richards, 1998). En folículos preantrales interviene en la proliferación, crecimiento y diferenciación, induciendo la biosíntesis de estrógenos (Hsueh y col, 1984; 2000). Por otro lado, en ratas hipofisectomizadas, la FSH incrementa el peso del ovario, el número de folículos preantrales y aumenta los niveles de expresión de inhibina α en estos folículos (Mcgee y col, 1997). En ratones hembras knockout para la subunidad β de la FSH se ha comprobado que esta hormona regula sus propios receptores e induce la expresión de receptores de la LH en las células de la granulosa, y se ha observado que estimula la actividad de la P-450 aromatasa, lo que a su vez incrementa la síntesis de estrógenos (Burns y col, 2001). Por otra parte, se ha demostrado que la FSH es un regulador importante en la maduración del ovocito del ratón (Eppig y Downs, 1987); recientemente se ha propuesto que participa en el crecimiento del ovocito a través de la modulación de factores como el ligando

Kit (KL), expresado en células de la granulosa y la proteína morfogenética del hueso-15 (BMP-15), la cual es producida por el ovocito (Thommas y col, 2005).

2.3 El eje hipotálamo-hipófisis-ovario

La participación de la hipófisis en el desarrollo gonadal se encuentra a cargo de las gonadotropinas hipofisarias, la FSH y la LH. En las aves, entre el 2º y 3º d.i. las células parenquimatosas que recubren las paredes de la bolsa de Rathke, proliferan y dan lugar a las tres regiones de la adenohipófisis: el lóbulo cefálico, el *pars tuberalis* y el lóbulo caudal (Sasaki y col, 2003). Las gonadotropinas son producidas en grupos celulares conocidos como gonadotropos presentes tanto en el lóbulo cefálico como en el caudal. El inicio de la diferenciación de estos grupos celulares se ha descrito a los 8 d.i. (Mazeki y col, 2004). Se ha demostrado que durante la embriogénesis de las aves la síntesis de FSH y LH ocurre en gonadotropos específicos para cada hormona a diferencia de lo que ocurre en mamíferos, en los cuales se observa que estos grupos celulares expresan ambas gonadotropinas (Puebla-Osorio y col, 2002, Mazeki y col, 2004).

La señal para la síntesis y secreción de la FSH y de la LH proviene del hipotálamo que secreta la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH). Esta hormona viaja a través del sistema portal, llega a la hipófisis anterior y se une a su receptor, el cual pertenece a la familia de receptores de siete dominios transmembranales acoplados a proteínas Gq (Stojilkovic y col, 1988). Se ha demostrado que la secreción de la FSH y de la LH depende de la frecuencia y la amplitud de los pulsos de la GnRH. Los pulsos de alta amplitud y baja frecuencia inducen la secreción de la FSH, mientras que los pulsos de baja amplitud y alta frecuencia estimulan la secreción de la LH (Anderson, 1996). La secreción de las gonadotropinas es regulada por dos sistemas de retroalimentación, las hormonas esteroideas gonadales y el sistema activina-inhibina-folistatina. En etapa embrionaria se ha demostrado que la FSH actúa sobre la enzima P-450 aromatasa incrementando los niveles de estrógenos gonadales (Gómez, y col, 2001). A su vez, los estrógenos tienen como blanco el hipotálamo y la hipófisis en donde regulan la producción de la GnRH y de las

gonadotropinas, respectivamente. Se ha observado que en el embrión de pollo, el estradiol es un supresor importante de la secreción de la FSH (Rombauts y col, 1993). Por otro lado, los péptidos ováricos la inhibina, la activina y la folistatina ejercen una regulación fundamental sobre la FSH. La inhibina es una glicoproteína heterodimérica que suprime la secreción de la FSH. Está constituida por dos subunidades: α y β . Se han descrito dos variantes de la subunidad β : βA y βB , los cuales, a su vez, pueden formar la inhibina A ($\alpha\beta A$) o la inhibina B ($\alpha\beta B$) (Rombauts y col, 1993). La activina está compuesta por homodímeros o heterodímeros de las subunidades β , los cuales conforman la activina A ($\beta A\beta A$), la activina AB ($\beta A\beta B$) o la activina B ($\beta B\beta B$). Estos péptidos pertenecen a la superfamilia del factor de crecimiento transformante β (TGF- β) y una de sus funciones consiste en regular la secreción de la FSH (Carroll y col, 1989; Bilezikjian y col, 2001). Asimismo, la folistatina es un polipéptido altamente glicosilado que no se encuentra relacionado ni con la inhibina ni con la activina pero del cual se sabe que se une al receptor de la activina, regulando a la baja la secreción de la FSH (Esch y col, 1987).

Por lo tanto, la secreción de los esteroides y de los péptidos gonadales junto con la producción y la liberación de GnRH y de las gonadotropinas hipofisarias dirigidas hacia el ovario o el testículo, establecen sistemas de retroalimentación que regulan la producción hormonal y con ello, el desarrollo y la maduración gonadal, los ciclos reproductivos y la conducta sexual.

2.4 El ovario embrionario de las aves

En las aves, el sexo femenino es el resultado de la combinación de cromosomas sexuales heterogaméticos (ZW), mientras que la diferenciación masculina es dirigida por la presencia de cromosomas homogaméticos (ZZ) (Ohno y col, 1959). El desarrollo gonadal ocurre en etapa embrionaria e inicia con el establecimiento de la cresta genital. En este proceso participan las células germinales primordiales (CGP's) de origen extraembrionario, las células del mesénquima, las células somáticas (precursoras de las células de la teca y de la granulosa en el ovario, así como de las células de Leydig y las de Sértoli en el testículo), y las células endoteliales. Entre el primero y segundo día de

incubación las CGP's, cuyo origen ocurre en el epiblasto, y luego constituyen la creciente germinal a nivel del hipoblasto cefálico, se desplazan a través de los vasos sanguíneos y salen de los capilares del mesenterio esplácnico posterior de la arteria onfalomesentérica rumbo a la cresta genital (Ando y Fujimoto, 1983). Para entonces, las células del mesénquima de la cresta comienzan a organizarse en cordones de tipo epitelial. Entre el 3º y 4º d.i. el epitelio superficial prolifera, se observan CGP's entre las células epiteliales, las células del mesénquima más dorsales se reúnen y forman un segundo grupo de cordones epiteliales (Fargeix y col, 1981). Al 4º d.i. los cordones sexuales, el mesénquima y los vasos sanguíneos permiten distinguir a la gónada del tejido mesonéfrico (Carlson y Stahl, 1985).

A los 5 d.i. la gónada es una estructura constituida por el epitelio superficial, la región cortical y la médula. Entre el 6º y 7º d.i. el epitelio germinal del ovario izquierdo prolifera, las CGP's se dividen y dan lugar a las ovogonias, las cuales se organizan en nidos. La corteza continúa su crecimiento, las células somáticas rodean los nidos de ovogonias y constituyen los cordones sexuales corticales. El epitelio germinal del ovario derecho comienza a transformarse en una capa de células planas con ausencia de cordones sexuales. En ambos ovarios se desarrollan lagunas medulares, las cuales son evidentes en la gónada izquierda, debido a su desarrollo morfológico (Carlson y Stahl, 1985).

Las investigaciones sobre los mecanismos que participan en la diferenciación y el desarrollo del ovario han demostrado la presencia temprana de los esteroides gonadales, andrógenos y estrógenos (Yoshida y col, 1996; Nishikimi y col, 2000; Villalpando y col, 2000), de los péptidos inhibina, activina y folistatina en el ovario (Ottinger, 1988; Bruggerman y col, 2002) y de las gonadotropinas, la LH y la FSH en la adenohipófisis (Puebla-Osorio y col, 2002; Maseki y col, 2004).

2.5 El papel de las gonadotropinas en el desarrollo del ovario embrionario de pollo

Los primeros estudios para conocer la importancia de las gonadotropinas en el embrión de pollo se realizaron en organismos hipofisectomizados por

decapitación parcial, en los cuales se observó la inhibición en el crecimiento de las gónadas a los 13 d.i. (Fugo, 1940; Vogel, 1956) y su restablecimiento al colocar transplantes de hipófisis en la membrana corioalantoidea (Betz, 1967).

Recientemente se ha descrito en el ovario embrionario de pollo un incremento exponencial en el número de células somáticas y de células germinales desde los 9 hasta los 14 d.i., la reducción de esta proliferación celular bajo el efecto de la hipofisectomía y la reversión del fenómeno con implantes de hipófisis sobre la membrana corioalantoidea (Méndez y col, 2005). Asimismo, se ha visto en embriones de pollo que la hipofisectomía afecta la actividad de enzimas esteroideogénicas y la producción de los esteroides sexuales, lo que ha permitido sugerir que a partir de los 13.5 d.i. se establece el eje hipotálamo-hipófisis-gónada (Woods y col, 1984). Sin embargo, otros trabajos han propuesto que existe una regulación de la actividad gonadal por parte de la hipófisis en etapas más tempranas del desarrollo del embrión de pollo. Se ha demostrado, en el ovario de pollo, que la hipofisectomía reduce la síntesis de 17β -estradiol a los 10 y 13 d.i. (Weniger y col, 1990). Se ha detectado la presencia de la LH en el primordio de la hipófisis desde los 4 d.i. (Gasc y Sar, 1981); y se han encontrado transcritos de la subunidad β de la LH a los 4 d.i. y de la FSH a los 7 d.i. en esta glándula (Maseki y col, 2004). Asimismo, se han cuantificado los niveles de la FSH en el plasma de embriones de pollo de 8 a 20 d.i. estudiados a intervalos de 2 días (Rombauts y col, 1993). Por otro lado, se ha reportado una respuesta funcional a la LH y a la FSH, por parte del ovario de pollo a los 7.5 y a los 8 d.i. (Pedernera y col, 1999) y se ha determinado el efecto de la FSH sobre la proliferación celular de la gónada "in vivo" a los 13 d.i. (Méndez y col, 1998) e "in vitro" a los 18 d.i. (Velázquez y col, 1997). Asimismo, se ha demostrado en embriones tratados con la FSH un aumento en la proliferación de las células del epitelio superficial, de las ovogonias en la corteza y de las células de los cordones medulares del ovario de pollo a los 14 d.i. (Méndez y col, 2003). Por otra parte, se ha observado el efecto estimulador de la FSH sobre la función de las enzimas P-450_{scc}, 3β - 3β -HSD y de la P-450 aromatasa en cultivos celulares de embriones de pollo de 18 d.i. (Gómez y col, 2001). Otras investigaciones han detectado la

presencia de receptores a la FSH y a la LH en gónadas de embriones de pollo de 4.5 d.i. (Akasome y col, 2002).

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Las gonadotropinas hipofisarias, la FSH y la LH, son fundamentales en el desarrollo y función de las gónadas de los vertebrados. La secreción de estas hormonas ocurre como resultado del establecimiento del eje hipotálamo-hipófisis-gónada, que en las aves, tiene lugar en etapa embrionaria. Se ha planteado que este evento ocurre, en el embrión de pollo, alrededor de los 13.5 días de incubación, sin embargo, existen evidencias que sustentan una actividad hipofisaria previa a esta edad. En el modelo del embrión de pollo hipofisectomizado se ha mostrado la inhibición del crecimiento de las gónadas a los 13 d.i. y su recuperación al colocar transplantes de hipófisis en la membrana corioalantoidea. Asimismo, se ha visto que la ausencia de la adenohipófisis en embriones de pollo afecta la actividad de la enzima 3β -HSD a los 13.5 d.i. así como la síntesis de 17β -estradiol a los 10, 11 Y 13 d.i. Por otra parte, se han cuantificado los niveles de la FSH en el plasma de embriones de pollo de 8 a 20 días y se ha propuesto que esta hormona regula la producción de la inhibina en el ovario embrionario de pollo a esas mismas edades. Asimismo, se ha encontrado una respuesta funcional a la LH y a la FSH por parte del ovario de los 7.5 hasta los 18 días de incubación. Por otro lado, se ha detectado la presencia de la LH y de la FSH en la hipófisis desde los 4 d.i., así como sus receptores en gónadas de embriones de pollo a los 4.5 días de incubación.

Se ha demostrado que la FSH tiene un efecto proliferativo en el ovario embrionario de pollo "in vivo" a los 13 días y en particular, este efecto se ha observado en las células del epitelio superficial, en las ovogonias presentes en la corteza y en las células de los cordones medulares del ovario embrionario de pollo a los 14 días. Con base en lo anterior, en la presente investigación se pretende elucidar si la FSH es la principal hormona adenohipofisaria que modula la proliferación del ovario embrionario de pollo y establecer la edad en que inicia la actividad en la hipófisis del embrión de esta especie.

presencia de receptores a la FSH y a la LH en gónadas de embriones de pollo de 4.5 d.i. (Akasome y col, 2002).

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Las gonadotropinas hipofisarias, la FSH y la LH, son fundamentales en el desarrollo y función de las gónadas de los vertebrados. La secreción de estas hormonas ocurre como resultado del establecimiento del eje hipotálamo-hipófisis-gónada, que en las aves, tiene lugar en etapa embrionaria. Se ha planteado que este evento ocurre, en el embrión de pollo, alrededor de los 13.5 días de incubación, sin embargo, existen evidencias que sustentan una actividad hipofisaria previa a esta edad. En el modelo del embrión de pollo hipofisectomizado se ha mostrado la inhibición del crecimiento de las gónadas a los 13 d.i. y su recuperación al colocar transplantes de hipófisis en la membrana corioalantoidea. Asimismo, se ha visto que la ausencia de la adenohipófisis en embriones de pollo afecta la actividad de la enzima 3β -HSD a los 13.5 d.i. así como la síntesis de 17β -estradiol a los 10, 11 Y 13 d.i. Por otra parte, se han cuantificado los niveles de la FSH en el plasma de embriones de pollo de 8 a 20 días y se ha propuesto que esta hormona regula la producción de la inhibina en el ovario embrionario de pollo a esas mismas edades. Asimismo, se ha encontrado una respuesta funcional a la LH y a la FSH por parte del ovario de los 7.5 hasta los 18 días de incubación. Por otro lado, se ha detectado la presencia de la LH y de la FSH en la hipófisis desde los 4 d.i., así como sus receptores en gónadas de embriones de pollo a los 4.5 días de incubación.

Se ha demostrado que la FSH tiene un efecto proliferativo en el ovario embrionario de pollo "in vivo" a los 13 días y en particular, este efecto se ha observado en las células del epitelio superficial, en las ovogonias presentes en la corteza y en las células de los cordones medulares del ovario embrionario de pollo a los 14 días. Con base en lo anterior, en la presente investigación se pretende elucidar si la FSH es la principal hormona adenohipofisaria que modula la proliferación del ovario embrionario de pollo y establecer la edad en que inicia la actividad en la hipófisis del embrión de esta especie.

4. HIPÓTESIS

La FSH es la principal hormona de la adenohipósis que regula la proliferación celular del ovario embrionario de pollo en etapas tempranas del desarrollo.

5. OBJETIVO GENERAL

Demostrar el papel regulador de la FSH sobre la proliferación celular en el ovario embrionario de pollo, en etapas tempranas del desarrollo gonadal.

5.1 Objetivos particulares

1. Determinar el patrón de proliferación de las células somáticas y de las células germinales en el ovario izquierdo de embrión de pollo, desde los 8 hasta los 11 días de incubación.
2. Evaluar el efecto de la hipofisectomía y del tratamiento sustitutivo con la FSH humana recombinante (rhFSH) sobre la proliferación celular en el epitelio, la corteza y la médula del ovario de 9 d.i.
3. Distinguir el efecto de la rhFSH y de la gonadotropina coriónica humana recombinante (rhCG) sobre la proliferación celular del ovario de 9 d.i. en cultivo de órgano.
4. Estudiar el efecto de la hipofisectomía y del tratamiento sustitutivo con la rhFSH y la rhHCG sobre el número de células somáticas, esteroidogénicas y germinales en el ovario embrionario de 13 días.

5. Determinar la expresión del mRNA de la subunidad FSH β por la técnica de reacción en cadena de la polimerasa por transcriptasa reversa (RT-PCR) en tiempo real, en la hipófisis de embriones de pollo machos y hembras de 7 a 17 días.
6. Utilizar un bioensayo para la FSH con base en la secreción de 17 β -estradiol por las células de ovario de embrión de pollo.
7. Analizar la actividad biológica de la FSH producida por las células de la adenohipófisis del embrión de pollo de 8 a 17 días, discriminando la bioactividad de acuerdo al sexo del embrión.

6. MATERIAL Y MÉTODO

6.1 Reactivos

Los siguientes productos: Medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), tripsina, inhibidor de tripsina, Albumax, estreptomycin, penicilina y glutamina son marca Gibco-BRL Products. La albúmina sérica de bovino (BSA) se obtuvo en Sigma Chemical. Las cajas de cultivo son marca Nalge Nun Internacional. Las membranas de policarbonato son fabricadas por Whatman. El kit 5-Bromo-2'-deoxy-uridine Labeling and Detection kit I y el Transcriptor First Strand cDNA Synthesis kit se obtuvieron de Roche Diagnostics. El kit SensiTek HRP Anti-Mouse (DAB) es de ScyTek. Las sondas MGB TaqMan fueron sintetizadas por Applied Biosystems. El TRIZOL es marca Invitrogen. El Dietilpirocarbonato se obtuvo de Sigma, El kit para cuantificación de estradiol (E2) enzyme immunoassay test kit es de Internacional Immuno-Diagnostics. La hormona folículo estimulante recombinante humana (13.5 UI/ μ g) (Gonal-F) y la hormona

5. Determinar la expresión del mRNA de la subunidad FSH β por la técnica de reacción en cadena de la polimerasa por transcriptasa reversa (RT-PCR) en tiempo real, en la hipófisis de embriones de pollo machos y hembras de 7 a 17 días.
6. Utilizar un bioensayo para la FSH con base en la secreción de 17 β -estradiol por las células de ovario de embrión de pollo.
7. Analizar la actividad biológica de la FSH producida por las células de la adenohipófisis del embrión de pollo de 8 a 17 días, discriminando la bioactividad de acuerdo al sexo del embrión.

6. MATERIAL Y MÉTODO

6.1 Reactivos

Los siguientes productos: Medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), tripsina, inhibidor de tripsina, Albumax, estreptomycin, penicilina y glutamina son marca Gibco-BRL Products. La albúmina sérica de bovino (BSA) se obtuvo en Sigma Chemical. Las cajas de cultivo son marca Nalge Nun Internacional. Las membranas de policarbonato son fabricadas por Whatman. El kit 5-Bromo-2'-deoxy-uridine Labeling and Detection kit I y el Transcriptor First Strand cDNA Synthesis kit se obtuvieron de Roche Diagnostics. El kit SensiTek HRP Anti-Mouse (DAB) es de ScyTek. Las sondas MGB TaqMan fueron sintetizadas por Applied Biosystems. El TRIzol es marca Invitrogen. El Dietilpirocarbonato se obtuvo de Sigma, El kit para cuantificación de estradiol (E2) enzyme immunoassay test kit es de Internacional Immuno-Diagnostics. La hormona folículo estimulante recombinante humana (13.5 UI/ μ g) (Gonal-F) y la hormona

gonadotropina coriónica recombinante humana (20 UI/ μ g (Ovidrel) son de Serono.

6.2 Material biológico

El huevo fértil se obtuvo de la granja ALPES (Aves Libres de Patógenos Específicos), ubicada en Tehuacan, Puebla. Se incubó a 37.8 °C de temperatura y 80% de humedad en una incubadora marca Jamesway. Para la obtención del tejido en todos los ensayos, los embriones se sacrificaron por decapitación.

6.3 Hipofisectomía

La hipofisectomía se realizó en embriones de 44 horas de incubación (etapa 11 de Hamburger y Hamilton, 1951) a los cuales se les realizó un corte al nivel del prosencéfalo y se retiró la región anterior de la región cefálica (Fugo, 1940). Los grupos de embriones testigo fueron manipulados bajo las mismas condiciones que los embriones hipofisectomizados, sin realizar la cirugía.

6.4 Tratamiento de embriones hipofisectomizados

Los embriones se incubaron después de la hipofisectomía y se estudiaron a los 9 y a los 13 d.i. De los embriones de 9 d.i. hipofisectomizados, a su vez, se formaron dos grupos: el grupo tratado con la rhFSH (140ng/embrión) y el grupo tratado con la rhCG (100 ng/embrión). Los tratamientos fueron aplicados sobre la membrana corioalantoidea y su efecto evaluado a los 13 d.i. Por otro lado,

siguiendo la misma estrategia experimental, se aplicó solo el tratamiento con la rhFSH (140 ng/embrión) a un grupo de embriones de 8 d.i. y se estudió a los 9 d.i.

6.5 Suspensión celular

Se obtuvo el ovario izquierdo de los embriones de pollo; el tejido se recibió en cajas de Petri con 5 mL de solución salina libre de calcio y magnesio (1 mg/mL), pH 7.4. Los ovarios se transfirieron a viales siliconizados, conteniendo 500 μ L de tripsina disuelta en solución salina libre de calcio y magnesio (1 mg/mL), pH 7.4. Se formaron grupos de 3 ovarios por vial. El tejido se incubó a 37 °C, en un baño con agitación, marca Precision Scientific a 90 ciclos/min, por 10 minutos. Después de este tiempo, las gónadas se disociaron haciendo pasar el tejido a través de una pipeta Pasteur siliconizada. A continuación, se agregó 1 mL de inhibidor de tripsina (2 mg/mL) disuelto en medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) con albúmina sérica de bovino (BSA) (1.0 mg/mL). La dilución final fue de 1 mL/ovario izquierdo.

6.6 Número total de células

Después de obtener la suspensión celular del ovario izquierdo de 9 y 13 d.i., las muestras se contaron por duplicado en un hematocitómetro marca Sigma. Los datos se expresaron como número total de células/ovario izquierdo. Las células se clasificaron en somáticas, esteroideogénicas y germinales. Las células esteroideogénicas se identificaron por la presencia de al menos, cinco gotas de lípidos en el citoplasma. Las células germinales se reconocieron por el diámetro mayor a 15 μ m, su forma ovalada, la superficie lisa, el núcleo

localizado en posición excéntrica y por la localización yuxtannuclear del cuerpo de Balbiani (Figura 1 B).

6.7 Incorporación de 5-Bromo-2'-deoxiuridina

Las células obtenidas en suspensión se resuspendieron en 200 μ L de medio DMEM+5-Bromo-2'-deoxiuridina (BrdU) y se transfirieron a un vial conteniendo 800 μ L de la misma solución. Se incubaron a 37 °C en una estufa de cultivo con atmósfera de 5% de CO₂ marca Nuair, por 50 minutos. Después de este tiempo, se centrifugaron a 200 x g, 10 minutos. La pastilla se lavó con solución amortiguadora de fosfatos enriquecida con albúmina (PBS+albúmina) al 5% y se centrifugó a 200 x g, 10 minutos. El remanente se resuspendió y las células se colocaron en portaobjetos tratados con poli-L-lisina, se dejaron secar al aire y se procesaron de acuerdo a la técnica de detección de BrdU por inmunocitoquímica.

6.7.1 Detección de BrdU por inmunocitoquímica

Se realizó la detección usando el kit 5-Bromo-2'deoxy-uridine Labeling and Detection kit I. Las preparaciones se fijaron en alcohol ácido a -20 °C por 30 minutos y se dejaron secar al aire. Se realizó un lavado con PBS frío y tres lavados más con PBS a 90 °C, por 10 minutos. Los frotis se incubaron con 30 μ L del anticuerpo primario monoclonal de ratón, anti-BrdU, contenido en una solución con nucleasas en PBS-glicerina, en dilución 1:10 con solución amortiguadora de incubación. Este paso se realizó en una cámara húmeda a 37 °C en baño María, protegido de la luz, durante 1 hora. Se realizaron tres lavados con PBS, en agitación, por 10 minutos. Las preparaciones se incubaron con

30 μ L del anticuerpo secundario de oveja marcado con fluoresceína anti-Ig de ratón, en dilución 1:10 con PBS, una hora, en las mismas condiciones que el anticuerpo primario. Después de este tiempo, las preparaciones se lavaron

primero con una solución de PBS con Tween 20 al 0.01%, 10 minutos y posteriormente se realizaron dos lavados con PBS solo. A continuación, se montaron para su observación al microscopio de epifluorescencia marca Nikon y se determinó el porcentaje de células marcadas, considerando un mínimo de 200 células somáticas por muestra (figura 1 C).

6.8 Estudio morfológico

Para determinar la proliferación celular en el epitelio superficial, la corteza y la médula del ovario embrionario, se obtuvo el ovario izquierdo de embriones de 9 d.i. Se formaron los grupos testigo, hipofisectomizados e hipofisectomizados tratados con rhFSH (140 ng/embrión), 24 horas antes. Asimismo, 1 hora antes de las cirugías, los tres grupos de embriones fueron inyectados “in ovo” con 1.53 mg de BrdU disuelto en DMEM. La aplicación de los tratamientos se realizó sobre la membrana corioalantoidea.

6.8.1 Preparación del tejido para inmunohistoquímica

Los ovarios se recibieron en una solución de paraformaldehído en PBS al 4% y se mantuvieron así toda la noche. Después de 24 horas, el tejido se deshidrató utilizando alcoholes graduales al 30%, 50%, 70%, 90%, 96%, 100% y xilol, 20 minutos en cada uno. El tejido se incluyó en parafina y se almacenó a 4 °C . Se realizaron cortes de 5 μ m de grosor en un microtomo marca Leica y se montaron en portaobjetos tratados con poli-L-lisina.

6.8.2 Detección de BrdU por inmunohistoquímica

Para la detección se utilizó el kit SensiTek HRP Anti-Mouse (DAB). El tejido se desparafinó a 55 °C, una hora. Se lavó dos veces con xilol, por 5 minutos. Las preparaciones se sumergieron en alcoholes al 100%, 96%, 70%, 50% por 5 minutos en cada uno y se mantuvieron en agua destilada 5 minutos más. Se realizaron dos lavados con PBS de 5 minutos cada uno y el tejido se incubó con peróxido de hidrógeno por 8 minutos. Se lavó 2 veces con agua destilada y posteriormente se sumergió dos veces en PBS por cinco minutos cada una. El tejido se incubó con buffer de citratos en olla de presión por 3 minutos. A continuación se realizaron cuatro lavados con PBS. Se trató con el bloqueador de proteínas Super Block, por 6 minutos y se lavó una vez con PBS. Posteriormente, las preparaciones se incubaron con el anticuerpo primario en dilución 1:25 con PBS- albúmina (1%)-triton (0.1%), a 37 °C, 1 hora. Se lavaron cuatro veces y se agregó el anticuerpo biotinilado en dilución 1:300 en PBS- albúmina, a temperatura ambiente por 15 a 20 minutos. Después de este tiempo, las muestras se lavaron cuatro veces más con PBS y se agregó el conjugado estreptavilina unida a peroxidasa de rábano (Strep/HRP), manteniéndolas 20 minutos a temperatura ambiente. La marca en el tejido se reveló con diaminobencidina/peróxido de hidrógeno (DAB/H₂O₂), por 2 a 20 minutos y se lavó 5 veces con PBS. Las preparaciones se contratiñeron con hematoxilina, se deshidrataron y se montaron con resina. Se cuantificó el número de células marcadas en el epitelio superficial, la corteza y la médula del ovario embrionario por digitalización de imágenes utilizando el software Image-Pro Plus (Media Cybernetics). Se midieron entre 10 y 12 áreas por ovario y la media de los valores obtenidos se expresó como el número de células marcadas/1000µm² (Figura 1 A).

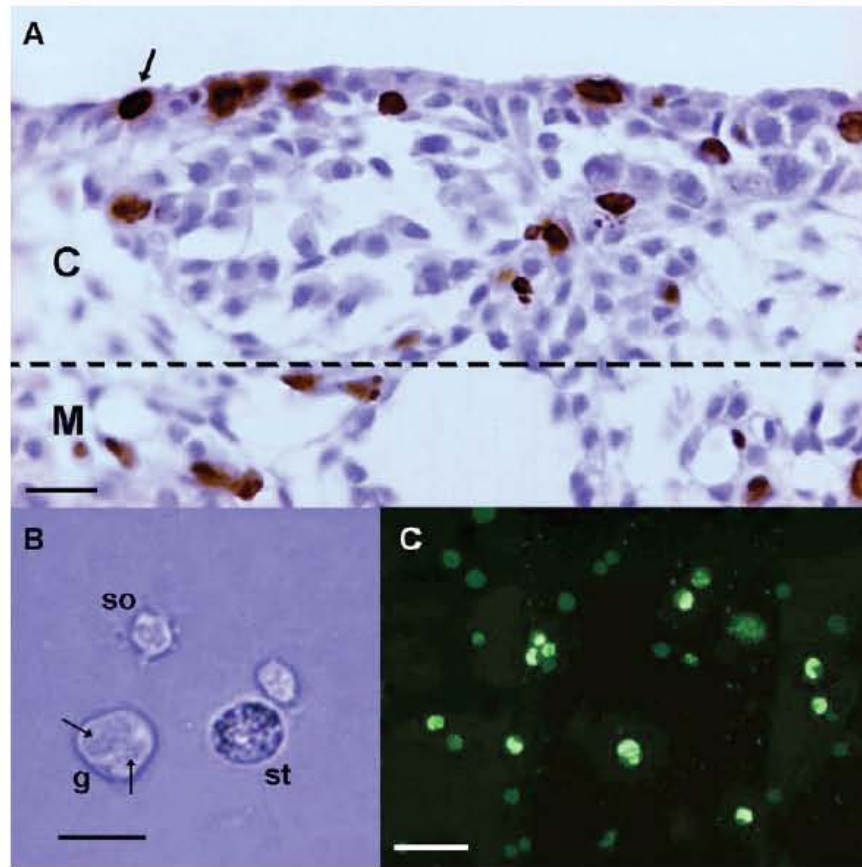


Figura 1 (A) Inmunohistoquímica para BrdU de un corte histológico del ovario embrionario de pollo de 13 d.i. La flecha señala una célula positiva en el epitelio superficial, la corteza [C] y la médula [M]. La línea punteada indica la división aproximada entre la corteza y la médula. Barra de escala = 40 μm . (B) Micrografía de las células de ovario embrionario de pollo de 13 d.i. Se observa la imagen de una célula somática [so], una célula germinal [g] con el núcleo (flecha izquierda) y el cuerpo de Balbiani (flecha derecha) y una célula esteroidogénica [st]. Barra de escala = 20 μm . (C) Inmunofluorescencia del frotis de la suspensión celular de ovario de pollo de 13 d.i. Barra de escala = 40 μm .

6.9 Cultivo de órgano

Para conocer la proliferación del ovario embrionario de pollo a los nueve días en cultivo, se diseñó el sistema que a continuación se describe. Se utilizaron cajas de cultivo conteniendo medio libre de suero DMEM enriquecido con albúmina sérica de bovino rica en lípidos (Albumax) (1 mg/mL) y adicionado con penicilina (100 U/mL), estreptomycin (50 µg/mL) y glutamina. Se obtuvo el ovario izquierdo de embriones de 9 d.i. y, en grupos de tres, el tejido se depositó sobre una membrana de policarbonato. Se colocaron tres membranas por caja, flotando en el medio y se incubaron a 37 °C, en una estufa de cultivo con atmósfera de 5% de CO₂ y humedad relativa de 95%, bajo tratamiento de la rhFSH (18 ng/mL) o bajo tratamiento de la rhCG (12.5 ng/mL); cada caja se consideró como un experimento. Las hormonas fueron añadidas al medio desde el inicio del cultivo; los ovarios se cultivaron durante 24 o 48 horas. Al concluir el tiempo de cultivo, los ovarios se trabajaron de acuerdo a la técnica de obtención de suspensión celular y se procesaron para la incorporación de BrdU. Se midió la tasa de proliferación celular del ovario embrionario de 9 d.i., con cada tratamiento y en el ovario de la misma edad recién disecado. Las células se contaron bajo un microscopio de epifluorescencia y se determinó el porcentaje de células marcadas, considerando un mínimo de 200 células por muestra.

6.10 Expresión del mRNA de la subunidad FSH β en la hipófisis de embriones de pollo de 7 a 17 días

6.10.1 Obtención del RNA total

Para conocer la expresión del mensajero de la subunidad FSH β , se obtuvieron las hipófisis de embriones de pollo machos y hembras, de 7 a 17 días. El tejido se colocó en tubos Eppendorf, se homogenizó en TRIzol

(4 hipófisis/mL) y se incubó a temperatura ambiente por 5 minutos. A cada tubo se le agregó 200 μ L de cloroformo, se agitó por 15 segundos y se incubó a temperatura ambiente por 3 minutos. Se transfirió la fase acuosa a otro tubo y se le añadieron 500 μ L de alcohol isopropílico por tubo; se incubó a temperatura ambiente, 10 minutos. A continuación, los tubos se centrifugaron a 11,500 rpm, a 4 °C durante 10 minutos. La pastilla se lavó con 1 mL de etanol al 75%, y se centrifugó a 9,500 rpm, a 4 °C por 5 minutos. Posteriormente, el RNA total se dejó secar a temperatura ambiente, 30 minutos, para luego disolver la pastilla en 40 μ L de agua tratada con dietil-pirocarbonato (DEPC). La pureza y concentración del RNA total se verificó mediante espectrofotometría de luz UV.

6.10.2 Obtención del cDNA de la subunidad FSH β de pollo

Para llevar a cabo la reacción se utilizó el Transcription First Strand cDNA Síntesis kit. De acuerdo a las especificaciones del fabricante se mezclaron 2 μ g de RNA total con 2 μ L de amortiguador 10X, 4 μ L de MgCl 25 mM, 2 μ L de dNTPs MIX, 2 μ L de Oligo p(dt), 1 μ L de Inhibidor de RNAsa, 0.8 μ L de AMV Reverse Transcriptase y agua tratada con DEPC, para obtener un volumen final de 20 μ L. La reacción se mezcló y se incubó a 25 °C, 10 minutos; 42 °C, 60 minutos, 99 °C, 5 minutos y 4°C, 5 minutos, en un termociclador marca Eppendorf.

6.10.3 Oligonucleótidos y sonda para PCR en tiempo real

Los oligonucleotidos específicos para amplificar los fragmentos de cDNA y la sonda, se diseñaron de acuerdo a las secuencias publicadas: para el gen de la FSH β (No. de acceso al GeneBank NM 204257) y para el gen constitutivo, β -actina (No. de acceso al GeneBank X00182). Los oligonucleótidos y las sondas TaqMan (marcadas con FAM) fueron sintetizadas por Assay-by-Design service (Applied Biosystems).

Gen	Secuencia del oligonucleótido	Tamaño del amplicón
FSHβ	Forward: 5' -AAATATCCACCAGTCTCATCTGTTTCAG- 3' Reverse: 5' -CCAGGGATCTTCACTGTTTCATACA- 3'	77 pb
Sonda	5' -AAATATGTACCTTCAAGGAG- 3'	
β-actina	Forward: 5'-CCACAGCCGAGAGAGAAATTGT- 3' Reverse: 5'-AAATCCAGTGCGACGTAGCA- 3'	
Sonda	5' -ACATCAAGGAGAAGCTG- 3'	66 pb

6.10.4 Cuantificación relativa del mRNA de la subunidad FSH β por PCR en tiempo real

Las alícuotas se prepararon con una mezcla de solución constituida por MgCl₂ (5 mM), 200 nM de cada oligonucleótido, 100 nM de la sonda y 0.02 U/ μ L de la enzima Taq DNA polimerasa (FastStart); buffer de reacción 1X el cual incluye: 200 μ L de dATP, dCTP, dGTP y dUTP. La mezcla maestra se suplementó con la LightCycler TaqMan Master, y la PCR en tiempo real se llevó a cabo en alícuotas de 20 μ L, en un termociclador marca LightCycler 2.0. Los ciclos de amplificación fueron, para la desnaturalización 95 °C por 10 minutos, seguido de 45 ciclos de 95 °C por 10 segundos; el anelado se realizó a 60 °C por 30 segundos, la extensión se llevó a cabo a 72 °C por un segundo y el enfriamiento final fue a 40 °C. En cada caso se realizó una curva estándar que permitió identificar cualquier diferencia en la eficiencia de la amplificación entre el gen de la subunidad FSH β y el gen de la β -actina, para lo cual, la cantidad del gen de la FSH β se dividió entre la cantidad del gen constitutivo

para normalizarlo. Los grupos de muestras estuvieron integradas por cinco diferentes preparaciones de cDNA por edad y se procesaron en ensayos

independientes para asegurar las condiciones similares de la PCR. Se eligió la hipófisis masculina de 7 d.i. como el valor de referencia y se dividió el valor normalizado de cada muestra por el de la referencia, con lo que se obtuvo la cantidad relativa del mRNA de la FSH β . Los datos fueron analizados usando el método de Cuantificación Relativa propio del software del LightCycler, versión 4.5.

6.11 Actividad biológica de la hipófisis sobre las células del ovario izquierdo del embrión de pollo

La participación de la hipófisis a través de las gonadotropinas, sobre la proliferación celular del ovario se estudió mediante la cuantificación del 17 β -estradiol producido por las células ováricas en co-cultivo con las células de la hipófisis. Este método ha sido validado y es específico para la FSH (Jia y Hsueh, 1985). Se obtuvo el ovario izquierdo de embriones de pollo de 9 días; se eligió esta edad debido a que los datos previos obtenidos en este trabajo indican que es cuando el ovario inicia su capacidad de responder a la FSH exógena mediante la proliferación de sus células; asimismo, se disecaron las hipófisis de embriones de pollo de 8 a 17 d.i., separándolas por sexo. El número de células en co-cultivo se determinó a través de ensayos con diferentes densidades celulares; el tiempo y concentración de las hormonas utilizadas se estableció de acuerdo a reportes previos (Velázquez y col, 1997; Pedernera y col, 1999). Los diferentes tejidos se recibieron por separado en solución salina libre de calcio y magnesio y se sometieron a digestión enzimática, utilizando tripsina disuelta en solución salina libre de calcio y magnesio (1 mg/mL), pH 7.4. Se mantuvieron en agitación a 90 ciclos/minuto a 37 °C, en un baño de incubación por 10 minutos. Las células se recibieron en inhibidor de tripsina (2 mg/mL) disuelto en DMEM enriquecido con glucosa,

BSA (1.0 mg/mL), penicilina (100 U/mL), estreptomina (50 µg/mL) y glutamina. Considerando por separado las edades y el sexo, se centrifugaron las hipófisis y los ovarios, a 200 x g por 10 minutos.

La densidad celular se calculó contando las células del ovario y de las hipófisis de acuerdo a la edad y al sexo, en una cámara de Neubauer; para controlar la viabilidad de las células, se utilizó el método de exclusión del colorante azul tripano. En cajas de cultivo conteniendo DMEM enriquecido con glucosa, BSA (1 mg/mL), con penicilina (100 U/mL), estreptomina (50 µg/mL) y glutamina; sobre una membrana de policarbonato, se colocaron por caja 500,000 células de ovario de 9 d.i. junto con 100,000 células de la hipófisis de la edad y sexo correspondiente, se cultivaron por triplicado y se incubaron 60 horas a 37 °C, en atmósfera de 5% de CO₂/aire. Por cada triplicado se elaboró un testigo, al cual no se le colocaron las células de la hipófisis. Al final del cultivo se hicieron alícuotas del medio y se cuantificó el contenido de 17β-estradiol, utilizando la técnica de ELISA.

6.12 Curvas de dosis-respuesta de la rhFSH y de la rhCG

Con la finalidad de controlar el ensayo y comprobar la actividad biológica de la adenohipófisis a través de la FSH sobre las células del ovario, simultáneo a cada cultivo se realizaron las curvas de dosis-respuesta de la FSH y la LH. Se cultivaron 500,000 células de ovario izquierdo de 9 d.i. con distintas concentraciones de la rhFSH (0.03, 0.06, 0.12, 0.25, 0.5, 1.0, 2.0, 4.0, 8.0 y 16.0 ng) y de la rhCG (0.12, 0.25, 0.5, 1.0, 2.0, y 4.0 ng) por 60 horas. Se cuantificó la concentración de 17β-estradiol producido y se obtuvo el patrón de secreción de las células.

6.13 Cuantificación de 17 β -estradiol

Se cuantificaron las concentraciones de 17 β -estradiol de cada muestra mediante la técnica de ELISA (Enzyme Linked Immunoabsorbent Assay). El kit utilizado tiene una especificidad del 100%, presenta una reacción cruzada de 2.1% con estrona; asimismo, maneja un rango de sensibilidad de 1–1000 pg/mL, sin embargo, las muestras cuya concentración fue mayor a 1000 pg/mL se diluyeron con el diluyente propio del kit. En pozos de micro elisas cubiertos con IgG Anti-conejo de cabra, se colocaron por separado 25 μ L de los estándares, de los controles propios del ensayo y de las muestras experimentales. En cada pozo se agregaron 100 μ L del reactivo de conjugado de estradiol-HRP y 50 μ L de reactivo anti-estradiol (E2) de conejo. Se mezcló por 30 segundos y se incubó a 25 °C por 90 minutos. Los pozos se lavaron 5 veces con agua desionizada y se añadieron 100 μ L de solución TMB en cada pozo; se mezcló por 5 segundos y se incubó a temperatura ambiente por 20 minutos. La reacción se detuvo agregando 100 μ L de solución de frenado a cada pozo. Se leyó la absorbancia a 450 nm en un lector marca Dynatech y se usó el software Assayzap con el cual se obtuvo la concentración de estradiol para cada muestra.

6.14 Análisis estadístico

Los datos, con excepción del último estudio, se analizaron con las pruebas T de Student o por ANOVA seguida por la prueba de Tukey, usando el paquete estadístico SAS y considerando una $P < 0.05$ como significativa. El análisis de la expresión del mRNA de la subunidad FSH β se llevó a cabo con la prueba de Mann Whitney; las curvas de dosis-respuesta de la rhFSH y de la rhCG se analizaron con el índice de correlación de Pearson; la estadística de la actividad biológica de la hipófisis sobre las células del ovario se realizó con las pruebas de ANOVA, seguida de Tukey, para estos estudios se utilizó el paquete estadístico MINITAB, considerando una $P < 0.01$ como significativa.

7. RESULTADOS

7.1 Efecto de la hipofisectomía sobre la proliferación celular del ovario embrionario de pollo

7.1.1 Incorporación de BrdU en las células del ovario de embrión de pollo testigo e hipofisectomizado evaluado de los 8 a los 11 días de incubación

Se estudió el efecto de la hipofisectomía sobre la proliferación celular del ovario de embriones de los 8 a los 11 d.i. a partir del porcentaje de incorporación de BrdU por las células ováricas. Al comparar las células ováricas marcadas de los embriones Hx contra los embriones testigo, la disminución tuvo significancia estadística a los 9 y 10 d.i. Asimismo, en el ovario de los grupos testigo se detectó una mayor incorporación de BrdU desde los 9 d.i., (Figura 2).

7.1.2 Variaciones de la proliferación del ovario izquierdo de embriones de pollo de 9 días

La hipofisectomía redujo la proliferación celular del ovario izquierdo embrionario de 9 d.i. Cuando se aplicó una sola dosis de la rhFSH (140 ng/embrión) "in ovo", 24 horas antes de disecar la gónada, se restableció el patrón proliferativo del ovario (Figura 3). El análisis del efecto de la hipofisectomía sobre el porcentaje de células en síntesis en las tres regiones determinó que, tanto el epitelio superficial como la corteza y la médula, disminuyeron la proliferación celular. Sin embargo, bajo el tratamiento sustitutivo de la rhFSH, ésta incrementó y alcanzó el índice de proliferación de los grupos testigo (Figura 4).

Resultado de la hipofisectomía sobre la proliferación celular del ovario embrionario de pollo

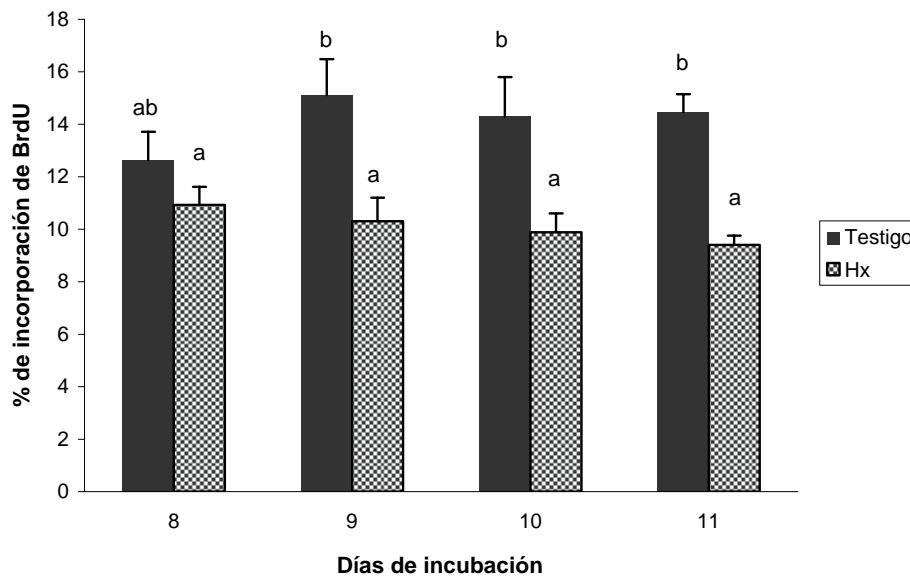


Figura 2. Se muestra el porcentaje de incorporación de BrdU por las células del ovario embrionario de pollo a los 8, 9, 10 y 11 d.i., testigos e hipofisectomizados. Las barras indican el % de células marcadas \pm ESM.

n (Testigo 8 d.i.)=6; n (Testigo 9 d.i.)=12; n (Testigo 10 y 11 d.i.)=5; n (Hx 8, 10 y 11 d.i.)= 6 y n (Hx 9 d.i.)= 5, se consideraron 200 células por muestra; Las letras sobre las barras indican la significancia estadística, las letras diferentes indican un significado de $P < 0.05$.

Cambios en la proliferación celular del ovario embrionario de pollo de 9 días

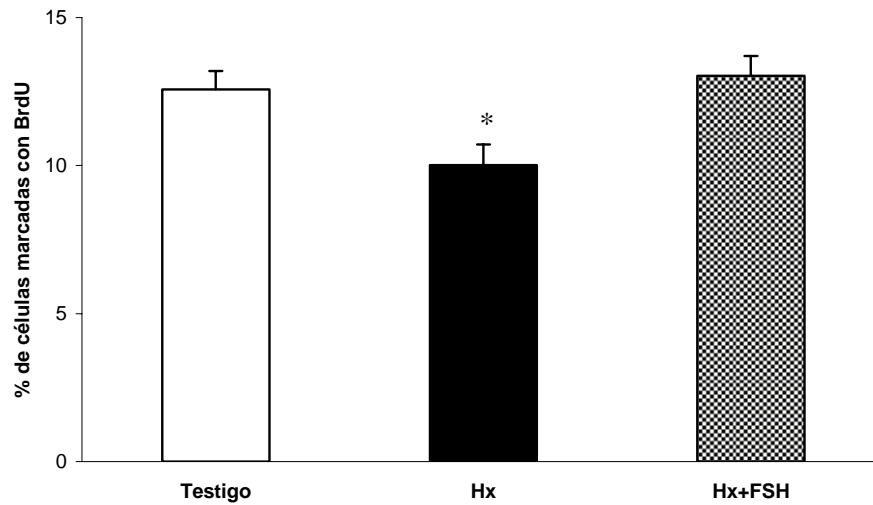


Figura 3. Mediante la incorporación de BrdU, se determinó el porcentaje de las células somáticas en fase de síntesis del ciclo celular, en el ovario izquierdo embrionario de 9 días. Se muestran los grupos de ovarios de embriones Testigo, hipofisectomizados (Hx) e hipofisectomizados y tratados con rhFSH (140ng/embrión) (Hx+FSH). Las barras representan la media \pm ESM; n (Testigo)= 16; n (HX) = 14 y n (Hx+FSH) = 16. *P<0.05 vs. Testigo y Hx+FSH.

Recuperación de la proliferación celular en las regiones del ovario izquierdo embrionario de 9 días

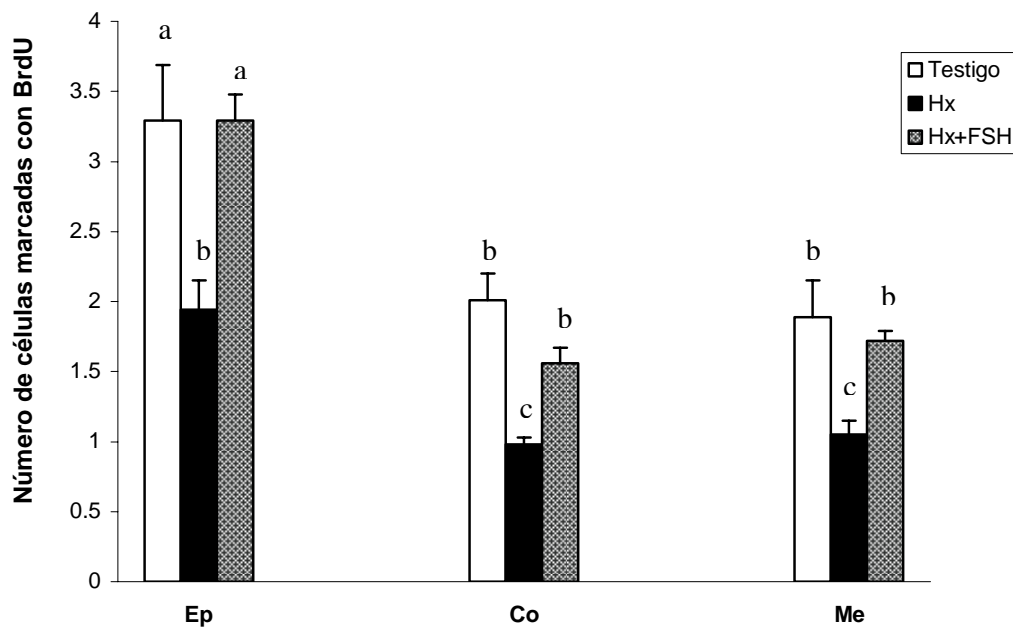


Figura 4. Densidad numérica de las células somáticas en fase de síntesis evaluadas por inmunohistoquímica de cortes histológicos del ovario izquierdo de embriones de pollo de 9 días. Epitelio superficial (Ep), corteza (Co) y médula (Me). Se midieron entre 10 y 12 áreas por ovario y la media de los valores obtenidos se expresó como el número de células marcadas/1000μm². Las barras representan la media ± ESM, n = 4; las barras con distinta letra difieren significativamente P<0.05.

7.1.3 Cambios en la proliferación del ovario izquierdo embrionario de pollo de 9 días en cultivo de órgano

Se estudió el índice de proliferación celular del ovario izquierdo de 9 días de incubación en cultivo, midiendo el porcentaje de incorporación de BrdU por las células. Inicialmente se mantuvo el ovario completo en medio libre de suero, condicionando a las células a un ambiente de ayuno, el cual dio como resultado una reducción del 50% de la proliferación celular a las 24 y 48 horas. Cuando se agregó la rhFSH (18 ng/mL) al medio de cultivo, se determinó un incremento en el porcentaje de células en fase de síntesis del ciclo celular, a las 48 horas. Sin embargo, en los cultivos que recibieron el tratamiento hormonal de la rhCG (12 ng/mL) no ocurrió ningún cambio en la proliferación celular del ovario (Figura 5).

Efecto de las gonadotropinas sobre la proliferación celular del ovario embrionario de pollo de 9 días de incubación en cultivo de órgano

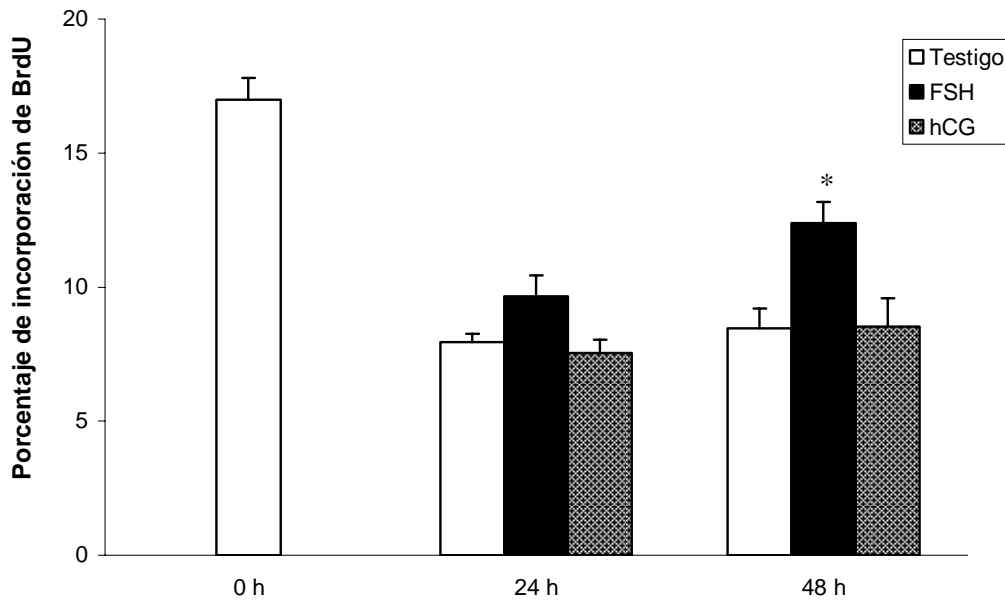


Figura 5. Se midió el porcentaje de incorporación de BrdU por las células del ovario de pollo de 9 días de incubación, en cultivo de órgano. Se muestran los grupos: Testigo y bajo tratamiento al inicio del cultivo con una dosis de la rhFSH (18 ng/mL) o de la hCG (12.5 ng/mL) en el medio. Se midió la proliferación del ovario recién disecado (0h) y el efecto se estudió a las 24 y 48 horas. Las barras representan la media \pm ESM; n = 11. *P<0.05 vs. Testigo y hCG.

7.1.4 Consecuencias del tratamiento con las gonadotropinas sobre la proliferación celular del ovario izquierdo de embriones de pollo de 13 días hipofisectomizados

El resultado de la hipofisectomía en embriones estudiados a los 13 días fue la disminución del porcentaje de células marcadas con BrdU. Al comparar con el grupo testigo se determinó que la diferencia entre la proliferación de ambos grupos tiene significancia estadística. El tratamiento con la rhFSH (140 ng/embrión) a los 9 d.i., restablece la disminución de proliferación celular observada en el ovario de 13 d.i., en ausencia de la hipófisis (Figura 6). La reducción del índice de proliferación como consecuencia de la hipofisectomía, afectó el número de células somáticas, esteroidogénicas y de las células germinales. La recuperación se observó de manera significativa en los tres grupos celulares después del tratamiento con la rhFSH (140 ng/embrión) (Figuras 7A, 8A y 9A). Con la finalidad de comprobar que la disminución de la proliferación celular en el ovario de embriones hipofisectomizados es consecuencia de la ausencia de la FSH, se estudió la respuesta proliferativa del ovario a la LH. Para este propósito, el tratamiento se realizó con una dosis de rhCG (100 ng/embrión) en condiciones similares al tratamiento con rhFSH. Los datos obtenidos muestran que el número de células somáticas, esteroidogénicas y germinales marcadas en embriones hipofisectomizados y tratados con la hCG, no difieren significativamente con respecto a los embriones con ausencia de hipófisis (Figuras 7B, 8B y 9B).

Variaciones en la proliferación de las células del ovario embrionario de pollo de 13 días

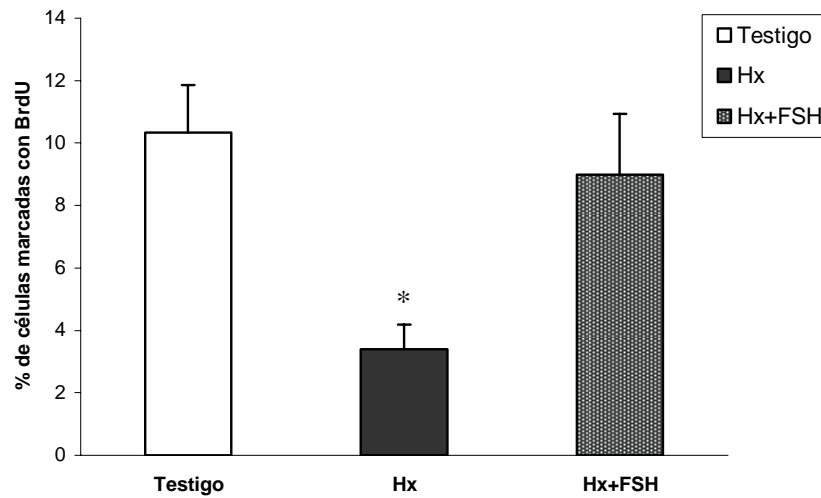
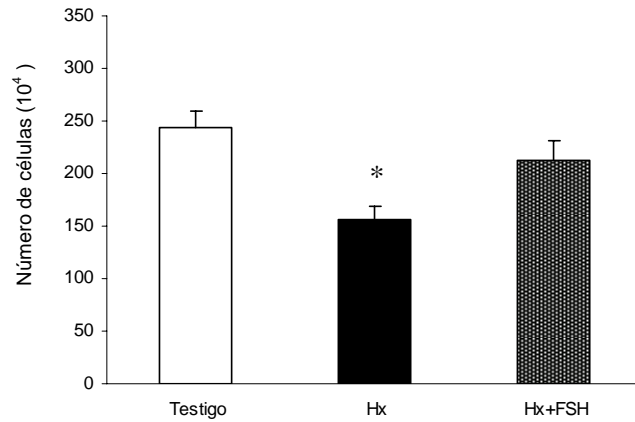


Figura 6. Consecuencia de la hipofisectomía y del tratamiento sustitutivo con rhFSH (140 ng/embrión), sobre la proliferación de las células del ovario de 13 d.i. de embriones de pollo Testigo, hipofisectomizados (Hx) e hipofisectomizados y tratados con la rhFSH (Hx+FSH); n (Testigo) = 5; n (Hx) = 7; n(Hx+FSH) = 6. Los valores graficados corresponden a la media \pm ESM. * $P < 0.05$ vs. Testigo y Hx+FSH.

Efecto de las gonadotropinas sobre el número de células somáticas del ovario embrionario de 13 días

A)



B)

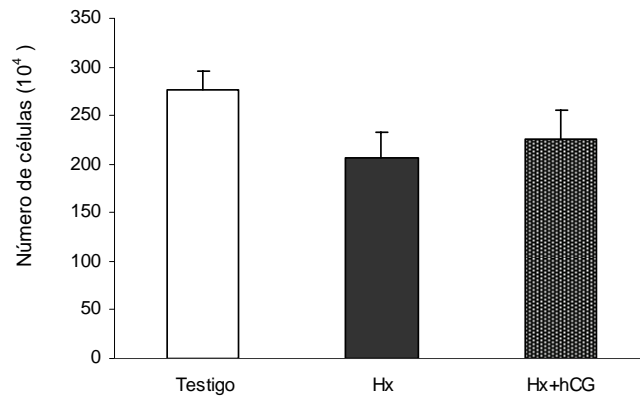
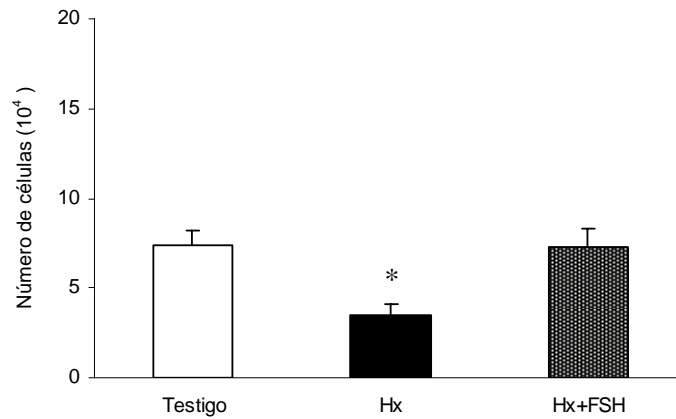


Figura 7. Número total de células somáticas en los grupos Testigo, hipofisectomizado (Hx), hipofisectomizado y tratado con la rhFSH (Hx+FSH) (A) e hipofisectomizado y tratado con la rhCG (Hx+hCG) (B). Las barras representan la media \pm ESM; n = 5 – 7. *P<0.05 vs. Testigo y Hx+FSH.

Efecto de las gonadotropinas sobre el número de células esteroidogénicas del ovario de embrión de pollo de 13 días

A)



B)

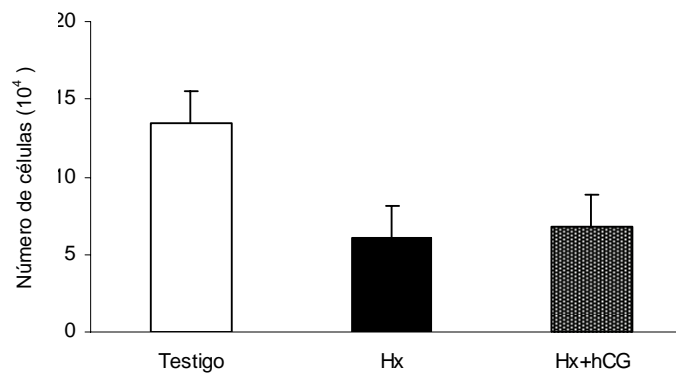
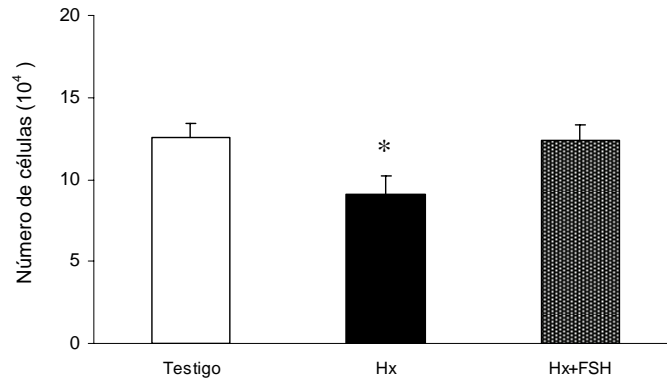


Figura 8. Número total de células esteroidogénicas presentes en el ovario de los grupos de embriones Testigo, hipofisectomizado (Hx) e hipofisectomizado y tratado con FSH (Hx+FSH) (A) e hipofisectomizado y tratado con hCG (Hx+hCG) (B). Las barras representan la media \pm ESM; $n = 5 - 7$. * $P < 0.05$ vs. Testigo y Hx+FSH.

Efecto de las gonadotropinas sobre el número de células germinales del ovario embrionario de pollo de 13 días

A)



B)

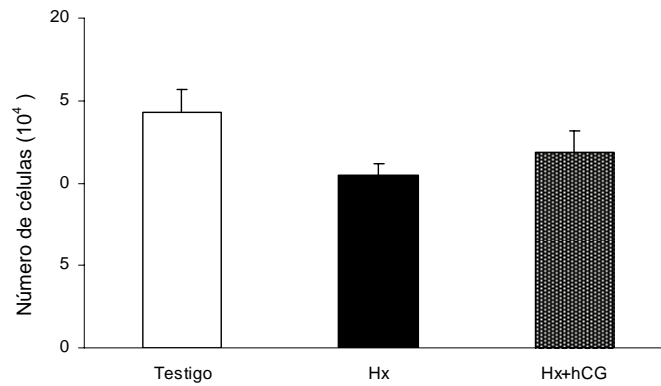


Figura 9. Número total de células germinales en el ovario embrionario de pollo. Se muestran los grupos Testigo, hipofisectomizado (Hx) e hipofisectomizado tratado con FSH (Hx+FSH) en (A) e hipofisectomizado y tratado con hCG (Hx+hCG) en (B). Las barras representan la media \pm ESM; n = 11-12. *P<0.05 vs. Testigo y Hx+FSH.

7.2 Expresión del mRNA de la FSH β en la hipófisis del embrión de pollo

Para investigar el patrón de expresión de la FSH β en la hipófisis de embrión de pollo distinguiendo por sexo, se cuantificaron los niveles del mensajero de esta subunidad en hipófisis de embriones de pollo macho y hembra de 7 a 17 d.i., para lo cual se utilizó la técnica de PCR en tiempo real. El análisis de la cuantificación relativa indica que la expresión de la subunidad FSH β fue significativamente mayor en las hipófisis de machos que de hembras. Los niveles de mRNA mostraron variaciones a lo largo de las edades estudiadas, particularmente en la hipófisis del macho. En este grupo, el patrón de expresión se caracterizó por presentar bajos niveles de los 7 a los 12 d.i., seguido de un incremento de la expresión de los 13 a los 17 d.i. En las hembras, la expresión del mRNA de la subunidad FSH β se mantuvo baja a lo largo del tiempo estudiado (Figura 10).

Cuantificación del mRNA de la subunidad FSH β en la hipófisis del embrión de pollo macho y hembra

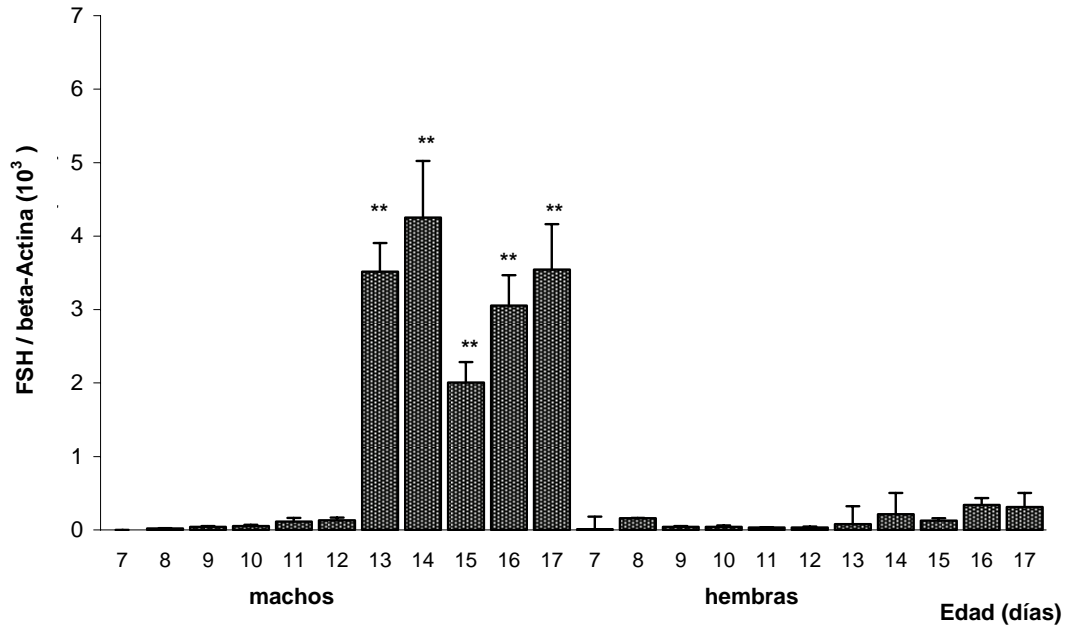


Figura 10. Expresión del mRNA de la subunidad FSH β durante el desarrollo de la hipófisis embrionaria de pollo. Se obtuvo el cDNA de las hipófisis de embriones machos y hembras a diferentes edades del desarrollo (7 a 17 d.i.) y se amplificó por la técnica de RT-PCR en tiempo real. Las barras representan la media \pm ESM de 5 muestras por grupo. **P<0.01. machos vs. hembras.

7.3 Actividad biológica de la hipófisis sobre las células del ovario izquierdo del embrión de 9 días

7.3.1 Curva de dosis-respuesta para la FSH sobre la biotransformación de 17 β -estradiol por las células del ovario izquierdo de embrión de pollo de 9 días

Se determinó la curva de dosis-respuesta para la rhFSH y la rhCG. La curva que describe el estímulo de la FSH sobre la producción de estradiol por las células del ovario muestra que existe una respuesta desde la dosis inicial; en la medida en que se incrementa la dosis de la FSH, aumenta la producción de 17 β -estradiol. Al llegar a los 4 ng/mL de la FSH, las células del ovario alcanzan su más alta producción de 17 β -estradiol. Cuando se estudió el efecto de la hCG, se encontró que no hubo diferencias con el testigo (Figura 11).

Curva dosis-respuesta de la secreción de estradiol por las células del ovario embrionario de pollo de 9 días en respuesta a las gonadotropinas

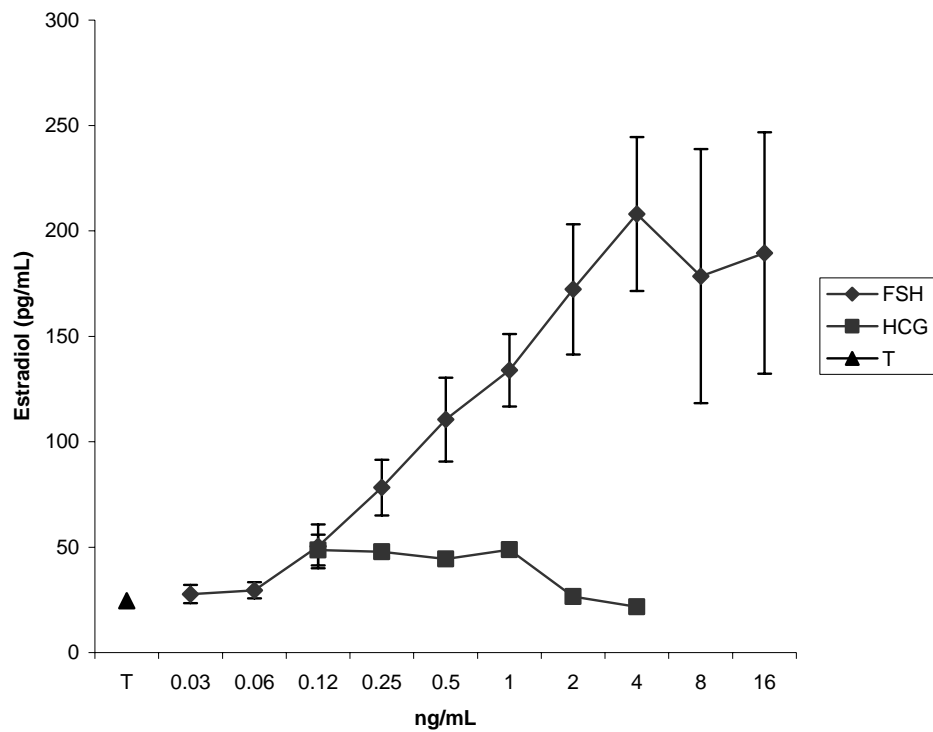


Figura 11. Producción de 17β -estradiol por las células del ovario de embriones de pollo de 9 días, bajo el estímulo de la rhFSH y de la rhCG. Los valores corresponden a la media \pm ESM; $n = 3 - 4$; $R = 0.943$; $P < 0.05$.

7.3.2 Actividad de la hipófisis embrionaria de pollo macho y hembra sobre la biotransformación de 17 β -estradiol por las células ováricas del embrión de pollo

Se midió la actividad biológica por las células de la hipófisis de embrión de pollo macho y hembra de 8 a 17 d.i., a través de la FSH, sobre la biotransformación de 17 β -estradiol por las células del ovario embrionario de pollo de 9 días. Bajo el estímulo de la hipófisis de la hembra, la secreción de 17 β -estradiol por las células del ovario tuvo un incremento significativo con respecto al grupo testigo a los 9 días; aumentó a los 10 y se redujo a los 11 y 12 d.i.; estas dos últimas edades no fueron estadísticamente diferentes de sus respectivos grupos testigo. La máxima concentración de 17 β -estradiol se observó a los 13 d.i. y aunque se determinó una disminución, los niveles de 17 β -estradiol continuaron siendo estadísticamente distintos de los grupos testigo a los 14 y 15 días del desarrollo. A los 16 y 17 d.i. la secreción de 17 β -estradiol por las células del ovario se redujo sin mostrar significancia estadística (Figura 12).

Cuando se analizó la actividad de la hipófisis de macho sobre la secreción de 17 β -estradiol por las células embrionarias del ovario, se observó un incremento significativo que inició a los 9 d.i. y continuó a los 10 d.i.; a los 11 d.i. ocurrió una caída en la concentración del esteroide y la recuperación a los 12 d.i. A los 13 y 14 días se alcanzó el mayor incremento de la concentración de 17 β -estradiol registrado en las edades evaluadas, y la diferencia estadística se mantuvo a los 15 y 16 d.i. A los 12 y 16 días, solo la hipófisis de macho indujo un aumento en la síntesis de 17 β -estradiol (Figura 13).

Como se puede observar en la figura 14, el fenómeno biológico de la secreción de 17 β -estradiol por las células embrionarias del ovario, bajo el estímulo de la hipófisis de hembra y macho es similar en ambos sexos a pesar de la diferencia en los valores obtenidos. Ambas incrementan la biotransformación de 17 β -estradiol de manera significativa a los 9, 10, 13, 14 y 15 días de desarrollo y el máximo nivel de secreción de 17 β -estradiol se

encuentra a los 13 d.i., sin embargo, en los co-cultivos con células hipofisarias de macho, ese nivel máximo se prolonga a los 14 d.i. Asimismo, se observa que la síntesis de 17β -estradiol por las células ováricas es mayor bajo la influencia de la hipófisis de macho, que por las células hipofisarias de la hembra en los días 9, 10, 13, 14 y 15.

A los 8, 11 y 17 días del desarrollo los niveles de 17β -estradiol secretados por las células del ovario de 9 d.i. no presentan variación entre ninguno de los tres grupos estudiados.

Influencia de la adenohipófisis de embrión de pollo hembra en la biotransformación de 17 β -estradiol por las células del ovario de pollo de 9 días de incubación

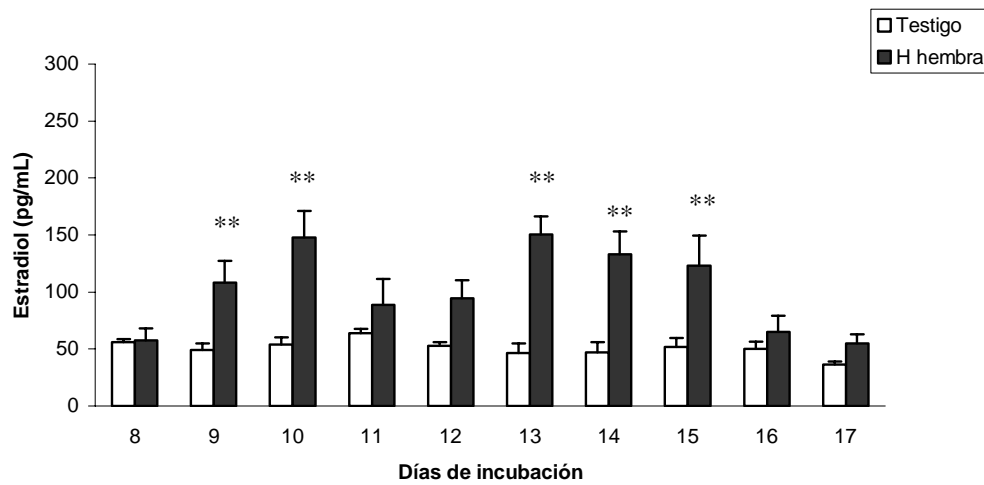


Figura 12. Determinación de la biotransformación de 17 β -estradiol por las células del ovario embrionario de pollo de 9 días en co-cultivo con las células de la hipófisis embrionaria de la hembra (H hembra), de diferentes edades del desarrollo; n (5, 14, 15, 16) = 5, n (9, 10, 13) = 4, n (12, 17) = 3. Las barras representan la media \pm ESM. **P<0.01. H hembras vs. Testigo.

Influencia de las células de la hipófisis de embrión de pollo macho sobre la secreción de 17β -estradiol por las células del ovario de pollo de 9 días de incubación

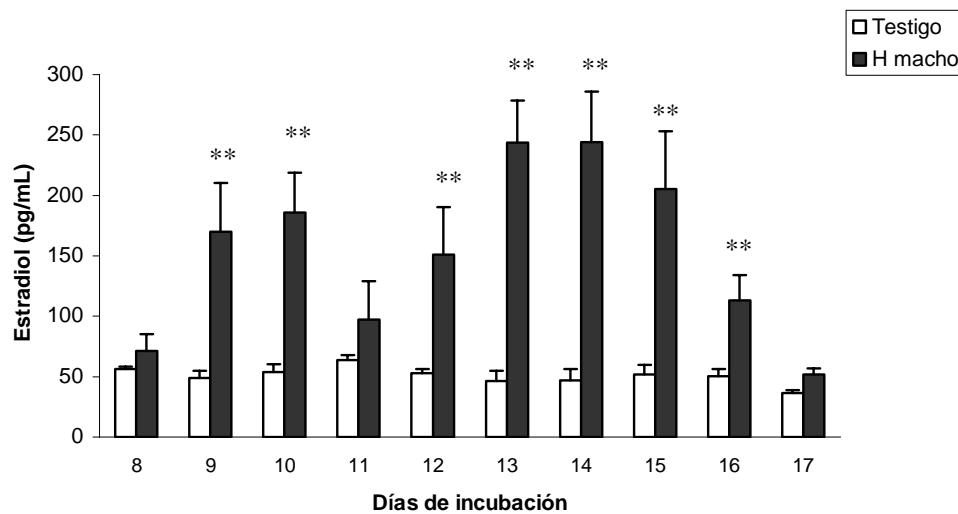


Figura 13. Secreción de 17β -estradiol por las células del ovario de 9 d.i. regulada por la adenohipófisis embrionaria de macho (H macho) de 8 a 17 días de incubación; n (8, 14, 15, 16) = 5, n (9, 10, 14) = 4, n (12, 17) = 3. Las barras representan las medias \pm ESM. **P<0.01. H macho vs. testigo.

**Actividad de la hipófisis embrionaria de pollo sobre la
biotransformación de 17β -estradiol por las células
ováricas del embrión de pollo**

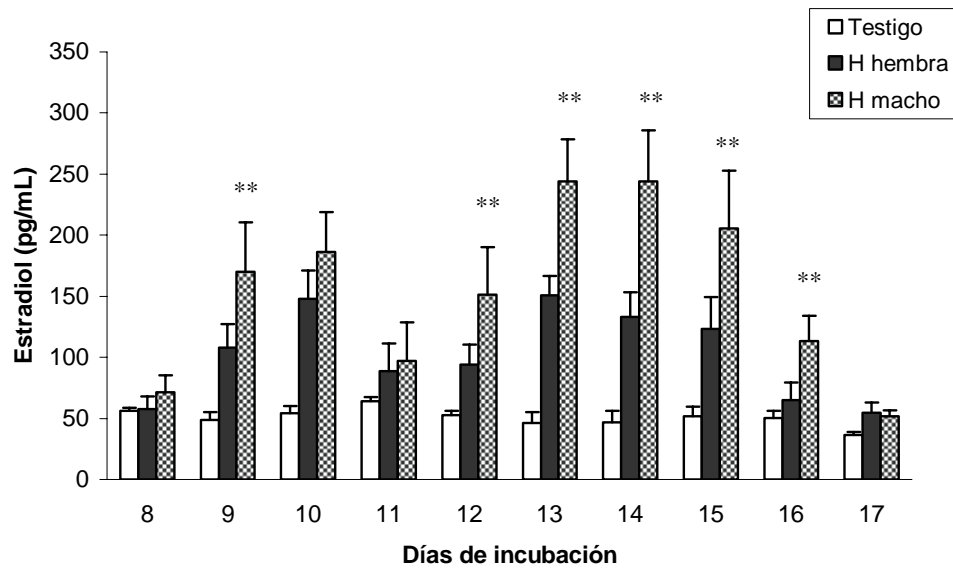


Figura 14. Análisis para 17β -estradiol por las células de ovario embrionario de 9 días en co-cultivo con células de la adenohipófisis de embriones machos (H macho) y hembras (H hembra) a través del desarrollo; n (5, 14, 15, 16) = 5, n (9, 10, 13) = 4, n (12, 17) = 3. Las barras representan la media \pm ESM. **P<0.01 H macho vs. H hembra.

8. DISCUSIÓN

El presente estudio aportó evidencias de que la FSH es la principal hormona glicoprotéica de la adenohipósis que regula la proliferación celular del ovario, en etapas tempranas del desarrollo embrionario de pollo. Por otro lado, se demostró que el gen de la subunidad FSH β se expresa en mayores niveles en la adenohipósis embrionaria de machos que de hembras durante el desarrollo y esto se confirmó por la bioactividad encontrada en la adenohipósis de los machos. Asimismo, que la secreción de la FSH inicia a los 9 días de incubación y mantiene un patrón bifásico similar en ambos sexos.

Para demostrar la importancia de la hipófisis sobre la proliferación del ovario, se procedió a estudiar las consecuencias de la ausencia de esta glándula sobre el desarrollo de la gónada del embrión de pollo hembra. Esto último se llevó a cabo mediante el método de decapitación parcial (Fugo, 1940), el cual asegura que al retirar el prosencéfalo embrionario a las 44 horas de incubación, se anula por completo el desarrollo de la hipófisis, ya que en el embrión de pollo, éste inicia entre el 2° y 3° d.i.

Para evaluar el porcentaje de proliferación en los distintos ensayos se utilizaron dos métodos experimentales, la incorporación de BrdU por las células ováricas y el número total de células presentes después de los correspondientes tratamientos. En la incorporación de BrdU, las células son incubadas en un medio con 5-Bromo-2'-desoxiuridina, lo que permite que las células que se encuentran en fase de síntesis del ciclo celular incorporen este análogo de la timidina y puedan ser detectadas por inmunofluorescencia. Por otro lado, se utilizó la técnica de conteo del número total de células con la finalidad de determinar la cantidad de células presentes en el ovario que resultan del balance entre los procesos de proliferación y muerte celular; asimismo, esta técnica hizo posible clasificar las células en somáticas, esteroidogénicas y germinales de acuerdo a los criterios morfológicos validados en otros estudios histoquímicos y ultraestructurales (Álvarez-Fernández y col, 1995).

Inicialmente se estudió, mediante el porcentaje de incorporación de BrdU, el

efecto de la hipofisectomía sobre la proliferación del ovario de 8 a 11 d.i. y se observó que a los 8 días no hubo ningún efecto sobre el crecimiento del ovario, lo cual puede indicar que a esta edad la proliferación del ovario es independiente de la actividad hipofisiaria; sin embargo, se determinó una reducción con significancia estadística a partir de los 9 d.i., que se sostuvo a los 10 y a los 11 d.i. En estudios recientes se demostró que el número de células del ovario embrionario de pollo incrementa de manera exponencial a partir de los 9 d.i. (Méndez y col, 2005), lo que aunado a los resultados obtenidos en este ensayo, permite establecer que los 9 d.i. es una edad crítica en la proliferación celular del ovario embrionario de pollo, en la cual es necesaria la presencia de la hipófisis.

Una vez establecido en este estudio que la ausencia de la hipófisis reduce la proliferación celular del ovario a los 9 d.i. se determinó en esta edad, el efecto del tratamiento sustitutivo de una sola dosis de la rhFSH, aplicada 24 horas antes. Nuestros datos muestran que la reducción de la proliferación celular del ovario, como resultado de la hipofisectomía, se revierte completamente bajo el tratamiento sustitutivo de la rhFSH. La disminución de la proliferación celular afectó las tres áreas que integran el ovario, el epitelio superficial, la corteza y la médula, y la recuperación de la densidad celular se observó en las tres regiones; el epitelio superficial del ovario fue la zona con el mayor índice de proliferación, ya que el porcentaje de las células en fase de síntesis fue 60% más alto que en la corteza y la médula. Esto confirma que el epitelio es la región que da origen a los cordones corticales y a parte de la médula (Jordanov y col, 1978). Para confirmar el efecto de las gonadotropinas sobre la proliferación del ovario de 9 d.i. se utilizó un sistema de cultivo de órgano y se consideraron los siguientes aspectos metodológicos. Por un lado, las células se mantuvieron en un medio libre de suero, lo que permitió asegurar que de existir algún efecto en la proliferación, éste fuera causado por el tratamiento administrado. Por otro lado, los cultivos se trataron con la rhFSH y con la rhCG, que por su origen recombinante reduce la posibilidad de factores contaminantes que pudieran estimular la proliferación celular. Aunque la hCG es producida por el trofoblasto y no por la hipófisis, se utilizó debido a que

presenta una estructura similar a la subunidad LH β , lo que le permite acoplarse al mismo receptor y activar las mismas señales intracelulares (Vassart y col, 2004). Nuestros datos muestran que haber mantenido durante 24 y 48 horas al ovario en un medio libre de suero disminuyó la proliferación celular en un 50%. Bajo el tratamiento con la rhFSH, el porcentaje de incorporación de BrdU tuvo un incremento significativo después de 48 horas, situación que no ocurrió con la administración de la rhCG. Esto coincide con que la LH es una gonadotropina relacionada principalmente con la diferenciación de las células más que con la proliferación (Robker y Richards, 1998).

Por otro lado, se determinó el efecto de la hipofisectomía sobre la proliferación celular del ovario de embriones de 13 días, así como la respuesta al tratamiento sustitutivo de una sola dosis de la rhFSH efectuado a los 9 d.i. Se eligió realizar este estudio en base a la información que distintos grupos de investigación han aportado desde hace varias décadas. Se ha demostrado que en ausencia de hipófisis existe la retracción del crecimiento del ovario embrionario de pollo de 13 d.i., (Fugo, 1940; Vogel, 1957); asimismo se ha observado que la hipofisectomía produce una disminución en la actividad de la enzima 3 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa en embriones de pollo de 13.5 d.i. (Woods y Weeks, 1969) y se ha propuesto que el establecimiento del eje hipotálamo-hipófisis-ovario, ocurre alrededor de los 13.5 d.i. en el embrión de pollo (Woods, 1987). En este trabajo se encontró que la ausencia de hipófisis redujo la proliferación celular del ovario de 13 d.i. y una sola dosis de la rhFSH, administrada a los 9 d.i. fue suficiente para recuperar el índice de proliferación. Esto indica que a los 9 días del desarrollo las células del ovario son capaces de responder a la FSH y que esta respuesta se mantiene durante 4 días, lo que se tradujo en una tasa de proliferación similar a la de los grupos testigo. El efecto de la hipofisectomía incidió sobre las poblaciones celulares del ovario embrionario de 13 días, dando lugar a una disminución significativa en el número de células somáticas, esteroideogénicas y germinales, así como a la recuperación de los tres componentes celulares del ovario después de la aplicación de una dosis de la FSH a los 9 d.i. El tratamiento con la hCG, no restableció la densidad celular en estas poblaciones, lo que sugiere que la FSH es la hormona glicoprotéica hipofisiaria responsable del efecto proliferativo de las células del ovario.

Hasta aquí se ha demostrado que la ausencia de la hipófisis reduce la proliferación del ovario embrionario y que este evento biológico se revierte a través del tratamiento con una sola dosis de la FSH en el embrión de pollo de 9 y 13 días del desarrollo. Esto sugiere que la integración del eje hipotálamo-hipófisis-gónada ocurre ya desde los 9 d.i. y que en este proceso la hipófisis embrionaria a través de la FSH contribuye en etapas tempranas del desarrollo a la proliferación celular del ovario.

Como ya se mencionó, la especificidad del heterodímero FSH $\alpha\beta$ para dirigir las señales intracelulares reside en la estructura de la subunidad β , por tal motivo, el siguiente planteamiento fue conocer el patrón de expresión de esta subunidad para embriones de pollo machos y hembras. Mediante la técnica de RT-PCR en tiempo real, se cuantificó el mRNA de la FSH β en la hipófisis de embriones de 7 a 17 días, discriminando por sexo. Nuestros resultados indican que la hipófisis del macho, expresa niveles significativamente más altos que la hipófisis de la hembra a partir de los 13 días hasta los 17 d.i. A pesar de que se ha documentado la presencia del mensajero de la subunidad FSH β en la hipófisis del embrión de pollo desde los 7 d.i. (Maseki, 2004), hasta ahora, no existe ningún trabajo que proponga posibles diferencias por sexo. Nuestros resultados son los primeros en describir la expresión diferencial del mensajero de la FSH β , en la hipófisis embrionaria de pollo, por sexo. La presencia del mRNA indica que el gen de la FSH β está siendo transcrito bajo un patrón de expresión temporal diferente entre machos y hembras. La determinación de mayores niveles de la subunidad β en machos sugiere que existe una mayor síntesis de la FSH en este sexo de los 13 a los 17 d.i. Con base en lo anterior se analizó la actividad biológica de la adenohipófisis, a través de la FSH, sobre la secreción de 17 β -estradiol por las células del ovario, discriminando la bioactividad de acuerdo al sexo del embrión. Como parte de la validación del bioensayo, se determinó la curva de dosis-respuesta para la FSH y la hCG y se observó que las células del ovario embrionario de pollo de 9 días responden al estímulo de la FSH y no al de la hCG, ya que bajo el efecto de esta última, la producción de 17 β -estradiol fue similar a los grupos testigo. Asimismo, se determinó que la mayor concentración de 17 β -estradiol se alcanzó con una dosis de 4 ng/mL de FSH.

La bioactividad se estudió mediante el co-cultivo de células de hipófisis embrionaria de pollo macho o hembra de 8 a 17 d.i., con células de ovario de 9 d.i. de la misma especie, y se interpretó mediante la cuantificación de 17β -estradiol en el medio. Los resultados obtenidos indican que la hipófisis de machos y hembras muestran un patrón de actividad biológica similar sobre las células del ovario; sin embargo, las células hipofisarias del macho ejercen mayor estímulo sobre la secreción de 17β -estradiol que las células de la hipófisis de la hembra. En ambos sexos, la regulación de la secreción de 17β -estradiol inició a los 9 d.i., lo que corrobora que esta edad es crítica en la proliferación del ovario. Sin embargo, el mayor estímulo a la biotransformación de 17β -estradiol ocurre a los 13 d.i. en los dos casos; en los cultivos con hipófisis de macho el pico de secreción se extiende a los 14 días, mientras que la actividad de la hipófisis de la hembra disminuye a partir de los 14 días. Estos resultados coinciden con los obtenidos por Rombauts y colaboradores (1993), quienes midieron los niveles de la FSH inmunoreactiva en el plasma de embriones de pollo de ambos sexos, encontrando un patrón de concentración de hormona mayor en los machos que en las hembras, el cual alcanzó el máximo nivel alrededor de los 13 d.i. Sin embargo, en ese estudio no se evaluó la concentración de la hormona a los 9 días, edad en la que nosotros detectamos el inicio del estímulo de la adenohipofisis de ambos sexos. Es de hacer notar que este inicio va acompañado de un mayor grado de actividad estimuladora por parte de adenohipofisis de embriones machos.

La proliferación del ovario de pollo se ha estudiado de los 8 a los 14 d.i., y se ha observado que partir de los 9 días muestra un incremento exponencial en ese periodo, sin embargo, en el testículo embrionario de pollo, el índice de proliferación se mantiene constante desde los 9 hasta los 13 días (Méndez, y col, 2005). Considerando que la adenohipofisis a través de la FSH estimula la proliferación gonadal en el embrión de pollo, esta diferencia en el patrón de proliferación del ovario y del testículo pudiera explicarse de varias maneras. 1) En la hipófisis de la hembra, el mensajero de la subunidad $FSH\beta$ se puede estar transcribiendo y traduciendo simultáneamente, por lo que en nuestros

resultados los niveles de mRNA detectados son muy bajos, mientras que la bioactividad de la FSH sobre el ovario es evidente a través de su proliferación.

2) La baja proliferación del testículo embrionario de los 9 a los 13 días se podría deber a que en el macho no hubiera síntesis de FSH hasta antes de los 14 días. Sin embargo, nuestros resultados determinaron la presencia del mensajero de la subunidad FSH β en muy bajos niveles entre los 9 y los 12 d.i. con un incremento notable a los 13 días que se mantuvo hasta los 17 d.i. Posiblemente el mensajero se podría estar traduciendo completamente de los 9 a los 12 d.i., por lo que los niveles detectados en estas edades son mínimos. 3) Otra posible explicación consiste en que a pesar de los niveles de la bioactividad de la FSH en la hipófisis, y de la presencia de la hormona en el plasma, el receptor para la FSH en el testículo se encuentre ausente. Sin embargo, esto es poco probable ya que se ha encontrado la expresión del mensajero del FSHR en el testículo embrionario a los 6, 7, 8 y 14 d.i. (Méndez y col, 2003) y se ha demostrado que el testículo prolifera respondiendo al estímulo de la FSH de los 8 a los 18 d.i., (Pedernera y col, 1999). De manera que el patrón de proliferación diferencial entre el ovario y el testículo puede ser regulado por la interacción de la FSH con factores intragonadales.

Por ejemplo, en mamíferos se ha demostrado que el sistema del factor de crecimiento semejante a insulina (IGF) está involucrado en la regulación de la proliferación y diferenciación del ovario. La participación de este sistema se da en relación a la maduración folicular y al tipo celular y se ha planteado que el IGF-I incrementa la respuesta de las células foliculares a la FSH al comienzo de la etapa de crecimiento folicular dependiente de gonadotropinas (Mognet y col, 2000). Asimismo, se sabe que en las células de la granulosa de la rata, la FSH sinergiza con el factor de crecimiento semejante a insulina I (IGF-I) y estimula la actividad de la enzima adenilato ciclasa, la actividad de la enzima P-450 aromatasa, la síntesis de receptores de la LH y la producción de progesterona (Adashi, 1985).

Por otra parte, estudios realizados en el ovario de la gallina doméstica en etapa reproductiva han mostrado la expresión del mRNA del IGF-I en las células del folículo ovárico, así como una mayor concentración de este factor

en las células de la granulosa que en las células de la teca. Asimismo, en ese estudio se demostró que el IGF-I incrementa la proliferación en ambos tipos celulares (Roberts y col, 1994). Por lo anterior, se podría pensar que la proliferación del ovario embrionario de pollo se incrementa a través de la interacción de la FSH con el IGF-I.

En el testículo, la proliferación constante de los 9 a los 13 d.i. podría deberse a la ausencia del IGF-I, o a la falta de receptores para este factor, o bien a la presencia de las proteínas de unión al IGF (IGFBP's) que podrían estar inhibiendo la disponibilidad del ligando para efectuar el sinergismo con la FSH en ese periodo de tiempo.

Una explicación alternativa podría considerar al factor de crecimiento transformante β (TGF- β) como un modulador de la proliferación gonadal del embrión de pollo. En mamíferos y en aves se han estudiado los efectos del TGF- β sobre la proliferación celular y se han identificado diferentes isoformas de este factor (Roberts y Sport, 1993), lo cual podría explicar que el efecto del TGF- β en las gónadas sea diferente en ambos grupos de vertebrados.

En el embrión de pollo se ha encontrado la presencia del mensajero del TGF- β 2 en el ovario y el testículo del embrión de pollo de 7 días; esos estudios mostraron que la expresión del mRNA decrece gradualmente hacia el día 14 y se mantiene disminuida hasta el día 17, para luego incrementar hasta el día 21 del desarrollo (Hattori y col, 2002). Por otra parte, se ha demostrado que el tratamiento con TGF- β 1 y 2 inhibe la proliferación de las células somáticas del ovario de 9 días (Méndez y col, 2006). Esos resultados junto con lo encontrado en este estudio nos permiten sugerir que el TGF- β puede ser un factor inhibitorio de la proliferación del testículo, ya que el periodo de mayor expresión del mensajero del TGF- β coincide con el periodo de menor expresión del mRNA de la subunidad FSH β en la hipófisis de machos y con la baja y constante proliferación del testículo. Asimismo, la disminución de la expresión del TGF- β de los 14 a los 17 d.i. concuerda con la elevación de los niveles del mensajero de la FSH β y con el incremento de la proliferación de las células del testículo embrionario de pollo.

9. CONCLUSIONES

1. La ausencia de la hipófisis disminuye significativamente la proliferación celular del ovario embrionario de pollo estudiado desde los 9 a 11 días. Por lo tanto, a los 9 días de incubación, el ovario comienza a ser regulado por la actividad de la adenohipófisis.
2. La hipofisectomía reduce la proliferación celular del epitelio, la corteza y la médula del ovario de 9 d.i.; el tratamiento sustitutivo con la FSH exógena recupera la proliferación en las tres regiones del ovario.
3. El epitelio superficial del ovario de 9 d.i. es la región que presenta un mayor índice de proliferación celular con respecto a la corteza y a la médula.
4. El ovario de embriones de 9 días, en cultivo de órgano, responde a la FSH exógena a través de un incremento significativo en la proliferación celular.
5. En ausencia de hipófisis, el ovario embrionario de 13 días disminuye la proliferación celular; esta disminución afecta el número de células somáticas, esteroidogénicas y germinales. Sin embargo, el tratamiento con la FSH exógena a los 9 días del desarrollo restablece la densidad en los tres tipos celulares.
6. En el embrión de pollo, el mRNA para la subunidad FSH β se expresa en niveles más altos en la adenohipófisis del macho que de la hembra. Asimismo, a los 13 y 14 días de incubación, esta expresión alcanza los máximos niveles, de las edades estudiadas.
7. La adenohipófisis del embrión de pollo de machos y hembras inicia su actividad a los 9 días medido a través del estímulo de la secreción de 17 β -estradiol por las células del ovario.
8. La adenohipófisis embrionaria de pollo mantiene un patrón de bioactividad bifásico similar en el macho y en la hembra; sin embargo, la hipófisis del macho estimula en mayor grado la secreción de 17 β -estradiol por las células ováricas alcanzando sus niveles máximos a los 13 y 14 días del desarrollo.

REFERENCIAS

1. Adashi EY, Resnick CE, Svoboda, Van Wyk JJ (1985) Somatomedin-C synergizes with follicle stimulating hormone in the acquisition of progesterone biosynthetic capacity by an insulin-like growth factor II expression is theca-interstitial cell-exclusive: hormonal regulation and receptor distribution *Endocrinology* 127, 3249-3252
2. Akazome Y, Abe T, Mori T (2002) Differentiation of chicken gonad as an endocrine organ: expression of LH receptor, FSH receptor, cytochrome P450c17 and aromatase genes. *Reproduction* 123, 721-728
3. Álvarez-Fernández G, Juárez-Oropeza MA, Velázquez P, González del Pliego M, Méndez-Herrera MC, Pedernera E (1995) Newly hatched chick ovarian cell subpopulations metabolize distinctively progesterin and androgen precursors. *Gen Comp Endocrinol* 97, 31-41
4. Ando Y and Fujimoto T (1983) Ultrastructural evidence that chick primordial germ cells leave the blood-vascular system prior to migrating to the gonadal anlagen. *Dev Growth Differ* 25, 345-352
5. Anderson L (1996) Intracellular mechanisms triggering gonadotrophin secretion. *Rev Reprod* 1, 193-202
6. Arey BJ, Stevis PE, Deecher DC, Shen ES, Frail DE, Negro-Vilar A, López FJ (1997) Induction of promiscuous G protein coupling of the follicle-stimulating hormone (FSH) receptor: a novel mechanism for transducing pleiotropic actions of FSH isoforms. *Mol Endocrinol* 11, 517-126
7. Baenziger JU (1996) Glycosilation: To what end for the glucoprotein hormones? *Endocrinology* 137, 1520-1522
8. Betz TW (1967) The effects of embryonic pars distalis grafts on the development of hypophysectomized chick embryos. *Gen Comp Endocrinol* 9, 172-186
9. Bilezikjian LM, Blount AL, Corrigan AZ, Leal A, Chen Y, Vale WW (2001) Actions of activins, inhibins and follistatins: Implications in anterior pituitary function. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 28, 244-248
10. Bruggerman V, Pieter VA, Decuypere E (2002) Developmental endocrinology of the reproductive axis in the chicken embryo. *Comp Bioch Physiol* 131, 839-846
11. Burns KH, Yan Ch, Kumar R, Matzuk MM (2001) Analysis of ovarian gene expression in follicle stimulating hormone β knockout mice. *Endocrinology* 142, 2742-2751

12. Carlon N and Sthal A (1985) Origin of the somatic components in chick embryonic gonads. *Archiv Anat Microsc Morphol Exper* 74, 52-59
13. Carroll RS, Corrigan AZ, Gharib SD, Vale WW, Chin WW (1989) Inhibin, activin and follistatin: regulation of follicle-stimulating hormone messenger ribonucleic acid levels *Mol Endocrinol* 3, 1969-1976
14. Chun SY, Eisenhauer KM, Minami S, Billig H, Perlas E, Hsueh AJ (1996) Hormonal regulation of apoptosis in early antral follicles: follicle-stimulating hormone as a major survival factor. *Endocrinology* 137:1447-56
15. Dohlman HG, Thorner J, Caron MG, Lefkowitz RJ (1991) Model systems for the study of seven-transmembrane-segment receptors. *Annu Rev Biochem* 60, 653-688
16. Eppig JJ and Downs SM (1987) The effect of hypoxanthine on mouse oocyte growth and development "in vitro": maintenance of meiotic arrest and gonadotropin-induced oocyte maturation. *Dev Biol* 119, 313-321
17. Esch FS, Shimasaki S, Mercado M (1987) Structural characterization of follistatin: A novel follicle-stimulating hormone release-inhibiting polypeptide from the gonad *Mol Endocrinol* 1, 849-855
18. Fan QR and Hendrickson WA (2005) Structure of human follicle-stimulating hormone in complex with its receptor. *Nature*, 433(7023), 269-77
19. Fargeix N, Didier E, Didier P (1981) Early sequential development in avian gonads. An ultrastructural study using selective glycogen labelin in the germ cells. *Reprod Nutr Dévelop* 21, 479-496
20. Fugo NW (1940) Effects of hypophysectomy in the chick embryo. *J Exp Zool* 85, 271-279
21. Gasc JM and M Sar (1981) Appearance of LH-immunoreactive cells in the Rathke's pouch of the chicken embryo. *Differentiation* 20, 77-80
22. Gómez Y, Velázquez PN, Peralta-Delgado I, Méndez MC, Vilchis F, Juárez-Oropeza MA, Pedernera E (2001) Follicle-stimulating hormone regulates steroidogenic enzymes in cultured cells of the chick embryo ovary. *Gen Comp Endocrinol* 121, 305-315
23. Hamburger V and Hamilton HL (1951) A series of normal stages in the development of the chick embryo. *J Morphol* 88, 49-92

24. Hattori M, Furuta H, Hiyama Y, Kato Y, Fujihara N (2002) Prominent expression of transforming growth factor-beta2 (TGF- β 2) gene in the chicken embryonic gonad as revealed by suppressive subtraction cloning. *Gen Comp Endocrinol* 125, 311-316
25. Hirsch B, Masataka K, Naro F, Conti M, Hsueh JW (1996) The C-terminal third of the human luteinizing hormone (LH) receptor is important for inositol phosphate release: analysis using chimeric human LH/follicle-stimulating hormone receptors. *Mol Endocrinol* 10, 1127-1137
26. Hsueh JW, Adashi EY, Jones PBC, Welsh TH (1984) Hormonal regulation of the differentiation of cultured ovarian granulosa cells. *Endocrine Rev* 5, 76-127
27. Hsueh AJW, Billing H, Tsafiriri A (1994) Ovarian follicle atresia: a hormonally controlled apoptotic process. *Endocr Rev* 15:707-724
28. Hsueh AJW, McGee EA, Hayashi M, Hsu SY (2000) Hormonal regulation of early follicle development in the rat ovary. *Mol Cel Endocrinol* 163, 95-100
29. Jia XC and Hsueh AJ (1985) Sensitive in vitro bioassay for the measurement of serum follicle-stimulating hormone. *Neuroendocrinol* 41, 445-8
30. Jordanov J, Angelova P, Boyadjieva-Michailova A, Bakalska M (1978) Ultrastructure of developing interstitial cells in chick embryonic gonad in relation to their genesis and steroidogenic function. *Z Mikrosk Anat Forsch* 9, 449-64
31. McGee EA, Perlas E, LaPolt PS, Tsafiriri A, Hsueh AJW (1997) Follicle-stimulating hormone enhances the development of preantral follicles in juvenile rats. *Biol Reprod* 57, 990-998
32. McGee EA and Hsueh AJW (2000) Initial and cyclic recruitment of ovarian follicles. *Endocr Rev* 21, 200-214
33. Mazeki Y, Nakamura K, Iwasawa A, Zheng J, Inoue K, Sakai T (2004) Development of gonadotropes in the chicken embryonic pituitary gland. *Zoolog Sci* 21, 435-444
34. Méndez-Herrera MC, Tamez L, Cándido A, Reyes-Esparza JA, Pedernera E (1998) Follicle stimulating hormone increases somatic and germ cell number in the ovary during chick embryo development. *Gen Comp Endocrinol* 111, 107-215

35. Méndez MC, Ramírez M, Varela AR, Chavez B, Pedernera E (2003) Follicle-stimulating hormone increases cell proliferation in the ovary and the testis of the chick embryo. *Gen Comp Endocrinol* 133, 181-8
36. Méndez C, Carrasco E, Pedernera E (2005) Adenohypophysis regulates cell proliferation in gonads of the developing chick embryo. *J Exp Zool* 303A, 179-185
37. Méndez C, Alcántara L, Escalona R, López-Casillas F, Pedernera E (2006) Transforming growth factor beta inhibits proliferation of somatic cell without influencing germ cell number in the chicken embryonic ovary. *Cell Tissue Res* 325, 143-149
38. Monget P, Bondy C (2000) Importance of the IGF system in early folliculogenesis. *Mol Cell Endocrinol* 163, 89-93
39. Nishikimi H, Kansaku N, Saito N, Usami M, Ohno Y, Shimada K (2000) Sex differentiation and mRNA expression of p450c17, P450arom and AMH in gonads of the chicken. *Mol Reprod Dev* 55, 20-30
40. Ohno S, Kaplan WD, Kinoshita R (1959) On the sex chromatin of *Gallus domesticus*. *Exp Cell Res* 19, 180-183
41. Ottinger MA (1988) Sexual differentiation of neuroendocrine systems and behavior. *Poult Sci* 68, 979-989
42. Pedernera E, Solís L, Peralta I, Velazquez PN (1999) Proliferative and steroidogenic effects of follicle-stimulating hormone during chick embryo gonadal development. *Gen Comp Endocrinol* 116, 213-220
43. Puebla-Osorio N, Proudman JA, Compton AE, Clements KE, Decuypere E, Vandesaende F, Berghman LR (2002) FSH- and LH- cells originate as separate cell populations and at different embryonic stages in the chicken embryo. *Gen Comp Endocrinol* 127, 242-248
44. Richards JS (2001) New signaling pathways for hormones and cyclic adenosine 3',5'-monophosphate action in endocrine cells. *Mol Endocrinol* 15, 209-218
45. Roberts AB and Sporn MB (1993) Physiological actions and clinical applications of transforming growth factor beta (TGF- β). *Growth Factors* 8, 1-9
46. Roberts RD, Sharp PJ, Burt DW, Godard C (1994) Insulin-like growth factor-I in the ovary of the laying hen: gene expression and biological actions on granulosa and thecal cells. *Gen Comp Endocrinol* 93, 327-336

47. Robker RL and Richards JS (1998) Hormonal control of the cell cycle in ovarian cells: proliferation versus differentiation. *Biol Reprod* 59, 476-82
48. Rombauts L, Berghman LR, Vanmontfort D, Decuyper E, Verhoeven G (1993) Changes in immunoreactive FSH and inhibin in developing chicken embryos and the effects of estradiol and the aromatase inhibitor R76713. *Biol Reprod* 49, 549-554
49. Sasaki F, Doshila A, Matsumoto Y, Kuwana S, Tsukamoto Y, Ogawa K (2003) Embryonic development of the pituitary gland in the chick. *Cells Tissues Organs* 173, 65-74
50. Shen ST and Yu JY (2002) Cloning and gene expression of a cDNA for the chicken follicle-stimulating hormone (FSH)-beta-subunit. *Gen Comp Endocrinol* 125, 375-386
51. Stojilkovic SS, Chang JP, Izumi S, Tasaka K, Catt KJ (1988) Mechanisms of secretory responses to gonadotropin-releasing hormone and phorbol esters in cultured pituitary cells. *Jour Biol Chem* 263, 17301-17306
52. Thomas FH, Ethier JF, Shimasaki S, Vanderhyden BC (2005) Follicle-stimulating hormone regulates oocyte growth by modulation of expression of oocyte and granulosa cell factors. *Endocrinology* 146, 941-949
53. Ulloa-Aguirre A and Timossi C (1998) Structure-function relationship of follicle-stimulating hormone and its receptor. *Hum Reprod* 4, 260-283
54. Ulloa-Aguirre A and Timossi C (2003) Impact of carbohydrate heterogeneity in function of follicle-stimulating hormone: studies derived from in vitro and in vivo models. *Biol Reprod* Aug 69, 379-89
55. Vassart G, Pardo L, Costagliola S (2004) A molecular dissection of glycoprotein hormone receptors. *Trends in Biochem Sci* 29, 119-126
56. Velázquez PN, Peralta I, Pedernera E (1997) Proliferative effect in vitro of follicle-stimulating hormone on the left ovary of the chick embryo. *Gen Comp Endocrinol* 105, 40-49
57. Villalpando I, Sánchez-Bringas G, Sánchez Vargas I, Pedernera E, Villafán-Monroy H (2000) The P450aromatase (P450arom) gene is asymmetrically expressed in a critical period for gonadal sexual differentiation in the chick. *Gen Comp Endocrinol* 117, 325-334

58. Vogel NW (1956) Pituitary-gonad relationships in the chick embryo. Ph D Dissertation Indiana University
59. Weniger JP, Chouraqui J, Zeis A (1990) Pituitary control of estrogen secretion in the chick embryo: true or spurious? *Gen Comp Endocrinol* 79, 346-350
60. Woods JE and Weeks RL (1969) Ontogenesis of the pituitary-gonadal axis in the chick embryo. *Gen Comp Endocrinol* 13, 242-254
61. Woods JE and Thommes RC (1984) Ontogeny of hypothalamo-adenohypophyseal-gonadal (HAG) interrelationships in the chick embryo. *J Exp Zool* 232, 435-441
62. Woods JE (1987) Maturation of the hypothalamo-adenohypophyseal-gonadal (HAG) axes in the chick embryo. *J Exp Zool(suppl. 1)*, 265-271
63. Yoshida K, Shimada K, Saito S (1996) Expression of P456 (17alpha) hydroxylase and P450 aromatase genes in the chicken gonad before and after sexual differentiation. *Gen Comp Endocrinol* 102, 233-240
64. You S, Bridham JT, Foster DN, Johnson AL (1996) Characterization of the chicken follicle stimulating hormone receptor (cFSH-R) complementary deoxyribonucleic acid, and expression of cFSH-R messenger ribonucleic acid in the ovary. *Biol Reprod* 55, 1055-1062