

00361
Jep



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

RESPUESTA PROLIFERATIVA INDUCIDA POR LA
HORMONA FOLICULO ESTIMULANTE (FSH)
EN TESTICULOS EMBRIONARIOS DE AVES
(*Gallus domesticus*)

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRA EN CIENCIAS
(BIOLOGIA)
P R E S E N T A :
BIOL. IRMA PERALTA DELGADO

DIRECTOR DE TESIS: DR. PEDRO NICOLAS VELAZQUEZ.



MEXICO, D. F.

1998.

26227

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central

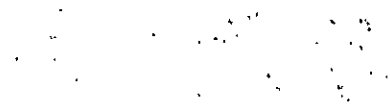


UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

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.



RECONOCIMIENTO

Este trabajo de tesis se realizó en el Departamento de Biología Celular y Tisular de la Facultad de Medicina de la U.N.A.M. bajo la dirección del Dr. Pedro Nicolás Velázquez. Proyecto financiado parcialmente por DGAPA (IN203594) y CONACYT (0265P-N)

AGRADECIMIENTOS

A los miembros del jurado:

DRA. MARIA LUISA FANJUL PEÑA
DR. LUIS FELIPE JIMENEZ GARCIA
DRA. MARIA EUGENIA MENDOZA GARRIDO
DRA. MARTA CATALINA ROMANO PARDO
DR. PEDRO NICOLAS VELAZQUEZ
DRA. MARCELA ESPERANZA AGUILAR MORALES
DR. RENE DE JESUS CARDENAS VAZQUEZ

Por la revisión del manuscrito y sus valiosas aportaciones que contribuyeron a mejorar el presente trabajo.

Al Biol. Armando Zepeda Rodríguez por su valiosa ayuda en el procesamiento del material para microscopía electrónica de barrido.

Al Pasante de Biología Guillermo Espinoza Villanueva por su colaboración en el procesamiento del material para microscopía electrónica de transmisión y autoradiografía.

Al Pasante de Biología Francisco Pasos Nájera y Tomas Cruz por su apoyo en el procesamiento del material fotográfico.

A mis padres Carmen y Manuel por su apoyo y gran cariño

A mis hermanos Sara, Memi, Sergio, Rafael, Armando, Arturo, Eduardo y Jorge

A todos mis sobrinos por su cariño y dulzura

Muy especialmente a Pedro por su cariño, por compartir gran parte de mi vida y por ser un estímulo constante para seguir adelante.

A mis amigos Leti, Andrea, Arturo y Esther

*“Solo así he de irme
como las flores que perecieron,
nada quedará en mi nombre”
“Nada de mi fama aquí en la tierra”
; Al menos flores, al menos cantos!*

Nezahualcoyotl

INDICE

RESUMEN

INTRODUCCION

DIFERENCIACION DEL TESTICULO	1-4
Papel del mesonefros	4-6
TESTICULO DE AVES	6-8
Epidídimo	8
Glándulas accesorias, Vascularización y Vías deferentes.....	9-10
Testículo embrionario de aves	11
CELULAS SOMATICAS DEL TESTICULO	
Células de Sertoli	11-14
Funciones de las células de Sertoli	
Barrera hematotesticular	14-15
Secreción de proteínas y otros productos	15-19
Células de Leydig	19-21
Células de Leydig fetales	21-22
Células de Leydig adultas	22-23
Células Peritubulares	23-24
INTERACCIONES CELULARES	24-27
ESTEROIDOGENESIS TESTICULAR	28-30
EVENTOS ENDOCRINOS INICIALES	31-32
Desarrollo del eje hipófisis-gonada	32-33
REGULACION DE LA FSH EN EL TESTICULO	33-35
NATURALEZA DE LA FSH	35-38
PROLIFERACION CELULAR EN LAS GONADAS	38-39
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y OBJETIVOS	40-41
MATERIALES Y METODOS	42-48
RESULTADOS	49-58
DISCUSION	59-63
CONCLUSIONES	64-65
APENDICE	66-68
BIBLIOGRAFIA	69-82

RESUMEN

En el testículo de los vertebrados se sintetizan hormonas, factores de crecimiento y algunas proteínas que participan en los diferentes procesos que se llevan a cabo durante el desarrollo gonadal; un grupo importante de estos compuestos lo constituyen las hormonas gonadotropas sintetizadas en la adenohipófisis, bajo la acción de factores liberadores producidos en el hipotálamo; estas hormonas son la foliculo estimulante (FSH) y la hormona luteinizante (LH), la primera interviene en el desarrollo, crecimiento y funcionalidad de las células de Sertoli en el testículo, estimulando la síntesis de diversas proteínas y hormonas esteroides, particularmente 17β -estradiol. Por otra parte, la LH regula la secreción de testosterona por las células de Leydig y contribuye en el desarrollo y maduración de éstas células somáticas testiculares. Ambas hormonas intervienen activamente en la diferenciación gonadal y en las múltiples funciones que se realizan en el testículo.

La acción de estas hormonas sobre el crecimiento y proliferación celular en el testículo embrionario de las aves ha sido poco estudiada, pero se sabe que en este proceso además del estímulo hormonal, es necesaria la presencia de algunos otros elementos, como factores de crecimiento para que se realice la división celular. El objetivo del presente trabajo fué evaluar el efecto proliferativo inducido por las hormonas hFSH (humana de alta pureza), rFSH (recombinante), hCG (gonadotropina coriónica humana) con actividad luteinizante y 17β -estradiol en el testículo embrionario de las aves. Para lo cual se obtuvieron testículos de embriones de pollo de 18 días de incubación, que se disociaron mecánico-enzimáticamente, obteniéndose una población mixta testicular y a través de gradientes de

metrizamida se purificaron cinco subpoblaciones testiculares (F1 a F5), estas al igual que la población mixta fueron sembradas sobre membranas de policarbonato y cultivadas con medio mínimo esencial modificado por Dulbecco (DMEM), adicionado con FSH, hCG o 17β -estradiol de acuerdo al grupo experimental de que se trató; a todos los grupos se les agregó $0.1 \mu\text{Ci}$ de timidina tritiada para evaluar el índice proliferativo. Los cultivos se incubaron durante 60 horas a 37°C en una atmósfera de 95% de aire y 5% de CO_2 .

Se observó que los cultivos celulares de población mixta testicular, tratados con hFSH y rFSH respondieron al estímulo hormonal incrementando *significativamente* la incorporación de timidina marcada, mientras que la hCG y el 17β -estradiol no son inductores de la división celular; el efecto proliferativo de la FSH, se observa a partir de las 36 horas de cultivo, alcanzando el nivel máximo de incorporación a las 60 horas.

La subpoblación de mayor densidad (F5) fué la que presentó un mayor estímulo proliferativo, mientras que la respuesta observada en F3 y F4 fué menor; las fracciones de menor densidad (F1 y F2) no respondieron a la FSH.

Con el empleo de técnicas de microscopía electrónica de transmisión, barrido y autoradiografía, observamos que el testículo de embriones de pollo de 18 días de incubación, esta cubierto por una gruesa capa fibrosa, bajo la cual se observaron cordones testiculares que presentan células de Sertoli de gran tamaño con varios nucleólos, así como células germinales; las células pericordonaes rodean los cordones, mientras que en el intersticio se encontraron células de Leydig con sus características inclusiones lipídicas. La autoradiografía comprobó morfológicamente los resultados obtenidos con la técnica de incorporación de ^3H -timidina, demostrados por la precipitación de gránulos de plata en el núcleo celular de algunas subpoblaciones testiculares.

La aportación del presente trabajo, fué demostrar que la hFSH, así como la rFSH inducen de manera selectiva la proliferación celular en algunas subpoblaciones celulares del testículo embrionario de las aves, mientras que la hCG y el 17 β -estradiol no participan en tal evento.

INTRODUCCION

El desarrollo ontogénico de las gónadas, así como las múltiples funciones que se llevan a cabo en ellas, se realizan por la interacción de diversos procesos y tipos celulares que finalmente organizan todos los elementos moleculares, morfológicos y funcionales para constituir una gonada estructural y metabólicamente madura.

El inicio de estos procesos de diferenciación del tejido gonadal, está determinado por el establecimiento del sexo genético de un organismo durante la fecundación, formándose dos tipos de embriones con diferente contenido cromosómico. El embrión hembra posee dos cromosomas X, convirtiéndose en el sexo homogamético; mientras que los embriones masculinos tienen un cromosoma X y uno Y constituyendo el sexo heterogamético (Ohno, 1981).

Una vez determinado el sexo genético, las células germinales primordiales que se originan en la pared del saco vitelino, migran hacia las crestas urogenitales en donde se establecen, iniciándose la formación de las gónadas características de cada sexo, estos órganos tempranamente, atraviesan por un periodo de gónada indiferenciada, debido a que no hay diferencias morfológicas entre ambos sexos, en esta etapa pueden identificarse tres componentes principalmente:

1) células germinales primordiales, 2) mesénquima de la cresta urogenital y 3) una cubierta de tejido epitelial (Wilson y cols. 1981).

DIFERENCIACION DEL TESTICULO

Una vez establecidas las células germinales primordiales en las crestas urogenitales, se inicia la diferenciación histológica de la gónada, aunque se ha observado que aún en ausencia de células germinales o en presencia de un bajo número de ellas, se lleva a cabo la reorganización del tejido mesenquimatoso presente en las crestas (Merchant, 1975). Bajo la

influencia del factor determinante del testículo Sry (del brazo corto del cromosoma Y, que abarca una región de 35 kilobases), la gónada se diferencia a testículo (Carlson, 1994); el epitelio celómico comienza a proliferar, mientras que la región medular inicia su organización estructural (en el ovario es la región cortical) y empiezan a constituirse los primeros cordones seminíferos (Ohno, 1978) (fig1); los cordones sexuales se separan del epitelio celómico debido a la invasión de mesénquima y vasos sanguíneos que modifican el arreglo de estos cordones, ahora denominados “cordones testiculares”; estas estructuras se desplazan y establecen en la región medular de la gónada como resultado de un movimiento morfogénico que implica cambios en la adhesividad de las células epiteliales y un activo depósito de las moléculas que forman la lámina basal (láminina y colágena principalmente) (Moreno y Merchant, 1997); los primeros cordones en diferenciarse son los que se encuentran en la periferia y también son los primeros en vascularizarse, mientras que las células germinales se sitúan dentro de los cordones por acción de las células de Sertoli, las células que quedan en el intersticio degeneran (Escalante y Merchant, 1992).

Alrededor de los cordones testiculares, se establecen células miodes peritubulares, que se aplanan en forma paralela a la lámina basal y estas células intervienen en la formación de las membranas basales. A nivel ultraestructural estas células se caracterizan por tener un retículo endoplásmico rugoso muy desarrollado, y en el espacio extracelular se presenta gran cantidad de material fibrilar como colágena y fibronectina (Paranko y cols. 1983).

Las células de Sertoli que se encuentran dentro de los cordones testiculares, se encargan del soporte físico de las células germinales primordiales y de la síntesis de hormona antimülleriana (HAM), que estimula la regresión de los conductos de Müller bajo la acción conjunta de la testosterona y dihidrotestosterona secretadas por las células de Leydig, con la regresión de estos conductos, no se desarrollan estructuras del tracto genital femenino como las tubas uterinas, el útero y la parte superior de la vagina.

La HAM es un miembro de la familia de los factores de crecimiento transformante (TGF β) y es la primera sustancia secretada por las células de Sertoli durante su diferenciación (Moreno y Merchant, 1997). En el ratón la HAM es detectada en testículos fetales por hibridación in situ a los 12 días postcoito (dpc) y su expresión no depende de la presencia de células germinales primordiales (Münsterberg y cols. 1991). La secreción de HAM por las células de Sertoli puede estar regulada por el factor Sry, que probablemente se exprese en estas células, participando en su diferenciación e interviniendo en las funciones que se realizan durante el desarrollo testicular. En gónadas fetales de rata se encontró que “el Sry interactúa con los promotores de HAM y la enzima P450 aromatasa y se ha propuesto que la regulación de estos dos genes directamente controlan la diferenciación de la gónada hacia testículo” (Moreno y Merchant, 1997).

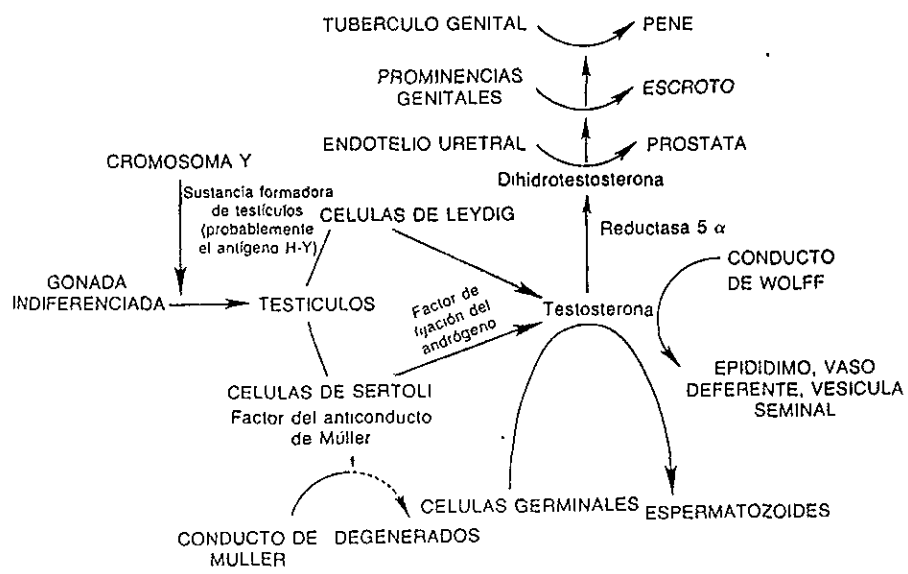


Fig.1 Resumen de los principales fenómenos que intervienen en el establecimiento de la gónada masculina en los mamíferos (Gilbert, 1985).

Una vez constituidos los cordones testiculares, fuera de ellos se encuentran células del estroma que se diferencian originando varios tipos celulares: células mioideas, fibroblastos, endotelios y células de Leydig; estas últimas sobresalen de los tipos celulares del estroma debido a que son las principales productoras de testosterona. Estas células se diferencian después del establecimiento de los cordones testiculares, comienzan a presentar mitocondrias con crestas tubulares, inclusiones de lípidos en su citoplasma y retículo endoplásmico liso bien desarrollado. El origen de estas células se encuentra aún en discusión y se explicará más adelante.

Papel del mesonefros

Durante la diferenciación gonadal, las gónadas de ambos sexos mantienen una estrecha relación con el mesonefros, por lo que se cree que esta estructura participa en la diferenciación gonadal, ya que se postula que las células somáticas se derivan del mismo (Witschi, 1951), aunque la teoría más aceptada es la que propone su origen a partir de células del mesénquima (Satón, 1985; Pelliniemi, 1980). A través de cultivos de órganos, en donde se observó la diferenciación gonadal en presencia o ausencia del mesonefros, se encontró que la diferenciación de las principales células somáticas, células de Leydig y de Sertoli es independiente de la presencia del mesonefros. Sin embargo, la formación de los cordones testiculares depende de la presencia de células provenientes del mesonefros.

Se encontró que células mioideas y endoteliales, de origen mesonéfrico, son necesarias para la organización de los cordones testiculares. Estudios más recientes con cultivos de órganos, en donde se colocaron gonadas indiferenciadas en contacto con mesonefros de embriones transgénicos, que expresan el gen Lac-Z de origen bacteriano, el cual tiene como característica que las células que lo contienen al ser incubadas en un sustrato de x-gal producen un color azul, permitió observar que células teñidas provenientes del mesonefros

migran hacia la gónada y a nivel ultraestructural se demostró que algunas de estas células tienen la capacidad para diferenciarse en células de Leydig (Moreno y Merchant, 1997). Con lo anterior, la propuesta sobre el origen mesonéfrico de estas células, tiene algunas pruebas a su favor, pero otros autores recientemente proponen que algunas de ellas se derivan del mesénquima (Saez, 1994), por lo que tal vez estas células tengan un origen dual.

Durante las primeras etapas de la diferenciación sexual, la participación de factores de crecimiento tales como el TGF β (factor de crecimiento transformante β), EGF (factor de crecimiento epidérmico), hormonas hipofisarias y gonadales son de vital importancia para el desarrollo morfológico y funcional de las gonadas características de cada sexo (Carlson, 1994). Además de estos elementos químicos, también las interacciones celulares (células somáticas-células germinales) tienen un papel importante, así como los cambios que presentan las propias células a lo largo del desarrollo gonadal; es así, que se cree que las células de Sertoli en el caso del testículo, pierden paulatinamente su adhesividad al progresar el desarrollo gonadal, lo cual es importante para el establecimiento normal de las células germinales dentro de los cordones seminíferos (Escalante, 1992); también ambos tipos celulares son esenciales para la regulación de la gametogénesis en estado adulto (Steinberger, 1971; Dorrington y Armstrong, 1979; Skinner, 1991) y las células somáticas contribuyen a la formación de un microambiente físico y químico óptimo para las células germinales. A pesar de la importancia de ambos grupos celulares, algunos estudios in vitro indican que el establecimiento de una gónada se puede lograr con un número reducido de células germinales primordiales (McCarrey, 1978, 1979 y 1982; Merchant 1975,1979), lo cual nos indica, que la diferenciación gonadal es un proceso complejo en el que existen aun

interrogantes acerca de la importancia de las interacciones entre los diferentes tipos celulares que constituyen el testículo.

TESTICULO DE AVES

Los testículos en las aves son órganos pareados que están situados entre la base de los pulmones y el segmento intermedio de los riñones. Aunque están próximos a los sacos aéreos, su temperatura es la misma que la del resto del cuerpo (41-43°C), por lo que la espermatogénesis en las aves no se lleva a cabo a una temperatura inferior a la corporal como en el caso de algunos mamíferos.

Estos órganos se encuentran suspendidos de la parte dorsal de la cavidad abdominal por un ligamento, el mesorquio, muy cerca de la aorta y de la vena cava (fig.2). Están envueltos por dos capas: la primera, delgada y transparente, mientras que la segunda, la albugínea es de color blanco. En el macho maduro sexualmente activo, los testículos miden 3.25 a 5.6 cm de largo, 1.6 a 2.9 cm de ancho y unos 2.5 cm de grosor dorsoventralmente.

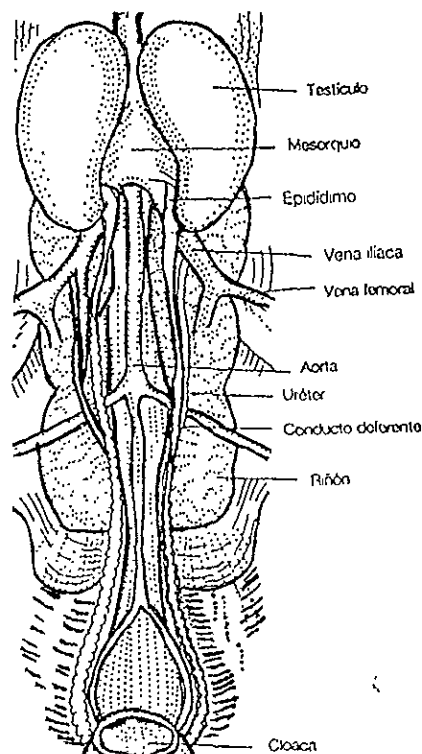


Fig. 2. Localización de los testículos en aves adultas (Sturkie, 1976)

Internamente, los testículos están constituidos por miles de túbulos seminíferos, cada uno de los cuales se encuentra rodeado por mesénquima, células mioideas peritubulares y células de Leydig. En el interior de los túbulos pueden observarse células de Sertoli formando una barrera entre los vasos sanguíneos y las oogonias (barrera hemato-testicular) y células germinales en diferentes etapas de maduración. Durante el periodo de quiescencia sexual, el epitelio germinal está formado por espermatogonias tipo A y células de Sertoli. Durante el periodo reproductivo, las espermatogonias tipo A presentan una actividad mitótica elevada, transformándose en espermatogonias tipo B, posteriormente estas se convierten en espermátocitos primarios que entran en la primera división reduccional, transformándose en espermátocitos secundarios que sufren la segunda división meiótica, originándose espermátidas que entran al proceso de espermiotelirosis, en el que pierden gran parte de su

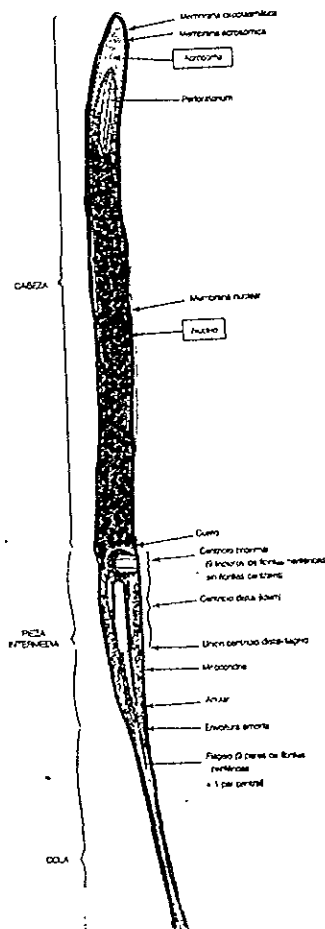


Figura 3. Espermatozoide de Gallus domesticus

citoplasma, formándose finalmente espermatozoides maduros (Gomar,1982), los espermatozoides de las aves domésticas, son muy diferentes de los encontrados en mamíferos, tienen una cabeza larga en forma de lanza, con un acrosoma puntiagudo y una cola larga (fig.3).

La longitud de la cabeza es de 14m μ , mientras que la longitud de la cola es de 84m μ . Los espermatozoides son liberados a la luz del túbulo seminífero, migrando hacia la rete testis, conductos eferentes, epidídimo, conducto deferente y vesícula espermática, que se encuentra en la pared lateral del segmento intermedio de la cloaca o urodaeum.

Epidídimo

El epidídimo es una estructura alargada unida al borde dorsomedial del testículo. En los gallos de ocho a nueve meses de edad tiene un grosor de 1 mm (Gray, 1937), menor al de los mamíferos. Su extremidad cefálica está en íntimo contacto con la glándula adrenal, esta asociación es más evidente en el epidídimo izquierdo (Lake,1957). En el epidídimo de las aves puede distinguirse la cabeza, el cuerpo y la cola; la rete testis se extiende desde el testículo, dentro de la superficie adyacente de las extremidades craneal y caudal del epidídimo. En un macho de dos meses de edad la rete testis alcanza hasta 70 conductos deferentes de los testículos. Estos comienzan como conductos grandes con mucha altura, recubiertos por epitelio columnar o pseudoestratificado en su mayor parte ciliado (Gray, 1937), se continúan como canales más estrechos y se reduce su número a unos 50 aproximadamente, con un recubrimiento de células ciliadas columnares pseudoestratificadas. Finalmente, se abren en el conducto epididimario. El epidídimo contiene cerca de 90 conductos aberrantes, remanentes de sacos ciegos de túbulos mesonéfricos (Marshall, 1961). El conducto epididimario es muy corto comparado con el de los mamíferos (Lake,1957), su extremo caudal se continúa con el conducto deferente.

Glándulas genitales accesorias

No existe ninguna estructura homóloga a la próstata, vesícula seminal o glándula bulbouretral de los mamíferos, Lake en 1957, se basó en las posiciones y secreciones para indicar que los cuerpos vasculares podrían tener una función análoga a las glándulas bulbouretrales de los mamíferos.

Vascularización

La sangre aferente es drenada por una arteria testicular muy corta que proviene de la aorta, esta arteria penetra directamente en el tejido testicular en donde se ramifica. Las pequeñas venas que van desde el interior del testículo hacia la periferia se unen formando varias venas testiculares sub-albugíneas que desembocan en la vena cava (fig.4). No existe complejo pampiniforme que regule el flujo sanguíneo en función de la temperatura testicular (al contrario de lo que ocurre en mamíferos).

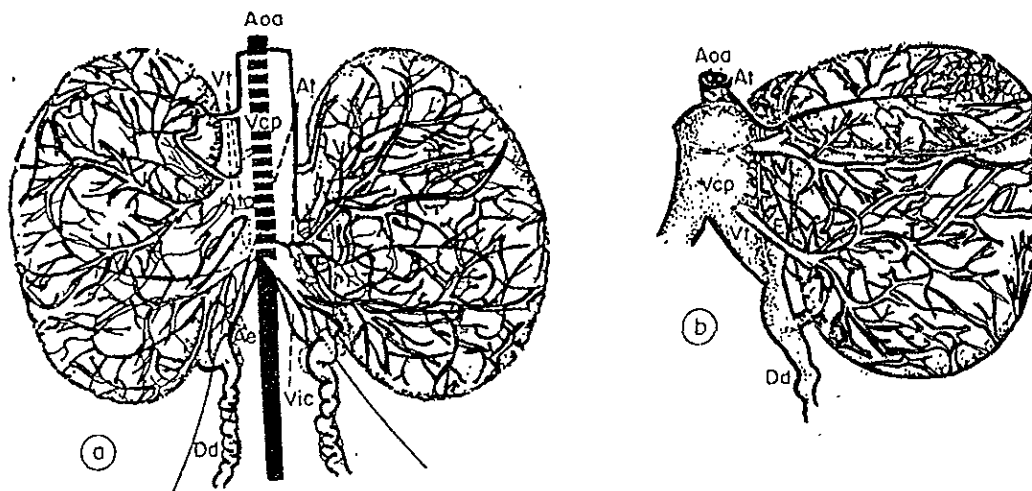


Figura 4. Vascularización del testículo de *Gallus domesticus*. Aoa, aorta; At, arteria testicular principal; Aa, Arteria testicular accesoria; Vt, venas testiculares; Ae, arteria epididimaria; E, epidídimo; Dd, conducto deferente; Vic, vena cava inferior. (Sturkie, 1976).

Vías deferentes

Los túbulos seminíferos terminan en la proximidad inmediata del cordón testicular en donde se conectan con los túbulos de la *rete testis*, comunicados a su vez con los conductos deferentes que desembocan lateralmente en el canal del epidídimo. Esta estructura se prolonga por el conducto deferente, muy desarrollado, el cual se extiende a lo largo de 12-15 cm, hasta desembocar a través de una vesícula espermática, en la pared lateral de segmento intermedio de la cloaca o urodaeum (figs. 5 y 6) la cual concluye en una papila eyaculadora. El conducto deferente por donde transitan los espermatozoides esta muy plegado, de manera que tal vez su longitud real sea superior a los 30 cm. Entre las porciones proximal y distal su diámetro aumenta de 300 a 900 μm , a la vez que el espesor de su pared disminuye de 30 a 15 μm . Por las funciones que realiza puede ser comparado con el epidídimo de los mamíferos, dado que es el lugar de maduración y almacenamiento de los espermatozoides.

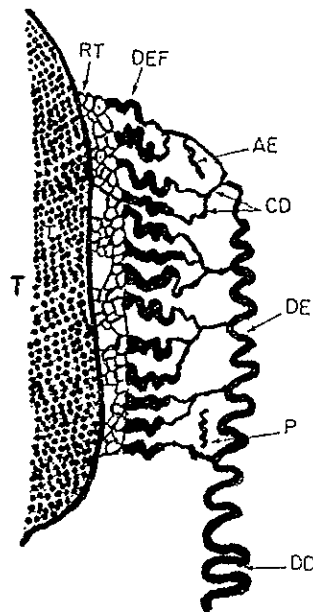


Fig 5. Vías deferentes de *Gallus domesticus*. Los tubos seminíferos del testículo (T) se interconectan con la rete testis (RT), la cual a su vez esta conectada por los conductos eferentes (DEF) y finos conductillos (CD) al canal epididimario (DE), este se prolonga por el conducto deferente (DD). Epidídimo accesorio (AE), paradídimo (P). (Sturkie, 1976).

Testículo embrionario de aves

El testículo de embriones de pollo de 18 días de incubación ya presenta una verdadera túnica albugínea rodeando al testículo. Entre el epitelio superficial y la región medular donde se encuentran los cordones testiculares, se encuentra tejido laxo y material fibrinoide tal vez constituido de colágena y fibronectina; pueden observarse también algunos vasos sanguíneos y en el intersticio se encuentran células de Leydig con sus características inclusiones lipídicas, algunas de estas células tienden a formar conglomerados (fig.7). Rodeando los cordones testiculares se encuentran células pericordonaes o peritubulares que mantienen la integridad de los cordones y participan en la formación de la lámina basal. Delimitando los cordones testiculares se observa una lámina basal, y hacia el interior se encuentran espermatogonias de gran tamaño con citoplasma claro y un núcleo de gran tamaño con cromatina poco condensada, células de Sertoli de menor tamaño que las espermatogonias, que presentan un núcleo pequeño en donde pueden observarse varios nucléolos.

CELULAS SOMATICAS DEL TESTICULO

Células de Sertoli

En el testículo y en el ovario, las células somáticas proporcionan un microambiente óptimo para el desarrollo de las células germinales. En el testículo, las células de Sertoli constituyen el tipo principal de células somáticas, cuyo origen es incierto, aunque se ha propuesto que se derivan del mesonefros (Witschi, 1951; Byskov, 1981). Estas células proliferan durante el desarrollo fetal y neonatal, pero cesan la mitosis al iniciarse la espermatogénesis. Ya establecidas las células de Sertoli dentro de los cordones testiculares, aumentan de tamaño y emiten prolongaciones citoplásmicas laterales y apicales, formándose la barrera hematotesticular y comunicándose íntimamente con las pre-espermatogonias (Knobil, 1988).

Ultraestructuralmente los núcleos de estas células poseen poca heterocromatina en comparación con otras células somáticas; principalmente contienen eucromatina. El núcleo de las células de Sertoli es de tamaño variable, polimorfo en el gallo; su cromatina está condensada en pequeños puntos. El nucléolo es poco desarrollado, en ocasiones se presentan hasta cuatro nucleólos por núcleo de célula de Sertoli. El aparato de Golgi está bien desarrollado tal vez debido a la elevada síntesis de proteínas, sin embargo, el retículo endoplásmico rugoso es escaso en relación a la cantidad de proteínas que se sintetizan en estas células. Carecen de grandes vacuolas y de gránulos de secreción relacionados con el aparato de Golgi, no hay evidencias de exocitosis y presentan un número pequeño de vesículas que se abren en la superficie lateral interna de estas células; estas características indican que este tipo celular no libera cantidades significativas de proteínas al lumen de los túbulos seminíferos, a pesar de que estas células pueden secretar cerca de 100 proteínas (Bardin y cols, 1988), (tabla 1.).



Fig.7. Corte semifino de testículo de embrión de pollo de 18 días de incubación. En el pueden observarse dentro de los cordones testiculares, células germinales de gran tamaño (cg), y células de Sertoli que presentan varios nucléolos en su núcleo (cs). En el intersticio se encuentran células de Leydig con inclusiones lipídicas (cl).

Al parecer estas proteínas no son almacenadas y son secretadas inmediatamente después de su síntesis. Otra de las características importantes de las células de Sertoli es la presencia de uniones especializadas entre ellas, que mantienen la integridad estructural del cordón testicular y constituyen el componente epitelial de la barrera hematotesticular.

El número total de células de Sertoli en el testículo adulto de aves oscila entre 100 y 300 millones por testículo, un número mucho menor que el de las células germinales.

El citoplasma de estas células presenta un elevado contenido de glucógeno y de sustancias PAS positivas; estas células presentan un retículo endoplásmico liso muy desarrollado. Entre las células de Sertoli pueden observarse uniones especializadas tipo desmosomas, las cuales se cree son formadas bajo acción de la FSH en mamíferos (Heckert y cols. 1993).

Las células de Sertoli llevan a cabo múltiples funciones, son consideradas como las células “nodrizas” de las células germinales (Griswold,1988), ya que las proveen de un soporte estructural, suplen sus requerimientos nutricionales a través de la producción de diversos metabolitos, principalmente glucosa y lactato, éste último es considerado un metabolito crítico para el desarrollo de estas células (Jutte y cols. 1981; Nakamura y cols. 1981; Skinner, 1987), producen la hormona fijadora de andrógenos, plasminógeno activador, poseen receptores para FSH la cual regula la síntesis de estrógenos; inhibina, transferrina y ceruloplasmina (proteínas que se unen a metales, hierro y cobre respectivamente), glucoproteínas sulfatadas 1 y 2 (Fritz, 1978; Griswold, 1988; Heckert, 1993, Carlson, 1994) (tabla 1).

Tabla 1. PROTEÍNAS SECRETADAS POR LAS CELULAS DE SERTOLI

Proteína	Función
ABP	Proteína que se une a andrógenos
Inhibina	Hormona que inhibe la secreción de FSH
Factores de crecimiento	TGF β , IGF, FGF, entre otros
Somatomedina	Actúa sinérgicamente con la FSH
Transferrina	Proteína que transporta hierro
Ceruloplasmina	Proteína que transporta cobre
Antígeno H-Y	Proteína específica de machos que se une a receptores en las células de Sertoli. Se cree participa en la diferenciación testicular.
Plasminógeno activador	Se ha propuesto que está relacionado con la migración celular en tejidos normales. Al parecer facilita la liberación de las espermátidas.
Clusterina	Esta proteína se concentra en el lumen de los cordones seminíferos, su función se desconoce.
Testibumina	Estructuralmente está relacionada con la albúmina y la alfa-fetoproteína. Responde a FSH y testosterona. También se encuentra en la hembra.

(Tomado de Knobil y Neill, 1988)

Funciones de las células de Sertoli

Barrera hematotesticular

Las uniones presentes entre las células de Sertoli contribuyen a la formación de la barrera hematotesticular. Además de ser una barrera física, también existen diferencias moleculares entre varios compartimientos, que indican la formación de una barrera química. Existe

evidencia de que la composición del líquido que se encuentra dentro de los túbulos seminíferos y de la rete testis es muy diferente de la sangre y linfa testicular, las células de Sertoli secretan líquido dentro de los túbulos seminíferos que contiene cinco o siete veces más potasio que el encontrado en la rete testis, y dos a tres veces más que en el suero (Mufly y cols. 1985). La producción de este líquido intratubular por las células de Sertoli es regulada por la FSH; por otra parte, el inicio de la secreción de este líquido en la luz de los túbulos seminíferos se da cuando los primeros espermatozoides son liberados para transportarse (con ayuda de este fluido) del testículo al epidídimo donde finalmente maduran. Una de las funciones de la barrera hematotesticular es la de mantener un gradiente de iones, pequeñas partículas y proteínas entre la sangre y el líquido intratubular (Bardín, 1988).

Secreción de proteínas y otros productos

Las células de Sertoli llevan a cabo la síntesis de cerca de 100 proteínas (Knobil, 1988). La proteína transportadora de andrógenos (ABP), fué una de las primeras en descubrirse. Esta proteína es una glucoproteína dimérica con un peso molecular nativo de 85,000; esta compuesta por dos tipos de monómeros con pesos moleculares aproximadamente de 45,000 y 41,000, estos monómeros son llamados pesado (H) y ligero (L) de acuerdo a su desplazamiento electroforético en geles de SDS-poliacrilamida. Las funciones que se cree realiza esta proteína son:

- a) transporte de testosterona a las células de Sertoli.
- b) transporte de andrógenos para mantener niveles altos de estas hormonas esteroideas en los túbulos seminíferos y el epidídimo.

Proteínas que transportan metales

Ya ha sido comprobada la síntesis y secreción de proteínas transportadoras de metales por las células de Sertoli (Skinner y Griswold, 1980; Skinner y Griswold, 1983; Wrigth y cols. 1981). Estas proteínas son la transferrina y la ceruloplasmina que transportan hierro y cobre respectivamente, se cree que estas son transportadas hacia las células germinales. La transferrina sin embargo, es necesaria para el crecimiento de las células de Sertoli, tal vez actúa como un agente mitogénico específico para este tipo celular, independientemente de su actuación como transportador de hierro (Bardin y cols, 1988). Algunas investigaciones indican que la transferrina en ausencia de hierro no presenta una actividad promotora del crecimiento (Pérez-Infante y cols. 1986).

Plasminógeno activador

La actividad de esta enzima es estimulada por la FSH y el dibutyryl AMPc *in vitro*. Se cree que esta proteína está relacionada con la restructuración tisular y con procesos de migración celular en tejidos normales. En el tejido gonadal puede contribuir a la liberación por las células de Sertoli de espermátidas maduras, e intervenir en la migración de las células germinales en su mayoría espermatoцитos en fase de preleptoteno, del compartimiento basal a la luz de los túbulos seminíferos interviniendo en las uniones celulares entre las células de Sertoli, produciendo su separación y la consecuente liberación de las células germinales (Bardin, 1988).

Factores de crecimiento

En las células de Sertoli se sintetizan diversos factores de crecimiento que tienen múltiples funciones en el tejido gonadal, se mencionan algunos de ellos:

El factor de crecimiento tipo insulínico-1 (IGF-1) es producido por células de Sertoli, células de Leydig y células germinales de ratas inmaduras (Hansson y cols. 1989). La producción de este factor es regulada por las hormonas hipofisarias, LH y FSH. Aunque se

ha comprobado un leve efecto mitogénico sobre las células de Leydig, una de las funciones principales de este factor es la de regular las funciones de las células de Leydig diferenciadas (Khan y cols. 1992). El pretratamiento de células de Leydig porcinas con IGF-1 estimula la producción de AMPc y testosterona *in vitro* (Bernier y cols. 1986; Perrard y cols. 1987; Benahmed y cols. 1987).

Factor de crecimiento transformante β (TGF β). La familia de estos factores de crecimiento contienen generalmente cinco distintas proteínas diméricas, pero sólo tres de ellas (β_1 , β_2 y β_3) son expresadas en mamíferos. Estas proteínas son parte de una superfamilia de proteínas relacionadas estructuralmente que incluyen inhibina, activina, hormona antimulleriana, el gene decapentaplégico de *Drosophila* y el gen *Vgl* de ranas (Massague, 1990; Burt y Paton, 1992). El TGF β se une a tres tipos de receptores de membrana, el 53K (tipo I), 75K (tipo II) y el 200-400K (tipo III). Estudios recientes han determinado el papel de cada uno de estos tipos de receptores, el receptor tipo III, también conocido como betaglicano, no actúa directamente en la señalización del TGF β , sin embargo, se une particularmente a TGF β_2 . El receptor tipo II, aumenta la sensibilidad celular al TGF β y disminuye las diferencias biológicas entre las isoformas de TGF β (López-Casillas y cols. 1993). Los receptores tipo II contienen dominio treonina-serina cinasa, se unen a TGF pero requieren del receptor tipo I para la inhibición de la señal de crecimiento (Wrana y cols. 1992). Finalmente el receptor de tipo I, el cual requiere del tipo II para su transporte a la superficie celular parece modular los efectos del TGF β sobre la expresión de *junB* y algunos componentes de la matriz extracelular (Chen y cols. 1993). Este factor de crecimiento ha demostrado tener propiedades multifuncionales, actuando como agente inhibitorio o estimulador de la diferenciación celular (Massague, 1990; Sporn y Roberts, 1992). Estudios *in vitro* indican que este factor es secretado por células de

Sertoli y células peritubulares de rata (Skinner y Moses, 1989) y células de Sertoli de cerdo (Benahmed y cols. 1988). Análisis por inmunoblot de medio condicionado de células de Sertoli y peritubulares de rata indican que los tres TGF β s, son secretados por ambos tipos celulares (Mullaney y Skinner, 1993). Este factor de crecimiento tiene una importante actividad mitogénica; la secreción de estrógenos particularmente 17 β -estradiol estimula la síntesis de TGF β el cual actúa junto con la FSH desencadenando una respuesta mitogénica en células de Sertoli de ratas (Dorrington, 1993).

Factor de crecimiento fibroblástico

Este factor es miembro de una familia que incluye el FGF ácido, FGF básico, FGF del sarcoma de Kaposi y factor de crecimiento de queratinocitos, entre otros. Todos ellos se encuentran distribuidos en diversos tejidos y presentan múltiples funciones, incluyendo la estimulación de la multiplicación celular y la diferenciación de las células derivadas del mesodermo embrionario, neuroectodermo, crecimiento neuronal y angiogénesis (Gospodarowicz, 1990). El receptor para FGF es una proteína glucosilada con una cadena simple transmembranal, un dominio citoplásmico tirosín-cinasa y dos a tres dominios extracelulares tipo inmunoglobulina (Partanen y cols. 1991; Werner y cols. 1992).

Factor de crecimiento epidérmico (EGF) y factor de crecimiento transformante- α (TGF α). Estos factores pertenecen a una familia de glucoproteínas que poseen seis residuos de cisteína separados por un número variable de aminoácidos (Carpenter, 1987; Fisher y Lakshmanan, 1990). El EGF y el TGF α son los principales miembros de esta familia relacionados con el desarrollo en mamíferos. Existen estudios contradictorios sobre el tipo celular que secreta este factor, aunque en estudios recientes utilizando anticuerpos específicos, se demostró la presencia de EGF en células germinales posmeióticas y en

células de Sertoli (Radhakrishnan y cols. 1992). Por otra parte, el RNAm para TGF α se expresa en cultivos de células peritubulares y de Sertoli (Skinner y cols. 1989).

Algunos otros factores secretados por las células de Sertoli se muestran en la siguiente tabla:

Tabla 2. Principales factores producidos por los testículo que actúan en las células de Leydig

Factor	Sitio de producción	Evidencia	Regulación	Células de Leydig	
				Receptor	Efecto
Factor estimulador de la espermatogénesis	CS	proteína	↑ FSH	ND	↑ esteroidogénesis
Factor inhibitorio de la espermatogénesis diferenciación	CS	proteína			ND ↓ funciones de
IGF-1	CS y CL	RNAm, proteína	↑ FSH en CS	+	↑ funciones de diferenciación
TGF β s	CS, CP y CL	RNAm, proteína	↓ FSH en CS	+	↑↓ diferenciación y mitosis
EGF/TGF α	CS, CG, CP, CL	RNAm, proteína	?	+	↑ esteroidogénesis funciones de diferenciación
FGF	CS, CG, CP, CL	RNAm, proteína	↑ FSH en CS	+	↓ funciones de diferenciación
PDGF	CL	proteína	↑ hCG en CL	+	
Inhibina/activina esteroidogénesis	CS, CL	RNAm, proteína	↑ FSH en CS ↑ hCG en CL		ND inhibina ↑ activina ↓
esteroidogénesis Interleucina-1 diferenciación	CS, CL, M	RNAm, proteína	↑ LPS en CS		+ funciones de
ABP	CS, CL	RNAm, proteína		+	↑ esteroidogénesis
Endotelina	CS	RNAm, proteína	↓ FSH en CS	+	↑ esteroidogénesis

GC, células germinales, CS, células de Sertoli; CL, células de Leydig, CP, células peritubulares; M, macrófagos; ND, no determinado; PDGF, factor de crecimiento derivado de plaquetas; TNF α , factor de necrosis tumoral;

Células de Leydig

Las primeras descripciones sobre la histología del tejido intertubular testicular fueron realizadas por Leydig en 1850, quien reportó que en este espacio se encontraban masas celulares que presentaban vacuolas con lípidos. Años más tarde se descubriría que estos lípidos contenían esteres de colesterol (Ciaccio, 1910; Lotz y Jaffe, 1924) que son utilizados como sustrato para la síntesis de hormonas esteroideas en el testículo (Loisel, 1902; Ganfini, 1902), identificándose más tarde, la testosterona como principal esteroide sintetizado en las células de Leydig (David y cols, 1935; Gallagher y Koch, 1929).

Aunque las células de Leydig fueron identificadas en mamíferos a la mitad del siglo diecinueve, no fué hasta los años 60's cuando se demostró que estas células eran el mayor productor testicular de andrógenos. El origen de las células de Leydig es incierto, se cree que provienen del mesénquima (Christensen, 1975; Pelliniemi y Niemi, 1969) o de células que se derivan del mesonefros (Wartenberg, 1983; Moreno y Merchant, 1997). Estas células sólo proliferan durante etapas tempranas de la diferenciación gonadal y durante su maduración adquieren rápidamente una morfología característica de células productoras de esteroides, con abundante retículo endoplásmico liso, mitocondrias con crestas tubulares e inclusiones lipídicas (Knobil, 1988).

Las células de Leydig típicas de los mamíferos son células epitelioides de tipo poliédrico que poseen un núcleo único excéntrico de forma esférica o vesicular (Johnson, 1970).

En etapa fetal, las células de Leydig en mamíferos inician la producción de testosterona cuando se han diferenciado morfológicamente, a los 15.5-16.5 días en roedores. Estas células son muy activas esteroidogénicamente, a pesar de que su volumen es menor que en estado adulto, la producción de hormonas esteroides por célula es cinco veces mayor que en el adulto, se cree que esta elevada producción de hormonas esteroides se debe a la presencia de una población especial de éstas células, morfológicamente distintas a las células de Leydig adultas (Huhtaniemi, 1994), la elevada secreción de testosterona y dihidrotestosterona principalmente, tal vez se encuentren relacionadas con la aparición de los caracteres sexuales primarios en el embrión (Saéz, 1994). Una característica cualitativa de las células de Leydig fetales, es que forman acúmulos en lugar de dispersarse en el espacio intersticial como en el adulto. En 1994, Huhtaniemi, propuso un modelo en el cual las precursoras de las células de Leydig, carecen de los componentes necesarios para la síntesis de hormonas esteroides, como enzimas, receptores para LH y no contienen organelos característicos de este tipo de células; al avanzar el desarrollo embrionario las

células precursoras van adquiriendo los elementos celulares y metabólicos para llevar a cabo su función característica (fig. 8).

Otras características de las células de Leydig diferenciadas, es que presentan una alta actividad de 3β -hidroxiesteroide deshidrogenasa, NADPH, NADH, fosfatasa alcalina en la membrana plasmática y glucosa 6 fosfato deshidrogenasa. Las funciones de estas células estan reguladas por la hormona hipofisiaria LH, la cual estimula la síntesis de andrógenos y a su vez, estos esteroides regulan la síntesis de un factor parácrino, el PModS, sintetizado por las células peritubulares (Norton, 1994) y también por algunos factores liberados por las células de Sertoli (Saéz, 1994).

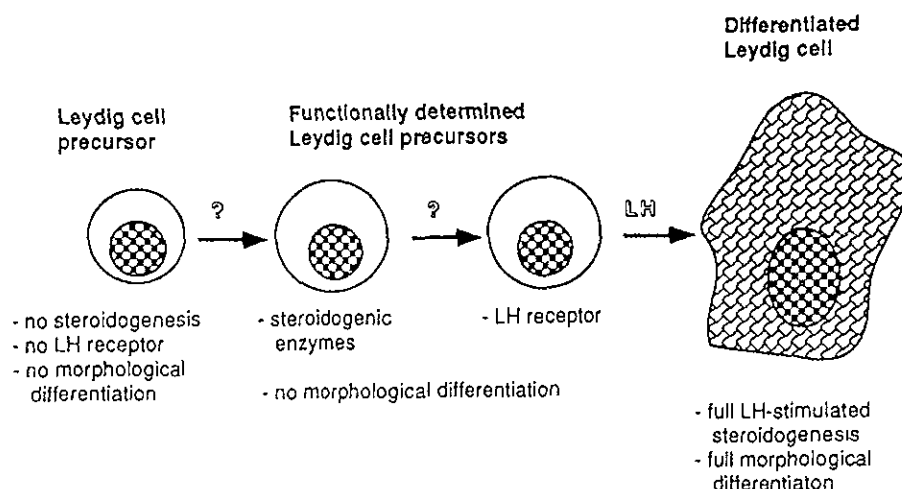


Fig.8 Esquema del desarrollo de las células de Leydig en mamíferos. (Propuesto por Huhtaniemi, 1994)

Células de Leydig fetales

El desarrollo ontogénico de las células de Leydig en los mamíferos involucra dos generaciones de estas células, las de tipo fetal que son responsables de la masculinización

adulto de células de Leydig bajo la acción de la LH. Este proceso de diferenciación involucra la aparición y un marcado incremento del retículo endoplásmico liso, mitocondrias con crestas tubulares, inclusiones lipídicas y cristales de Reinke, así como cambios en la morfología del núcleo (Mancini y cols. 1963; Prince, 1984).

Observaciones histológicas y ultraestructurales sugieren que la mayor parte de las células de Leydig fetales degeneran y algunas son transformadas en células de Leydig adultas (Tsai-Morris y cols. 1985; Roosen-Ruge, 1959; Kuopio y cols. 1989). Los factores que regulan la regresión de las células fetales durante la vida fetal tardía en la rata son desconocidas, y debido a la falta de evidencias claras que expliquen lo anterior, se ha planteado la idea de que este proceso de degeneración es controlado por factores parácrinos o autócrinos (Saez, 1994).

Células peritubulares

Las células peritubulares derivadas del mesénquima, se encuentran rodeando y contribuyen en el mantenimiento de la integridad estructural de los túbulos seminíferos. Estas células son sitios de acción de andrógenos y se cree participan en la regulación de estos en la función testicular (Verhoeven, 1979); se ha demostrado que estas células producen un factor parácrino, el PModS (Skinner y Fritz, 1985, 1986) bajo la acción de andrógenos, los cuales modulan la función de las células de Sertoli in vitro (Mullaney y cols., 1994). Dos formas de este factor han sido purificadas, el PModS-A y PModS-B ambos relacionados estructural y funcionalmente (Skinner y cols, 1988). Este factor producido por las células peritubulares, junto con los andrógenos y las gonadotropinas hipofisarias, coordinan la espermatogénesis y otras funciones testiculares.

Tabla 3. Funciones de las células somáticas encontradas en el testículo de los vertebrados.

Células de Leydig	Síntesis de andrógenos	Receptores a LH
Células de Sertoli	Síntesis de estrógenos, mantenimiento de la barrera hemato-testicular, secreción de inhibina, proteína acarreadora de andrógenos, transferrina, producción de lactato, plasminógeno activador.	Receptores a FSH
	Fagocitosis de los cuerpos residuales, regulación de la espermatogénesis.	Receptores a andrógenos
	Síntesis de proteínas sulfatadas 1 y 2; factores de crecimiento y mitógenos.	
Células peritubulares	Mantenimiento de la organización morfológica de los túbulos seminíferos y secreción del factor parácrino PModS.	Receptores a andrógenos

INTERACCIONES CELULARES

El mantenimiento y control de la diferenciación y fisiología normal del testículo, así como la realización de la espermatogénesis requiere de la interacción de los distintos tipos celulares que constituyen la gónada y de otros elementos como las hormonas hipofisarias LH y FSH. Se ha determinado que el papel de las células somáticas, es proveer a las células germinales de los elementos necesarios para su desarrollo y maduración, sin embargo, se desconocen algunos aspectos de cómo se realiza esta función y también el papel que juegan las interacciones entre las células germinales-somáticas, células de Leydig, Sertoli y peritubulares.

Algunos estudios in vitro han mostrado que diversos factores producidos en el testículo pueden actuar sobre las células de Leydig, regulando la esteroidogénesis o bien sus funciones y su sensibilidad a la acción de las hormonas luteinizantes, LH y hCG; también varias proteínas y factores de crecimiento liberados por las células de Sertoli, pueden influir negativa o positivamente en las funciones realizadas por las células de Leydig, es así que la endotelina, el factor de crecimiento tipo insulínico-I (IGF-I) y la inhibina actúan positivamente sobre las funciones de las células de Leydig, mientras que la activina, la

proteína acarreadora de esteroides y algunos factores de crecimiento como el factor de crecimiento transformante (TGF β), la interleucina-1 y el factor de crecimiento fibroblástico (FGF), entre otros, actúan en forma negativa (fig. 9); otros factores liberados por las células germinales, como el factor de necrosis tumoral- α actúa negativamente sobre las células de Leydig, mientras que el IGF liberado por las células de Leydig, actúa positivamente sobre ellas mismas (Saez, 1994). En las interacciones entre las células somáticas es claro, que la regulación de sus funciones se da a distintos niveles, desde la intervención de las hormonas liberadas por la hipófisis, LH y FSH, con la consecuente liberación de hormonas y factores de crecimiento en la gónada, hasta la síntesis de proteínas in situ, que van a actuar sobre la misma célula que las produjo.

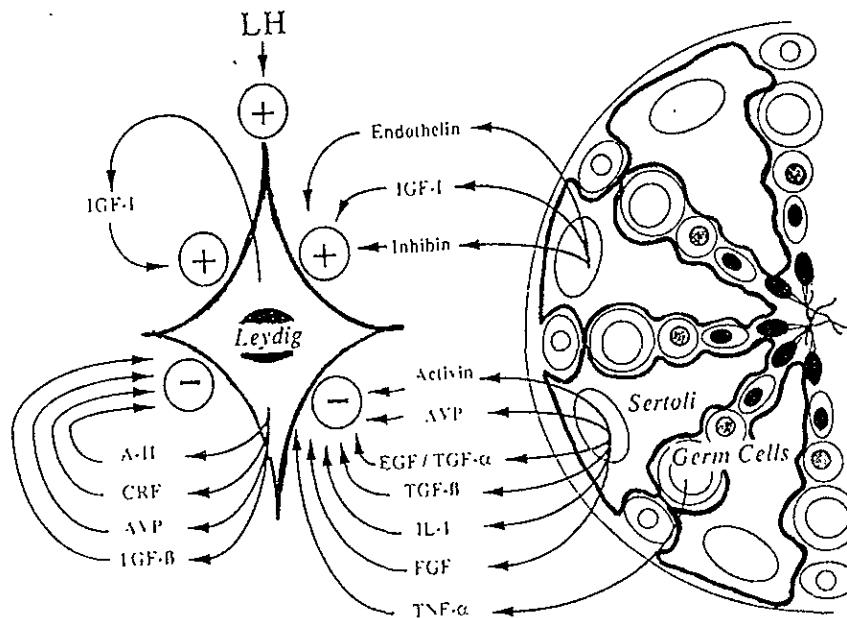


Fig. 9. Representación esquemática de los factores producidos en el testículo que regulan positiva (+) o negativamente (-), las funciones de las células de Leydig (tomado de Saéz, 1994)

Todas estas relaciones celulares-moleculares, son iniciadas por un determinado factor que desencadena toda una reacción en cascada. La FSH por ejemplo, actúa en la diferenciación de las células de Sertoli, estas células junto con las células peritubulares poseen receptores para los andrógenos sintetizados por las células de Leydig, estos andrógenos, son utilizados a su vez, por las células peritubulares para secretar el factor parácrino PModS (Norton y Skinner, 1992; Norton, 1994), este factor es transportado a las células de Sertoli, donde bajo la acción de la FSH, se sintetiza la proteína transportadora de andrógenos, transferrina y lactato, estos últimos son metabolitos utilizados para la nutrición y el desarrollo normal de las células germinales (Norton y cols. 1994; Mullaney y cols., 1994) (fig. 10).

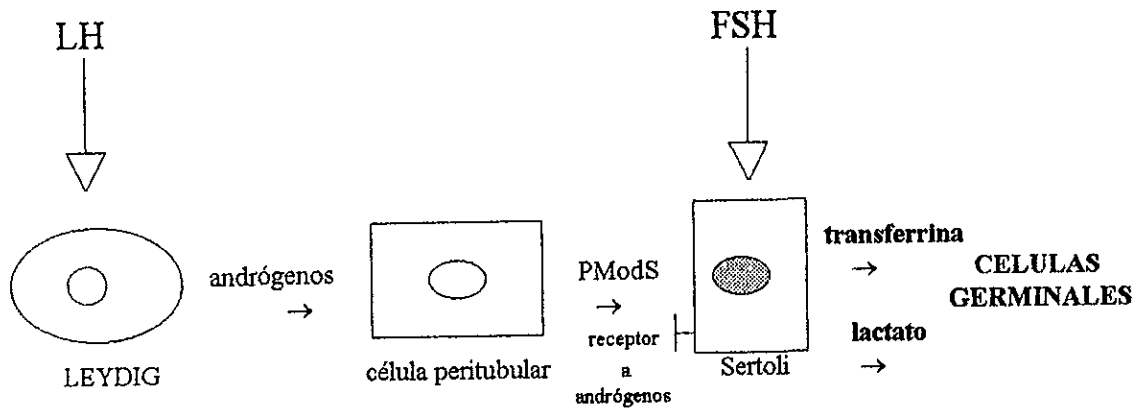


Fig. 10. Representación esquemática de las interacciones celulares que se llevan a cabo para la formación de lactato y transferrina.

Otro ejemplo de la importancia de las interacciones celulares moleculares, se da en la producción de hormonas esteroideas y probablemente en el proceso de proliferación celular. En las células de Leydig bajo la acción de la LH, se estimula a la adenilato ciclasa, la cual produce AMPc a partir de ATP, este segundo mensajero es utilizado para transformar el colesterol en andrógenos, estas hormonas esteroideas son transportadas hacia las células de Sertoli. Bajo la acción de la FSH se va a inducir la actividad de las enzimas P450 aromatasas que se encargan de la transformación de andrógenos en estrógenos , principalmente 17β- estradiol, el cual estimula la formación de TGFβ que junto con la FSH desencadena el proceso de división celular en mamíferos (Dorrington y cols. 1993) (fig. 11)

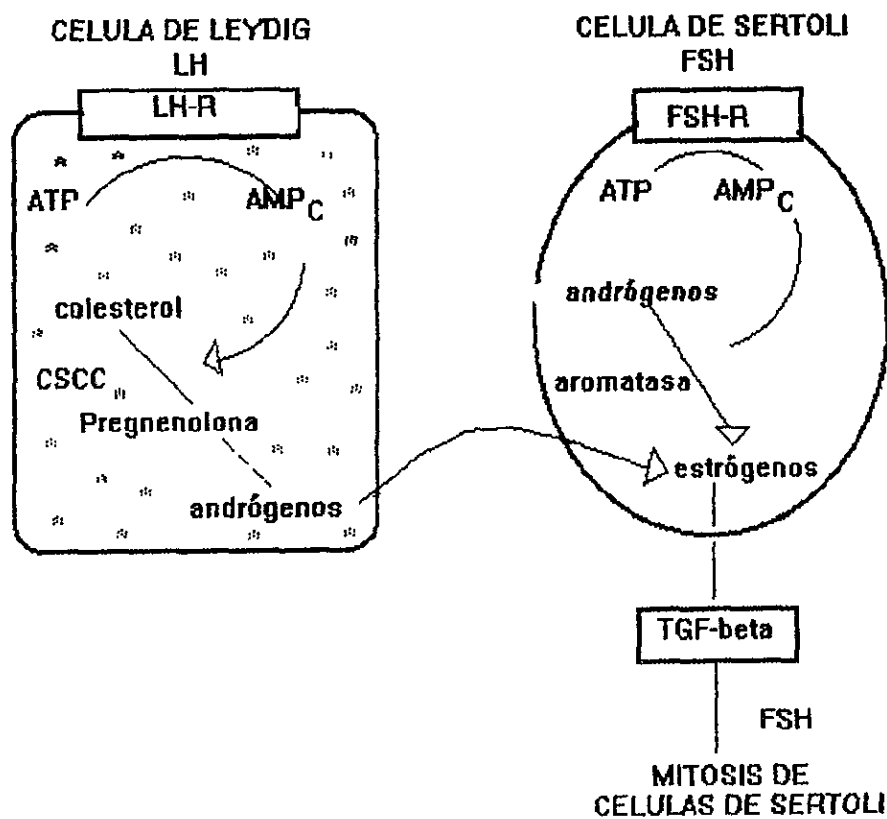


Fig. 11. Papel de la FSH en la proliferación celular, Dorrington, 1993.

ESTEROIDOGENESIS TESTICULAR

Los principales esteroides producidos por el testículo son los andrógenos, y dentro de ellos la testosterona. Aunque se había propuesto que los túbulos seminíferos contribuían en la producción de andrógenos, se ha demostrado que dos de las enzimas que intervienen en la biosíntesis de testosterona, el citocromo P-450 scc y la 3β -hidroxiesteroideshidrogenasa/5-ene-4-ene-isomerasa (3β -HSD) no están presentes en los túbulos seminíferos (Rouiller y cols. 1990; Pelletier, 1992). Todos los andrógenos testiculares son producidos y secretados por las células de Leydig; el principal precursor de las hormonas esteroides en general es el colesterol el cual se encuentra almacenado en la forma de inclusiones de lípidos dentro de las células de Leydig, este sustrato puede ser sintetizado de novo a partir de acetato o bien provenir de lipoproteínas circulantes de alta y baja densidad. La utilización de estos sustratos depende de la especie de que se trate, es así que en el cerdo, las células de Leydig utilizan lipoproteínas de baja densidad (Benahmed y cols. 1983), mientras que en la rata se utilizan preferencialmente lipoproteínas de alta densidad (Chen y cols. 1980).

Existen evidencias de que las lipoproteínas de baja y alta densidad, se unen a un receptor en la membrana celular, este complejo es internalizado y degradado en los complejos lisosómicos, liberándose colesterol. Este compuesto obtenido de la sangre, se almacena en el citoplasma como ésteres de colesterol. El equilibrio entre los ésteres de colesterol y el colesterol libre depende de dos enzimas, la colesterol ester sintetasa (ACAT) y la colesterol transferasa (fig.12).La enzima que contribuye a la formación de colesterol a partir de acetato es la 3-hidroxi-3-metil-glutaril coenzima A reductasa. La cantidad de colesterol libre originado de sus tres fuentes principales, va a depender de la regulación hormonal y de su propia cantidad (Strauss III y cols. 1981).

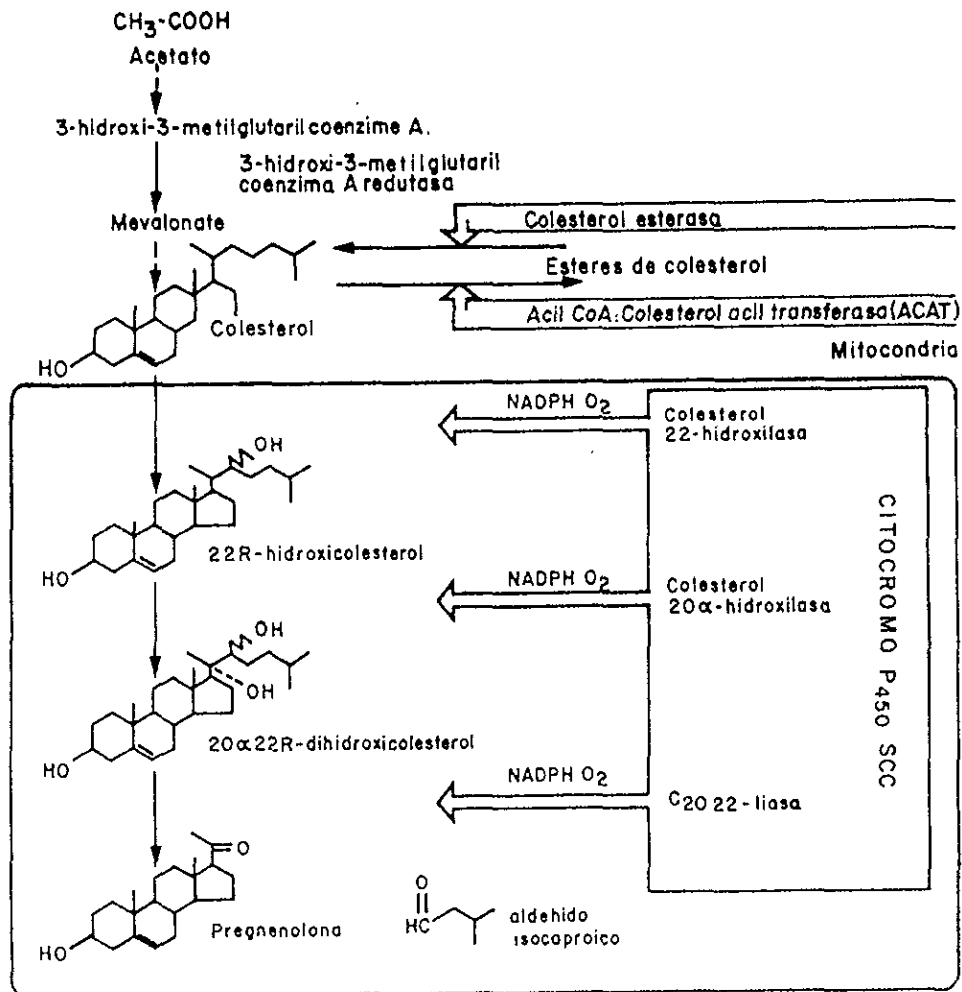


Fig 12. Esquema de la biosíntesis de colesterol y de su biotransformación a pregnenolona, en el recuadro se encierran los principales pasos metabólicos que ocurren en la mitocondria (Cooperación celular en la biosíntesis de hormonas esteroideas en: Comunicación Neuroendócrina, 1993)

El primer paso en la esteroidogénesis testicular es la conversión de colesterol a pregnenolona, la cual se lleva a cabo en la mitocondria, esta transformación esta regulada por la P-450scc. La pregnenolona puede transformarse en dos compuestos, por dos diferentes vías de biosíntesis, en una es transformada a progesterona por acción de la 3 β - HSD. La actividad de deshidrogenasa y de isomerasa no han podido ser separadas en

células de mamíferos, por lo que se considera que una sola proteína tiene ambas funciones (Pedernera, 1993). La reacción es irreversible en condiciones fisiológicas y requiere de NAD⁺ como aceptor de electrones. La segunda vía en la transformación de la pregnenolona es en la que se produce 17 α - hidroxipregnenolona o 17 α hidroxiprogesterona bajo la acción de la Δ^1 hidroxilasa/17-20 liasa (P450 α) que tiene la función de hidroxilar en el C17 y cortar la unión C-C en la unión 17-20 (fig.13). Esta enzima es microsomal y requiere de NADP y sólo FAD como transportador de electrones. los sustratos de esta enzima pueden ser pregnenolona y progesterona y sus productos son dehidroepiandrosterona (DHEA) o androstenediona respectivamente, ambos son andrógenos C19 (Saez 1994). Finalmente la DHEA puede ser transformada a androstenediona por acción de la 3 HSD, la cual también interviene en la transformación de androstenediona a testosterona y estrona a estradiol (Saez, 1994).

La conversión de andrógenos a estrógenos es regulada por la P450 aromatasa la cual esta localizada en los microsomas. La reacción de aromatización utiliza 3 moles de oxígeno y 3 electrones donados por el NADPH mediante la P450 reductasa (Fishman y Goto, 1981; Thompson y Siiteri, 1974).

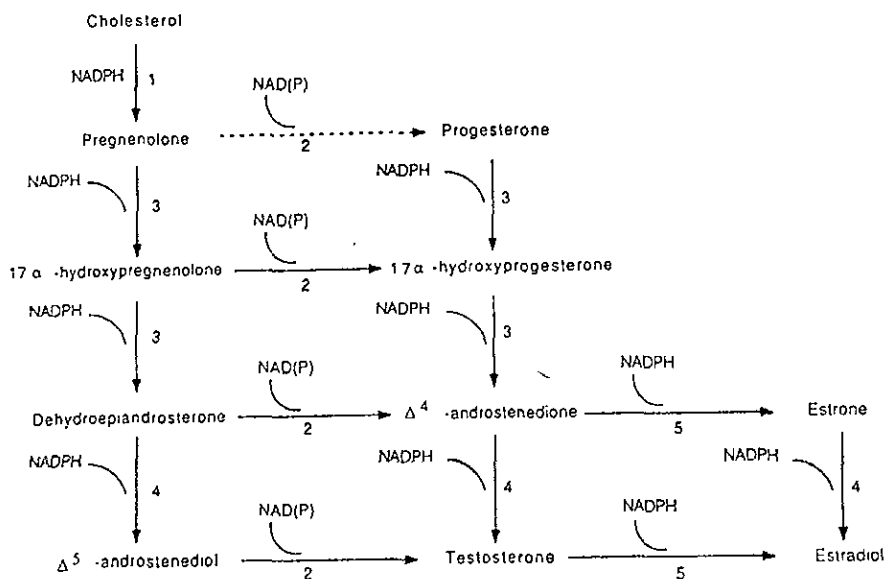


Fig 13 Representación esquemática de la esteroidogénesis testicular:(1) P450_{scc}; (2) 3 β -hidroxiesteroidehidrogenasa Δ^5/Δ^4 (3 β -HSD); (3) 17 α -hidroxilasa/17-20 liasa (P450 α), (4) 17 β -hidroxiesteroidehidrogenasa; (5) aromatasa (P450 arom).

EVENTOS ENDOCRINOS INICIALES

Concluida la diferenciación morfológica de la gónada, la funcionalidad de la misma también ha sufrido cambios graduales. Durante el desarrollo gonadal temprano, las hormonas hipofisiarias FSH y LH tienen un papel secundario en la producción de hormonas esteroides, estas gonadotropinas están presentes en la bolsa de Rathke en el embrión de pollo a los 4.5 días de incubación, (Gasc y Sar, 1981; Woods y cols. 1985) mucho antes del establecimiento del eje hipotálamo-hipófisis, el cual se establece hasta el día 12 de incubación (Thommes y Russo, 1959; Daskocil, 1970; Daikoku y cols. 1974; Stritesky y Rychter, 1977).

Esto nos indica que la hipófisis es capaz de sintetizar gonadotropinas, antes de que se establezca comunicación vascular con el hipotálamo. El hipotálamo por su parte, también es autónomo durante el desarrollo embrionario temprano (Mikami y cols. 1973; Daikoku y cols. 1974). La presencia de hormona liberadora de LH (LHRH) se ha demostrado inmunocitoquímicamente a los 5.5 días en el infundíbulo y a los 7.5-8.0 días en la eminencia media anterior (Woods y cols. 1985) mientras que la LH está presente en la circulación el día 10.5 (Woods y Thommes, 1984; Woods y cols. 1987).

Por otra parte, la síntesis de hormonas esteroides, regulada por las hormonas hipofisiarias en etapas avanzadas del desarrollo embrionario, es independiente de estas en su inicio, la síntesis de 17β -estradiol y andrógenos se inicia desde los 3.5 días del desarrollo en aves (Weniger, 1968, 1971; Woods, 1974, 1978), mientras que el eje hipotálamo-hipófisis-gónada, no se establece sino hasta el día 13.5 de incubación en machos y 14.5 en hembras (Gilbert 1971; Woods y cols. 1981).

Todo lo anterior nos indica que cada una de las estructuras que constituyen el eje hipotálamo-hipófisis-gónada son capaces de funcionar en forma independiente durante el

desarrollo temprano, por lo que la diferenciación gonadal (Fugo, 1940;Vogel, 1956, Woods,1969) y la síntesis de hormonas esteroides (Woods, 1969;1977 y 1983), son eventos inicialmente autónomos, regulados tal vez, por factores de crecimiento de origen extragonadal o secretados por la gónada misma (Erickson, 1994).

Desarrollo del eje hipófisis-gonada

Fugo en 1940 fué el primer investigador que demostró la relación de la hipófisis con el crecimiento y desarrollo gonadal del embrión de pollo; él observó que las gónadas de embriones de pollo hipofisectomizados entre las 33-38 horas de incubación, presentaban un desarrollo normal hasta el día 13, en días posteriores no observó aumento en el tamaño, peso o grado de diferenciación histológica (Woods,1987). Años más tarde, se corroboraron los resultados de Fugo y se determinó además, que después del día 13 de desarrollo, no se presentaba un incremento de colesterol, principal precursor de hormonas esteroides, en las gónadas de embriones decapitados, por lo que el desarrollo gonadal y la síntesis de hormonas sexuales fué afectado; sin embargo, el efecto de la decapitación fué parcialmente invertido por la administración de gonadotropinas (Vogel, 1956,1957).

La regulación inicial de las gonadotropinas en la síntesis de andrógenos testiculares, fué demostrada por Woods (1977a y b), se determinó por inmunocitoquímica, que después de la decapitación, los embriones de pollo presentaban un decremento en los andrógenos testiculares en el día 13.5 de incubación, los niveles normales de estos se restablecieron cuando se transplantó la adenohipófisis o LH en la membrana corioalantoidea (CAM). Datos más directos sobre la regulación pituitaria de la función testicular, cuantificando los niveles plasmáticos de testosterona por radioinmunoanálisis (RIA) después de una hipofisectomía y después de la adición de LH o de un trasplante adenohipofisiario a la CAM, demostraron que la síntesis y secreción de testosterona por el testículo en el embrión de pollo, está bajo control hipofisiario desde el día 13.5 de incubación,

estableciéndose el eje adenohipofisario-testicular en este tiempo (Woods, 1983). Después del día 13.5 de incubación se presenta un decremento en los niveles plasmáticos de LH y testosterona en embriones intactos (no hipofisectomizados), sugiriendo que durante este periodo también inicia un sistema de retroalimentación negativa que afecta los niveles tanto de LH como de testosterona. Se encontró que las hormonas esteroides y sus metabolitos, se unen a complejos neuroendócrinos que regulan la síntesis de gonadotropinas, estableciéndose sistemas de retroalimentación positiva y negativa. Se realizaron investigaciones en donde se demostró que en embriones de pollo de 10 días de incubación, el estradiol tritiado se une a núcleos hipotalámicos (Martínez-Vargas y cols. 1975) y el estradiol y la dihidrotestosterona se unen a las células que sintetizan LH en la pars distalis en embriones de 12 días de incubación (Gasc y cols. 1980), estableciéndose así la importancia de las hormonas esteroides en la regulación de la unidad hipotálamo-hipofisaria.

REGULACION DE LA FSH EN EL TESTICULO

Las hormonas folículo estimulante (FSH) y luteinizante (LH) son necesarias para la reproducción en machos y hembras, regulando directamente el desarrollo y funcionamiento de las células somáticas características de cada gónada; células tecales y de la granulosa en el ovario, células de Sertoli y de Leydig en el testículo. Las células somáticas de ambas gónadas crean un microambiente óptimo para las células germinales, cubriendo los requerimientos físicos y metabólicos necesarios para su desarrollo normal y para que se lleve a cabo la gametogénesis (Dorrington y Armstrong, 1979). Este microambiente está determinado por la síntesis y secreción de estrógenos, andrógenos y progestágenos, así como factores de crecimiento, entre otros (Well y Gilbert, 1984; Hsueh y cols., 1984).

Ambas hormonas hipofisarias son liberadas por el estímulo de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH), la cual es producida en el hipotálamo bajo el estímulo de factores

hormonales, nutricionales y estacionales (Warren, 1983). Los factores liberadores sintetizados en el hipotálamo actúan sobre la adenohipófisis, estimulando la síntesis y secreción de FSH y LH, las cuales viajan a través del torrente circulatorio a sus órganos blanco.

En el testículo la regulación endócrina realizada por estas hormonas hipofisarias, está determinada por su acción en sus células blanco; las células de Sertoli poseen receptores para FSH y proveen de un soporte estructural y bioquímico a las células germinales en desarrollo, bajo la acción de esta hormona se sintetizan estrógenos y en etapas tempranas de la diferenciación gonadal se produce la hormona anti-mülleriana la cual ejerce su efecto degenerativo en los conductos de Müller. Por otra parte la LH actúa sobre las células de Leydig estimulando la producción de andrógenos, particularmente testosterona, necesarios para la diferenciación gonadal y la realización de la espermatogénesis (Huang y cols., 1979; Ritzhaupt y Bahr, 1987). Los andrógenos estimulan a su vez a las células peritubulares que se encuentran rodeando a los túbulos seminíferos (Verhoeven, 1979), liberando un factor parácrino, el PModS el cual está involucrado en la producción de lactato por las células de Sertoli (bajo acción de la FSH), que es utilizado preferencialmente como sustrato energético por las células germinales (Jutte y cols. 1981; Nakamura y cols. 1981). La FSH en el testículo, también participa en el establecimiento de la barrera hematotesticular, estimulando la presencia de uniones comunicantes entre las células de Sertoli, con lo cual se constituye esta barrera, por otra parte, esta hormona es esencial para el inicio de la espermatogénesis. Se ha propuesto que la acción de la FSH sobre la espermatogénesis, resulta de la estimulación de las células de Sertoli para producir diversas proteínas, como la proteína transportadora de andrógenos, plasminógeno activador, transferrina, glucoproteínas sulfatadas 1 y 2 y un número importante de mitógenos y factores de crecimiento (Fritz y cols. 1978; Griswold y cols. 1988). La adquisición de cierto número de características

morfológicas de células de Sertoli maduras, como los patrones de condensación de la cromatina, el desarrollo de grandes nucléolos y el aumento en la cantidad de retículo endoplásmico liso, también parecen necesitar de la acción de la FSH (Solari y Fritz, 1978)

NATURALEZA DE LA FSH

En las aves la FSH tiene un peso molecular de 38000 Kd (Krishnan y cols, 1992), esta hormona junto con la LH, hCG y TSH son hormonas glucoproteicas que poseen dos cadenas peptídicas muy similares α y β ricas en enlaces disulfuro (Pierce y Parsons, 1981), la subunidad α es común a las cuatro hormonas (Tager, 1974) y posee de 90 a 96 aminoácidos, mientras que la subunidad β de 115 a 121, esta última, se cree interviene en la función biológica específica de cada hormona. Cada subunidad está glucosilada en residuos específicos. Se han determinado dos tipos de enlaces glucosídicos, el N-glucosídico de las subunidades α y β , el cual se establece entre el grupo amino de la asparagina y el azúcar N-acetilglucosamina y corresponde a un complejo biantenarico (hCG) o triantenarico (FSH), con un centro de manosa y ramificaciones que terminan en galactosa-ácido siálico o galactosa sulfato. el enlace o-glucosídico se encuentra en la subunidad β de la hCG y se establece entre el grupo OH de la serina y el azúcar N-acetilgalactosamina. Para la FSH se han determinado dos sitios de glucosilación en la subunidad y cuatro para toda la hormona (Ryan y cols. 1988).

La función de los carbohidratos en estas glucoproteínas está relacionada con su vida media y su actividad biológica (Carranza, 1996), es así que la separación de carbohidratos a través de exoglucosidasas *in vivo*, produce la pérdida de la actividad biológica de la FSH, no afectandose la unión a su receptor; mientras que la eliminación de los carbohidratos de la subunidad α , produce un aumento en la unión a los receptores y la hormona sin carbohidratos (desglucosilada), se comporta como un antagonista de su propia actividad

(Ryan, 1988). En estudios *in vitro* la desglucosilación no afecta la actividad biológica de la hormona (Chappel y cols. 1983; Ulloa y cols. 1986), con lo que se sugiere que los carbohidratos, como el ácido siálico, tienen una función protectora contra la degradación de la FSH (Pierce y Parsons, 1981). Por otra parte, la conducta en un gradiente de pH y la sobrevivencia de las diferentes isoformas de FSH en la circulación, dependen de la cantidad de cargas negativas en sus residuos terminales (ácido siálico o residuos sulfatados) unidos a la estructura de oligosacáridos que se enlazan al núcleo proteico de la hormona (Ulloa y cols. 1995).

Los receptores de estas glucoproteínas son miembros de una familia de receptores acoplados a proteínas G (Parmentier, 1989; Sprengel, 1990), en este grupo se encuentran los receptores α y β adrenérgicos (Kobilka y cols. 1987a y b), los receptores D1 y D2 de dopamina (Dal Toso y cols, 1989; Sunahara, 1990), diferentes receptores muscarínicos y rodopsina (Nathans y Hogness, 1983). Los receptores para las hormonas FSH, LH, hCG y TSH presentan una cadena simple de polipéptidos que forman siete α hélices que constituyen los segmentos transmembranales. El receptor para la FSH, así como el de las otras hormonas glucoproteicas, poseen un dominio extracelular muy grande, 348, 333 y 398 aminoácidos para FSH, LH/hCG y TSH respectivamente. El dominio extracelular de los receptores de estas hormonas, presentan aproximadamente entre el 40 y 45% de similitud en su secuencia de aminoácidos, los cuales están organizados en series repetitivas de 25 residuos ricos en leucina (Vassart y cols. 1991). Se ha propuesto que estas regiones repetitivas de leucina son importantes para las interacciones proteína-proteína principales en la unión hormona-receptor. Por otra parte, los dominios transmembranales en estas hormonas, presentan cerca del 70% de secuencias homólogas y tienen una homología importante en esta region con otros miembros de la familia de receptores acoplados a

proteínas G . La región intracelular, de menor tamaño que la extracelular, por su parte, termina en un grupo carboxilo. El ADNc para el receptor de FSH en mamíferos, fué codificado por Sprengel y cols. (1990) determinándose que posee 675 aminoácidos (fig.14).

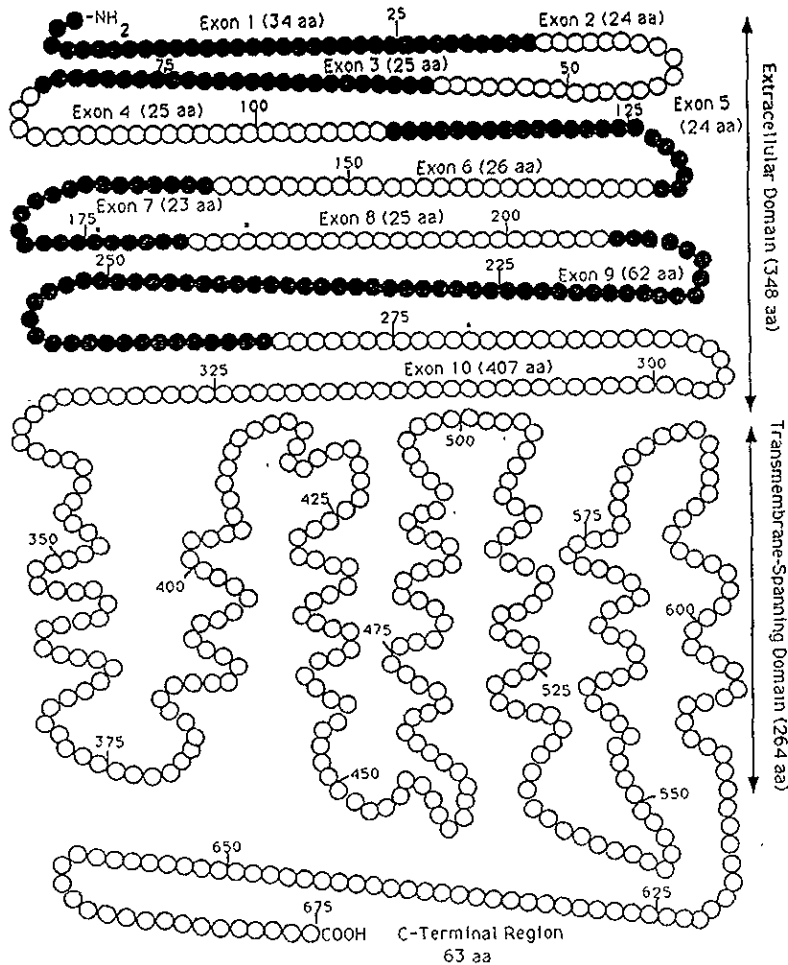


Fig. 14. Representación de la estructura proteica del receptor para FSH. (Heckert y cols. 1993).

Se ha propuesto que en el desarrollo embrionario y posnatal de las gónadas, se lleva a cabo un proceso de maduración de los receptores para las hormonas hipofisarias LH, FSH y TSH, por lo que la especificidad del complejo hormona-receptor en los vertebrados es variable durante el proceso de diferenciación gonadal (Csaba y cols., 1980, 1981).

En las aves se ha determinado que en el periodo comprendido entre los 6.5 a 11.5 días de incubación no hay un reconocimiento específico del receptor a la FSH, determinándose este hasta el día 12.5 del desarrollo embrionario (Woods y cols., 1991). La respuesta a la

FSH no solo depende de la presencia de un receptor funcional a nivel membranar, sino que cambios en el mecanismo de transducción, por ejemplo a nivel de isoformas de la adenilato ciclasa, pueden dar como resultado cambios en la respuesta a la FSH (Tang y Gilman, 1992; Richards, 1994).

PROLIFERACION CELULAR EN LAS GONADAS

La proliferación celular, es uno de los diversos procesos que se realizan durante el establecimiento y desarrollo embrionario, determinando la formación de los diferentes componentes estructurales del embrión, incluyendo su tamaño y forma. Este proceso no se lleva a cabo en forma azarosa, sino que se encuentra regulado por diversos factores, algunos de ellos aun desconocidos.

Uno de los factores que participa en la regulación de los procesos de proliferación celular es la hormona FSH liberada en la adenohipófisis. Se ha demostrado que esta hormona actúa sobre las células de Sertoli estimulando su proliferación a través de un mecanismo que inicia con el acoplamiento de esta glucoproteína con su receptor en la membrana celular, una vez formado el complejo hormona receptor, se estimula la subunidad estimuladora de las proteínas G, la cual a su vez estimula a la adenilato ciclasa, con la consecuente formación de AMPc, este segundo mensajero es utilizado para activar el sistema enzimático de las aromatasas, transformando los andrógenos provenientes de las células de Leydig, en estrógenos principalmente 17β -estradiol, esta hormona esteroide es un agente mitogénico *in vivo* en células de la granulosa en ovario de rata (Dorrington, 1993); mientras que *in vitro* no posee esta actividad. En cultivos celulares, el estradiol participa en la proliferación celular, pero en forma indirecta estimulando la secreción de TGF- β por células de la granulosa de rata. Este factor, junto con la FSH desencadenan la respuesta proliferativa de las células granulosas en el ovario.

En distintos vertebrados, se ha determinado, la importancia de la FSH en la proliferación celular del testículo y se ha comprobado en algunos, el esquema propuesto por Dorrington en 1993. Se demostró que en células de Sertoli de cerdo y de rata la, FSH aumenta la división celular, produciendo un aumento en la secreción de 17β -estradiol y TGF β (Benahmed, 1988 y Dorrington, 1993) (fig.11), mientras que en las aves se demostró que la proliferación celular es estimulada por la FSH en cultivos de células de ovarios y testículos embrionarios de 18 días de incubación. En estos estudios se observó un incremento significativo en la incorporación de ^3H -timidina en cultivos expuestos a la FSH; sin embargo, el estradiol y una hormona de acción luteinizante, la hCG no estimularon la actividad proliferativa de éstas células (Velázquez y cols. 1997; Solís, 1996). En otros vertebrados, se observó la importancia de la FSH en la proliferación de espermatogonias, a través de su acción sobre la células de Sertoli (Kohtaro y Shin-Ichi, 1995), con lo que se hace evidente también, la importancia de las interacciones celulares en el funcionamiento gonadal.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El efecto proliferativo de la FSH en gónadas en desarrollo, ha sido poco estudiado comparativamente con el efecto que producen las hormonas gonadotropas en la inducción de la esteroidogénesis. Sin embargo, se ha demostrado que las células granulosas de mamíferos responden al estímulo de la FSH en la división celular (Pennibaker y Herman, 1991, 1992; Peluso y cols., 1991; Bley y cols., 1992; Delidow y cols., 1992; Dorrington y cols., 1993). Además, esta hormona, produce actividad mitótica en las células de Sertoli en los primeros estadios de desarrollo testicular, la cual disminuye con la edad en los mamíferos (Dorrington y cols., 1993).

En el caso del testículo de las aves en etapa embrionaria, es importante estudiar en que momento del desarrollo las hormonas gonadotropas antes mencionadas, participan induciendo división celular y/o esteroidogénesis.

La utilización de un modelo *in vitro*, la obtención de subpoblaciones celulares con alto grado de pureza, por medio de gradientes de densidad y el uso de técnicas de autoradiografía, permitirían determinar la participación de la LH y la FSH en el crecimiento y diferenciación celular del testículo. Además, estos resultados aportarían información sobre el papel que tienen las diferentes subpoblaciones celulares, que constituyen el testículo embrionario de las aves, como posibles reguladoras de la proliferación celular, puesto que durante el desarrollo del testículo del embrión de pollo, es muy evidente desde el punto de vista ultraestructural, la interacción de las células peritubulares con las células de Sertoli (Pedernera y cols., 1980). Además recientemente se ha demostrado la presencia de un factor parácrino, secretado por las células peritubulares de mamíferos, que regula la función de las células de Sertoli *in vitro* (Norton y cols., 1994), hasta el momento se

desconoce cual es la importancia de esta interacción durante la morfogénesis del testículo y como participan las gonadotropinas en la misma.

OBJETIVOS

*Cuantificar el efecto *in vitro* de la FSH y la hCG sobre la síntesis de DNA y la proliferación celular, en el testículo del embrión de pollo de 18 días de incubación, utilizando la técnica de incorporación de timidina tritiada.

*Caracterizar la respuesta a la FSH por medio de curvas dosis-respuesta y curvas temporales de respuesta.

*Comparar el efecto de la FSH, la hCG y el 17β - estradiol sobre la proliferación celular en el testículo del embrión de pollo.

*Identificar la o las subpoblaciones celulares del testículo que responden al estímulo proliferativo inducido por la FSH por medio de gradientes de densidad y técnicas de autoradiografía.

MATERIALES Y METODOS

Material biológico. Embriones de pollo de 18 días de incubación fueron proporcionados por la granja avícola ALPES (Puebla, Méx.).

Material no biológico. El medio mínimo esencial modificado por Dulbecco (DMEM), la tripsina y el inhibidor de tripsina fueron obtenidos de Grand Island Biological Co. (Grand Island, NY). La albúmina sérica bovina (BSA), duodecyl sulfato de sodio (SDS) y la gonadotropina coriónica humana (hCG) y el 17β -estradiol se obtuvieron de Sigma Chemical Co. (St. Louis MO). La hormona folículo estimulante (hFSH) obtenida de mujeres postmenopaúsicas (Fertinorm HP), fué provista por Serono de México, 1mUI es equivalente a 14ng. de hFSH con 2 pg de hLH, (Ulloa-Aguirre y cols. 1995). La hormona folículo estimulante recombinante humana (rhFSH) también fué provista por Serono (Gonal-F, Serono). la timidina tritiada (2.0 Ci/mmol) y el líquido de centelleo (aquasol-2000) fueron provistos por NEN DuPont (Boston, MA).

REACTIVOS

Acido acético concentrado (Merck, México, S.A.)

Acido tricloro acético (Merck, México, S.A.)

Albúmina sérica bovina (SIGMA, St. Louis, USA No. Cat. A-7888)

Azul tripano (SIGMA, St. Louis, USA No. Cat. T0776)

Bicarbonato de sodio NaHCO_3 (J.T. Baker S.A. de C.V. México)

Cloruro de potasio KCl (Merck, México, S.A.)

Cloruro de sodio NaCl (Merck, México, S.A.)

Duodecil sulfato de sodio (SIGMA, St. Louis, USA)

Hormona folículo estimulante humana (Serono de México, S.A de C.V.)

Hormona folículo estimulante recombinante (Gonal-F, Serono)

Gonadotropina coriónica humana (SIGMA, St. Louis, USA)

Inhibidor de tripsina (SIGMA, St. Louis, USA No. Cat. T-9128)

Líquido de centelleo (Beckman, U.S.A.)

Metanol (Merck, México, S.A.)

Metrizamida (SIGMA St. Louis, U.S.A. No. Cat. M-3383)

Timidina tritiada (DUPONT, NEN products No. Cat. NET027A)

Tripsina (GIBCO, Grand Island, N.Y. USA)

DMEM (GIBCO No. de Cat. 430-1600EB)

Cultivos de células testiculares

Se utilizaron aproximadamente 80 testículos de embriones de pollo de 18 días de incubación para cada cultivo. Las gónadas fueron extraídas en condiciones estériles y se colocaron en una caja de Petri con solución salina balanceada libre de calcio y magnesio (S.S.B.). Una vez obtenidos todos los testículos, se sometieron a una disociación mecánico-enzimático con una solución de tripsina (2.5 mg/ml) durante 20 minutos a 37°C. Después de este tiempo, se resuspendió el tejido y se agregó un volumen equivalente de inhibidor de tripsina (5mg/ml) para detener la reacción enzimática. La suspensión celular se filtró en una malla de nylon, para eliminar tejido conjuntivo y restos de tejido no disociado. Posteriormente las células se colocaron en un tubo cónico de 50 ml y se centrifugaron a 1000 r.p.m. durante 10 minutos. Transcurrido este tiempo, se eliminó el sobrenadante y se agregó medio mínimo esencial modificado por Dulbecco (DMEM), adicionado con albúmina sérica bovina (BSA); se resuspendió el botón celular y se centrifugó nuevamente a la misma velocidad y por el mismo tiempo para eliminar residuos de inhibidor de tripsina. Este procedimiento se repitió dos veces más. Al botón celular se le agregaron 1.5 ml de DMEM + BSA. Aproximadamente el 25% de las células se utilizaron para población mixta y el resto se sembró en un gradiente de metrizamida 0-20% para obtener subpoblaciones celulares testiculares.

Población mixta

A las células utilizadas para población mixta, se les determinó la viabilidad celular a través de la técnica de exclusión del azul tripano (Tennant, 1964). Una vez verificado un porcentaje mayor del 90% de viabilidad, se sembraron 5×10^5 células sobre una membrana

de policarbonato suspendida en DMEM + BSA en cajas de Petri para cultivo de 35 x 10 mm de diámetro (se colocaron dos membranas de policarbonato por caja).

Las diferentes hormonas y las dosis utilizadas en los grupos experimentales, se presentan en el siguiente cuadro:

Cuadro 1. Hormonas y dosis utilizadas en cada grupo experimental
GRUPO
1. Grupo control (DMEM +BSA)
2. DMEM + BSA + hFSH (0.5 UI/ml) (hFSH humana)
3. DMEM + BSA + rhFSH (0.5 UI/ml) (rhFSH recombinante)
4. DMEM + BSA + hCG (0.5 UI/ml)
5. DMEM + BSA + Estradiol (2×10^{-8} M)

Para determinar la dosis efectiva 50 (DE₅₀) de la hFSH, se realizó una curva dosis-respuesta, con las siguientes dosis de la hormona (cuadro 2):

Cuadro 2. Dosis utilizadas de hFSH en cultivos de células testiculares.	
DOSIS DE hFSH	
Grupo control (DMEM +BSA)	
a) 2 UI/ml.	f) 0.062 UI/ml.
b) 1 UI/ml.	g) 0.031 “
c) 0.5 “	h) 0.015 “
d) 0.25 “	i) 0.007 “
e) 0.125 “	j) 0.003 “
	k) 0.001 “

También se realizó una curva temporal para población mixta testicular; los tiempos utilizados se presentan a continuación (cuadro 3):

Cuadro 3.		CURVA TEMPORAL	
Grupo control		hFSH (0,5 UI/ml)	
24h		24h	
36h		36h	
48h		48h	
60h		60h	

A todos los grupos experimentales se les adicionó 0.1 μ Ci de 3 H-Timidina para cuantificar su incorporación y se incubaron a 37° C en una atmósfera de 95% de aire y 5% de CO₂ durante 60 horas; los cultivos utilizados para la curva temporal se incubaron durante 24, 36, 48 y 60 horas en las condiciones ya mencionadas.

Subpoblaciones testiculares

Se sembraron células testiculares en un gradiente de metrizamida 0-20% y se centrifugaron durante 20 minutos a 3200 r.p.m., las fracciones obtenidas se sometieron a tres lavados con DMEM + BSA para eliminar residuos de metrizamida. Después de los lavados, se verificó la viabilidad celular con la técnica anteriormente mencionada. Se sembraron 500 mil células de cada fracción celular en las mismas condiciones que para población mixta; para cada subpoblación testicular se formaron dos grupos experimentales; el grupo control con DMEM + BSA y los estimulados a los que se les adicionó 0.5 UI/ml. de hFSH, ambos grupos se expusieron a 0.1 μ Ci de 3 H-Timidina y se incubaron durante 60 horas a 37°C en una atmósfera de 95% de aire y 5% de CO₂.

Por otra parte, se determinó la densidad celular de cada fracción testicular con un refractómetro ATAGO tipo 500.

Trancurridas las 60 horas se cuantificó la incorporación de ^3H -timidina de los cultivos celulares de población mixta y subpoblaciones testiculares (ver apéndice).

A los datos obtenidos de población mixta y subpoblaciones testiculares se les realizó un análisis de varianza y las pruebas estadísticas de Duncan y Tukey con una $p < 0.001$

Microscopía de luz y electrónica

Se realizó la fijación de testículos embrionarios de pollos, con glutaraldehído al 2 % en buffer de fosfatos 0.15 M a pH 7.4 durante 2 horas. Posteriormente las muestras se sometieron a tres lavados en buffer de cacodilatos 0.15 M a pH 7.4. Después se realizó la osmificación con tetraóxido de osmio al 1% en buffer de fosfatos 0.2 M a un pH 7.4 durante 1 a 2 horas. Se llevo a cabo la deshidración con alcoholes graduales y posteriormente se incluyo en Epon. Una vez polimerizada la resina, se realizaron los cortes en un ultramicrotomo manual Porter-Blum, MT-1. Los cortes semifinos de testículo se tiñeron con azul de toluidina y se observaron por microscopia de luz.

Los cortes finos (de entre 60-90 nm) se contrastaron con acetato de uranilo para posteriormente observarse en el microscopio electrónico de transmisión EM-109 (Zeiss)

Para microscopía electrónica de barrido se realizaron algunas modificaciones a la técnica general. Después de llevar a cabo la desecación por punto crítico en CO_2 , algunas muestras se fracturaron mecánicamente; mientras que otras que se encontraban en alcohol al 70%, se sumergieron en nitrógeno líquido, se fracturaron y nuevamente se regresaron al alcohol.

Después se prosiguió con la técnica general para este tipo de microscopía. La observación se realizó en un microscopio de barrido modelo DSM950 Zeiss.

Autoradiografía

La técnica de autoradiografía se realizó para determinar si existen diferencias en la actividad proliferativa entre las subpoblaciones celulares que constituyen el testículo embrionario de pollos, así como para reforzar los datos obtenidos a través de la cuantificación de timidina tritiada. Ambas técnicas se describen en el apéndice.

RESULTADOS

Curva dosis respuesta

Se realizó una curva dosis-respuesta para hFSH en cultivos de células testiculares de embriones de pollo de 18 días de incubación, para determinar la dosis efectiva 50 (DE50). Las concentraciones de hFSH que se utilizaron comprendieron desde 0.003 hasta 2 UI/ml de la hormona. Se observó que la respuesta proliferativa se incrementó gradualmente al aumentar la concentración hormonal, alcanzando su nivel máximo a 1UI/ml. de hFSH; se determinó que la DE50 se encuentra entre 0.06 y 0.125 UI/ml de hFSH (fig.15).

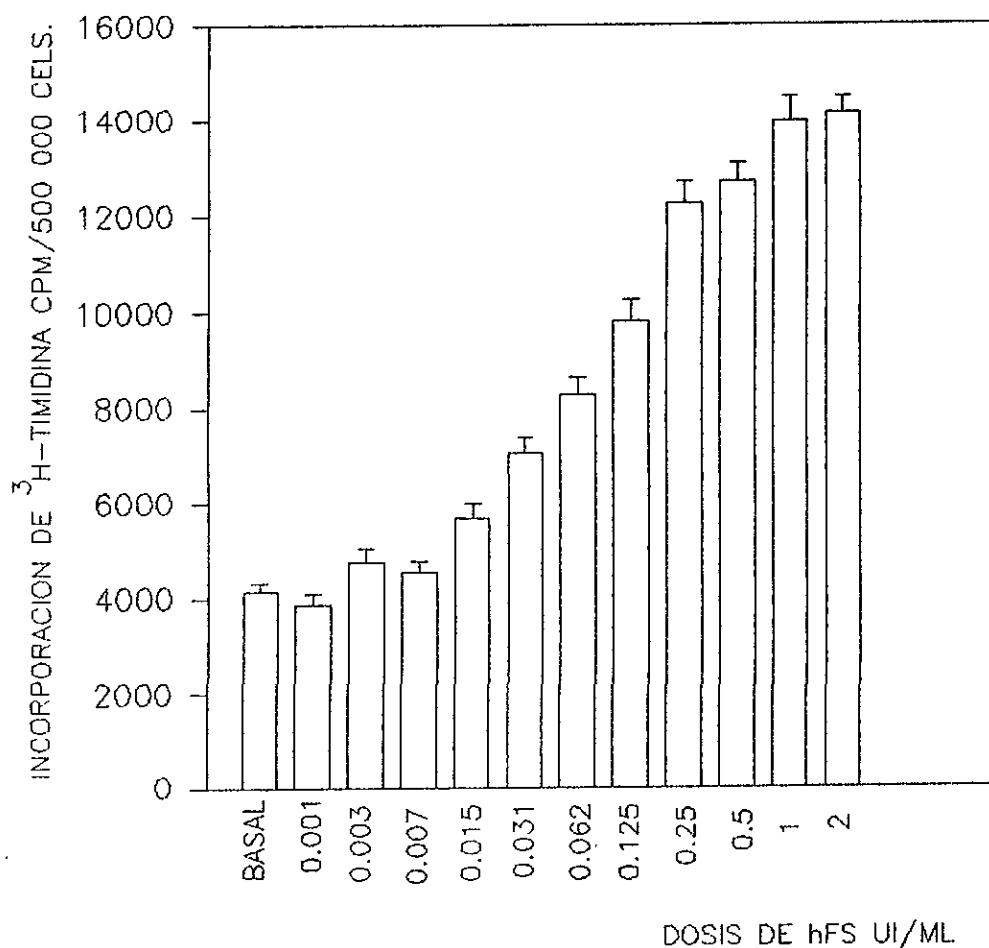


Fig. 15. Gráfica que muestra la curva dosis-respuesta para hFSH y la incorporación de ³H-timidina durante 60 horas de cultivo, en células disociadas de testículos de embriones de pollo de 18 días de incubación. Determinándose que la dosis efectiva 50 (DE50) se encuentra entre 0.06 y 0.125 UI/ml. de hFSH.

Tratamiento hormonal

Se utilizaron diferentes hormonas, hFSH, rhFSH, hCG y 17β -estradiol, como posibles agentes inductores de la proliferación celular. Después de 60 horas de cultivo a 37°C en una atmósfera de 95% de aire y 5% de CO_2 , se determinó la cantidad de timidina incorporada por las células testiculares en los diferentes grupos experimentales; encontrándose que tanto la hormona hFSH humana, como la rhFSH recombinante humana (0.5 UI/ml) adicionadas al medio de cultivo, incrementaron en forma significativa la incorporación de ^3H -timidina, con respecto al grupo basal, no se presentaron diferencias significativas entre la hFSH y la rhFSH.

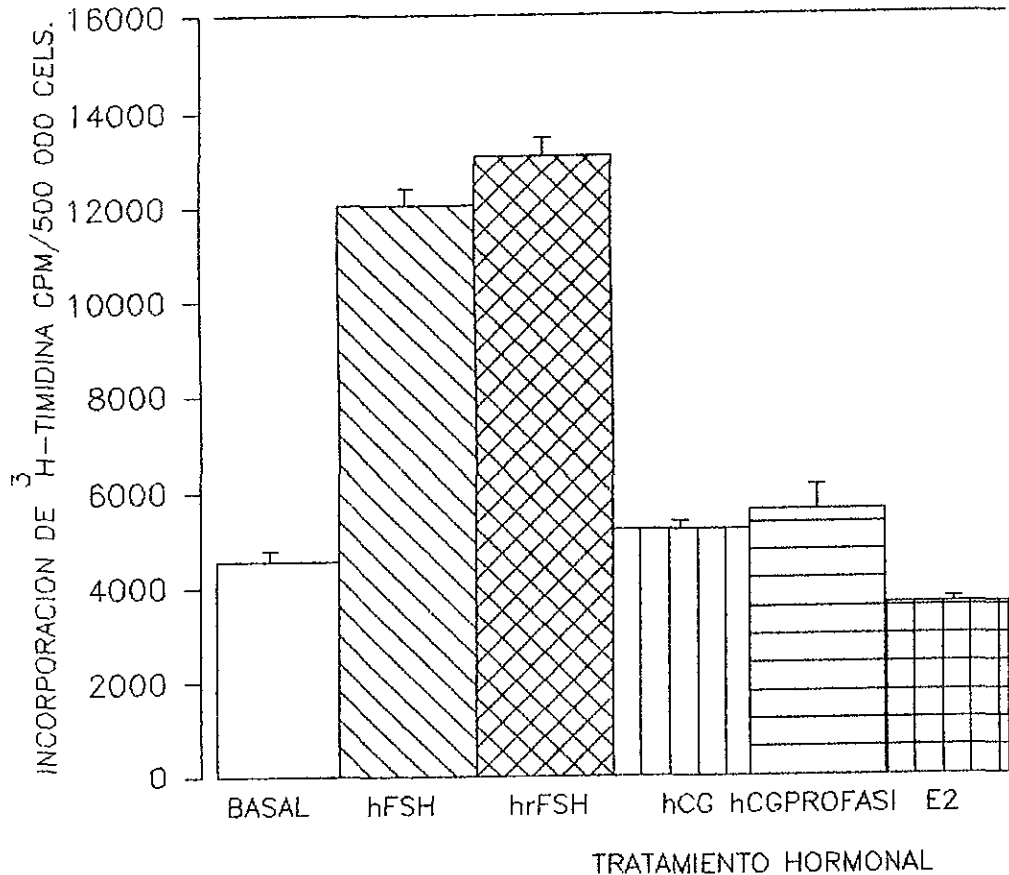


Fig. 16. Gráfica que muestra la incorporación de ^3H -timidina del grupo control y los grupos tratados con hFSH, hrFSH, hCG (de Serono de México y Profasi) y 17β -estradiol (E2). Se observa el importante estímulo proliferativo que producen ambas hormonas foliculo estimulantes en células testiculares de embriones de pollo de 18 días de incubación. El resto de los grupos experimentales no presentaron diferencias significativas con respecto al grupo basal.

Por otra parte, las células testiculares tratadas con hCG (2.0 UI/ml) y 17β -estradiol (200 ng/ml) no presentaron diferencias significativas con respecto al grupo control (fig.16).

Encontrándose que la proliferación celular en el testículo embrionario de pollos de 18 días de incubación, es estimulada por la hormona FSH, tanto humana como recombinante, mientras que la hormona con acción luteinizante (hCG), al igual que el 17β -estradiol, no participaron en este proceso.

Por otra parte, se realizó una curva temporal de respuesta, en la que se cuantificó la incorporación de timidina marcada en los cultivos testiculares a las 24, 36, 48 y 60 horas, observándose que el estímulo proliferativo fué significativo a partir de las 36 horas (fig.

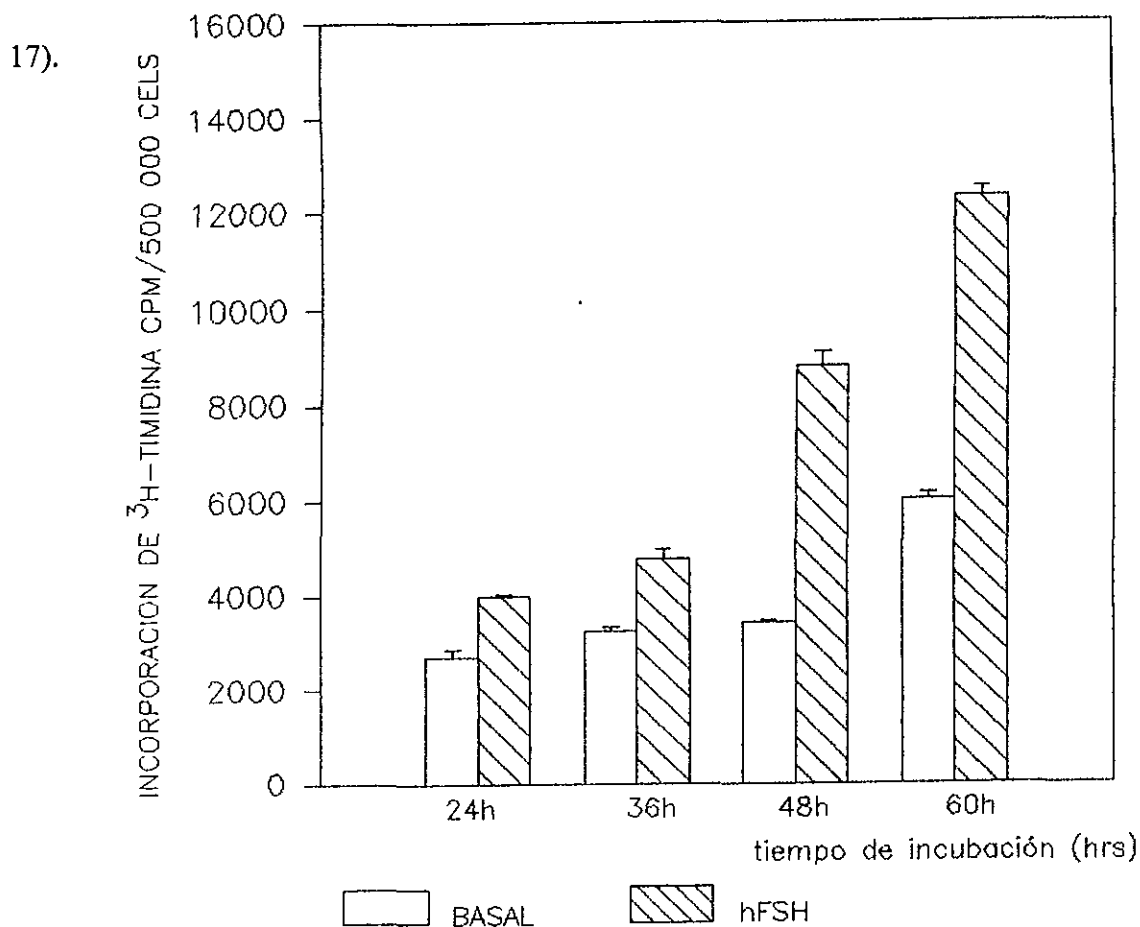


Fig. 17. Curva temporal de respuesta para FSH. Se cuantificó la incorporación de $3H$ -timidina a las 24, 36, 48 y 60 horas. Se observa que el estímulo proliferativo es significativo a partir de las 36 horas de cultivo, alcanzando su nivel máximo a las 60 horas de incubación.

Subpoblaciones testiculares

Con el uso de gradientes de metrizamida se obtuvieron cinco subpoblaciones testiculares F1 (densidad = 1.068 g/ml), F2 (densidad = 1.090 g/ml.), F3 (densidad = 1.098 g/ml.), F4 (densidad = 1.113 g/ml.) y F5 (densidad = 1.129 g/ml) (fig.18), a cada una de estas subpoblaciones testiculares se les adicionaron 0.5 UI/ml de hFSH. La incorporación de ^3H -timidina en cada subpoblación testicular se muestra en la figura 19. Las subpoblaciones F1 y F2 no mostrarán diferencias significativas con respecto al grupo basal, mientras que las subpoblaciones F3, F4 y F5 incorporaron timidina en forma muy importante en respuesta a la hFSH, observándose que la mayor cantidad de timidina incorporada se presentó en la subpoblación de mayor densidad, F5 (fig.19).

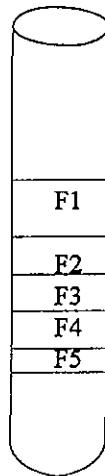


Fig. 18 . Tubo de gradiente que muestra las subpoblaciones testiculares obtenidas a través de un gradiente de metrizamida.

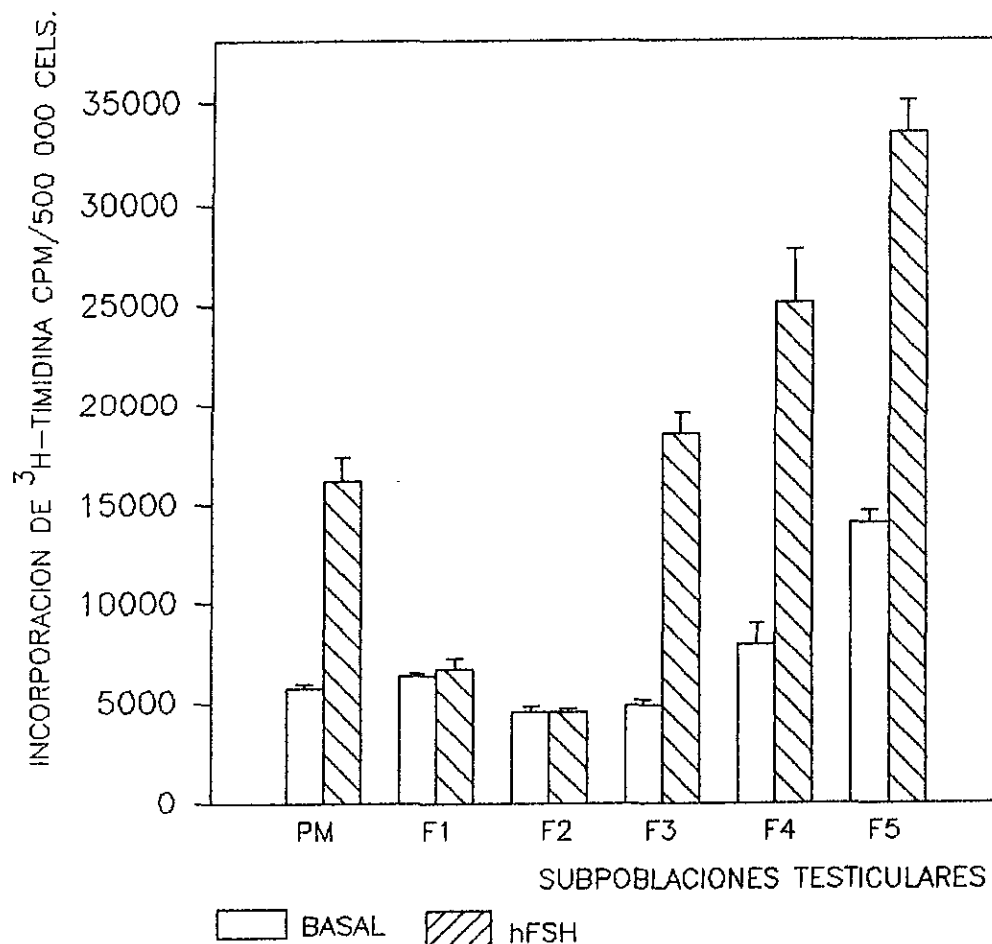


Fig. 19. Gráfica que muestra la incorporación de timidina tritiada por las diferentes subpoblaciones testiculares, obtenidas a través de un gradiente de metrizamida. Las subpoblaciones F3, F4 y F5 tratadas con hFSH, mostraron diferencias significativas con respecto al grupo basal. La fracción F5, presentó el mayor incremento de timidina incorporada en respuesta a la hFSH.

MICROSCOPIA

Las observaciones ultraestructurales de testículos embrionarios de pollos de 18 días de incubación, demostraron cordones testiculares rodeados por una membrana basal y en la periferia se observa tejido intersticial. Dentro del cordón testicular, encontramos todos los elementos celulares que lo caracterizan, células germinales de gran tamaño, con núcleos grandes de cromatina poco condensada, y múltiples mitocondrias en su citoplasma. En la base del cordón, rodeando una parte de las células germinales, se encuentran células de Sertoli con núcleos más pequeños que los encontrados en las células germinales. En la

periferia del cordón testicular, se encuentran células pericordales, con núcleos de diferente forma y tamaño (fig.20), entre los cordones testiculares, encontramos células secretoras de andrógenos (Leydig) con inclusiones lipídicas y mitocondrias en el citoplasma (fig.21).

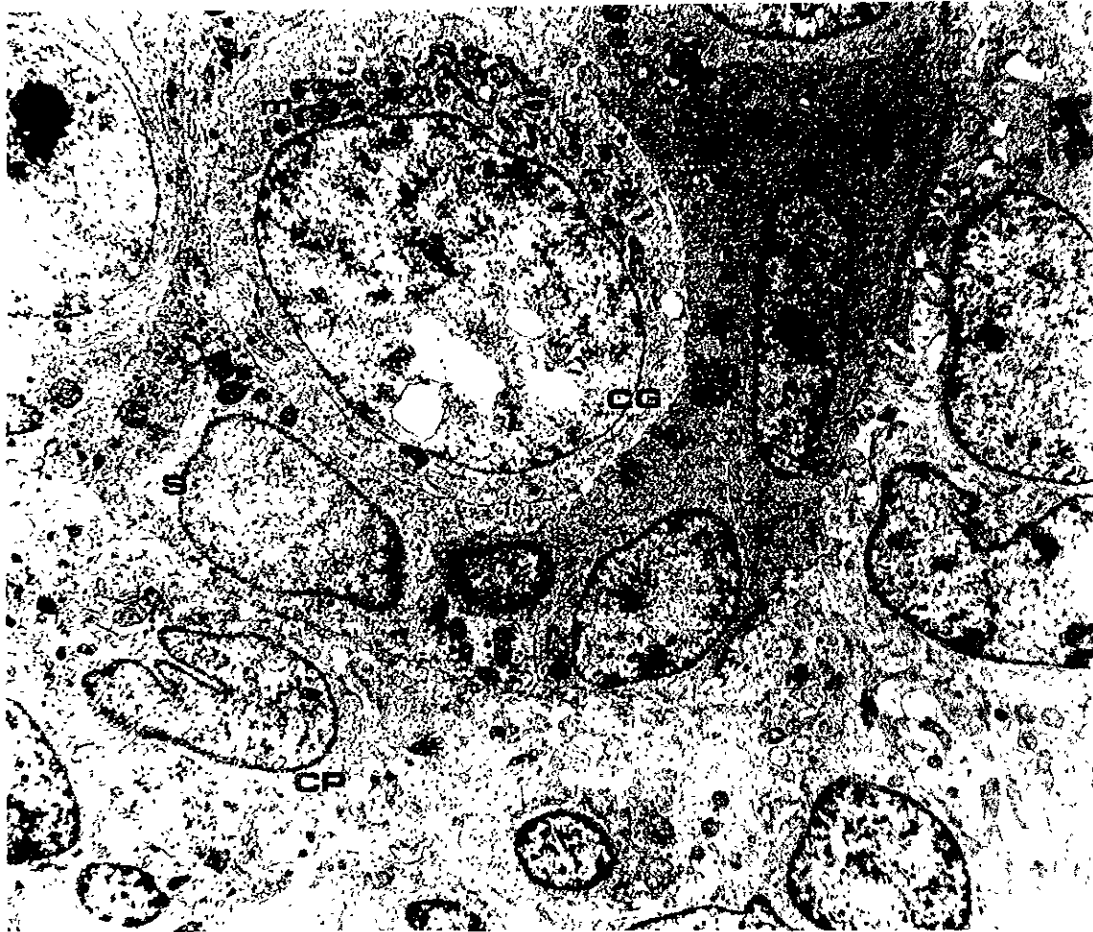


Fig 20 Micrografía electrónica de transmisión de testículo embrionario de pollo de 18 días de incubación. Se observan dentro del cordón células germinales (CG), con mitocondrias en su citoplasma (m) y células de Sertoli (S). Rodeando el cordón se encuentran células pericordales (CP). 3000x.

Para establecer la morfología testicular en tres dimensiones y correlacionarla con lo observado a través de microscopía electrónica de transmisión, se realizaron observaciones en el microscopio de barrido. Se encontro que la gónada se encuentra rodeada por una extensa capa de fibras de tejido conjuntivo, la cual trato de eliminarse con el uso de tripsina (0.25%) antes de realizar la fijación del tejido. Bajo la capa fibrosa, no hay una clara diferenciación regional a pocos aumentos (fig.22). A mayor aumento, se observaron varios cordones testiculares y en su interior sobresalen células de gran tamaño, muy posiblemente células germinales (fig. 23 y 24).

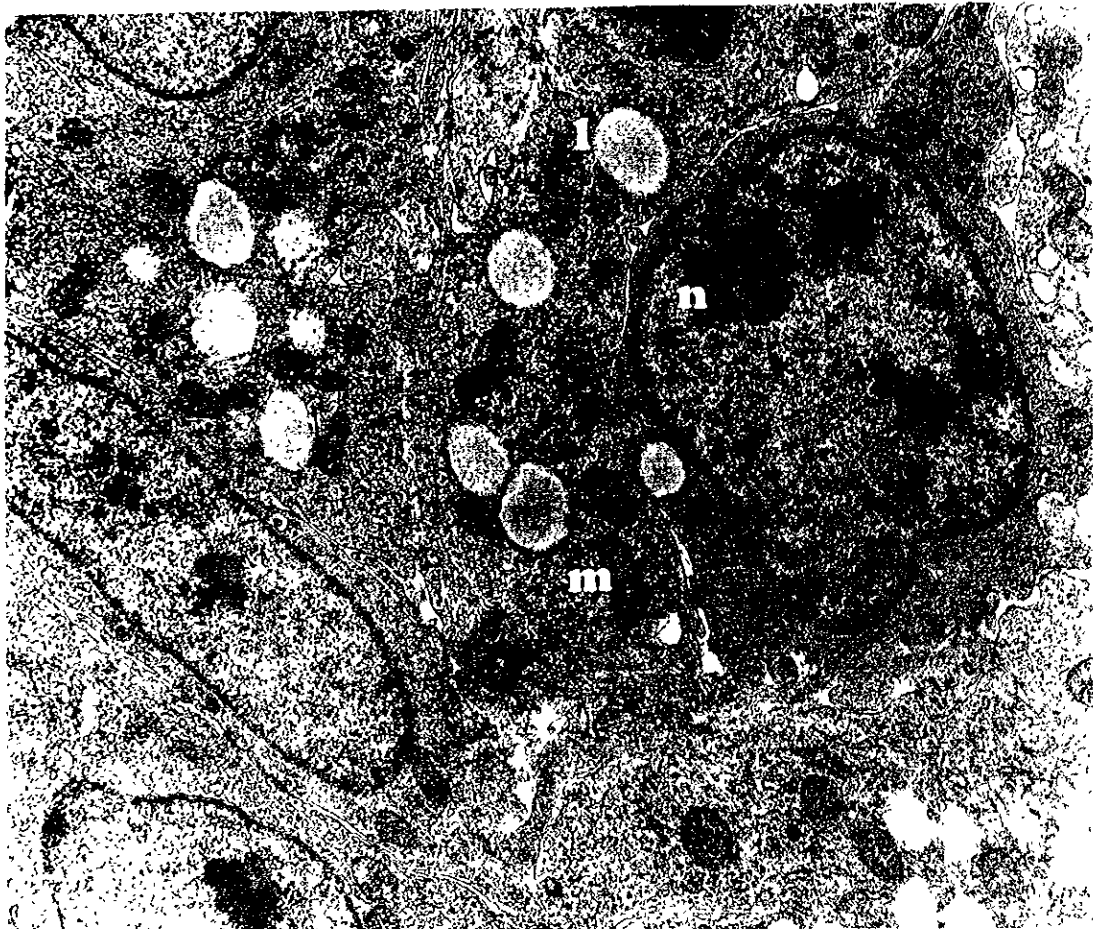


Fig 21. Célula de Leydig de testículo embrionario de pollo de 18 días de incubación. En el núcleo pueden observarse varios nucléolos (n) y en el citoplasma mitocondrias con crestas tubulares (m) e inclusiones lipídicas (l). 7.000x

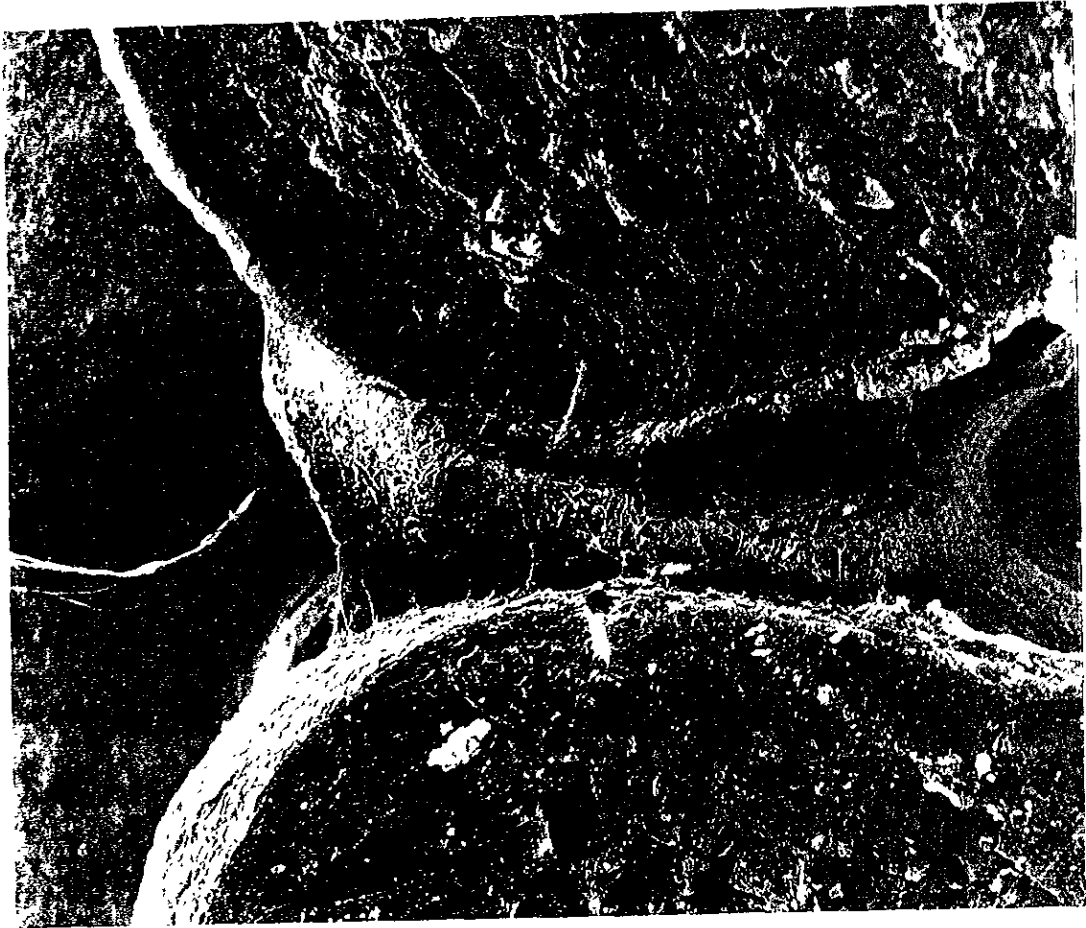
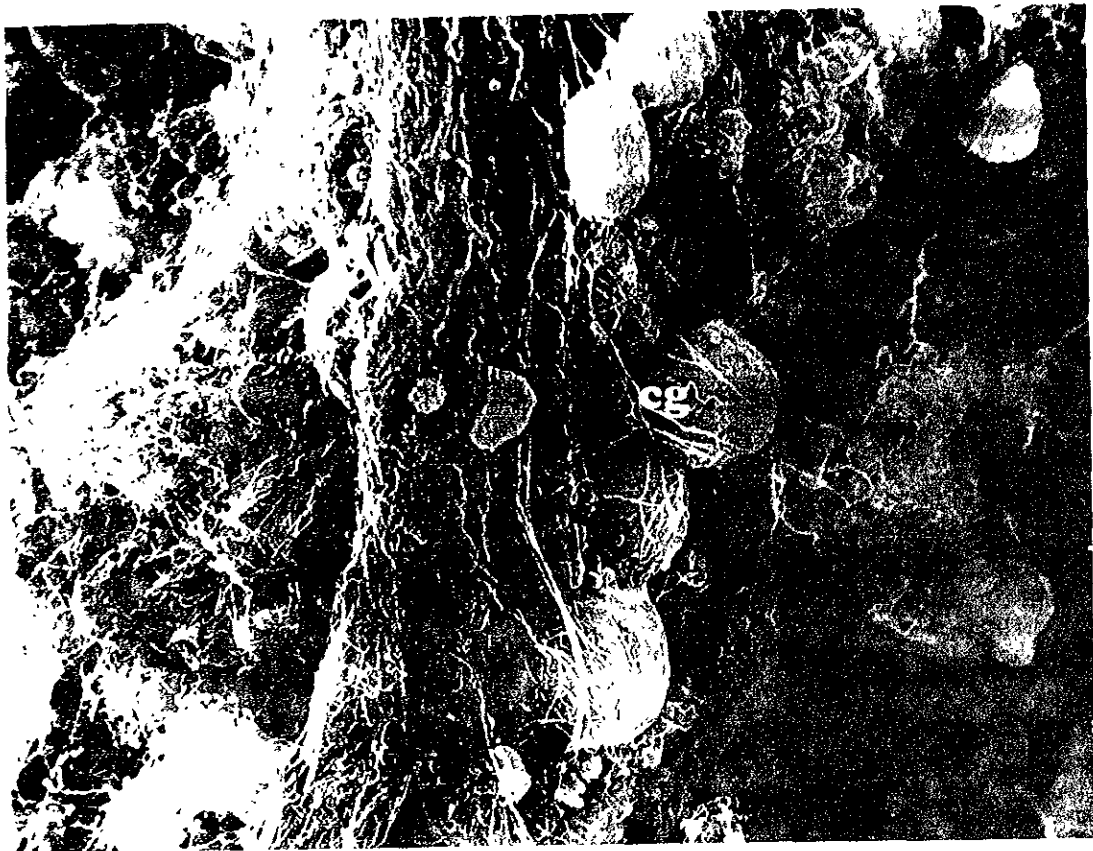
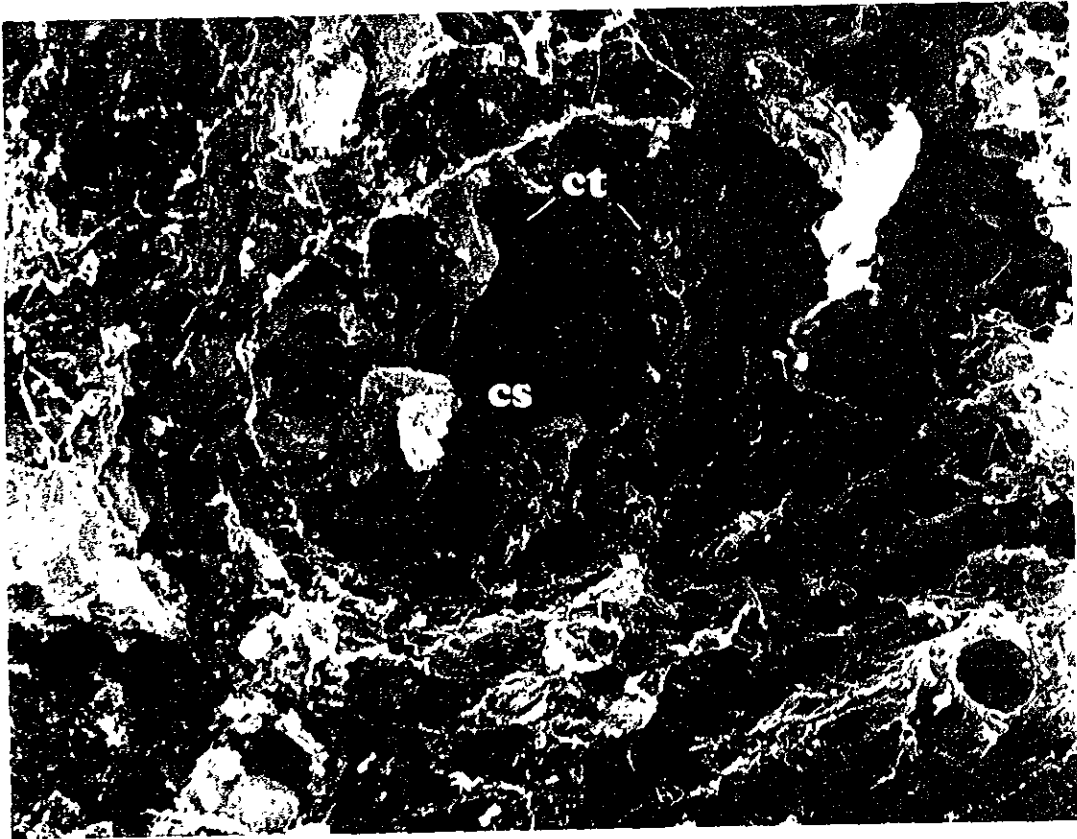


Fig.22. Micrografía electrónica de barrido de testículo embrionario de pollo de 18 días de incubación. Se puede observar la gran cantidad de fibras colágenas que forman la cápsula y por debajo de la misma, el estroma propio del testículo. 200x.



Figs. 23 y 24 . Micrografías electrónicas de barrido. Se muestran cordones testiculares embrionarios (ct); en su interior pueden observarse células de gran tamaño, que probablemente son células de Sertoli (cs) (fig.23) y células germinales (cg) (fig.24). 2000x

Autoradiografía

En los cortes semifinos de cultivos de población mixta testicular a las 60 horas, procesados para autoradiografía, pueden observarse células que presentan varios gránulos de plata, mientras que otras no los presentan. Esto nos muestra que los distintos tipos celulares testiculares que se encuentran en los cultivos incorporan diferencialmente la timidina marcada (fig.25).



Fig. 25 y 26 Cortes semifinos procesados por la técnica de autoradiografía, que nos demuestran que algunas subpoblaciones celulares del testículo incorporan timidina tritiada, siendo evidentes por los gránulos de plata depositados en la cromatina nuclear (fig. 25), mientras que otras subpoblaciones celulares del testículo no responden al estímulo proliferativo de la FSH (fig. 26) 1250X.

DISCUSION

Con la determinación del sexo durante la fecundación, se desencadenan múltiples procesos moleculares que intervienen en el establecimiento de una gonada madura. Estos mecanismos de diferenciación y proliferación celular, implican la interacción de diferentes agentes químicos (hormonas y proteínas) y biológicos (células somáticas-germinales) que están regulados a distintos niveles; desde la síntesis de factores liberadores a nivel del hipotálamo, hasta las proteínas producidas por las células somáticas que regulan procesos que se realizan en ellas mismas o en las células germinales. Además, los mecanismos que se llevan a cabo durante el desarrollo gonadal, pueden variar de una etapa a otra; un ejemplo de esto es la actividad proliferativa de las células de Sertoli durante el proceso de diferenciación, es así, que el índice mitótico es elevado durante etapas tempranas del desarrollo embrionario, disminuyendo a medida que avanza hacia la madurez gonadal (Orth, 1984).

Gran parte de lo que sucede durante el desarrollo del ovario y del testículo es regulado por las hormonas gonadotropas FSH y LH, sin embargo se considera que estas hormonas no tienen efecto sobre las gonadas en etapas muy tempranas del desarrollo embrionario en las aves, ya que el eje hipotálamo-hipófisis-gónada se establece hasta el día 13.5 en estos vertebrados (Woods, 1977). Las gonadotropinas, FSH y LH en el testículo actúan sobre las células de Sertoli y Leydig respectivamente, estimulando la síntesis de hormonas esteroides, estradiol y testosterona; en el caso de la FSH, se ha demostrado que regula la producción de diferentes proteínas, así como la formación de uniones comunicantes que permiten el

establecimiento de la barrera hematotesticular (Heckert, 1993), además de participar junto con la LH en el proceso de espermatogénesis.

La actividad proliferativa de ambas gonadotropinas, ha sido poco estudiada, sin embargo, varios estudios han demostrado que este proceso es regulado particularmente por la FSH (Heckert, 1993; Dorrington y cols. 1993; Baraño, 1991; Kohtaro, 1995), mientras que la LH no interviene en la división celular en mamíferos. Por otra parte, los trabajos realizados sobre la acción de la FSH en la división celular se han llevado a cabo en mamíferos adultos y en menor grado en otros vertebrados. En las aves, el efecto de esta hormona durante el desarrollo embrionario fué determinado realizando cultivos celulares de ovarios prefoliculares de pollos de 13 y 18 días de incubación, estableciéndose que esta hormona induce proliferación celular, mientras que hormonas de tipo luteinizante (hCG) y el 17β -estradiol que es considerado como agente mitogénico *in vivo*, no tuvieron ningun efecto sobre la síntesis de ADN en este organo (Solis, 1996; Velázquez y cols. 1997). También se logró purificar la subpoblación ovárica efectora del estímulo proliferativo de la FSH, que esta constituida por células pregranulosas secretoras de 17β -estradiol (Alvárez-Fernández y cols. 1992).

En el testículo, las células de Sertoli son las efectoras de la acción de la FSH, ya que poseen receptores para esta hormona y el gene para el receptor, se expresa únicamente en ellas (Means, 1974, 1975, 1977, 1978; Fritz, 1978). La FSH en estas células somáticas regula diferentes funciones, gran parte de las cuales contribuyen a crear un microambiente óptimo para el desarrollo de las células germinales en el desarrollo embrionario y para la realización de la espermatogénesis en el adulto. La actividad de esta hormona es regulada

por AMPc y otros segundos mensajeros como el calcio (Grasso y Reichert, 1989; Grasso y cols. 1991; Heckert, 1993).

En la proliferación celular en células de Sertoli de roedores, se ha determinado que la FSH produce un incremento en los niveles intracelulares de AMPc, lo cual induce la activación de las enzimas encargadas de transformar los andrógenos sintetizados por las células de Leydig en estrógenos, principalmente 17β -estradiol, el cual como ya se ha mencionado, en los mamíferos es considerado un importante agente inductor de la mitosis *in vivo*.

En el presente trabajo, nosotros demostramos a través de la cuantificación de la incorporación de ^3H -timidina y de técnicas de autoradiografía, que la FSH incrementa significativamente el índice proliferativo en cultivos celulares de embriones de pollo y no observamos efecto alguno de la hCG que posee actividad luteinizante, ni del 17β -estradiol. Esto nos indica que al igual que en los mamíferos, la FSH participa específicamente en el proceso de división celular y que puede diferenciarse claramente un efecto luteinizante de uno folículo estimulante en el testículo embrionario de las aves, siendo las células efectoras de tal estímulo proliferativo, las que constituyen la subpoblación celular de mayor densidad (F5) obtenida a través de gradientes de metrizamida. La fracción (F5) muy probablemente está constituida por células de Sertoli, aunque no podemos descartar la posibilidad de que las células peritubulares y/o las intersticiales sean blanco de la FSH.

El 17β -estradiol en nuestro estudio, no demostró estimular la división celular, contrario a lo que sucede en estudios *in vivo*. Esta hormona esteroide no actúa directamente en el mecanismo de proliferación celular *in vitro*, ya que se ha demostrado en células granulosas y de Sertoli de ovario y testículo de rata respectivamente, que el estradiol estimula la

secreción del factor de crecimiento transformante beta (TGF β). La acción de este factor y de la FSH, inducen un aumento en la actividad de aromatización de andrógenos, así como un incremento en la división celular en las gonadas de rata. La función de los factores de crecimiento en la actividad proliferativa, durante etapas muy tempranas del desarrollo embrionario es particularmente importante, debido a que aún no existe comunicación entre el hipotálamo, la hipófisis y la gónada, que más tarde regularán este proceso. Un hecho interesante, es que existe una actividad proliferativa interespecífica de estos factores, ya que se ha demostrado que su función puede ser estimuladora o inhibitoria, dependiendo de la especie de que se trate (Gospdarowicz y Bialecki, 1979; Savion y cols. 1981). Además, es determinante la presencia de factores de crecimiento para la progresión de la fase G1 del ciclo celular a la fase S, en la que el material genético se duplica para después dividirse durante la mitosis (Pledger, 1985).

Por otra parte, el estímulo proliferativo de la FSH en testículos embrionarios de aves *in vitro*, se ha establecido a partir de los 8 días de incubación (Solís, 1996), antes del establecimiento del eje hipotálamo-hipófisis-gonada, lo cual nos indica que ya existen receptores a la FSH en etapas tempranas del desarrollo gonadal en las aves.

En el testículo embrionario la FSH no actúa indistintamente en todas las subpoblaciones celulares que lo constituyen. Esto se deduce de la diferente respuesta proliferativa que presentaron las fracciones testiculares. En el presente estudio, con la utilización de la técnica de autoradiografía se comprobaron morfológicamente estos resultados, al demostrarse que los precipitados de gránulos de plata y sólo se presentaron en algunas subpoblaciones testiculares.

Todo lo anterior nos indica que la acción promotora de la FSH en el crecimiento gonadal de las aves, depende de ciertos factores de crecimiento e involucra respuestas intracelulares, como el aumento en las concentraciones de AMPc y otros compuestos que finalmente estimulan a las células efectoras de esta hormona, para que se lleve a cabo la proliferación celular.

CONCLUSIONES

Además de las funciones clásicamente descritas para la hormona folículo estimulante (FSH), como la secreción de hormonas esteroides, síntesis y metabolismo de proteínas y su participación en la formación de uniones comunicantes entre las células de Sertoli; se ha demostrado que esta hormona regula el mecanismo de división celular en gónadas de mamíferos, estimulando la actividad mitótica de células de Sertoli durante el desarrollo embrionario y en etapa postnatal. En las aves, demostramos que la FSH de alta pureza, así como la FSH recombinante, son importantes inductores de la proliferación celular, en cultivos de células testiculares de embriones de pollo de 18 días de incubación, mientras que el 17β -estradiol, que había sido descrito como agente mitogénico *in vivo*, no mostró tener actividad proliferativa *in vitro*; por otra parte, la hormona con actividad luteinizante hCG tampoco tuvo efecto sobre el índice proliferativo de las células en cultivo; esto nos sugiere que cada una de estas hormonas juegan diferentes papeles durante el desarrollo gonadal. Las distintas funciones que se realizan en el testículo, reguladas por la FSH y la LH, interactúan en forma tal, que permiten que el tejido gonadal se desarrolle y madure, logrando llevar a cabo al término de estos procesos, el establecimiento de la espermatogénesis, con todos los mecanismos que esta involucra. La acción de la FSH sobre el proceso de división celular, debe realizarse a través de la modificación del tiempo de duración de alguna de las fases del ciclo celular, muy probablemente la fase G1 o etapa presintética; por otra parte, la acción de esta gonadotropina puede realizarse en forma independiente o bien en combinación con alguno de los factores de crecimiento liberados extragonadalmente, o producidos en la gónada misma. La formación del complejo

hormona-receptor en la membrana celular, desencadena múltiples mecanismos intracelulares, en los cuales participan segundos mensajeros como el AMPc y el calcio, así como la activación de proteínas cinasas que logran que una señal extracelular sea transformada en el interior de la célula y se realice el fenómeno de la división celular en el tejido gonadal.

Encontramos una respuesta diferencial de las distintas subpoblaciones celulares que constituyen el testículo, las fracciones de menor densidad (F1 y F2), no respondieron al estímulo de la hFSH, mientras que las subpoblaciones de mayor densidad (F4 y F5) respondieron significativamente al estímulo proliferativo inducido por esta hormona. Todo lo anterior, nos sugiere que no todos los componentes celulares que constituyen el testículo de aves de 18 días de desarrollo, son células efectoras del estímulo proliferativo de la FSH.

El presente trabajo de tesis es además un excelente modelo experimental que puede utilizarse como un ensayo biológico para discriminar perfectamente acción luteinizante y folículo estimulante, valorado por la capacidad que la FSH presenta como inductora de la proliferación celular en el tejido gonadal estudiado.

APENDICE

TECNICA PARA MEDIR LA INCORPORACION DE ^3H -TIMIDINA EN CULTIVOS PRIMARIOS DE TESTICULOS DE EMBRIONES DE POLLO DE 18 DIAS DE INCUBACION

- 1). Eliminar el medio de cultivo con una micropipeta hasta donde sea posible (sin mover el boton celular).
- 2). Agregar sobre la membrana con el boton celular 2ml. de fijador (metanol-ácido acético 3:1) durante 15 minutos a temperatura ambiente.
- 3). Retirar el fijador y agregar 2ml. de ácido tricloroacético (TCA) frio al 10% a 4°C durante 60 minutos.
- 4). Eliminar el TCA
- 5). Agregar 400 μl de dodecil-sulfato de sodio (SDS) al 2% e incubar durante 30 minutos a 60°C.
- 6). Mantener a temperatura ambiente, agregar 5ml. de líquido de centelleo y cuantificar la timidina incorporada en un contador de centelleo líquido.

TECNICA DE AUTORADIOGRAFIA

1). Toma de la muestra

Se utilizaron células sembradas sobre membranas de policarbonato incubadas durante 60 horas con DMEM + BSA y 0.1 μ Ci de 3 H-timidina.

2). Eliminar el medio de cultivo

3). Fijar con glutaraldehído al 2% en buffer de fosfatos durante 60 minutos.

4). Lavar en buffer de fosfatos 0.15 M (3 cambios de 15 minutos cada uno).

5). Osmificar con tetraóxido de osmio 60 minutos.

6). Deshidratar en alcoholes graduales

50%..... 1 lavado

70%..... 1 lavado

80%..... 10 minutos

90%..... 2 cambios de 10 minutos cada uno

100%..... 3 cambios de 15 minutos cada uno

Tolueno..... 2 cambios de 10 minutos cada uno

7). Infiltración en resina-tolueno 1:1 (temperatura ambiente) durante 24 horas

Resina pura..... 60°C durante 1 hora

Resina pura..... 60°C durante 1 hora

8). Inclusión en resina pura 60°C 24 horas

9). Una vez polimerizado el bloque, se enfría a temperatura ambiente y se hace una pirámide truncada para realizar los cortes semifinos.

APLICACION DE LA EMULSION FOTOGRAFICA PARA LA TECNICA DE AUTORADIOGRAFIA

En un cuarto oscuro utilizando luz roja o ambar se coloca en baño maria a una temperatura de 40-45°C la emulsión en una dilución 1:1 con agua destilada agitando constantemente hasta que se diluya.

Poner emulsión diluida en un recipiente (frasco rectangular) para cubrir las laminillas.

Se introduce la laminilla con el corte semifino en el recipiente con emulsión fotográfica, posteriormente se saca y se limpia con una gasa húmeda la parte posterior (donde no se encuentra el corte).

Se colocan las laminillas verticalmente para que se escurran durante 30 minutos en obscuridad total. Después de este tiempo se colocan las laminillas en una caja negra con un paquete de sílica gel para que absorba la humedad. Se tapa perfectamente la caja y se cubre con una bolsa negra o papel aluminio y se etiqueta con los datos del tejido y la fecha.

Se guarda la caja en el refrigerador a 4°C durante 10 a 15 días.

REVELADO (en el cuarto oscuro)

Pasados los 10-15 días las laminillas se introducen cuidadosamente en un recipiente con revelador fotográfico a 21°C durante 4 minutos.

Introducir las laminillas en agua destilada a 21°C durante 1 minuto.

Introducir las laminillas en fijador a 21°C durante 4 minutos.

dar otro lavado en agua destilada a 21°C durante 1 minuto (para eliminar el fijador).

Dejar secar las laminillas para posteriormente tefirlas con azul de toluidina o GIMSA.
Utilizar revelador Kodak D-11, cat. 1464569

TINCION PARA CORTES SEMIFINOS

1. A la laminilla se le coloca el colorante cubriendo el corte.
2. Se pone en una parrilla a aproximadamente 80°C hasta que empiece a evaporarse el colorante formando un halo brillante en el borde del colorante.
3. Se enfria a temperatura ambiente.
4. Se lava con agua corriente.
5. Se enjuaga con agua destilada.
6. Se deja secar y se monta con resina.
7. Observación.

BIBLIOGRAFIA

- Alvárez-Fernández G., Juárez-Oropeza M.A., Pedemera E. (1992). Steroid biosynthesis in cell subpopulations obtained from the ovary of the newly hatched chicken. 25th annual meeting of the society for the study of reproduction (Abst. 239).
- Baraňao J.L., Bley M.A., Batista F.D. and Glikin G.C. (1991). A DNA topoisomerase I inhibitor blocks the differentiation of rat granulosa cells induced by follicle-stimulating hormone. *Biochem. J.* 277: 557-560.
- Bardin W.C., Cheng Y.C. Musto A.N. and Gunsalus L.G. (1988). The Sertoli Cell. In: *The Physiology of Reproduction*. Edited by Knobil E. and Neill D.J. Raven Press, New York. 933-974.
- Benahmed M., Reventos J., Saez J.M. (1983). Steroidogenesis of cultured purified pig Leydig cells: effects of lipoproteins and human chorionic gonadotropin. *Endocrinology*. 112: 1952-1957.
- Benahmed M., Morera A.M., Chauvin M.C. (1987). Somatomedin C/insulin-like factor I as a possible intratesticular regulator of Leydig cell activity. *Mol. Cell. endocrinol.* 50: 69-77.
- Benahmed M., Cochet M., Keramidas M., Chauvin M.A., Morera A.M. (1988). Evidence for a FSH dependent secretion of a receptor reactive transforming growth factor- β -like material by immature Sertoli cells in primary culture. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 154: 1222-1231.
- Bernier M., Chatelain P.G., Mather J.P., Saez J.M. (1986). Regulation of gonadotropin responsiveness and cell multiplication by somatomedin-C and insulin in cultured pig Leydig cells. *J. Cell. Physiol.* 129: 257-263.
- Bley, A.M., Simón, C.J., Estévez, G.A., Jiménez de Asúa L. and Baraňao, L.J. (1992). Effect of follicle stimulating hormone on insulin-like growth factor-I-stimulated rat granulosa cell deoxyribonucleic acid synthesis. *Endocrinology*, 131:(3), 1223-1229.
- Burt D.W., Paton I.R. (1992). Evolutionary origins of the transforming growth factor- β gene family. *DNA cell Biol.* 11: 497-510.
- Carlson B.M. (1994). *Human embryology and developmental biology*. 1ª edición. Mosby Year Book, Inc. St. Louis Missouri.
- Carpenter G.(1987). Receptors for epidermal growth factor and other polypeptide mitogens. *Annu. Rev. Biochem.* 56: 881-914.

Carranza S. M.E. (1996). Estudio de algunas características bioquímicas y biológicas de la hormona estimulante del folículo bovina (bFSH). Tesis de Maestría. Facultad de Ciencias. U.N.A.M. México.

Ciaccio C. (1910). Contributo alla distribuzione de alla fisiopathologia cellulare dei lipoidi. Arch. Zellforsch. 5:235.

Csaba, G., Shahin, M.A. and Dobozy, O. (1980). The overlapping effect of gonadotropins and TSH and embryonic chicken gonads. Arch. Anat. Histol. Embryol. (Strasbourg). 63, 31-38.

Csaba, G., Nagy, S.U. and Shahin, M.A. (1981). Overlapping binding of FSH and TSH in embryonic chicken testicle and thyroid gland. Acta Phys. Acad. Sci. Hung. 58, 253-255.

Chappel S.C., Ulloa-Aguirre A. and Coutifaris C. (1983). Biosynthesis and secretion of follicle-stimulating hormone. endocrinology Review. 4: 179-211.

Chen Y.I., Kraemer F.B., Reaven G.M. (1980). Identification of specific HDL-binding sites in the rat testis. J. Biol. Chem. 265: 9162-9169.

Chen R.H., Ebner R., Derynck R. (1993). Inactivation of the type II receptor reveals two receptor pathways for the diverse TGF- β activities. Science 260: 1335-1338.

Christensen A.K. (1975). Leydig cells. In: Greep RO, Astwood EB, Hamilton DW, Geiger S (eds) Handbook of Physiology. American Physiological society, Washington DC, Vol 5: 57-94.

Daikoku S., Ikeuchi C. and Nakagawa H. (1974). Development of the hypothalamohypophysial unit in the chick. Gen. Comp. Endocrinol. 23: 256-275.

Dal Toso R., Sommer B., Ewert M., Herb A., Pritchett D.B., Bach A., Shivers BD. and Seeburg PH. (1989). EMBO J. 8, 4025-4034.

David K., Dingemans E., Freud J., and Laquer E. (1935). Ueber krystallinisches mannliches Hormon aus Hoden (testosteron), wirksamer als aus Harn oder aus Cholesterin bereites Androsteron. Z. Physiol. Chem. 233: 281-282.

Delidow, B.C., Lynch, J.P., White, B.A., Peluso, J.J. (1992). Regulation of proto-oncogene expression and deoxyribonucleic acid synthesis in granulosa cells of perfused immature rat ovaries. Biol. Reprod. 47, 428-435.

Dorrington, J.H. and Armstrong, T.D. (1979). Effect of FSH on gonadal functions. Rec. Progr. Hormone. Res. 35, 301-342.

Dorrington J.H., Bendell J.J. and Khan S.A. (1993). Interactions between FSH, Estradiol-17 β and Growth and Differentiation in the rat gonad. *Steroid. Biochemic. Molec. Biol.* 44 (4-6), 441-447.

Doskocil M. (1970). Development of the chick hypophysis. *Acta Univ. Carol. [Med.] (Praha)*. 40:1-131.

Erickson, G.F. (1994). Non-gonadotropin regulation of ovarian function: growth hormone and IGFs. In: Filicori M, Flamigni C, eds. *Ovulation induction: basic science and clinical advances: International Congress Series*. Amsterdam, The Netherlands: Elsevier Science Publishers. 1046,73-84.

Escalante-Alcalde D. and Merchant-Larios H. (1992). Somatic and germ interactions during histogenetic aggregation of mouse fetal testes. *Exp. Cell Res.* 198: 150-158.

Fishman J., Goto J. (1981). Mechanism of estrogen biosynthesis: participation of multiple enzyme sites in placental aromatase hydroxylations. *J. Biol. Chem.* 256: 4466-4471.

Fisher D.A., Lakshmanan J. (1990). Metabolism and effects of epidermal growth factor and related growth factors in mammals. *Endo. Rev.* 11:418-442.

Fouquet J.P., Kann M.L. (1987). Mitotic activity in monkey and rat Leydig cells. *reprod. Nutr. Dev.* 27 : 1053-1062.

Fritz I. (1978). "Biochemical actions of hormones". New York, Academic Press.

Fugo, N. W. (1940). Effects of hypophysectomy in the chick embryo. *J. Exp. Zool.*, 85: 271-297.

Gallagher T.F. and Koch F.C. (1929). The testicular hormone. *J. Biol. Chem.* 84: 495-500.

Ganfini C. (1902). Struttura e sviluppo delle cellule interstiziali del testicolo. *Arch. Ital. Anat. Embriol.* 1:233.

Gasc J.M., Sar M., Stumpf W.E.(1980). Immunocharacteristic of oestrogen and androgen target cells in the anterior pituitary gland of the chick embryo as demonstrated by a combined method of autoradiography and immunohistochemistry. *J. Endocrinol.*, 86: 245-250.

Gasc, J.M. and Sar M. (1981). Appearance of LH-immunoreactive cells in the Rathke's pouch of the chicken embryo. *Differentiation*, 20: 77-80.

Gilbert, A.B. (1971). In: *Physiology an Biochemistry of the Domestic Fowl*. (D.J. Bell and B.M. Freeman, eds. Academic Press, London. 3, 1149-1168.

Gilbert, A.B., Davidson M.F. and Wells J. W. (1985). Detection of gonadotrophic hormones on isolated thecal interstitial cells of the domestic hen, *Gallus domesticus*, by an immunohistochemical method. *Histochem. J.*, 17: 105-11.

Gomar G.Y. (1982). Desarrollo de las células de Leydig en testículos de embriones de pollo. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias, U.N.A.M.

Gondos B. (1980). Development and differentiation of the testis and male reproductive tract. In: Steinberger a, Steinberger E. (eds), *Testicular Development, Structure and Function*. Raven Press, New York, 3-26.

Gospodarowicz D. and Bialecki H. (1979). Fibroblast and epidermal growth factors are mitogenic agents for cultured granulosa cells of rodent, porcine and human origin. *Endocrinology*. 104: 757-764.

Gospodarowicz D. (1990). Fibroblast growth factor and its involvement in developmental processes. *Curr. Top. Dev. Biol.* 24: 57-93.

Grasso P., Joshep M.P. and Reichert L.E. (1991). A new role for follicle-stimulating hormone in the regulation of calcium flux in sertoli cells: inhibition of $\text{Na}^+/\text{Ca}^{++}$ exchange. *Endocrinology (Baltimore)*, 128(1), 158-164.

Grasso P. and Reichert L.J. (1989). Follicle-stimulating hormone receptor-mediated uptake of $^{45}\text{Ca}^{2+}$ by proteoliposomes and cultured rat sertoli cells: evidence for involvement of voltage-activated and voltage-independent calcium channels. *Endocrinology (Baltimore)*, 125(6), 3029-3036.

Grasso P., Joshep M.P. and Reichert L.E. (1991). Follicle Stimulating hormone receptor-mediated uptake of $^{45}\text{Ca}^{2+}$ by cultured rat Sertoli cells does not require activation of cholera toxin or pertussis. *Endocrinology (Baltimore)*, 128 (1), 158-164.

Gray J.C. (1937). The anatomy of the male genital ductsin of the birds. *J. Morph.*, 60: 393-405.

Griswold, M.D. (1988). Protein secretions of Sertoli cells. *Int Rev. Cytol.* 110, 133-156.

Habert R., Picon R. (1984). Testosterone, dihydrotestosterone and estradiol 17- β levels in maternal and fetal testes in the rat. *J. Steroid. Biochem.* 21: 193-198.

Hansson HA., Billig H., Isgaard J. (1989). Insulin-like growth factor I in the developing and mature rat testis: immunohistochemical aspects. *Biol. Reprod.* 40: 1321-1328.

Hardy M.P., Zirkin B.R., Ewing L.L. (1989). Kinetic studies on the development of the adult population of Leydig cells in testes of the pubertal rat. *Endocrinology*. 124: 762-770.

- Heckert L.L., Daley I. and Griswold M.D. (1992). Structural organization of the follicle hormone receptor gene. *Mol. Endocrinol.* 6, 70-80.
- Heckert L.L. and Griswold M.D.(1993). Expression of the FSH receptor in the testis. *Recent Progress in hormone research.* Vol. 48., 61-77.
- Hsueh, J.H., Adashi, Adashi, E.Y., Jones, P.B.C., Welsh, T.H. (1984). Hormonal regulation of the differentiation of cultured ovarian granulosa cells. *Endocr. Rev.* 5, 76-127.
- Huang, E. and Nalvandov, A.V. (1979). Steroidogenesis of chicken granulosa and theca cells: *in vitro* incubation system. *Biol. Reprod.* 20, 442-461.
- Huhtaniemi, I. (1994). Fetal testis a very special endocrine organ. *Euro. Jour. Endocrinol.* 130, 25-31.
- Johnson A.D. (1970). Testicular lipids. In: *The testis, Vol II*, edited by A.D. Johnson, W.R. Gomes and N.L. Van demark, 193-258. Academic Press, New York.
- Jutte; N.H.P.M., Grootegoed, J.A., Rommerts, F.F.G. and van der Molen, H.J. (1981). *J. Reprod. fertil.* 65, 431-438.
- Khan S., Teerds K., Dorrington J. (1992). Growth factor requirements dor DNA synthesis by Leydig cells from the immature rat. *Biol. Reprod.* 46: 335-341.
- Knobil E. and Neill J.D. (1988). The cytology of the testis. in *The physiology of reproduction.* Raven Press New York. Vol. 1. 837-932.
- Knobil E. and Neill J.D. (1988). The Sertoli cell. in *The physiology of reproduction.* Raven Press New York. Vol. 1. 933-974.
- Kobilka B.K., Frielle T., Dohlman H.G., Bolanski M.A., Dixon R.A.F., Keller P., Caron MG. and Lefkowitz R.J.(1987a). Delineation of the intronless nature of the genes for the human and hamster beta 2-adrenergic receptor and their putative promoter regions. *J. Biol. Chem.* 262, 7321-7327.
- Kobilka B.K., Matsui H., Kobilka T., Yang-Feng T., Francke U., Caron M., Lefkowitz R. and Regen J. (1987b). Cloning, sequencing and expression of the gene coding for the human platelet alpha 2-adrenergic receptor. *Science* 238, 650-656.
- Kohtaro M. Zai-Si Ji and Shin-Ichi A. (1995). Proliferation of newth spermatogonia by mammalian FSH via Sertoli cells *in vitro*. *Jour. Exp. Zool.* 272: 363-373.

- Krishnan, K.A., Proudman, J.A. and Bahr, J.M. (1992). Purification and characterization of chicken follicle-stimulating hormone. *Comp. Biochem. Physiol.* 102-B, 67-75.
- Kuopio T., Tapanainen J., Pelliniemi L.J., Huhtaniemi I. (1989). Developmental stages of fetal-type Leydig cells in prepubertal rats. *Development.* 107: 213-220.
- Lake P.E. (1957). The male reproductive tract of the fowl. *J. Morph.* 91: 116-129.
- Leydig F. (1850). Zur Anatomie der mannlichen Geschlechtsorgane und Analdrusen ser Säugetiere. *Z. Wiss. Zool.* 2:1-57.
- Loisel G. (1902). Etudes sur le spermatogenese chez le moineau domestique. *J.L.'Anat. Physiol.* 33: 112.
- Lopez-Casillas F., Wrana J.L., Massagué J. (1993). Betaglycan presents ligand to the TGF- β signaling receptor. *cell.* 73: 1435-1444.
- Lording D.W., De Krester D.M. (1972). Comparative ultrastructural and histochemical studies of the interstitial cells of the rat testis during fetal and postnatal development. *J. Reprod. Fertil.* 298: 261-269.
- Lotz A. and Jaffe R. (1924). Die Hoden bei Allgemeiknerkrankungen. *Z. Konstit.* 10: 99.
- Mancini R.E., Vilar O., Lavieri J.C., Andrada J.A., Heinrich J.J. (1963). Development of Leydig cells in the normal human testis. A cytological, Cytochemical and quantitative study. *Am. J. Anat.* 112: 203-214.
- Marshall A.J. (1961). Reproduction. In Marshall A.J. *Anatomy and comparative Physiology of birds.* Vol. 2. Chapt. 18. New York. Academic Press, Inc.
- Martínez-Vargas M.C., Gibson D.B., Sar M. and Stumpf W.E. (1975). Estrogen target sites in the brain of the chick embryo. *Science,* 190: 1307.
- Massague J. (1990). The transforming growth factor- β family. *Annu. Rev. Cell. Biol.* 6: 597-641.
- McCarrey J.R. and Abbott U.K. (1978). Chick gonad differentiation following excision of primordial germ cells. *Devl. Biol.* 66, 256-265.
- McCarrey J.R. and Abbott U.K. (1979). Mechanism of genetic sex determination, gonadal sex differentiation and germ cell development in animals. *Adv. Genet.* 20,217-290.
- McCarrey J.R. and Abbott U.K. (1982). Functional differentiation of chick gonads following depletion of primordial germ cells. *J. Embryol. Exp. Morph.* Vol. 68, 161-174.

- Means A.R. and Huckins C. (1974). In: Hormone binding and target cell activation in the testis (M.L. Dufau and A.R. Means, eds.) New York, Plenum. 145-165.
- Means A.R. (1975). "Handbook of Physiology, V, " Male reproductive system", section 7, American Physiological society. Washington, D.C. 203-218.
- Means A.R. (1977). The testis. Academic Press, New York.
- Means A.R., Dedman J.R., Tindall D.J. and Welsh M.J. (1978). In: Endocrine approach to male contraception, Scriptor, Copenhagen. 403-423.
- Mendis-Handagama S.M.L.C., Risbridger G.P., De Kretser D.M. (1987). Morphometric analysis of the components of the neonatal and the adult rat testis interstitium. *Int. J. Androl.* 10: 525-534.
- Merchant H. (1975). Rat gonadal and ovarian organogenesis with and without germ cells: An ultrastructural study. *Devl. Biol.* 44, 1-21.
- Merchant-Larios H. and Coello J. (1979). The effect of busulphan on rat primordial germ cells at the ultrastructural level. *Cell Diff.* 8, 145-155.
- Mikami S., Hashikawa T. and Farner D.S. (1973). Cytodifferentiation of the adenohypophysis of the domestic fowl. *Z. Zellforsch. Mikros. Anat.* 138: 299-314.
- Moreno M. N. y Merchant-Larios H. (1997). Desarrollo embrionario de las gónadas. en: Curso internacional, "Actualización en Fisiología". Sociedad Mexicana de ciencias Fisiológicas A.C. U.N.A.M. y Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.
- Mufly K.E., Turner T.T., Brown M. and Hall P.F. (1985). Contents of K⁺ and Na⁺ in seminiferous tubule and rete testis fluids from Sertoli cell-enriched testes. *Biol. Reprod.*, 33: 1245-1251.
- Münsterberg A. and Lovell-Badge R. (1991). Expression of the mouse antiMüllerian hormone gene suggest a role in both male and female sexual differentiation. *Development.* 113: 613-624.
- Mullaney B.P., Skinner M.K. (1993). Transforming growth factor- β (β 1, β 2 and β 3) gene expression and action during pubertal development of the seminiferous tubule: potential role at the onset of spermatogenesis. *Mol. Endocrinol.* 7: 67-76.
- Mullaney P.B., Roselli, M. and Skinner, M.K. (1994). Developmental regulation of Sertoli cell lactate production by hormones and the testicular paracrine factor, PModS. *Mol. and Cell. Endocrinol.* 104, 67-73.

- Nakamura, M., Hino, A. and Kato, J. (1981). *J. Biochem.* 90, 933-940.
- Nathans J. and Hogness D.S. (1983). *Cell* (Cambridge, Mass.) 34, 807-814.
- Norton, J.N., Skinner, M.K. (1992). Regulation of Sertoli cell differentiation by the testicular paracrine factor PModS: Potential role of immediate-early genes. *Mol. Endocrinol.* 6, 2018-2026.
- Norton N.J., Vigne Jean-Louis and Skinner M.K. (1994). Regulation of sertoli cell differentiation by the testicular paracrine factor PModS: analysis of commom signal transduction pathways. *Endocrinology*. Vol. 134, No. 1. 149-157.
- Ohno W. (1978). The role of H-Y antigen in primary sex determination. *J. Amer. Med. Assoc.* 239: 217-220.
- Orth J.M. (1984). *Endocrinology* (Baltimore), 115(4), 1248-1255.
- Paranko J. , Pelliniemi J., Vaheri A., Foidart JM. and Lakkala-Paranko T. (1983). Morphogenesis and Fibronectin in sexual differentiation of rat embryonic gonads. *differentiation* S23: S72-S81.
- Parmentier, M. (1989). Molecular cloning of the thyrotropin receptor. *Science.* 246: 1620-1622.
- Partanen J., Makela TP., Eerola E., Korhonen J., Hirvonen H., Claesson-Welsch L, Alitalo. (1991). FGFR-4, a novel acidic fibroblast growth factor receptor with a distinc expression pattern. *EMBO. J.* 10: 1347-1354.
- Pedernera E., Romano M., Besedovsky H. and Aguilar M.C. (1980). The bursa of fabricius is required for normal endocrin development in chicken. *Gen. Comp. Endocrinol.* 42: 413-419.
- Pedernera E. (1993). Cooperación celular en la biosíntesis de hormonas esteroides. En: *Comunicación Neuroendócrina. Sociedad Mexicana de Ciencias Fisiológicas A.C. Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología. México.* 33-46.
- Peluso, J.J., Delidow, B.C., Lynch, J., White, B.W. (1991). Follicle-stimulating hormone and insulin regulation of 17 β -estradiol secretion and granulosa cell proliferation within immature rat ovaries maintained in perfusion cultured. *Endocrinology.* 128, 191-196.
- Pelletier G., Dupont E., Simard J., Luu-The V., Bélanger A., Labrie F. 1992. Ontogeny and subcellular localization of 3 β -hydroxysteroid dehydrogenasa (3 β -HSD) in the human and rat adrenal, ovary and testis. *J. Steroid Biochem Mol. Biol.* 43:451-467.

- Pelliniemi L.J. and Niemi M. (1969). Fine structure of the human fetal testis. I. the interstitial tissue. *Z. Zellforsch.* 99,507-522.
- Pelliniemi L.J. and Dym M. (1980). The fetal gonad and sexual differentiation. In: *Maternal-Fetal Endocrinology*. Edited by D. Tulchinsky and K.J. Ryan. 252-280. W.B. Saunders, Philadelphia.
- Pennybacker, M., Herman, B.(1991). Follicle stimulating hormone increases C-fos mRNA levels in rat granulosa cells via a protein kinase C-dependent mechanism. *Mol. Cell. Endocrinol.* 1, 11-20.
- Pennybacker, M. Herman, B. (1992). Transforming growth factor beta (TGF- β) induced phosphorylation of the myristoylated alanine rich C kinase substrate (Marcks) protein in ovarian granulosa cells in modulated by follicle. *Res. Comm. Chem. Pathol. Pharmacol.* 78, 358-367.
- Perez-Infante, V., Bardin c.W., Gunsalus G.L., Musto N.A., Rich K.A., and Mather J.P. (1986). Differential regulation of testicular transferrin and androgen-binding protein in primary cultures of rat sertoli cells. *Endocrinology*, 118: 383-392.
- Perrard-Sapori M.H., Chatelain P.G., Jaillard C., Saez J.M. (1987). Characterization and regulation of somatomedin-C/insulin-like growth factor I (Sm-C/IGF-I) receptors on cultured pig Leydig Cells. Effects of Sm-C/IGF-I on luteotropin receptor and steroidogenesis. *Eur. J. Biochem.* 165: 209-214.
- Pierce J.G. and Parsons T.F. (1981). Glycoprotein Hormones: structure and function. *Annual review of Biochemistry* 50: 465-495.
- Pledger W.J. (1985). Regulation of cell proliferation: serum growth factor control of ordered series of G1 events. In: *Control of cell growth and proliferation*. Edited by C.M. Veneziale. Van Nostrand Reinhold Co. New York. 108-131.
- Prince F.P. (1984). Ultrastructure of immature Leydig cells in the human prepubertal testis. *Anat. Rec.* 209: 165-176.
- Radhakrishnan B., Oke B.O., Papadopoulos V., diaugustine R.I., Suarez-Quian C.A. (1992). Characterization of epidermal growth factor in mouse testis. *Endocrinology*, 131: 3091-3099.
- Richards, J.S. (1994). Hormonal control of gene expression in the ovary. *Endocrinol. Rev.* 15, 725-751.
- Ritzhaup, L.K. and Bahr, J.M. (1987). A decrease in FSH receptors of granulosa cells during follicular maturation in the domestic hen. *J. Endocr.* 115,303-310.

- Roosen-Runge E.C., Anderson D. (1959). The development of the interstitial cells in the testis of albino rat. *Acta Anat.* 37: 125-137.
- Rouiller V., Gangnerau M.N., Vayssiere J.L., Picon R. (1990). Cholesterol side-chain cleavage activity in rat fetal gonads: a limiting step for ovarian steroidogenesis. *Mol. Cell. Endocrinol.* 72: 111-120.
- Ryan R.J., Charlesworth M.C., McCormick D.J., Milius R.P. and Keutmann H.T. (1988). The glycoprotein hormones: recent studies of structure-function relationships. *Federation of American Societies for Experimental Biology Journal.* 2: 2661-2669.
- Saez J.M. (1994). Leydig cells: endocrine, paracrine and autocrine regulation. *Endocrine Reviews.* Vol. 15 No.5. 574-626.
- Saton M. (1985). The histogenesis of the gonads in rat embryos. *J. Anat.* 143: 17-37.
- Savion H., Lui G-E., Laherty R. and Gospodarowicz D. (1981). Factors controlling proliferation and progesterone production by bovine granulosa cells in serum-free medium. *Endocrinology.* 109: 409-420.
- Skinner M.K. and Griswold M.D. (1980). Sertoli cells synthesize and secrete a transferrin-like protein. *J. Biol. Chem.* 255: 9523-9525.
- Skinner M.K. and Griswold M.D. (1983). Sertoli cells synthesize and secrete a ceruloplasmin-like protein. *Biol. Reprod.* 28: 1225-1230.
- Skinner M.K., Fritz I.B. (1985). Testicular cells secrete a protein under androgen control that modulates Sertoli cell function. *Proc.Natl. Acad. Sci. USA.* 82: 114-118.
- Skinner M.K. and Fritz I.B. (1986). *Mol. Cell. endocrinol.* 44, 85-97.
- Skinner, M.K. (1987). Cell-cell interactions in the testis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 513, 158-171.
- Skinner M.K., Fetterolf P.M., Anthony C.T. (1988). Purification of the paracrine factor, PModS, produced by testicular peritubular cells that modulates Sertoli cell function. *J. Biol. Chem.* 263: 2884-2890.
- Skinner M.K., Moses H.L. (1989). Transforming growth factor- β gene expression and action in the seminiferous tubule: peritubular cell-Sertoli cell interaction. *Mol. Endocrinol.* 3: 625-634.
- Skinner, M.K. (1991). Cell-cell interactions in the testis. *Endocrine Rev.* 12 (1), 45-77.

Steinberger, E. (1971). Hormonal control of mammalian spermatogenesis. *Physiol. Rev.* 51(1), 1-22.

Solari A.J. and Fritz I.B. (1978). The Ultrastructure of immature Sertoli cells. Maturation-like changes during culture and the maintenance of mitotic potentiality. *Biol. reprod.* 18 (3), 329-345.

Solis A.L. (1996). Efecto de la hormona folículo estimulante (FSH) sobre la división celular en gonadas de ave durante el desarrollo embrionario. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias. U.N.A.M. México.

Sprengel R., Braun T., Nikolics K., Segaloff D.L. and Seeburg P.H. (1990). The testicular receptor for follicle stimulating hormone: structure and functional expression of cloned cDNA. *Mol. Endocrinol.* 4(4), 525-530.

Sporn M.B., Roberts A.B. (1992). Transforming growth factor- β : recent progress and new challenges. *J. Cell. Biol.* 119: 1017-1021.

Strauss III J.F., Schuler L.A., Roseblum M.F., Tanaka T. (1981). Cholesterol metabolism by ovarian tissue. *Adv. Lipid. Res.* 18: 99-157.

Stritesky J. and Rychter Z. (1977). Contribution to the problem of the vascularization of the hypophysis cerebri in the chick embryo. *Proc. XIXth Morphol. Cong. Folia Morphol., XXV: 324-328.*

Sturkie P.D. (1976). *Avian Physiology*. 3a. de. Springer-Verlag, New York.

Sunahara R.K., Niznik H.B., Weiner D.M., Stormann T.M., Brann M.R., Kennedy J.L., Gelernter J.e., Rozmahel r., Yang Y.L., Israel Y. (1990). Human dopamine D1 receptor encoded by an intronless gene on chromosome 5. *Nature (London)*, 347, 80-83.

Tager H.S. and Steiner D.F. (1974). Peptide hormones. *Annu. Rev. Biochem.* 43: 509-538.

Tang, W.J., Gilman, A.G. (1992). Adenylyl cyclases. *Cell* 70 (6), 869-872.

Tapanainen J., Kuopio T., Pelliniemi I.J., Huhtaniemi I.T. (1984). Rat testicular endogenous steroids and number of Leydig cells between the fetal period and sexual maturity. *Biol. Reprod.* 31:1027-1035.

Tennant, J.R. (1964). Evaluation of the trypan blue technic for the determination of cell viability. *Transplantation.* 2: 685.

Thommes R.C. and Russo R.P. (1959). Vasculogenesis in the adenohypophysis of the developing chick embryo. *Growth.* 23:205-219.

- Thompson Jr. E.A., Siiteri P.K. (1974). The involvement of human placental microsomal cytochrome P450 in aromatization. *J. Biol. Chem.* 249: 5373-5378.
- Tsai-Morris C.H.; Aquilano D.R., Dufau M.L. (1985). Cellular localisation of rat testicular aromatase activity during development. *Endocrinology.* 116: 38-46.
- Ulloa-Aguirre A., Mejía J.J., Domínguez R., Guevara-Aguirre J., Díaz-sánchez V. and Larrea F. (1986). Microheterogeneity of anterior pituitary FSH in the male rat: isoelectric focusing pattern throughout sexual maturation. *Jour. Endocrinology.* 110: 539-549.
- Ulloa-Aguirre, A., Zambrano, E., Timossi, C., Olivares, A., Quintanar, A., Aguinaga, M., Díaz-Cueto, L. and Méndez, J.P. (1995). On the nature of the follicle stimulating signal delivered to the ovary during exogenously controlled follicular maturation. A search into the immunological and biological attributes and the molecular composition of two preparations of Urofollitropin. *Arch. Med. Res.* 26, Suppl. S219-230.
- Vassart G., Parmentier M., Libert F., and Dumont J. (1991). Molecular genetics of the thyrotropin receptor. *Trends endocrinol. Metab.* 2(4), 151-156.
- Velázquez P.N., Peralta D.I. and Pedernera E. (1997). Proliferative effect *in vitro* of follicle-stimulating hormone on the left ovary of the chick embryo. *Gen. and Comp. End.* 105, 40-49.
- Verhoeven G. (1979). *J. Steroid. Biochem.* 13, 469.
- Vogel, N.W. (1956). Pituitary-gonad relationship in the chick embryo. PhD Dissertation, Indiana University.
- Vogel N.W. (1957). Free tissue cholesterol and growth in chick embryos hypophysectomized by "decapitation". *Anat. Rec.*, 127: 382.
- Warren D.W., Haltmeyer G.C., Eik-Nes K.B. (1973). Testosterone in the fetal rat testis. *Biol. Reprod.* 8: 560-565.
- Warren M.P. (1983). Effects of undernutrition on reproductive function in the human. *Endo. Rev.* 4: 363-377.
- Wartenberg H. (1983). Structural aspects of gonadal differentiation in mammals and birds. In: *Differentiation*, edited by U. Müller and W.W. Franke (Suppl.), 64-71. Springer-Verlag, Berlin.
- Well, W.J. and Gilbert, A.B. (1984). Steroid hormone production by the ovary of domestic fowl. *Physiol. Biochem.* 5, 323-342.

- Weniger, J.P. (1968). Sur la précocité de la sécrétion d'oestrogènes par les gonades embryonnaires de Poulet cultivées in vitro. C.R. Acad. Sci., Paris, Sér. D. 266, 2277-2279.
- Weniger, J.P. (1971). Biosynthèse d'oestrogènes par les ébouches gonadiques de Poulet. Gen. Comp. Endocrinol. 16, 391-397.
- Werner S., Duan D.S.R., Vries C., Peters K.G., Johnson D.E., Williams L.T. (1992). Differential splicing in the extracellular region of fibroblast growth factor receptor 1 generates receptor variants with different ligand-binding specificities. Mol. Cell. Biol. 12:82-88.
- Wilson J.D., George F.W., Griffin J.E. (1981). The hormonal control of sexual development. Science. 211: 1278-1284.
- Witschi E. (1951). Embryogenesis of the adrenal and the reproductive gland. recent. Prog. Horm. Res. 6: 1-27.
- Woods, J.E. and Weeks R.L. (1969). Ontogenesis of the pituitary-gonadal axis in the chick embryo. Gen. Comp. Endocrinol. 13:242-254.
- Woods, J.E. and Podczaski, E.S. (1974). Androgen synthesis in the gonads of the chick embryo. Gen. and Comp. Endocrinol. 13, 242-254.
- Woods J.E., Podczaski E.S., Erton L.H., Rutherford J.E. and McCarter C.F. (1977a). Establishment of the adeno-hypophyseal-testicular axis in the chick embryo. I. Testicular androgen levels. Gen. Comp. Endocrinol. 32: 390-394.
- Woods J.E. and Rutherford J.E. (1977b). Establishment of the adeno-hypophyseal-testicular axis in the chick embryo. Am. Zool. 17: 229.
- Woods, J.E. and Erton, L.H. (1978). The synthesis of estrogens in the gonads of the chick embryo. Gen. and Comp. Endocrinol. 36, 360-370.
- Woods, J.E. and Brazzil, D.M. (1981). Plasma 17 β -estradiol levels in the chick embryo. Gen. and Comp. Endocrinol. 44, 37-43.
- Woods, J.E., Rutherford J.E. and Thommes R.C. (1983). Functional development of the hypothalamic-adeno-hypophyseal-testicular (HAT) axis in the chick embryo. Gen. Comp. Endocrinol. 50: 235-241.
- Woods J.E. and Thommes R.V. (1984). Ontogeny of hypothalamo-adeno-hypophyseal-gonadal (HAG) interrelationships in the chick embryo. J. Exp. Zool., 232: 435-441.

Woods J.E., Hopkins W.E., Caliendo J., Sorrentino M.J., Martens J.B. and Thommes R.C. (1985). Ontogenesis of LHRH in the hypothalamus and LH and FSH in the pars distalis of the chick embryo. In: current Trends in Comparative Endocrinology. B. Lofts and W.K. Holmes, eds. Hong Kong University Press, Hong Kong. 131-134.

Woods J.E. (1987). Maturation of the hypothalamo-adenohypophyseal-gonadal (HAG) axes in the chick embryo. *J. Exp. Zool. Suppl.* Vol. 1. 265-271.

Woods, J.E., Damianides-Keenan, M., Thomes, R.C. (1991). FSH and TSH binding cells in the ovary of the developing chick embryo. *Gen. Com. Endocrinol.* 82, 487-494.

Wrana J.L., Attisano L., Carcamo J. Zentella A., Doody J., Laiho M., Wang XF., Massagué J. (1992). TGF- β signals through a heteromeric protein kinase receptor complex. *Cell.* 71: 1003-1014.

Wright W.W., Musto N.A., Mather J.P., Bardin C.W. (1981). Sertoli cells secrete both testis-specific and serum proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78: 7565-7569.